

- приемом психоактивных веществ, на территории Приморского края : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 2001.
11. Крылов А.А., Шацкая Е.Г. // *Клин. мед.* — 1995. — № 2. — С. 26–29.
 12. Моисеев В.С., Огурцов ИЛ. // *Тер. архив.* — 1997. — № 12. — С. 5–12.
 13. Холошина Г.И. *Клиника и лечение вторичных пневмоний.* — Владивосток, 1991.
 14. Чучалин А.Г. // *Медицинская газета.* — 1995. — №41.
 15. Nicholas R. // *Amer. J. Respir. Crit. Med.* — 2002. — Vol. 66. — P. 675–679.

Поступила в редакцию 16.06.05.

CLINICAL-MORPHOLOGICAL FEATURES OF SECONDARY PNEUMONIAS AT PATIENTS HAVING ALCOHOLIC AND DRUG ADDICTION

L.I. Kovaleva (City Hospital No. 1, Vladivostok)

Summary — 55 cases of pneumonia with the background of long alcoholic and drug addiction, at patients in the age of 23–45 years are investigated. It is established, that at this category of patients the pneumonia is characterized by severe symptoms, more often purulent complications, septic endocarditis and the toxic shock. Among the microorganisms causing the disease it is possible to allocate the mixed and opportunistic infections, and also fungi infections, correlated with a secondary immunodeficiency. One of the important reasons of severeness of the diseases and lethal outcomes should be the late hospitalization caused, in particular, by proceeding of taking of the alcohol and drugs.

Pacific Medical Journal, 2006, No. 2, p. 51–54.

УДК 576.36:616-002-02:616.248

В.А. Невзорова, С.А. Пазыч, Д.А. Бархатова,
В.А. Кудрявцева

РОЛЬ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: бронхиальная астма, апоптоз, индуцированная мокрота, воспаление.

Развитие хронического воспаления при бронхиальной астме в первую очередь зависит от продолжительности рекрутирования клеток из кровеносного русла в слизистую оболочку бронхов и их поверхностной активации. Существует мнение о ведущей роли в персистенции воспалительного процесса механизмов, отвечающих за регуляцию жизнеспособности и гибели клеток [2,6]. Известны две формы клеточной гибели — некроз и апоптоз. Первая ассоциируется с воздействием вредоносных факторов, приводящих к нарушению целостности клеточной мембраны, изоляции внутренней среды клетки от ее окружения с последующим развитием или прогрессированием воспаления [7, 10, 13]. Апоптоз определяется как генетическая программа, направленная на удаление ненужных, стареющих, поврежденных клеток и обеспечение постоянного мониторинга гомеостаза во взрослом организме [13]. В литературе широко обсуждается роль апоптотической гибели эффекторных клеток в развитии воспалительного повреждения при бронхиальной астме [6]. Согласно исследованиям Е.Н. Коновой [5], при бронхиальной астме наблюдается угнетение апоптотической активности клеток, а применение глюкокортикостероидов вызывает индукцию апоптоза. В то же время значение некротических процессов в формировании хронического воспаления при бронхиальной астме практически не изучено.

Целью настоящего исследования явился анализ показателей некротического и апоптотического индексов клеток индуцированной мокроты при бронхиальной астме в различные периоды заболевания и при использовании глюкокортикостероидной терапии.

Были обследованы 70 больных бронхиальной астмой (48 женщин и 22 мужчины), находившихся на лечении в пульмонологическом отделении Городской клинической больницы № 1 и в поликлинике № 4 г. Владивостока. Средний возраст пациентов составил $46,5 \pm 10,3$ года. В контрольную группу вошли 30 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу с основной группой обследованных.

С помощью люминесцентной микроскопии исследовали клеточный осадок мокроты, индуцированной ингаляцией 3–5% раствора NaCl. Для получения клеточного осадка использовали 0,1% раствор дитиотриетол в соотношении 1:1. Полученную суспензию отмывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса, фильтровали через нейлоновую марлю и центрифугировали в течение 10 мин. при 1000 об./мин. [1].

Для выявления апоптотически измененных клеток применяли метод окрашивания клеточного осадка красителем Hoechst 33342 (Sigma). При его использовании в момент проведения люминесценции наблюдается желто-зеленое свечение апоптотически измененных ядер.

