

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ ПЕРИОДА НОВОРОЖДЕННОСТИ С КЛЕБСИЕЛЛЕЗНЫМ СЕПСИСОМ

Х.С. Хаертынов¹, С.В. Бойчук¹, В.А. Анохин¹, Б.Р. Рамазанов¹, А.А. Ризванов², С.Ф. Хайбуллина², С.А. Любин³, И.В. Агапова³

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Городская детская больница № 1, Казань, Россия

Lymphocyte apoptosis in neonatal sepsis due to klebsiella

Kh.S. Khaertynov¹, S.V. Boichuk¹, V.A. Anokhin¹, B.R. Ramazanov¹, A.A. Rizvanov², S.F. Khaiboullina², S.A. Lubin³, I.V. Agapova³

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

³City children's Hospital № 1, Kazan, Russia

Проведено исследование апоптоза лимфоцитов у 10 детей с поздним неонатальным сепсисом, обусловленным *Klebsiella pneumoniae*. Большинство детей (70%) родились недоношенными. Контрольную группу составили 7 здоровых детей периода новорожденности. Оценка апоптоза лимфоцитов осуществлялась на основании количественной оценки гиподиплоидных клеток по изменению интенсивности их окраски пропидия йодидом (с помощью проточной цитометрии). Установлено, что неонатальный сепсис во всех случаях протекал на фоне активации процессов апоптоза лимфоцитов. Медиана активности изучаемого процесса к 5 дню культивирования составляла 18,1%, в то время, как в контроле она равнялась 7,8%. Развитие абсолютной лимфопении отмечалось в 30% случаев. Усиление гибели лимфоцитов по механизму апоптоза не коррелировало с исходным количественным показателем С-реактивного белка пациентов (Spearman R = 0,48, p = 0,18). Таким образом, острый период клебсиеллезного сепсиса у детей периода новорожденности протекает на фоне повышенной активности процессов апоптоза лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: неонатальный сепсис, клебсиелла, апоптоз лимфоцитов.

Введение

Неонатальный сепсис (НС) продолжает оставаться наиболее актуальной инфекционной патологией у детей периода новорожденности, что обуславливается значительной его распространенностью и летальностью в этой возрастной группе [1]. Исход любого инфекционного процесса, как известно, определяется соотношением сил между патогеном и иммунной системой организма. Иммунологическая недостаточность может стать решающим фактором, определяющим исход заболевания. Особенно актуальным данное положение является для детей неонатального периода, иммунная система которых характеризуется незрелостью факторов врожденного иммунитета и практически полным отсутствием адаптивных иммунных реакций, что и объясняет высокую заболеваемость сепсисом в данной возрастной группе [2]. Поэтому, при изучении патофизиологии НС актуальным представляется исследование причин, оказывающих депрессивное влияние на иммунную систему. Одной из них является апоптоз клеток иммунной системы. Апоптоз, или генетически программируемая гибель клеток, определяет патогенез различных заболеваний (онкологических, аутоиммунных), в том числе и инфекционных (ВИЧ-инфекция, сепсис) [3]. Роль апоптоза при инфекционном процессе состоит в элиминации

The apoptosis of lymphocytes was examined in 10 infants with late neonatal sepsis induced by *Klebsiella pneumoniae*. Most of the infants (70%) were preterm. Control group consisted of 7 healthy newborns. Apoptosis analysis was examined by counting the numbers of hypodiploid cells by using a propidium iodide (DNA staining procedure and flow cytometry analysis). We observed an elevated numbers of apoptotic cells in all cases of neonatal sepsis. Median of lymphocyte apoptosis was 18.1% on day 5 of cell culture, whereas in control patients it was up to 7,8%. Absolute lymphopenia was observed in 30% of cases with neonatal sepsis. The activity of lymphocyte apoptosis was not associated with quantitative baseline of C-reactive protein (Spearman R = 0,48, p = 0,18). Acute phase of neonatal sepsis induced by *Klebsiella pneumoniae* is associated with an increased apoptosis of peripheral blood lymphocytes.

