



О.С. Шевченко, О.А. Наконечна, О.О. Говардовська
Харківський національний медичний університет

Дослідження видів клітинної смерті та стадій апоптозу лейкоцитів у хворих на туберкульоз легень на тлі антимікобактеріальної терапії

Мета роботи – оцінити стан цитоплазматичних мембран лейкоцитів та дослідити їхню життєздатність, визначити різновиди та стадії клітинної смерті лейкоцитів крові хворих на туберкульоз (ТБ) легень з різною ефективністю лікування в інтенсивну фазу (ІФ) антимікобактеріальної терапії (АМБТ).

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь 30 пацієнтів зі встановленим діагнозом ТБ легень, що лікувалися в Обласній туберкульозній лікарні № 1 м. Харкова. Пацієнтів поділено на групи залежно від ефективності лікування в ІФ АМБТ. Першу групу склали 12 пацієнтів з ефективним лікуванням. У них після 60 доз ІФ АМБТ спостерігалася конверсія бактеріовиділення. Позитивну динаміку визначено за результатами клінічних та променеви досліджень. Другу групу склали 18 пацієнтів зі сповільненим та/або негативним результатом лікування, в яких після 60–90–120 доз ІФ АМБТ зберігалася бактеріовиділення. Визначалася стабільна або негативна динаміка та/або було зафіксовано невдачу лікування. Контрольну групу склали 12 практично здорових донорів. Дослідження проводили за методом проточної цитометрії на проточному цитофлуометрі FACS Calibur. Оцінку стадій клітинної смерті проводили шляхом додавання маркерів CD45⁺, Annexin V FITC detection KIT 1, 7AAD.

Результати та обговорення. Частка непошкоджених лейкоцитів у крові хворих на ТБ легень становила ($71,05 \pm 3,66$) %. У контрольній групі – ($91,8 \pm 0,1$) %, тобто на 20,75% менше. У хворих на ТБ було більше клітин як на початковій стадії апоптозу ($(14,7 \pm 1,47)$ порівняно з ($3,8 \pm 0,16$)% у контрольній групі), так і на пізній стадії апоптозу/некрозу ($(12,35 \pm 2,36)$ порівняно з ($3,08 \pm 0,3$)% у контрольній групі), що вказує на зменшення активного лейкоцитарного пулу. В крові хворих на ТБ легень кількість мертвих некротичних клітин зменшується у 1,8 разу ($(0,95 \pm 0,07)$ порівняно з ($1,78 \pm 0,32$)% у контрольній групі), що може свідчити про увімкнення компенсаторних механізмів імунної системи організму. Кожен показник вірогідно значущо ($p < 0,05$) відрізняється між групами. У жодному з аналізованих станів лейкоцитів не виявлено вірогідної ($p > 0,05$) різниці між групами порівняння за вірогідної ($p < 0,05$) різниці щодо контрольної групи.

Висновки. Туберкульоз супроводжується глибокими порушеннями імунної відповіді, оскільки спостерігається екстерналізація фосфоліпиду фосфатидилсерину в фосфоліпідному бішарі цитоплазматичної мембрани лейкоцитів периферійної крові. Кількість абсолютно живих, функціонально спроможних лейкоцитів на 20,75% менша у хворих на ТБ, ніж у практично здорових донорів. Оскільки дослідження проводили на тлі АМБТ, причиною такого дефіциту клітин лейкоцитарного пулу може бути не тільки прогресування захворювання, а й використання АМБТ, що потребує подальшого вивчення. Вірогідної різниці між станом цитоплазматичних мембран лейкоцитів у групах хворих на ТБ з різною ефективністю лікування в ІФ АМБТ не зауважено. У периферійній крові хворих на ТБ легень ($27,1 \pm 1,9$) % лейкоцитів перебували в стані апоптозу, з них ($14,7 \pm 1,47$) % – на початковій стадії, що вказує на терапевтичну потребу у використанні додаткових імуномодулювальних засобів з метою кількісного та якісного відновлення імунокомпетентних клітин.

Ключові слова

Туберкульоз, клітинна смерть, апоптоз лейкоцитів.