Для выявления некроза использовали метод окрашивания клеточного осадка акридиновым оранжевым [14]. В основе данного метода лежит способность клеток пропускать краситель через поврежденную клеточную мембрану и накапливать его (рис. 1, а). Живые клетки имеют зеленый цвет, погибшие — красно-оранжевый. Количество апоптотически и некротически измененных клеток (индексы) выражали в процентах в расчете на 100 клеток образца индуцированной мокроты.

Самым ранним проявлением апоптоза, выявляемым с помощью люминесцентной микроскопии, было резко очерченное уплотнение ядерного хроматина в виде гомогенной массы. На этой стадии

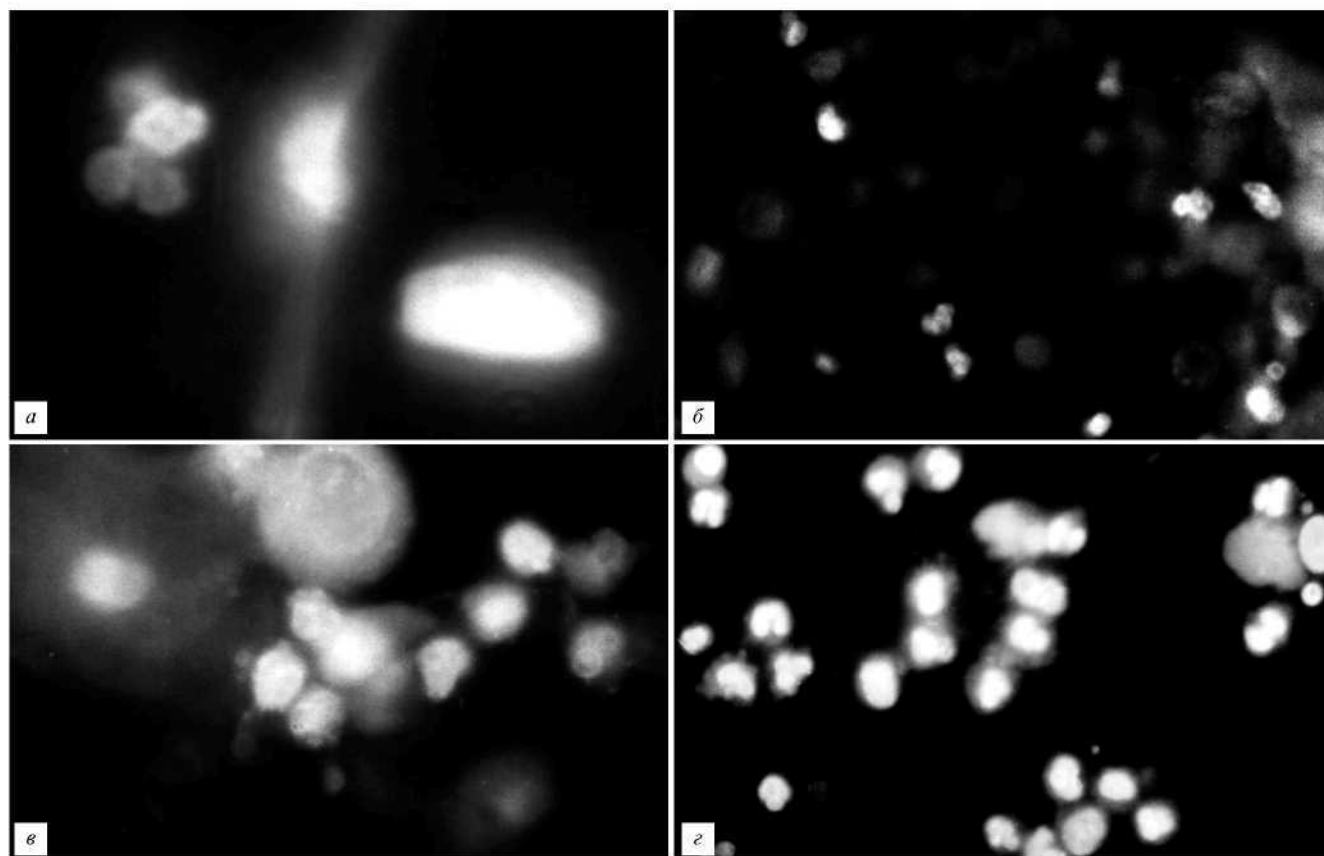


Рис. 1. Люминесцентная микроскопия индуцированной мокроты при бронхиальной астме.