Keywords: neonatal sepsis, klebsiella, lymphocyte apoptosis.

макрофагами «отработавших» активированных клеток иммунной системы, подвергшихся инфекционному воздействию. Индукция этого процесса может проходить двумя путями: либо через экспрессию т.н. «рецепторов смерти» (TNF-, Fas-рецепторов и др.) плазматической мембраны (внешний путь), либо через снижение мембранного потенциала митохондрий (внутренний путь) [3, 4]. Лабораторными маркерами апоптоза иммунокомпетентных клеток являются: выраженная экспрессия белков CD95 (Fas-рецептор) и CD120 (рецептор к фактору некроза опухоли) на плазматических мембранах, снижение мембранного потенциала митохондрий и высвобождение цитохрома С, транслокация фосфатидилсерина с внутренней на наружную поверхность мембраны клеток, повышение активности каспаз [3, 4]. Отличительными морфологическими признаками апоптоза являются: дегидратационное сжатие клеток, утрата межклеточных контактов, блеббинг, разрушение цитоскелета, конденсация хроматина, фрагментация ядра и деградация ДНК [5].

Активация апоптоза клеток иммунной системы при сепсисе сопровождается снижением в крови количества клеток врожденного и адаптивного иммунитета — CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов, В-лимфоцитов и дендритных клеток [6–8]. Результаты морфологического исследования тканей людей, умерших

e-mail: khalit65@rambler.ru

от сепсиса, также подтверждают наличие выраженного апоптоза иммунных клеток [7, 9, 10]. При этом, выраженность апоптоза лимфоцитов прямо коррелирует с тяжестью септического процесса и степенью иммуносупрессии [11]. Следствием избыточной активации апоптоза иммунных клеток при сепсисе является снижение эффективности иммунного ответа и ухудшении клиренса внутренних сред организма [12]. Иммуносупрессия и развивающийся при этом «иммунный паралич» являются одними из основных причин, определяющих неблагоприятный исход при сепсисе [10]. Поэтому изучение активности апоптоза при сепсисе имеет значение как для установления развивающейся иммуносупрессии, так и для оценки прогноза заболевания. Ранее нами на основании определения величины трансмембранного митохондриального потенциала [13] и методом количественной оценки гиподиплоидных клеток [14] уже была показана высокая активность процессов апоптоза лимфоцитов у детей с поздним началом НС. Однако, причина заболевания в этих исследованиях была неоднородной и была установлена менее, чем в 50% случаев [13, 14]. В настоящем исследовании было проведено изучение процессов апоптоза у детей с НС, этиология которой во всех случаях была обусловлена только одним возбудителем — *Klebsiella pneumoniae*.

Цель исследования: оценка активности апоптоза лимфоцитов крови у детей с клебсиеллезным неонатальным сепсисом на основе учета необратимых изменений в клетках.

Материал и методы

Проведено исследование методом «случай-контроль». Обследовано 10 детей (основная группа) с поздним началом неонатального сепсиса (НС). Доношенными родились 3 (30%), недоношенными — 7 детей (70%), из них на сроках 28–30 нед. гестации — двое, 35–36 нед. гестации — 5. Диагноз «сепсис» был установлен на основании развития синдрома