Бактеріальні та вірусні інфекції в разі потрапляння в організм людини зумовлюють безліч реакцій та формують специфічну систему «організм — хазяїн» — «організм — збудник». Основними реакціями макроорганізму є запалення, імунна відповідь, проліферація або клітинна загибель. Вказані процеси можуть мати як пошкоджувальний, так і захисний характер [4].

Клітинна загибель за умови дії інфекційних агентів реалізується різними шляхами та залежить від типу клітин макроорганізму і їхнього фізіологічного стану, стадії інфекції, інфікуючої дози та факторів вірулентності патогену. Відомо, що апоптоз — запрограмована клітинна смерть, є нормальним фізіологічним імуномодульованим процесом, що активізується у відповідь на клітинний стрес або метаболічні порушення [2, 7, 9]. У системі «організм — хазяїн» — «організм — збудник» апоптоз має три патогенетичних завдання та шляхи вирішення їх: апоптоз як механізм знищення клітин «організму — хазяїна»; апоптоз як пусковий механізм запалення; апоптоз як захисний механізм «організму — хазяїна» [2]. Залежно від ефективності реалізації завдань апоптозу загибель клітин впливає на формування або реакцію імунітету, результат інфекційного процесу, тобто перебіг та ефективність лікування захворювання.

Серед інфекційних захворювань туберкульоз (ТБ) займає лідирувальні позиції з основних епідемічних показників захворюваності, поширеності та смертності [10]. Чимало дослідників указують на важливість вивчення механізмів клітинної загибелі у хворих на ТБ як на шанс для підвищення ефективності та безпечності антимікобактеріальної терапії (АМБТ) [6, 8]. Відомо, що АМБТ впливає на функціональну активність клітин «організму — хазяїна» шляхом дезорганізації їхніх мембранних структур [1]. Визначено, що порушення регуляції процесів апоптозу є фактором ризику розвитку та прогресування ТБ [6].

Протитуберкульозний імунітет значно відрізняється від імунітету при інших захворюваннях. Механізм імунної відповіді при ТБ залежить від активності фагоцитозу клітинами крові, формування антитіл та реакції гіперчутливості сповільненого типу [3, 5]. Усі вказані процеси безпосередньо виконуються та напруга залежать від клітин лейкоцитарного ряду, тому вивчення процесів клітинної загибелі лейкоцитів у хворих на ТБ має важливе теоретичне та практичне значення.

Мета роботи — оцінити стан цитоплазматичних мембран лейкоцитів та дослідити їхню життєздатність, визначити різновиди та стадії клітинної смерті лейкоцитів крові хворих на тубер-

кульоз легень з різною ефективністю лікування в інтенсивну фазу антимікобактеріальної терапії.

Матеріали та методи

У дослідженні взяли участь 30 пацієнтів із встановленим діагнозом ТБ легень, що перебували на лікуванні в Обласній туберкульозній лікарні № 1. Усіх їх було обстежено, всіх лікували згідно з чинним на момент реєстрації наказом МОЗ України від 04.09.2014 р. № 620 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при туберкульозі». Пацієнтів поділено на групи залежно від ефективності лікування у інтенсивну фазу (ІФ) АМБТ. Першу групу склали 12 пацієнтів з ефективним лікуванням. У них після 60 доз ІФ АМБТ спостерігалися конверсія бактеріовиділення та позитивна динаміка, визначена за результатами клінічних та променевих досліджень. Другу групу склали 18 пацієнтів зі сповільненим та/або негативним результатом лікування, в яких після 60–90–120 доз ІФ АМБТ зберігалася бактеріовиділення та визначалася стабільна або негативна динаміка та/або було зафіксовано невдачу лікування. Контрольну групу склали 12 практично здорових донорів.