а - накопление акридинового оранжевого в некротизированных клетках; *б* - апоптоз клеток при обострении заболевания; *в* - апоптоз эпителиальных клеток при лечении бронхиальной астмы глюкокортикостероидами; *г* - некроз лейкоцитов при обострении бронхиальной астмы, *а, г* — окр. акридиновым оранжевым, *б, в* — окр. Hoechst 33342; *а, в* — $\times 900$, *б, г* — $\times 400$.

развитие процесса может быть приостановлено действием ингибиторов, что позволяет определять ее как «преапоптоз» [13]. Промежуточная стадия апоптотической гибели клетки сопровождалась уменьшением и конвульсией ядра. В конечную стадию апоптоза ядро распадалось на 3–5 дискретных фрагмента [7, 13].

В индуцированной мокроте здоровых лиц присутствовали клетки, находившиеся на разных этапах апоптотической гибели: $60,5 \pm 0,7\%$ из них находились в начальной стадии апоптоза, $17,0 \pm 0,6\%$ — в промежуточной и только $22,5 \pm 1,2\%$ — в конечной. Апоптотический индекс рассчитывался на основе показателя конечной стадии.

При обострении бронхиальной астмы в препаратах индуцированной мокроты были представлены клетки с различной степенью апоптотической активности. При этом количество клеток с признаками начальной стадии апоптоза снижалось в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой и составляло $40,7 \pm 3,1\%$. Усиление выживаемости клеток индуцированной мокроты при обострении астмы связано с их высокой рекрутизацией и активацией в дыхательных путях [5]. В то же время число клеток, находившихся на промежуточном ($23,2 \pm 2,3\%$) и конечном ($36,3 \pm 2,3\%$) этапах апоп-

тотического процесса, становилось достоверно выше их уровня у здоровых (рис. 1, б).

Вероятно, активация апоптоза при бронхиальной астме на его завершающей стадии обусловлена дисбалансом проапоптотических (Fas-рецептора) и антиапоптотических факторов (генов bcl-2) с доминированием первых [9], а также индукцией синтеза цитокинов (фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1), являющихся триггерами апоптоза в клетках воспалительного инфильтрата [4, 15]. Активация апоптоза направлена на уравнивание пролиферативной активности клеток при воспалении. Кроме того, его индукция связана с использованием в лечении бронхиальной астмы глюкокортикостероидов, которые играют роль внешних сигналов для запуска процесса генетически детерминированной гибели клеток.

Действительно, согласно нашим данным, апоптотический индекс клеток индуцированной мокроты больных бронхиальной астмой, которым проводилась глюкокортикостероидная терапия, составил $47,7 \pm 2,8\%$, что достоверно выше апоптотического индекса в контроле и у больных, не получавших глюкокортикостероиды ($31,0 \pm 1,6\%$). В то же время при назначении глюкокортикостероидов содержание клеток с ранними признаками апоптоза оказалось

Таблица 1

Содержание жизнеспособных и некротизированных клеток в индуцированной мокроте больных бронхиальной астмой в зависимости от проведения терапии глюкокортикостероидами

Группа	Содержание клеток, %							
	лимфоциты		нейтрофилы		макрофаги		эпителиоциты	
	жив.	некр.	жив.	некр.	жив.	некр.	жив.	некр.
Получавшие ГКС	44,7±0,4	3,4±0,4	15,3±0,5	5,3±0,3	26,8±1,2	13,0±0,6	13,9±0,8	19,3±1,6
Не получавшие ГКС	77,1±0,3	6,2±0,66	20,1±1,8	10,1±1,0	18,5±1,3	18,2±1,2	77,2±0,3	13,7±0,9
Контроль	33,8±0,4	1,3±0,22	10,8±0,8	5,8±0,3	26,0±1,4	12,5±1,1	14,3±0,8	25,6±2,8

Таблица 2

Содержание жизнеспособных и некротизированных клеток в индуцированной мокроте у больных бронхиальной астмой

Группа	Содержание клеток, %							
	лимфоциты		нейтрофилы		макрофаги		эпителиоциты	
	жив.	некр.	жив.	некр.	жив.	некр.	жив.	некр.
БА, обострение	8,2±1,3	7,3±1,6	23,1±2,2	7,3±1,5	17,4±1,6	16,1±1,3	7,4±2,2	7,4±2,0
БА, ремиссия	5,1±1,0	5,0±1,0	14,2±1,6	8,9±1,5	26,0±2,4	22,4±3,7	5,1±1,0	11,5±3,6
Контроль	3,8±0,4	1,3±0,2	10,8±0,8	5,8±0,3	26,0±1,2	12,5±1,1	14,3±0,8	25±2,8

достоверно ниже их количества у больных без глюкокортикостероидной терапии (30,7±2,5 и 57,0±1,1% соответственно). Таким образом, при обострении заболевания глюкокортикостероиды вызвали индукцию завершающего этапа апоптоза и ингибировали его начальную стадию.