системного воспалительного ответа (повышение концентрации в крови С-реактивного белка более 1,5 мг/дл), наличия одного или нескольких очагов инфекции и выделения микроорганизма из венозной крови. Во всех 10 случаях НС из крови была высеяна *Klebsiella pneumoniae*. В половине случаев (5 детей) заболевание развилось на 4–6 дни, у другой половины (5 детей) — на 7–10 дни после рождения. Клиническая характеристика больных представлена в таблице 1. Основными очагами инфекции были пневмония и энтероколит — по 4 случая. В двух случаях заболевание протекало в виде септицемии. Однако, основным клиническим проявлением НС было развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), которое имело место у 8 детей (80%) и проявлялось геморрагической петехиальной сыпью, кровоточивостью из мест инъекций и тромбоцитопенией. Сопутствующая патология была выявлена у 5 детей в виде гипоксического поражения головного мозга, диагностированной по результатам проведенной нейросонографии. В одном случае наступил летальный исход (ребенок с септицемией), вследствие развития декомпенсированного синдрома ДВС на 2 день заболевания. Кровь от больных для исследования активности апоптоза лимфоцитов забиралась однократно, в период развернутых клинико-лабораторных проявлений сепсиса (первые 2 дня от начала заболевания). Контрольную группу составили 7 здоровых детей периода новорожденности, забор крови которым осуществлялся перед проведением БЦЖ-вакцинации.

В качестве маркера фрагментация ядер клеток и деградации ДНК [6] использовали количественную оценку гиподиплоидных клеток по изменению интенсивности их окраски пропидия йодидом (Sigma Aldrich, США) с помощью метода проточной цитометрии (FACsCanto II, Becton Dickinson, США) [15]. Активность апоптоза лимфоцитов определялась на 5 день их культивирования. Полученные результаты обработаны с применением пакета программ Statistica for Windows 6,1 (Statsoft Inc., США) и программного обеспечения MS Excel (Microsoft, США).

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика детей с неонатальным сепсисом

№	Пол	Сроки гестации (в неделях) при рождении	Сроки развития сепсиса (день жизни)	Клинический синдром	Уровень СРБ (мг/дл)	Количество лейкоцитов в крови ($\times 10^9/\text{л}$)	Количество лимфоцитов в крови ($\times 10^9/\text{л}$)
1	мужской	39	6	ДВС	1,5	10,6	4,24
2	мужской	36	9	ДВС	1,5	12,0	2,76
3	женский	30	4	ДВС, пневмония	1,5	5,9	1,8
4	женский	38	8	ДВС, пневмония	2,0	31,2	5,3
5	мужской	35	8	ДВС, энтероколит	2,5	31,0	8,2
6	мужской	36	4	ДВС, пневмония	3,7	22,7	4,5
7	женский	36	6	ДВС, энтероколит	1,5	11,6	3,7
8	женский	36	6	ДВС, энтероколит	11,6	15,4	5,5
9	женский	38	6	пневмония	14,1	18,0	3,4
10	женский	27	6	энтероколит	11,3	15,4	1,6

Результаты и обсуждение

Установлено, что острый период клебсиеллезного сепсиса во всех случаях протекает на фоне повышенной активности апоптоза лимфоцитов, что свидетельствует о подавлении жизнеспособности этих иммунокомпетентных клеток. По литературным данным количество подвергшихся апоптозу лимфоцитов при сепсисе превышает 10% от всех циркулирующих в крови лимфоцитов, в то время, как среди здоровых людей эта цифра составляет около 5% [16]. В нашем исследовании медиана активности изучаемого процесса к 5 дню культивирования достигала 18,1%, в то время, как в контроле она равнялась 7,8% (табл. 2).

Среди факторов, способных повлиять на активность апоптоза лимфоцитов, следует выделить гестационный возраст ребенка. Однако, из-за небольшой выборки пациентов сравнительный анализ выраженности апоптоза лимфоцитов между доношенными и недоношенными детьми проведен не был. В то же время, в ранее выполненном аналогичном исследовании активности апоптоза лимфоцитов у детей с поздним началом НС достоверной разницы между показателями этих групп детей выявлено не было [14].

Как уже было отмечено выше, результатом активации процесса апоптоза лимфоцитов является угроза истощения пула этих клеток, что может проявляться снижением в крови как лимфоцитов, так и общего количества лейкоцитов. В нашем исследовании развитии лимфопении (менее $3 \times 10^9/\text{л}$) отмечалось в 30% случаев (3 детей), лейкопении (менее $8 \times 10^9/\text{л}$) – в 10% случаев (один ребенок). При этом, наиболее высокие показатели активности апоптоза лимфоцитов были зарегистрированы именно у детей с лимфопенией. Однако, достоверно значимого различия между активностью апоптоза лимфоцитов и их количеством в крови выявлено не было (Spearman $R = 0,55$, $p = 0,12$).