Характеристика груп порівняння: середній вік у першій групі становив 35,8 року, у другій — 42,9 року, у контрольній — 39,9 року. У першій групі нових випадків ТБ було 83,3%, повторних — 16,6%, у другій — 77,8% та 22,2% відповідно. Всі пацієнти мали позитивний аналіз на рідких живильних середовищах з використанням апаратури MGIT BACTEC та/або засіву на щільні середовища Левенштейна—Єнсена. Відповідно до результатів тесту медикаментозної чутливості, монополірезистентність збудника ТБ до антимікобактеріальних препаратів встановлено у 43,4% пацієнтів першої групи та у 46% другої. У решти пацієнтів було збережено чутливість до препаратів. Під час радіологічного дослідження деструкцію легеневої тканини виявлено у 77,7 та 94% пацієнтів першої й другої груп відповідно. За клінічною формою у 96,6% хворих першої групи та 78% другої засвідчено інфільтративний ТБ, у решти дисемінований. Таким чином, відповідно до основних критеріїв групи можна порівнювати між собою.

Біоматеріалом для дослідження була кров, взята з периферійної вени зранку натще в об'ємі 10 мл та поміщена в пробірку з ЕДТА. Забір біоматеріалу відбувався наприкінці ІФ АМБТ. Дослідження життєздатності лейкоцитів крові, а також різновидів та стадій клітинної смерті проводили за методом проточної цитометрії на

проточному цитофлуометрі FACS Calibur. Оцінку стадій клітинної смерті проводили шляхом додавання маркерів CD45⁺, Annexin V FITC detection KIT I, 7AAD (Becton Dickinson, США) [7]. Маркером пізньої стадії апоптозу та/або некрозу є 7-аміноактиноміцин (7AAD) — вітальний ДНК-барвник, який проникає в клітину в разі порушення цілісності клітинних мембран. Annexin V FITC — маркер початкової стадії апоптозу, що є Ca²⁺-залежним фосфоліпідозв'язуючим білком. Annexin V зв'язується з клітинами, що мають фосфатидилсерин на зовнішній поверхні мембрани, однак у нормі він розташовується на внутрішньому шарі мембрани. За допомогою Annexin V можна оцінити ступінь порушень розподілу ліпідів у цитоплазматичній мембрані та визначити стан клітини. Таким чином, було виділено 4 стадії клітинної смерті: Annexin V⁻, 7AAD⁻-клітини — повністю живі клітини; Annexin V⁺, 7AAD⁻ — клітини, що перебувають на початковій стадії апоптозу; Annexin V⁺, 7AAD⁺ — клітини на пізній стадії апоптозу та/або некрозу; Annexin V⁻, 7AAD⁺ — мертві некротичні клітини. Результати проточної цитометрії оцінювали з використанням програмного забезпечення CELLQuest Pro (Becton Dickinson, США) та WinMDI Version 2.9.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2016 (ліцензія № 00201-10554-16848-AA351), а також засобів Statsoft Statistica 8.0. (ліцензія STA862D175437Q). Дані наведено у вигляді $M \pm m$, при цьому значущою різницю вважалися за рівня $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За даними літератури, можна виявити екстерналізацію фосфоліпиду фосфатидилсерину в цитоплазматичній мембрані клітин, що є ознакою раннього апоптозу, за допомогою методу прото-

кової цитометрії. Фосфатидилсерин, розташований на зовнішньому бішарі мембрани апоптотичних клітин, зв'язується з Annexin V.

У хворих на ТБ легень спостерігається асиметрія розподілу фосфоліпідів у цитоплазматичній мембрані лейкоцитів, а саме виявлено екстерналізацію фосфатидилсерину.