В период ремиссии бронхиальной астмы количество клеток, находившихся на ранней стадии апоптоза, оставалось достоверно ниже показателей контрольной группы, составляя 43,5±3,3%, в то время как количество клеток в конечной стадии апоптоза уменьшалось по сравнению с периодом обострения болезни (28,5±1,1%). Стойкое снижение апоптотической активности в ремиссию бронхиальной астмы может быть связано с применением базисной противовоспалительной терапии. Исследование клеток в начальной стадии апоптоза в период ремиссии у больных, получавших и не получавших глюкокортикостероиды, показало, что в 1-й группе обследуемых количество клеток с ранними проявлениями апоптоза было достоверно выше, чем у пациентов, не получавших лечение глюкокортикостероидами (53,0±2,2 и 32,3±1,7% соответственно). В то время как апоптотический индекс под действием глюкокортикостероидов снижался до 23,0±0,5%, в группе лиц, не получавших эти препараты, он становился выше, чем в контроле, — 30,5±0,9% (рис. 1, в). Данные изменения можно связать с широкими противовоспалительными свойствами глюкокортикостероидов, которые, вследствие угнетения миграции и пролиферации клеток, приводят к стабилизации профиля цитоки-

нов с проапоптотической активностью и снижению уровня физиологической гибели клеток.

Состав индуцированной мокроты контрольной группы демонстрировал достоверное различие в содержании жизнеспособных и некротизированных клеток с явным преобладанием жизнеспособных лимфоцитов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, макрофагов и нежизнеспособных эпителиоцитов.

При обострении бронхиальной астмы, с одной стороны, наблюдалось увеличение числа жизнеспособных лимфоцитов и полинуклеаров, а с другой — происходило уменьшение количества живых макрофагов и эпителиоцитов. Одновременно с повышением содержания жизнеспособных лимфоцитов более чем в 5 раз увеличивалось число некротически измененных клеток, очевидно, в связи с высокой активностью воспалительного процесса (рис. 1, г). Недавние исследования позволили распенить лимфоциты как центральные клетки в регулировании воспалительного ответа при бронхиальной астме вследствие секреции ими полифункциональных цитокинов [3,8].

Количество некротизированных полинуклеаров в индуцированной мокроте при бронхиальной астме имело только тенденцию к росту, тогда как содержание жизнеспособных клеток повышалось более чем в 2 раза по сравнению с контролем, что можно связать с повышенным рекрутированием их в дыхательные пути. Регистрируемое параллельно уменьшение количества жизнеспособных макрофагов связано с их вытеснением вследствие увеличения доли основных эффекторных клеток (табл. 2).

Эпителий является первым звеном, контактирующим с экзогенными раздражителями. Его метаплазия и десквамация — характерные признаки бронхиальной астмы [12]. По нашим данным, при обострении заболевания по сравнению с контролем почти в 2 раза уменьшалось число жизнеспособных эпителиоцитов и в 3,5 раза — число некротизированных клеток. Возможно, одной из причин снижения содержания эпителиальных клеток в индуцированной мокроте больных астмой является более выраженное участие в формировании острой фазы воспаления таких механизмов, как острый бронхоспазм, дискриния и перестройка стенки бронхиального дерева [3, 11].

В настоящее время принято считать, что если клетка погибает вследствие некроза, то фармакологическое вмешательство не может дать положительного результата. Однако, по мнению профессора В.С. Новикова [7], торможение клеточного коллапса может быть достигнуто при раннем применении фармакологических средств. В связи с этим мы изучили влияние глюкокортикостероидов на процессы некротической гибели эффекторных клеток индуцированной мокроты у больных с обострением бронхиальной астмы через 10 дней после начала терапии.

Содержание живых и погибших лимфоцитов у пациентов, получавших глюкокортикостероиды, оказалось в 1,5 и 2 раза ниже по сравнению с больными, не получавшими этих препаратов. Глюкокортикостероиды, таким образом, оказывали блокирующее действие на пролиферацию лимфоцитов и продукцию этими клетками цитокинов.