Учитывая тот факт, что сепсис-индуцированный апоптоз лимфоцитов инициируется развитием воспалительной реакции организма, нами был проведен сравнительный анализ выраженности активности апоптоза лимфоцитов с содержанием в крови С-реактивного белка (СРБ), маркера воспаления с высокой специфичностью и чувствительностью. Было установлено, что выраженность воспалительной реакции не влияло на активность апоптоза лимфоцитов (Spearman $R = 0,48$, $p = 0,18$).

Активация процессов апоптоза при сепсисе в настоящее время рассматривается в качестве основной причины гибели иммунокомпетентных клеток и

формирования иммуносупрессии [9]. Традиционно считается, что формирование иммуносупрессии при сепсисе происходит во второй фазе заболевания, сопровождающегося развитием синдрома противовоспалительного ответа (СПВО) с преимущественным синтезом противовоспалительных цитокинов [17]. Начальная же стадия сепсиса, характеризующаяся формированием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и синтезом провоспалительных цитокинов, ассоциируется с развитием таких клинических проявлений, как грубые микроциркуляторные расстройства, шоковая реакция, полиорганная недостаточность и т. п. [17]. Как известно, одной из причин формирования органной дисфункции является массивный некроз клеток того или иного органа, способный привести к летальному исходу. Однако, морфологические исследования пациентов, погибших от сепсиса в первые сутки болезни, не всегда обнаруживают массивные некротические изменения в тканях. Очевидно, что в формировании тяжелой дисфункции органов может участвовать другой механизм гибели клеток, в частности апоптоз [9]. Активация апоптоза при сепсисе может происходить как в клетках иммунной системы, так и в эпителиальных клетках пищеварительного тракта, легких, печени [4]. Усиление апоптоза эпителиальных клеток различных органов может стать причиной развития органной дисфункции. И хотя, активация апоптотических процессов и иммуносупрессия ассоциируется, прежде всего, со второй стадией сепсиса, имеются сообщения о появлении признаков ускоренного апоптоза уже в течение первых суток септического процесса [12]. И в наших работах повышение активности апоптоза лимфоцитов выявлено именно в начальной стадии сепсиса (в первые два дня от начала заболевания) [13, 14]. Кроме того, выделение двух фаз иммунного ответа при сепсисе в известном хронологическом порядке является достаточно условным, поскольку как ССВО, так и СПВО могут регистрироваться на любой стадии сепсиса – и на ранних, и на более поздних сроках заболевания. Поэтому, развитие апоптоза клеток при сепсисе на обеих стадиях заболевания представляется закономерным.

В нашем исследовании у 4 из 10 детей (40%) отмечалось поражение кишечника, протекавшего в форме энтероколита. Гибель эпителиальных клеток кишечника может стать причиной нарушения целостности кишечной стенки, повышения ее проницаемости и транслокации грамотрицательной кишечной микрофлоры в кровотоки. В ранее проведенных исследованиях было показано развитие при сепсисе апоптоза как иммунных клеток, так и эпителия пищеварительного тракта [16].

Таблица 2. Количество и активность апоптоза лимфоцитов крови у детей с НС (Ме; МКР)

Показатель	Группы детей		P_{1-2}
	1. Дети с НС (n = 10)	2. Контрольная группа (n = 7)	
Возраст (дней)	6 (5–8)	4 (4–8)	1,0
Количество лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	3,7 (2,7–5,9)	5,8 (5,2–6,8)	1,0
Апоптоз лимфоцитов (в %)	18,1 (11,3–26,4)	7,8 (7,3–8,4)	0,0006

p – уровень значимости.