Під час аналізу стану цитоплазматичних мембран лейкоцитів усіх учасників дослідження було визначено, що ТБ легень супроводжується значними пошкодженнями цитоплазматичних мембран лейкоцитів. Про це свідчить вірогідно менша кількість клітин, що не вступили в реакцію з Annexin V, тобто повністю живих і функціональних клітин, у хворих на ТБ порівняно з контрольною групою. Частка непошкоджених лейкоцитів у крові хворих на ТБ легень становила $(71,05 \pm 3,66) \%$, у крові контрольної групи $(91,8 \pm 0,1) \%$, що на 20,75% менше. Частка клітин, що вступили в реакцію з Annexin V⁺ (Annexin V⁺, 7AAD⁻ та Annexin V⁺, 7AAD⁺), тобто апоптотичних, була значно більшою у групах порівняння, ніж у контрольній, і в середньому для хворих на ТБ легень становила $(27,1 \pm 1,9) \%$. Причому у хворих на ТБ було збільшення кількості клітин як на початковій стадії апоптозу $((14,7 \pm 1,47) \text{ порівняно з } (3,8 \pm 0,16) \%)$ у контрольній групі, так і на пізній апоптозу/некрозу $((12,35 \pm 2,36) \text{ порівняно з } (3,08 \pm 0,3) \%)$ у контрольній групі, що вказує на зменшення активного лейкоцитарного пулу. У крові хворих на ТБ легень відсоток мертвих некротичних клітин зменшується у 1,8 рази $((0,95 \pm 0,07) \text{ при } (1,78 \pm 0,32) \%)$ у контрольній групі, що може свідчити про ввімкнення компенсаторних механізмів імунної системи організму (рис. 1). Кожен визначений показник вірогідно значущо ($p < 0,05$) відрізняється між групами.

На рис. 2 наведено типові результати дослідження за методом проточної цитофлуометрії

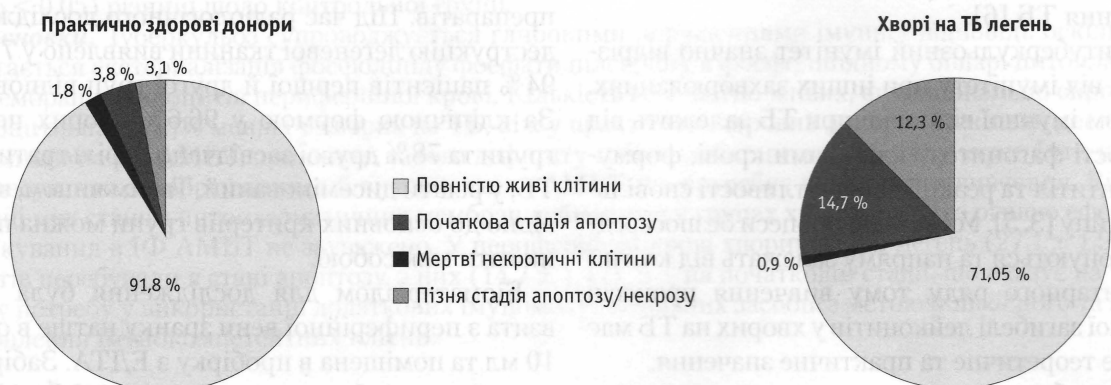


Рис. 1. Відсоток лейкоцитів, що перебувають на різних стадіях клітинної смерті у крові хворих на ТБ легень та практично здорових донорів

