



Л.Д. Тодоріко, І.В. Єременчук, І.С. Давиденко
ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», Чернівці

Дослідження проліферативної активності та інтенсивності апоптозу епітеліоцитів бронхів при мультирезистентному туберкульозі легень

Мета роботи — дослідити проліферативну активність та визначити інтенсивність апоптозу епітеліоцитів бронхів у хворих з уперше діагностованим мультирезистентним туберкульозом (ВДТБ) легень.

Матеріали та методи. Обстежено 15 пацієнтів з ВДТБ та 15 — з мультирезистентним туберкульозом (МРТБ) легень віком від 20 до 45 років. Серед обстежених переважали чоловіки. У всіх пацієнтів діагностовано деструктивні форми туберкульозу (ТБ): у 66,4 % — дисемінований та у 33,6 % — інфільтративний. Для прижиттєвого електронно-мікроскопічного морфологічного дослідження епітеліоцитів бронхів проводили браш-біопсію (за стандартною методикою). Виконували імуноцитохімічне визначення антигенів Вах, Bcl-2, PCNA- та TUNEL-позитивних ядер.

Результати та обговорення. У хворих із мультирезистентністю інтенсивність апоптотичних реакцій вища за таку у разі чутливого ТБ, супроводжується нижчою проліферативною активністю епітеліоцитів бронхоальвеолярної вистілки. Інтенсивність апоптозу клітин браш-біоптату хворих на МРТБ відбувається за рахунок зниження відсотка PCNA-позитивних ядер та підвищення TUNEL-позитивних на тлі підвищеної концентрації в них проапоптотичного протеїну Вах. Активізований процес апоптозу з переходом у неконтрольовану природну клітинну загибель характеризує поширеність та прогресування специфічного туберкульозного процесу, клінічну маніфестацію і прогноз щодо формування залишкових змін.

Висновки. У хворих із МРТБ легень спостерігається істотне порушення між процесами апоптозу та проліферації. Методику підрахунку кількості структур (індекси апоптозу та проліферації) можна застосовувати для визначення ранніх виявів апоптотичної активності, прогнозу клінічної маніфестації та формування залишкових змін.

Ключові слова

Мультирезистентний туберкульоз, проліферація, апоптоз, епітеліоцити.

Вивчення особливостей патогенезу туберкульозного процесу потребує уважного перегляду певних паралелізмів і феноменів запального процесу, щодо яких у фаховій літературі є доказові дані [1, 4]. У хворих на активну форму туберкульозу (ТБ) бувають вияви системної запальної реакції, частина з яких має захисний характер, а частина відображає різні аспекти метаболічної декомпенсації. За даними літератури [3, 6], особливістю ТБ є розвиток його маніфестних форм на тлі різного генезу неспроможності імунного захисту. Феномен природної клі-

тинної загибелі (ПКЗ) є одним із компонентів імунореактивності, дисбаланс регуляції його процесів — вияв системної запальної реакції, порушення рівноваги якої позначається на патоморфозі імунозалежних хвороб, а класичним прикладом цього є ТБ.

Апоптозу (АП) та порушенням його регуляції належить одне з провідних ролей у виникненні специфічного туберкульозного запалення, розвитку та прогресуванні імунної недостатності, підтриманні латентної персистенції мікобактерій туберкульозу (МБТ). За допомогою АП здійснюється елімінація автореактивних Т-клітин, цитоліз клітин-мішеней, задіяних у розвит-

ку специфічного запального процесу [1, 6]. Зміна активності системи імунітету та активізація процесів АП в умовах специфічного туберкульозного запалення є достатньо рашніми. Вони відіграють важливу патогенетичну роль у перебігу, прогресуванні й наслідках захворювання [3].

Особлива роль у створенні внутрішньоклітинного сигналу, індукованого туберкульозним процесом, належить регуляторним каскадам, які опосередковуються про- та антиапоптичними білками Вах і Vcl-2 [9]. Неузгодженість активності сигналів призводить до конформаційних змін у гепомі та загибелі клітин.

