

АПОПТОЗ И НЕКРОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ IN VITRO У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕКРОТИЗИРУЮЩИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ

Проф. Т. М. КЛИМЕНКО, канд. мед. наук О. В. ВОРОБЬЕВА, докт. мед. наук И. Г. ГЕРАСИМОВ

APOPTOSIS AND NECROSIS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN VITRO IN PRE-TERM NEWBORNS WITH NECROTIZING ENTEROCOLITIS

T. M. KLIMENKO, O. V. VOROBYOVA, I. G. GERASIMOV

*Харьковская медицинская академия последиplomного образования,
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,
НИИ медицинских проблем семьи Донецкого национального медицинского университета*

Исследован уровень апоптоза и некроза лимфоцитов крови у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом. Установлена возможность использования этого показателя в качестве диагностического критерия заболевания.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, некротизирующий энтероколит, лимфоциты, апоптоз, некроз.

Apoptosis and necrosis level in blood lymphocytes in pre-term newborns with necrotizing enterocolitis was investigated. The possibility to use this parameter as a diagnostic criterion of the disease was established.

Key words: pre-term newborns, necrotizing enterocolitis, lymphocytes, apoptosis, necrosis.

Апоптоз — генетически запрограммированная гибель клеток, которая не приводит к интоксикации организма продуктами их распада. Апоптоз индуцируется клеточным микроокружением, воздействием различных химических, физических и физико-химических факторов [1–3]. В процессе апоптоза происходит фрагментация клеток в окруженные мембранами частицы, которые могут быть элиминированы специализированными фагоцитами [4, 5]. Гибель клеток путем апоптоза индуцируется многими неспецифическими факторами [6–8], интенсивное воздействие которых на клетки может привести к некрозу последних [2]. Индуцировать апоптоз можно различными способами, в том числе лишением клеток условий среды, существующих *in vivo*, путем перенесения их в среду *in vitro*, что и было сделано в настоящей работе.

В литературе обсуждается возможность использования апоптоза и некроза лимфоцитов в качестве критериев тяжести бактериальной инфекции и степени инфекционного токсикоза [2, 9, 10]. Однако мы не нашли в литературе данных об уровнях апоптоза и некроза лимфоцитов при некротизирующем энтероколите (НЭК) у недоношенных новорожденных, хотя исследование этих показателей было бы полезно не только для более объективной характеристики заболевания, но и для диагностики ранних стадий НЭК.

Учитывая это обстоятельство, мы поставили перед собой цель оценить возможность исследо-

вания уровней апоптоза и некроза лимфоцитов крови для диагностики НЭК у новорожденных.

Обследовали 98 недоношенных новорожденных обоого пола в возрасте 1–28 суток. Контрольную группу составили 27 условно здоровых недоношенных новорожденных. В анамнезе беременности и родов у матерей этих детей отсутствовали факторы риска внутриутробного и интранатального бактериального инфицирования плода. В группу наблюдения вошел 71 недоношенный ребенок с клинически и лабораторно подтвержденным НЭК [11, 12]: у 34 детей диагностирована II стадия, у 37 — I стадия заболевания. Детей с III стадией НЭК в исследование не включали. Распределение детей по массе тела в зависимости от гестационного возраста (ГВ) представлено в табл. 1.

Таблица 1

**Масса тела (г)
недоношенных новорожденных**

Степень недоношенности	ГВ, нед	Контроль	Стадии НЭК	
			I	II
I	36–35	2100±410	—	—
II	34–32	—	1600±180	1600±200
III	31–28	—	1300±100	1300±150
IV	< 28	—	—	—

Количество (в %) типичных, апоптических, некротических и гибнущих лимфоцитов периферической крови недоношенных новорожденных в зависимости от стадии НЭК

Показатель, %	Стадии недоношенности	Контроль	Стадии НЭК		
			Все	I	II
ЛТ	Все	92±4,5	52±3,3*	58±3,2*	50±7,1*
	II	—	54±5,9	59±4,8	—
	III	—	54±5,7	59±7,8	51±6,5
ЛА	Все	5±2,2	8±1,9	11±2,1*	5,3±3,1*,**
	II	—	7±2,5	7±3,3	—
	III	—	9±3,4	12±2,9	4±2,5**
ЛН	Все	3±1,5	39±6,3* ^к	30±2,3* ^к	45±4,1*,**
	II	—	39±5,6	39±5,0	—
	III	—	36±7,2	29±3,0	46±7,6*,**
ЛА+ЛН	Все	9±2,9	47±1,9*	41±2,1*	49±4,0*,**
	II	—	45±5,4	39±5,1	—
	III	—	44±4,1	40±2,7	50±6,7**

Примечание. Статистически значимые отличия данного значения: * — от контроля; ** — от значений при НЭК I стадии.

Кровь (1 мл) из локтевой вены утром натошак гепаринизировали (5 ЕД/мл), термостатировали на водяной бане при 37 °С в течение 5 ч, отбирали лимфоцитарную взвесь, окрашивали акридиновым оранжевым и бромидом этидия и микроскопировали под люминесценцией [1]. Среди 100 клеток подсчитывали количество типичных (ЛТ), апоптических (ЛА) и некротических лимфоцитов (ЛН) [13].

Среднее и его доверительный интервал рассчитывали с доверительной вероятностью $p = 0,95$; регрессионный анализ проводили, используя пакет статистических программ «STATISTICA 6.0».

