

ИССЛЕДОВАНИЕ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ГРИППОМ

Сергеева И.В.¹, Лычковская Е.В.¹, Тихонова Е.П.¹, Камзалакова Н.И.¹, Булыгин Г.В.¹

¹ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России», Красноярск, Россия (660022, г. Красноярск, улица Партизана Железняка, дом 1), e-mail: rektorkgmu@rambler.ru

Грипп человека – острое высококонтагиозное инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусами гриппа. В общей структуре инфекционных болезней на долю гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций приходится до 92%. Патогенез гриппа является результатом взаимодействия множества факторов макроорганизма с вирусными белками. Рецепторы клеток, к которым вирусы гриппа человека имеют предпочтение, экспрессируются на эпителиальных клетках на всем протяжении дыхательных путей – в слизистой оболочке носа, околоносовых пазухах, глотке, трахее, бронхах, бронхиолах и альвеолах, но их количество различно на разных участках. В период пандемии основным фактором риска развития гриппозной вирусной пневмонии является отсутствие специфической защиты легких антителами против родственных штаммов вируса. Важную роль в патогенезе гриппа играет иммунная система. Установлено, что вирусы гриппа в процессе своей эволюции приобрели механизмы, которые способны ограничивать и подавлять иммунитет хозяина. Проявление в полном объеме функциональных возможностей иммунокомпетентных клеток в процессе распознавания антигена и формирования иммунного ответа происходит лишь при соответствующем состоянии их внутриклеточного метаболизма, который обеспечивается определенным уровнем активности внутриклеточных ферментов.

Ключевые слова: грипп, лимфоцит, апоптоз.

RESEARCH APOPTOSIS AND THE NECROSIS IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH FLU

Sergeeva I.V.¹, Lychkovskaya E.V.¹, Tihonova E.P.¹, Kamzalakova N.I.¹, Bulygin G.V.¹

¹Krasnoyarsk state medical university of a name of professor V.F.Vojno-Jasenetsky, Krasnoyarsk, Russi (660020, Krasnoyarsk, Street of the Guerrilla of Iron ore, the house 1), e-mail: rektorkgmu@rambler.ru

Flu of the person – the acute highly contagious infectious disease of respiratory ways caused by viruses of flu. In the general structure of infectious diseases it is the share of a share of flu and other sharp respiratory virus infections to 92%. Patogenez of flu grows out of interaction of a set of factors of a macroorganism with virus proteins. Receptors of cages to which viruses of flu of the person have preference, экспрессируются on epithelialny cages throughout respiratory ways – in a mucous membrane of a nose, okolonosovy bosoms, a drink, a trachea, bronchial tubes, bronchioles and alveoluses, but their quantity variously on different sites. In the period of a pandemic a major factor of risk of development of influenzal virus pneumonia is lack of specific protection of lungs antibodies against related strains of a virus. An important role in патогенезе flu is played by immune system. It is established that flu viruses in the course of the evolution got mechanisms which are capable to limit and suppress immunity of the owner. Manifestation in full functionality of immunocompetent cages in the course of recognition of an anti-gene and formation of the immune answer happens only at the corresponding condition of their intracellular metabolism which is provided with a certain level of activity of intracellular enzymes.

Keywords: flu, lymphocyte, apoptoz.

Введение

Грипп человека – острое высококонтагиозное инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусами гриппа. В общей структуре инфекционных болезней на долю гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций приходится до 92% [1; 2]. Патогенез гриппа является результатом взаимодействия множества факторов макроорганизма с вирусными белками. Рецепторы клеток, к которым вирусы гриппа

человека имеют предпочтение, экспрессируются на эпителиальных клетках на всем протяжении дыхательных путей – в слизистой оболочке носа, околоносовых пазухах, глотке, трахее, бронхах, бронхиолах и альвеолах, но их количество различно на разных участках. В период пандемии основным фактором риска развития гриппозной вирусной пневмонии является отсутствие специфической защиты легких антителами против родственных штаммов вируса [4].

Важную роль в патогенезе гриппа играет иммунная система. Установлено, что вирусы гриппа в процессе своей эволюции приобрели механизмы, которые способны ограничивать и подавлять иммунитет хозяина. Проявление в полном объеме функциональных возможностей иммунокомпетентных клеток в процессе распознавания антигена и формирования иммунного ответа происходит лишь при соответствующем состоянии их внутриклеточного метаболизма, который обеспечивается определенным уровнем активности внутриклеточных ферментов [3; 5].

Цель работы. Установить уровень апоптоза в лимфоцитах больных тяжелой формой гриппа.

Материал и методы исследования. Проведено исследование апоптоза и некроза лимфоцитов у 21 больного с тяжелой формой гриппа методом детекции апоптоза с помощью системы AnnexinV-FITC на клеточных мазках (после выделения культуры клеток из цельной периферической крови). Для сравнения обследованы 8 больных с присоединением бактериальных осложнений на фоне гриппа и проведением антибактериальной терапии в течение 3-5 дней.