Важливе значення в розвитку специфічного туберкульозного запалення відіграє пошкодження бронхіального епітелію, оскільки він ефективно виконує не лише бар'єрну функцію, а є й своєрідним індикатором стану захисних механізмів [5]. АП клітин, спрямований на підтримку антигеноструктурного гомеостазу організму, з одного боку, вважають одним із найважливіших інструментів його протиінфекційного захисту, а з іншого, він може виступати основною ланкою патологічного процесу і, певною мірою, визначати його характер та подальший перебіг [5].

Відомо, що саме баланс між загибеллю (зокрема й шляхом АП) та проліферацією клітин визначає клітинно-тканинний гомеостаз організму [8]. Співвідношення цих двох форм відповіді — проліферації і АП — є важливим параметром реактивності імунної системи.

Мета роботи — дослідити проліферативну активність та визначити інтенсивність апоптозу епітеліоцитів бронхів у хворих з уперше діагностованим мультирезистентним туберкульозом легень.

Матеріали та методи

Дизайн дослідження відповідав відкритому порівняльному рандомізованому спостереженню (випадок-контроль). До 1-ї групи ввійшли 15 хворих із чутливим вперше діагностованим туберкульозом легень (ВДТБ), 2-гу групу склали 15 хворих на мультирезистентний туберкульоз легень (МРТБ) віком від 20 до 45 років. 73,3 % пацієнтів були чоловіки. У всіх пацієнтів діагностовано деструктивні форми туберкульозу (ТБ), зокрема дисемінований — у 53,3 % та інфільтративний — у 46,7 %. Мікроскопічно бактеріовиділення діагностовано у 100 % пацієнтів. Усі вони підписали інформовану згоду.

Для прижиттєвого селекційно-мікроскопічного морфологічного дослідження епітеліоцитів бронхів проводили браш-біопсію (за стандартною методикою) [2, 7, 8]. Спеціальною щіткою-

скарифікатором проводили зішкрібок слизової оболонки бронхів (щітку-скарифікатор підводили до просвіту дрібних бронхів і робили кілька зішкрібків, після цього її наближали до дистального отвору бронхіального каналу і витягували разом із бронхоскопом). Робили кілька мазків-відбитків на предметних скельцях, поперечно оброблених 70 % медичним спиртом.

Проводили імуноцитохімічне та імуногістохімічне визначення антигенів Vcl-2, Вах та PCNA (ядерний антиген клітинної проліферації) у бронхіальній тканині за допомогою первинних моноклональних АТ до цих протеїнів та стрептавідин-біотинової системи візуалізації LSAB2 (Dako, Denmark), виконували імуноцитохімічну методику на визначення міжнуклеосомальних розривів ДНК — TUNEL із застосуванням тест-системи TACS XL™ (R&D Systems Incorporation, USA). Підраховували відсоток PCNA- та TUNEL-позитивних ядер бронхіальних епітеліоцитів. Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування ядер або цитоплазми проводили шляхом отримання цифрових копій (формат Tagged Image File Format) оптичного зображення бронхіальної тканини (об'єктив мікроскопа $\times 100$ — масляна імерсія) та його аналізу за допомогою програми GIMP (v. 2,81, ліцензія GPL). Аналіз здійснювали на підставі зондових замірів (площа круглого зонда — 4 мкм^2) інтенсивності забарвлення з обчисленням показника оптичної густини (од. опт. густини). З метою оцінки інтенсивності процесів апоптозу підраховували кількість структур, ідентифікованих як «апоптичні об'єкти» (АО) — TUNEL-позитивні ядра клітин чи TUNEL-позитивні фрагменти ядер. Індекс апоптозу (ІА) визначали як відношення кількості TUNEL-позитивних до кількості TUNEL-негативних клітин (у проміле). Індекс проліферації (ІП) визначали як відношення кількості PCNA-позитивних до кількості PCNA-негативних клітин (у %).