Через 5 ч термостатирования уровни апоптоза и некроза лимфоцитов крови у здоровых недоношенных новорожденных составили 5±2,2 и 3±1,5% соответственно, что не отличается ($p > 0,05$) от показателей у условно здоровых детей в возрасте 7–8 лет (4±4,1 и 4±4,0% соответственно) [1]. Результаты исследования уровня апоптоза и некроза лимфоцитов недоношенных новорожденных приведены в табл. 2. Поскольку НЭК учитывался только у детей со II и III степенями недоношенности и при этом у детей без НЭК была I степень недоношенности, в данной таблице приведены результаты исследования апоптоза и некроза лимфоцитов периферической крови новорожденных с указанными степенями недоношенности.

Как видно из таблицы, при наличии НЭК, независимо от стадии заболевания, уровни некроза и апоптоза лимфоцитов повышаются по сравнению с контролем. С развитием НЭК индуцированный апоптоз угнетается, тогда как уровень некроза, наоборот, возрастает. По этой причине число ти-

пичных лимфоцитов практически не зависит от стадии НЭК.

Наличие НЭК приводит к следующим изменениям рассматриваемых показателей по сравнению с контролем: при НЭК, независимо от стадии, число типичных лимфоцитов меньше ($p < 0,05$), ЛТ и (ЛА + АН) — больше ($p < 0,05$), а в случае ЛА наблюдается тенденция ($p > 0,1$) к увеличению их доли. Последняя тенденция обусловлена тем, что количество апоптических лимфоцитов периферической крови разнонаправлено изменяется в зависимости от стадии НЭК. Как видно из табл. 2, при НЭК I стадии доля ЛА выше ($p < 0,05$), а при НЭК II стадии — ниже ($p < 0,05$), чем в контроле. При этом в случае НЭК I стадии и недоношенности III степени выявлена только тенденция ($p < 0,1$), что, очевидно, обусловлено относительно высокой погрешностью определения показателя (примерно 20%).

Примечательно, что обсуждаемые показатели, за исключением ЛТ, значимо ($p < 0,05$) изменяются в зависимости от стадии НЭК. Так, при НЭК I стадии доля ЛА выше ($p < 0,05$), а ЛН и (ЛА + АН) ниже ($p < 0,05$), чем при НЭК II стадии (см. табл. 2). Следовательно, развитие заболевания приводит к угнетению индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови и к увеличению гибели клеток за счет их некроза.

Таким образом, НЭК I стадии может быть дифференциально диагностирован, когда доля апоптических лейкоцитов составляет примерно 12%, некротических лейкоцитов — около 30% и общее количество гибнущих клеток близко к 40%. При НЭК II стадии эти показатели составляют соответственно примерно 5, 45 и 50%.

Литература

1. Апоптоз лимфоцитов крови при болезни Легг-Кальве-Пертеса / И. Г. Герасимов, Д. Ю. Игнатов, Т. Я. Усикова, Ф. В. Климовицкий // Ортопед. травматол. и протезир.— 2002.— № 2.— С. 90–94.
2. *Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П.* Основы общей патофизиологии.— СПб.: ЭЛБИ-СПб, 1999.— 618 с.
3. *Huynh M. L., Fadok V. A., Henson P. M.* Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation // *Clin. Invest.*— 2002.— Vol. 109, № 1.— P. 41–50.
4. A high frequency of apoptosis was found in cultures of lymphocytes isolated from the venous blood of children born with a low birth weight / E. Barg, K. Gasiorowski, B. Brokos et al. // *Cell. Mol. Biol. Lett.*— 2004.— Vol. 9, № 1.— P. 135–143.
5. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation / T. Magnus, A. Chan, O. Grauer et al. // *J. Immunol.*— 2001.— Vol. 167, № 9.— P. 5004–5010.
6. *Levy O., Martin S., Eichenwald E.* Impaired innate immunity in the newborns: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein // *Pediatrics.*— 1999.— Vol. 104, № 6.— P. 1327–1333.
7. Psychological stress increases human T cell apoptosis in vitro / S. Sakami, A. Nakata, T. Yamamura, N. Kawamura // *Neuroimmunomodulat.*— 2002–2003.— Vol. 10, № 4.— P. 224–231.
8. Relationship between lymphocyte apoptosis and endotoxin translocation after thermal injury in rats / P. Y. Xia, J. Zheng, H. Zhou et al. // *World J. Gastroenterol.*— 2002.— Vol. 8, № 3.— P. 546–550.
9. Endotoxemia-induced lymphocyte apoptosis is augmented by a hyperinsulinemic-euglycemic clamp / J. S. Nielsen, A. Larsson, V. Brix-Christensen et al. // *Anesthesiology.*— 2005.— Vol. 102, № 4.— P. 768–773.
10. *Sharma R., Hudak M. L., Mollitt D. L.* Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis // *J. Pediatr. Surg.*— 2007.— Vol. 43.— P. 454–461.
11. *Шабалов Н. П.* Неонатология: Уч. пособие. В 2-х томах.— М.: МЕДпресс, 2006.— Т. 2.— 505 с.
12. Посібник з неонатології: Пер. з англ. / За ред. Джона Клоерті, Енн Старк.— Київ: Фонд допомоги дітям Чорнобиля, 2002.— 772 с.
13. *Анкина М. А., Михайлов Г. Ф.* Модификация способа посева лимфоцитов в культуру и приготовления препаратов при микроядерном методе, основанном на цитокинетическом блоке // *Клин.-лаб. диагн.*— 1992.— № 3–4.— С. 17–20.

Поступила 12.03.2008