Диагноз гриппа был подтвержден методом ИФА, РТГА, а генетический материал вирусов определяли в крови методом ПЦР. За диагностически достоверное принимали увеличение оптической плотности на 0,5 ед. и более в ИФА в динамике заболевания и 4-кратное нарастание титров антител в РТГА (диагностикумы вирусов гриппа А/Н0N1/, А/Н1N1/, А/Н2N2/, А/Н3N2/, В).

Всем обследованным пациентам проводилась оценка параметров периферической крови, показателей иммунитета. Иммунологические исследования включали в себя определение в крови методом проточной цитофлуориметрии: Т-лимфоцитов, несущих CD3+, и регуляторных субпопуляций лимфоцитов CD4+ и CD8+ (с подсчетом соотношения CD4/CD8), а также CD19-лимфоцитов. Также иммуноферментным методом определялись в сыворотке крови концентрация сывороточных IgA, IgM и IgG и ЦИК, а кроме того, – количественные показатели фагоцитарного звена.

У всех больных в лимфоцитах, выделенных из венозной крови на градиенте плотности фиколл-верографина, биолюминесцентным методом с использованием

бактериальной люциферазы, проводилось определение активности внутриклеточных ферментов. Определялись следующие энзиматические показатели: активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ), НАД- и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназ (НАДГДГ и НАДФГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой малатдегидрогеназ (НАДМДГ и НАДФМДГ), а также глутатионредуктазы (ГР). Активность ферментов выражалась в мкЕ на 10000 лимфоцитов.

Кроме больных гриппом, были обследованы 37 практически здоровых лиц

Статистический анализ результатов исследования проводился методом Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Оценка энзиматических параметров лимфоцитов у больных с тяжелым течением гриппа и тяжелым осложненным гриппом – позволила установить следующие особенности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов обследованных.

При тяжелой степени гриппа одним из важнейших обстоятельств, влияющих на функциональное состояние этих клеток, является резкое – в 3,34 раза снижение активности Г6ФДГ, по сравнению с контрольным уровнем. Активность ГЗФДГ, ЛДГ, НАДФГДГ превышала значения группы контроля. Для НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ в лимфоцитах больных тяжелой степенью гриппа отмечено еще более выраженное, по сравнению с контролем ингибирование. Снижение активности Г6ФДГ обращает на себя внимание в связи с тем, что этот показатель отражает снабжение субстратами ПФП, который во многом играет определяющую роль в обеспечении полноценного участия лимфоцитов в иммунном ответе. Резкое уменьшение субстратного потока на ПФП отражает снижение способности этих клеток к синтезу иммуноглобулинов, цитокинов и их пролиферативных возможностей. В совокупности перечисленные факторы могут ограничивать развитие адекватного иммунного ответа и определять более тяжелое течение заболевания.

Тяжелая осложненная форма гриппа сопровождается выраженной интенсификацией ряда внутриклеточных реакций ЦТК, о чем свидетельствуют высокие показатели активности всех ферментов, функционирующих в этом цикле или в ассоциированных с ним реакциях (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, НАДГДГ и НАДФГДГ, НАДМДГ и НАДФМДГ), а также ГР. По-видимому, высокий уровень выработки АТФ в ЦТК может являться провоцирующим фактором активации апоптоза – энергозависимого процесса, посредством которого удаляются нежелательные и дефектные клетки организма (лимфоциты, пораженные вирусом гриппа).

Следует отметить и тот факт, что в лимфоцитах больных с тяжелым осложненным течением гриппа максимально высоки показатели активности ЛДГ и ГЗФДГ,

свидетельствующие о включении «аварийного» механизма – активации гликолиза, происходящего при чрезмерном функциональном напряжении клеток. Обращает на себя внимание показатель активности Г6ФДГ, который по своей величине не отличается от контрольного значения. Отсутствие метаболической реакции в виде увеличения потока субстратов на ПФП может быть одним из существенных обстоятельств, определяющих в совокупности с изложенными выше факторами условия как для развития более тяжелого варианта течения гриппа, так и для присоединения бактериальных осложнений основного заболевания.

Результаты исследования активности ферментов в лимфоцитах больных гриппом позволили сделать заключение о том, что снижение функциональных возможностей иммунокомпетентных клеток и иммунной системы в целом зависит от особенностей внутриклеточных метаболических процессов.

Иммунологические параметры больных с тяжелой формой гриппа отражают ингибирование специфического иммунного ответа. Для них характерно наличие относительной и абсолютной лимфопении и Т-иммунодефицита (как проявление сниженных способностей лимфоцитов к пролиферации), снижение количества CD4-клеток при увеличении CD8-лимфоцитов, дисиммуноглобулинемии (в результате уменьшения способности лимфоцитов к синтезу иммуноглобулинов), достоверного угнетения поглотительной способности фагоцитов. Значительная часть изменений показателей иммунного статуса этих больных также, вероятно, во многом обусловлены низким уровнем активности Г6ФДГ. В то же время ферментные показатели лимфоцитов этих больных позволяют предполагать существование в них уровня энергопродукции, способного обеспечить функциональные возможности клеток, достаточные для предупреждения развития у больных этой группы осложнений основного заболевания.