Результати та обговорення

За результатами дослідження інтенсивності АП клітин браш-біоптату доведено (табл. 1), що у хворих 2-ї групи відсоток PCNA-позитивних ядер клітин стінки бронхів нижчий на 37,5 % порівняно з 1-ю ($p < 0,001$), однак відсоток TUNEL-позитивних ядер вищий у 2-й групі на 69,01 %, ніж у 1-й ($p < 0,05$).

Результати дослідження клітин браш-біоптату слизової оболонки бронхів хворих на ТБ легень свідчать не тільки про специфічне запалення, а й наявність епітеліоцитів з ознаками ПКЗ: поява ядер із позитивним TUNEL-забарвленням та апоптотичних тілець, які також є

Таблиця 1. Відсоток PCNA- та TUNEL-позитивних ядер клітин стінки бронхів у хворих з уперше діагностованим чутливим та мультирезистентним туберкульозом легень ($M \pm m$)

Матеріал		1-ша група (n = 11)	2-га група (n = 11)	Вірогідність розбіжності
Клітини браш-біоптату	PCNA	$0,8 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,01$	$p < 0,001$
	TUNEL	$9,8 \pm 0,24$	$14,2 \pm 0,29$	$p < 0,05$

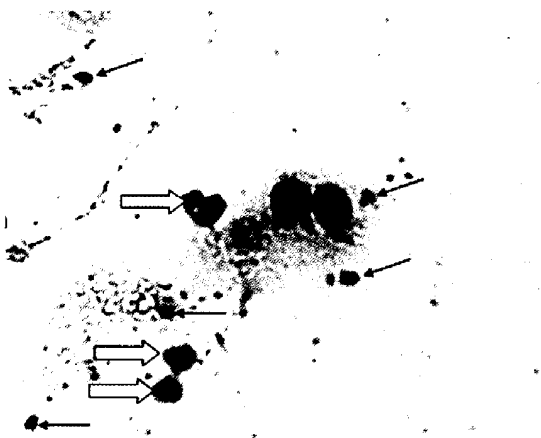


Рис. 1. Мікрофотознімок браш-біоптату слизової оболонки бронха

Великими стрілками позначено TUNEL-позитивні ядра клітин, малими — апоптотичні тільца, вони також є TUNEL-позитивні. Імуногістохімічний метод на міжнуклеосомальні розриви ДНК — TUNEL. Об. $\times 100$ (масляна імерсія). Ок. $\times 10$

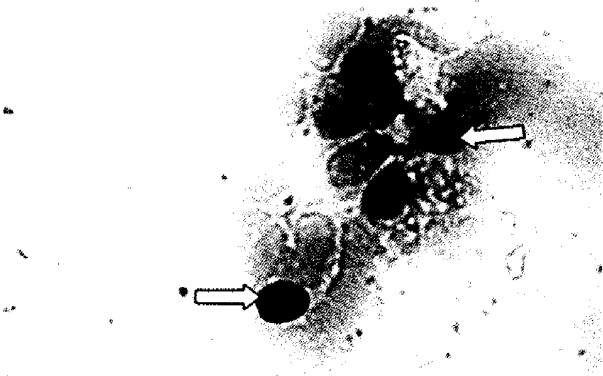


Рис. 2. Мікрофотознімок браш-біоптату слизової оболонки бронха

Стрілками позначено PCNA-позитивні ядра клітин. Імуногістохімічний метод з використанням первинних антитіл проти протеїну PCNA. Об. $\times 100$ (масляна імерсія). Ок. $\times 10$

TUNEL-позитивні (рис. 1). Виявлене нами у хворих 2-ї групи вірогідне підвищення відсотка TUNEL-позитивних ядер вказує на початкові фази морфологічних змін, характерних для активізації АП, і супроводжується нижчою проліферативною активністю відносно показників 1-ї групи.