Присутствие жизнеспособных и некротизированных полинуклеаров в индуцированной мокроте у пациентов при глюкокортикостероидной терапии также было менее выражено по сравнению с больными, которые не получали этого лечения. Глюкокортикостероиды угнетают рекрутирование и активацию эозинофилов, ингибируют трансэндотелиальную миграцию базофильной популяции лейкоцитов, а также блокируют повышенный хемотаксис и активацию нейтрофилов. Однако численность живых лейкоцитов в обоих случаях оставалась выше показателей контрольной группы, в то время как их некротический индекс при глюкокортикостероидной терапии приближался к уровню у здоровых, а без нее оставался в 1,7 раза выше (табл. 1).

При исследовании содержания жизнеспособных макрофагов обнаружено, что их количество в индуцированной мокроте при использовании глюкокортикостероидов достоверно не отличалось от контроля, а у больных без соответствующей противовоспалительной терапии не достигало показателей у здоровых. Однако численность некротически измененных макрофагов в индуцированной мокроте под действием глюкокортикостероидов уменьшалась до показателей контроля, тогда как их некротический индекс в группе пациентов, которым глюкокортикостероиды не назначались, оставался на высоком уровне (табл. 1).

Полученные данные об уменьшении некротического индекса лимфоцитов, лейкоцитов и макрофагов позволяют предположить, что глюкокортикостероиды могут оказывать ингибирующее действие не только на жизнеспособные эффекторные клетки, но и на клетки, подвергшиеся некрозу. Механизмы этого явления еще не изучены и требуют дальнейших исследований.

Кроме того, было выявлено, что глюкокортикостероиды повышают в индуцированной мокроте число как жизнеспособных, так и некротизированных эпителиальных клеток. В то время как некротический индекс эпителиоцитов в группе пациентов, не получавших глюкокортикостероиды, оставался достоверно ниже контрольных значений (табл. 1). Последние исследования продемонстрировали способность глюкокортикостероидов положительно влиять на интегративные свойства эпителия бронхов, нормализовать рядное строение эпителиоцитов, увеличивать синтез ингибитора секреторной лейкоцитарной протеазы и экспрессии нейтральной эндопептидазы, способствующих деградации ряда белков, вызывающих бронхоконстрикцию [11].

В период ремиссии бронхиальной астмы по сравнению с обострением заболевания содержание жизнеспособных и некротизированных лимфоцитов оставалось выше уровня контроля с явным преобладанием живых клеток. Данный факт можно связать с персистенцией воспаления, в котором лимфоциты играют одну из главных ролей.

В отличие от некротизированных полинуклеаров, доля которых оставалась без изменения в ремиссию астмы, их жизнеспособный пул уменьшался по сравнению с обострением в 1,6 раза и приближался к значениям контрольной группы (табл. 2). Снижение численности жизнеспособных полиморфно-ядерных лейкоцитов в данный период болезни обусловлено как действием противовоспалительной терапии, так и отсутствием триггерных и причинных инфекционных и аллергических факторов.

В период ремиссии в индуцированной мокроте количество макрофагов достигало контрольных значений, в то время как число некротически измененных клеток становилось в 1,8 раза выше. По данным литературы положительная динамика течения бронхиальной астмы сопровождается увеличением количества макрофагов, секрецией ими интерлейкина-12 и у-интерферона, которые подавляют функцию Т-лимфоцитов, поддерживающих эозинофильное воспаление. Кроме того, усиление жизнеспособности макрофагов может быть связано со снижением их естественно протекающей апоптотической гибели [8]. В ремиссию по сравнению с обострением астмы содержание жизнеспособных и некротизированных эпителиоцитов в индуцированной мокроте достоверно не изменялось и оставалось ниже контрольных значений в 2,8 и 2,2 раза соответственно.

Исследования показали, что в ремиссию бронхиальной астмы наблюдалось положительное действие

глюкокортикостероидов на соотношение живых и некротизированных клеток в мокроте. Так, цитограмма индуцированной мокроты больных, не получающих базисную противовоспалительную терапию, практически не изменилась с момента их первого обследования. В то время как назначение длительного лечения (в течение 16 недель) глюкокортикостероидами вызывало снижение в мокроте количества жизнеспособных и некротически измененных лимфоцитов (недостовверное по сравнению с контролем). Аналогичные изменения претерпевает и пул полинуклеаров, количество элементов которого приближалось к значениям контрольной группы (табл. 2). Численность жизнеспособных макрофагов в индуцированной мокроте пациентов, получавших глюкокортикостероиды, практически не изменялась, тогда как некротический индекс этих клеток снижался до уровня контроля. Кроме того, применение глюкокортикостероидов способствовало увеличению количества живых и некротизированных клеток бронхиального эпителия.