Подобные, но еще более выраженные изменения иммунной защиты по параметрам клеточного звена, отмечены у больных с тяжелой осложненной формой гриппа: выраженная относительная и абсолютная лимфопения, а также Т-иммунодефицит (несмотря на имеющийся лейкоцитоз). Кроме того, у этих пациентов отсутствовала активация гуморального звена, необходимая для адекватного иммунного ответа при острой вирусной инфекции. Вероятно, в значительной степени защита от инфекции у больных этой группы осуществлялась за счет повышенной активности фагоцитирующих клеток, функциональная активность которых была высокой. Вирусы гриппа А способны индуцировать апоптоз клеток иммунной системы. В пользу этого могут свидетельствовать высокие (а в большинстве своем – максимальные среди всех групп) уровни активности энергопродуцирующих реакций не только ЦТК, но и гликолиза, считающегося «аварийным» механизмом дополнительной

выработки АТФ, который включается при чрезмерном функциональном напряжении клеток. Известно, что высокий уровень выработки АТФ может являться провоцирующим фактором активации апоптоза – энергозависимого процесса, посредством которого удаляются нежелательные и дефектные клетки организма (например, лимфоциты, пораженные вирусом гриппа). Отсутствие же вполне объяснимой и необходимой в условиях вирусной инфекции активации гуморального звена иммунной системы можно связать с тем, что в лимфоцитах больных этой группы уровень активности Г6ФДГ (а значит и снабжение субстратами ПФП) не отличался от того, который определялся в контроле. Отсутствие реакции метаболизма в виде увеличения потока субстратов на ПФП может быть одним из существенных обстоятельств, определяющих в совокупности с изложенными выше факторами условия как для развития тяжелой формы гриппа, так и для присоединения бактериальных осложнений основного заболевания.

Вирус гриппа, как уже было указано, являясь индуктором апоптоза лимфоцитов, может быть причиной перевода физиологического апоптоза этих клеток в патологический, приводящий к дисфункции клеточного звена иммунитета.

Для подтверждения полученных метаболических нарушений было проведено исследование апоптоза и некроза лимфоцитов у 21 больного с тяжелой формой гриппа. Для сравнения обследованы 8 больных с присоединением бактериальных осложнений на фоне гриппа и проведением антибактериальной терапии в течение 3-5 дней проведения. Полученные данные представлены в таблице 1.

Статистический анализ результатов исследования методом Манна-Уитни показал высокий уровень апоптоза в лимфоцитах больных тяжелой формой гриппа ($P < 0,001$) по сравнению с некрозом. В группе пациентов с бактериальными осложнениями и антибактериальной терапией различий не выявлено ($P < 0,06$).

Таблица 1 – Уровень апоптоза и некроза в лимфоцитах обследованных больных гриппом

Больные с тяжелой формой гриппа (n=21)		Больные гриппом, осложненным бактериальной инфекцией и проводимой антибактериальной терапией (n=8)	
1	2	3	4
Уровень апоптоза	Уровень некроза	Уровень апоптоза	Уровень некроза
26,4%	58,8%	4,0%	94,0%
60,0%	40,0%	15,8%	84,0%
57,6%	32,0%	31,0%	60,0%
50,3%	29,0%	14,5%	79,0%
44,6%	52,0%	0,0%	97,0%
71,0%	25,5%	0,0%	70,0%

80,8%	18,7%	0,0%	75,0%
73,0%	23,0%	0,0%	97,0%
75,0%	17,6%		
69,8%	28,0%		
71,4%	25,4%		
Средние %			
61,81%	31,82% (p1<0,001)	8,16%	82,00% (p3<0,06)

Примечание: P₁, P₃ – достоверность различий по U-критерию Манна-Уитни с показателем соответствующего столбца

Заключение. Таким образом, результаты подтверждают полученные данные по метаболическим нарушениям в лимфоцитах больных при тяжелых формах гриппа.

Клинический вариант тяжелых форм гриппа формируется при снижении пролиферации и дифференцировки лимфоцитов за счет высокого уровня апоптоза, что имеет важную роль в патогенезе заболевания.

Список литературы

1. Андерсон Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль / пер. с англ. – М. : Научный Мир, 2004. – 784 с.
2. Белова Е.Г. Грипп – болезнь всех возрастов // Лечащий врач. – 2003. – № 10. – С. 73-75.
3. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М. : Медицинское информационное агентство, 2005. – 736 с.
4. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / под редакцией акад. РАМН проф. О.И. Киселева, д-ра мед. наук Л.М. Цыбаловой, акад. РАМН проф. В.И. Покровского. – М. : Медицинское информационное агентство, 2012. – 496 с.
5. Ильичева Т.Н. Репродукция вируса гриппа человека и иммунопатогенез вызываемого им заболевания / Т.Н. Ильичева, С.И. Бажан, А.М. Шестопалов, С.В. Нетесов // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, № 4. – С. 59-65.

Рецензенты:

Новицкий И.А., д.м.н., профессор, в.н.с. клинического отделения соматической патологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Красноярск.

Мартынова Г.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