На нашу думку, поява ядер з позитивним PCNA-зabarвленням у хворих 1-ї групи характеризує здатність клітин до репарації, реплікативної активності ДНК. Це може означати не тільки підвищення клітинної проліферації, а й здатність окремих клітин відновлювати пошкоджену ДНК, що сприяє відмежуванню запального вогнища і частковому відновленню анатомічної цілісності бронхіальної тканини (рис. 2) у пацієнтів з ВДТБ легень. Якщо ж репарація не вдається, то клітини стають на шлях ПКЗ, що супроводжується появою експресії ядерного антигену клітинної проліферації у бронхоальвеолярній тканині і є своєрідною компенсацією у відповідь на специфічне туберкульозне пошкодження.

Запуск апоптотичної активності за вперше діагностованого чутливого та мультирезистентного туберкульозу легень досліджували за допомогою визначення білків-регуляторів: проапоптотичного протеїну Вах та протиапоптотичного — Bcl-2 у клітинах браш-біоптату (табл. 2).

Таким чином, у хворих 2-ї групи в клітинах браш-біоптату на 19,8 % підвищена концентрація проапоптотичного протеїну Вах порівняно з таким у 1-ї групі ($p < 0,001$). Різниця за вмістом протиапоптотичного протеїну Bcl-2 у групах порівняння практично немає ($p > 0,05$). Тобто характер чутливості ТБ легень практично не впливає на протиапоптотичну активність.

Імуноцитохімічно в цитоплазмі епітеліоцитів бронхів при МРТБ спостерігається Вах-позитивність.

Таблиця 2. Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на Вах та Bcl-2 (од. опт. густини) у клітин стінки бронхів у хворих з уперше діагностованим чутливим та мультирезистентним туберкульозом легень ($M \pm m$)

Матеріал	Вах		Вірогідність розбіжності	Bcl-2		Вірогідність розбіжності
	1-ша група (n = 11)	2-га група (n = 11)		1-ша група (n = 11)	2-га група (n = 11)	
Клітини браш-біоптату	$0,248 \pm 0,0019$	$0,297 \pm 0,0022$	$p < 0,001$	$0,107 \pm 0,0012$	$0,106 \pm 0,0010$	$p > 0,05$

тивне забарвлення. У ядрі клітини наявні Вах-позитивні гранули з ознаками каріопікнозу, що характерно для ранньої стадії апоптозу (рис. 3).

Доведено, що протеїн Bcl-2 належить до чинників, здатних запобігати запуску ПКЗ [9]. Зниження концентрації протеїну Bcl-2 на тлі зростання кількості клітин із підвищеною концентрацією протеїну Вах розкриває молекулярні механізми травмивного впливу токсинів, особливо резистентних МБТ, на геном з перемикуванням клітин у режим надмірної апоптотичної активності.

Отже, у хворих із мультирезистентністю інтенсивність апоптотичних реакцій вища за таку в разі чутливого ТБ, супроводжується нижчою проліферативною активністю епітеліоцитів бронхоальвеолярної вистілки. На підставі цього можна стверджувати, що інтенсивність АП клітин браш-біоптату хворих на МРТБ відбувається за рахунок зниження відсотка PCNA-позитивних ядер та підвищення TUNEL-позитивних на тлі підвищеної концентрації в них проапоптотичного протеїну Вах, що, можливо, є тим чинником, який характеризує інтенсивність процесу запалення та призводить до загибелі епітеліоцитів через активізацію некрозу-казеозу. На нашу думку, активований процес у подальшому характеризує поширеність та прогресування специфічного туберкульозного процесу, клінічну маніфестацію і прогноз щодо формування залишкових змін.

Висновки

1. У клітинах браш-біоптату хворих на мультирезистентний туберкульоз легень відсоток PCNA-позитивних ядер клітин стінки бронхів нижчий порівняно з чутливим туберкульозом