ВЫВОДЫ

1. При обострении бронхиальной астмы наблюдается усиление апоптотической активности клеток индуцированной мокроты, которая заметно снижается в период ремиссии болезни.
2. Использование глюкокортикостероидов в терапии обострения бронхиальной астмы приводит к снижению числа клеток в начальной стадии и повышает количество клеток на завершающем этапе апоптоза. В то же время в ремиссию астмы кортикостероиды активизируют начальную стадию и подавляют конечный этап апоптотической гибели клеток индуцированной мокроты.
3. Содержание жизнеспособных и некротизированных лимфоцитов в индуцированной мокроте при бронхиальной астме повышается при обострении болезни, не изменяясь в ремиссию. Пул полиморфно-ядерных лейкоцитов характеризуется увеличением числа жизнеспособных клеток со снижением их количества в период ремиссии. Содержание эпителиальных клеток и макрофагов в индуцированной мокроте имеет противоположную тенденцию к содержанию лимфоцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов.
4. Глюкокортикостероидная терапия бронхиальной астмы приводит к уменьшению в индуцированной мокроте числа жизнеспособных и некротизированных лимфоцитов и полинуклеаров, в то время как пул эпителиоцитов проявляет противоположную тенденцию. Содержание жизнеспособных макрофагов при использовании глюкокортикостероидов практически не меняется, в то время как их некротический индекс снижается.
5. При исследовании типов клеточной гибели в различные периоды течения бронхиальной астмы некротический индекс клеток индуцированной мокроты преобладает над апоптотическим, за исключением

обострения астмы, когда показатели апоптотической гибели и некроза клеток практически одинаковы.

Литература

1. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. // Пульмонология. - 1998. - №3. - С. 81-87.
2. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. // Аллергология. - 2001. - №1. - С. 3-9.
3. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия : совместный доклад Национального института «Сердце, легкие, кровь» и Всемирной организации здравоохранения // Пульмонология. — 1996. — Приложение. - С. 1-165.
4. Казначеев К.С. // Гематология и трансфузиология. - 1999. - Т. 44, № 1. - С. 40-43.
5. Коновалова Е.Н. Апоптоз и межклеточные взаимодействия при бронхиальной астме и хроническом обструктивном бронхите : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 2001.
6. Невзорова В.А., Суровенко Т.Н., Коновалова Е.Н. // Тер. архив. - 2001. - № 12. - С. 92-96.
7. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. - СПб. : Наука, 1996.
8. Потапнев М.П., Печковский Д.В. // Пульмонология. - 1997. - №3. - С. 74-81.
9. Уханова О.П., Чуков С.З., Пасечников В.Д., Сизякова Л.П. // Иммунология. — 2004. — № 3. — С. 161-164.
10. Череев А.Н., Ковальчук Л.В. // Иммунология. — 1997. - № 7. - С. 31-35.
11. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма. Т. 2. — М. : Агар, 1997.
12. Шапорова Н.Л., Петрова М.А., Трофимов В.И. // Пульмонология. - 2003. - №6. - С. 108-113.
13. Ярили А.А. // Иммунология. - 1996. - №6. - С. 10-23.
14. Brauwer E., Jacobs J., Nieman F. et al. // J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol. 37, No. 2. - P. 427-429.
15. Cameron L., Hamid Q. // Curr. Allergy Asthma Rep. — 2001. - Vol. 1. - P. 153-163.

Поступила в редакцию 09.12.05.

THE ROLE OF PROCESS CELL DEATH IN COURSE OF INFLAMMATION UNDER BRONCHIAL ASTHMA

V.A. Nevzorova, S.A. Pazykh, D.A. Barkhatova,
V.A. Kudryavtseva

Vladivostok State Medical University

Summary — The aim of study was to investigate the apoptotic and necrotic index of induced sputum cells in different periods of bronchial asthma and under corticosteroids therapy. The authors have examined 70 patients suffering from bronchial asthma and 30 healthy voluntaries of the same age and sex. They used the fluorescent microscopy method of induced sputum cell sediment. During exacerbation of asthma the intensification apoptotic activity, increase of survive and necrotic lymphocytes and neutrophils amount were founded. These change returned to norm in remission and under application of corticosteroid therapy. When authors studied types of cell death in different periods of asthma it was founded that the necrotic index prevails over apoptotic index. During exacerbation of asthma these data were almost identical.

Pacific Medical Journal, 2006, No. 2, p. 54-58.