Как уже было отмечено выше, индукция апоптоза клеток при сепсисе может происходить как в результате активации Fas-, или TNF-рецепторов, так и вследствие повреждения митохондрий. Важную роль, определяющую механизм индукции апоптоза играют микроорганизмы. Так, в результате взаимодействия липополисахарида грамотрицательных бактерий с Fas-рецепторами индуцируется «внешний путь» активации апоптоза клеток [4]. Другая группа патогенов (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*), вырабатывающая поры-формирующие токсины, инициируют внутренний путь активации апоптоза [4]. В нашем исследовании у всех пациентов был выделен один единственный микроорганизм — *Klebsiella pneumoniae*, что указывает на индукцию апоптотических процессов путем активации «рецепторов смерти».

Активация процессов апоптоза может быть обусловлена и неинфекционными причинами, в частности состояниями, сопровождающимися гипоксией или гиперкапнией, а также гипо- или гиперкапнией [18]. Очевидно, что в этих случаях индукция апоптотических процессов будет осуществляться так-

же в результате повреждения митохондрий. Группу риска представляют новорожденные, родившиеся в состоянии гипоксии и асфиксии, прежде всего недоношенные дети. Повышенная активность апоптоза клеток ассоциируется с такими процессами, как бронхолегочная дисплазия, различные формы гипоксического поражения головного мозга (внутрижелудочковые кровоизлияния, перивентрикулярная лейкомаляция), почечная недостаточность [18].

Выводы

Острый период НС клебсиеллезной этиологии протекает на фоне активации процессов апоптоза лимфоцитов периферической крови. Наиболее высокие значения активности апоптоза лимфоцитов зарегистрированы у детей с лимфопенией, что имело место в 30% случаев. Основное клиническое значение усиления процессов апоптоза лимфоцитов при сепсисе заключается в снижении эффективности иммунного ответа. Активация апоптоза лимфоцитов и обусловленная этим процессом иммуносупрессия является основанием для проведения больным с НС иммуностимулирующей терапии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Camacho-Gonzales A., Spearman P.W., Stoll B.J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr. Clin. North Am.* 2013; 60: 367-89.
2. Самсыгина Г.А. О предрасполагающих факторах и факторах развития неонатального сепсиса и о современных подходах его лечения. *Педиатрия* 2012; 91 (3): 32-37.
3. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35 (4): 495-516.
4. Da Silva F.P., Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 2009; 14: 509-21.
5. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301: 5-17.
6. Boomer J.S., To K., MD, Chang K.C. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* 2011; 306(23): 2594-605.
7. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E. et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 2001; 166: 6952-63.
8. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E. et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol.* 2002; 168: 2493-500.
9. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 1999; 27: 1230-51.
10. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Immunosuppression in sepsis: novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 260-8.
11. Bochud P.Y., Calandra Th. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implication for future treatment. *BMJ* 2003; 326(738): 262-5.
12. Kasten K.R., Tschöp J., Adediran S.G. et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock* 2010; 34(4): 327-36.
13. Хаертынов Х.С., Бойчук С.В., Анохин В.А. и др. Апоптоз лимфоцитов у детей с неонатальным сепсисом. *Каз. Мед. Журн.* 2013; 94(5): 775-8.
14. Хаертынов Х.С., Бойчук С.В., Анохин В.А. и др. Показатели активности апоптоза лимфоцитов крови у детей с неонатальным сепсисом. *Гены и клетки* 2014; 9 (3): 267-71.
15. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2006; 1(3): 1458-61.
16. Hotchkiss R.S., Coopersmith C.M., Karl I.E. Prevention of Lymphocyte Apoptosis-A Potential Treatment of Sepsis? *Clin. Inf. Dis.* 2005; 41: 465-9.
17. Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl. J. med.* 2003; 348(2): 138-50.
18. Hargitai B., Szabó V., Hajdú J. et al. Apoptosis in Various Organs of Preterm Infants: Histopathologic Study of Lung, Kidney, Liver and Brain of Ventilated Infants. *Pediatr. Res.* 2001; 50(1): 110-4.

Поступила: 14.11.2015