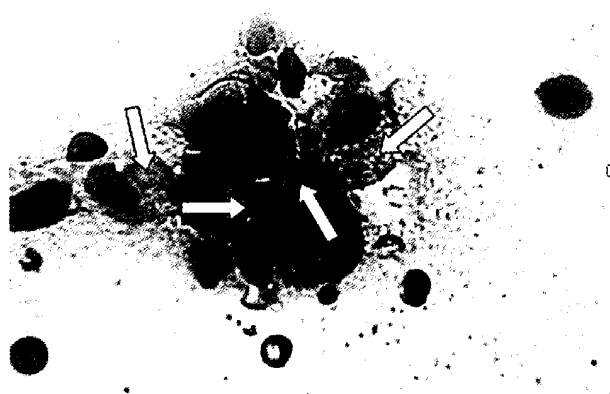


Рис. 3. Мікрофотознімок браш-біоптату слизової оболонки бронха

Великими стрілками позначено цитоплазму клітин з Вах-позитивними гранулами, малою — ядро клітини з Вах-позитивними гранулами, яке має ознаки каріопікнозу (рання стадія апоптозу). Імуногістохімічний метод з використанням первинних антитіл проти проапоптотичного протеїну Вах. Об. $\times 100$ (масляна імерсія). Ок. $\times 10$.

(на 37,5 %; $p < 0,001$), супроводжується вищим відсотком TUNEL-позитивних ядер (на 69,01 %; $p < 0,05$).

2. У хворих із мультирезистентністю у клітинах браш-біоптату відсоток проапоптотичного протеїну Вах є вищим порівняно з клітинами хворих на чутливий туберкульоз (на 19,8 %; $p < 0,001$).

3. У хворих із мультирезистентним туберкульозом легень спостерігається істотне порушення між процесами апоптозу та проліферації. Методику підрахунку кількості структур (індекси апоптозу та проліферації) можна застосовувати для визначення ранніх виявів апоптотичної активності, прогнозу щодо клінічної маніфестації та формування залишкових змін.

Список літератури

1. Ерохин В.В. Молекулярные, субклеточные и клеточные механизмы патогенеза туберкулезного воспаления легких // *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. — 2009. — Vol. 5, № 2. — С. 267–269.
2. Овчинников А.А. Методы эндобронхиальной диагностики при заболеваниях трахеи, бронхов и лёгких // *Атмосфера. Пульмонология и аллергология*. — 2005. — № 2. — С. 23–28.
3. Тодоріко Л.Д., Герман А.О., Сливка В.І. та ін. Місце апоптозу у формуванні загального синдрому дезадаптації при захворюваннях легень специфічного генезу // *Актуальні питання пульмонології: обмін досвідом та перспективи розвитку: Матер. наук.-практ. конф. з міжнародною участю (Чернівці, 8–9 вересня 2011 р.)*. — Чернівці: Медуніверситет, 2011. — С. 61–62.
4. Тодоріко Л.Д. Особливості еволюції імунопатогенезу лікарсько-стійкого туберкульозу // *Клін. імунол. Алергол. Інфектол.* — 2014. — № 3. — С. 16–20.
5. Тодоріко Л.Д., Рихліцька К.В., Шубравський А.О. Роль апоптозу у формуванні загального синдрому дезадаптації та прогресуванні системного запалення при хронічних обструктивних захворюваннях легень на тлі гіпоодотируїзму // *Галицький лікарський вісник*. — 2010. — Т. 17, № 2. — С. 103–108.
6. Чуриша Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* // *Мед. иммунол.* — 2012. — Т. 14, № 1–2. — С. 119–126.
7. Danila E. Diagnostic value of epithelioid cell granulomas in bronchoscopic biopsies / E. Danila, E. Zaurauskas // *Inter. Med.* — 2008. — Vol. 47. — P. 2121–2126.
8. Ensminger S.A., Prakash U.B. Is bronchoscopic lung biopsy helpful in the management of patients with diffuse lung disease? // *Eur. Respir. J.* — 2006. — Vol. 28. — P. 1081–1084.
9. Shore G., Viallet J. Modulating the Bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer // *Hematology*. — 2005. — P. 226–230.

Л.Д. Тодорико, И.В. Еременчук, И.С. Давыденко
ВГУЗ «Буковинский государственный медицинский университет», Черновцы

Исследование пролиферативной активности и интенсивности апоптоза эпителиоцитов бронхов при мультирезистентном туберкулезе легких

Цель работы — исследовать пролиферативную активность и определить интенсивность апоптоза эпителиоцитов бронхов у больных с впервые диагностированным мультирезистентным туберкулезом (ВДТБ) легких.

Материалы и методы. Обследовано 15 пациентов с ВДТБ и 15 — с мультирезистентным туберкулезом (МРТБ) легких в возрасте от 20 до 45 лет. Среди обследованных преобладали мужчины. У всех пациентов диагностированы деструктивные формы туберкулеза (ТБ): у 66,4 % — диссеминированный и у 33,6 % — инфильтративный. Для прижизненного электроно-микроскопического морфологического исследования эпителиоцитов бронхов проводили браш-биопсию (по стандартной методике). Провели иммуноцитохимическое определение антигенов Bax, Bcl-2, PCNA- и TUNEL-положительных ядер.

Результаты и обсуждение. У больных с мультирезистентностью интенсивность апоптотических реакций выше таковой при чувствительном ТБ, сопровождается сниженной пролиферативной активностью эпителиоцитов бронхоальвеолярной выстилки. Интенсивность апоптоза клеток браш-биоптата больных МРТБ происходит за счет сниженного процента PCNA-позитивных ядер и повышения TUNEL-положительных на фоне повышенной концентрации в них проапоптотического протеина Bax. Активизированный процесс апоптоза с переходом в неконтролируемую естественную клеточную гибель характеризует распространенность и прогрессирование специфического туберкулезного процесса, клиническую манифестацию и прогноз относительно формирования остаточных изменений.

Выводы. У больных с МРТБ легких наблюдаются существенные нарушения между процессами апоптоза и пролиферации. Методику подсчета количества структур (индексы апоптоза и пролиферации) можно применять для определения ранних проявлений апоптотической активности, прогноза клинической манифестации и формирования остаточных изменений.

Ключевые слова: мультирезистентный туберкулез, пролиферация, апоптоз, эпителиоциты.

L.D. Todoriko, I.V. Ieremenchuk, I.S. Davydenko
Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Study of proliferative activity and intensity of bronchial epitheliocyte apoptosis in case of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis

Objective — to investigate the proliferative activity and the intensity of the bronchial epithelial cells apoptosis in patients with newly diagnosed multidrug-resistant pulmonary tuberculosis (MRTB).

Materials and methods. 15 patients with primary diagnosed pulmonary tuberculosis (PDTB) and 15 MDR TB patients aged from 20 to 45, mostly male, were examined. All patients were diagnosed with destructive tuberculosis (TB): 66.4 % — disseminated TB and 33.6 % — TB with infiltrates. Brush-biopsy (by the standard method) was performed for intrevital morphological study of bronchial epitheliocytes with electron microscope as well as antigens Bax, Bcl-2, PCNA- and TUNEL-positive nuclei immunohistochemical definition was carried out.

Results and discussion. The apoptotic reactions is higher in Patients with MDR TB in comparison with preserved MBT sensitivity and is accompanied by an increased proliferative activity of bronchial epithelial cells. The intensity of the apoptosis-brush biopstat in MDR TB patients occurs due to a lower percentage of positive PCNA — nuclei and enhancement of TUNEL-positive nuclei with increased concentration of proapoptotic protein Bax. Activated apoptotic process with a transition into an uncontrollable natural cell

death is characterized by prevalence and progression of tuberculous process, clinical manifestation and prognosis of the residual changes formation.

Conclusions. It is proved that a substantial violation between apoptosis and proliferation processes takes place in patients with newly diagnosed multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. Method of counting of the number of structures (indexes of apoptosis and proliferation) may be used to determine the earliest manifestations of apoptotic activity, prognosis of clinical manifestations and residual changes formation.

Key words: multidrug-resistant tuberculosis, proliferation, apoptosis, epitheliocytes.

Контактна інформація:

Тодоріко Лілія Дмитрівна, д. мед. н., проф., зав. кафедри фтизіатрії та пульмонології
58002, м. Чернівці, пл. Театральна, 2
E-mail: mutia2@rambler.ru

Стаття надійшла до редакції 7 квітня 2015 р.