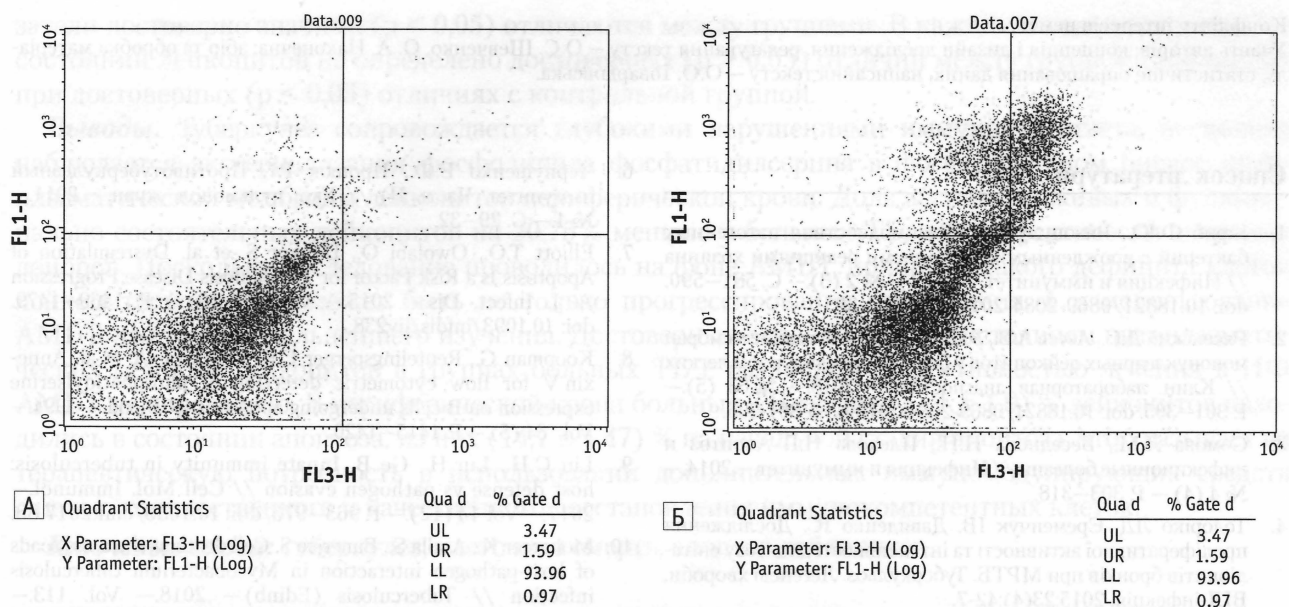


Рис. 2. Типова цитограма з візуалізацією раноапоптичних, пізноапоптичних/некротичних та мертвонекротичних лейкоцитів периферійної крові у хворого на ТБ легень (А) та представника контрольної групи (Б)

Таблиця. Стадії клітинної смерті лейкоцитів периферійної крові пацієнтів з туберкульозом легень з різною ефективністю лікування в інтенсивній фазі антимікобактеріальної терапії, %

| Показник | AnnexinV ⁻ , 7AAD ⁻ | AnnexinV ⁺ , 7AAD ⁻ | AnnexinV ⁺ , 7AAD ⁺ | AnnexinV ⁻ , 7AAD ⁺ |
|------------------|---|---|---|---|
| Стан клітин | Повністю живі клітини | Початкова стадія апоптозу | Пізня стадія апоптозу/некрозу | Мертві некротичні клітини |
| Перша група | 72,2 ± 2,7* | 14,5 ± 1,5* | 11,4 ± 1,9* | 1,0 ± 0,14* |
| Друга група | 70,2 ± 3,9* | 14,9 ± 1,62* | 13,0 ± 2,5* | 0,9 ± 0,08* |
| Контрольна група | 91,8 ± 0,1 | 3,8 ± 0,16 | 3,1 ± 0,3 | 1,8 ± 0,31 |

Примітка. * Значущо відрізняється від показників контрольної групи ($p < 0,05$).

з використанням реактивів CD45⁺, Annexin V FITC detection KIT I, 7AAD.

Результати визначення стадій клітинної смерті лейкоцитів за допомогою проточної цитометрії в групах з ефективним та уповільненим та/або негативним результатом лікування ТБ в ІФ АМБТ наведено в таблиці.

Під час порівняння стадій клітинної смерті у групах з різною ефективністю лікування у ІФ АМБТ встановлено, що у жодному з аналізованих станів лейкоцитів не виявлено вірогідної ($p > 0,05$) різниці між групами порівняння, за вірогідної ($p < 0,05$) різниці з контрольною групою.

Висновки

У хворих на туберкульоз спостерігається екстерналізація фосфоліпиду фосфатидилсерину у фосфоліпідному бішарі цитоплазматичної мембрани лейкоцитів периферійної крові, що супроводжується глибокими порушеннями імунної відповіді. Показник абсолютно живих, функ-

ціонально спроможних лейкоцитів є на 20,75% меншим у хворих на туберкульоз, ніж у практично здорових донорів. Оскільки дослідження проводили на тлі антимікобактеріальної терапії, причиною такого дефіциту клітин лейкоцитарного пулу може бути не тільки прогресування захворювання, а й використання антимікобактеріальної хіміотерапії, що потребує подальшого вивчення.

Вірогідної різниці між станом цитоплазматичних мембран лейкоцитів у хворих на туберкульоз легень з ефективним та уповільненим та/або негативним результатом лікування на тлі антимікобактеріальної терапії не виявлено.

3. У периферійній крові хворих на туберкульоз легень (27,1 ± 1,9) % лейкоцитів перебували в стані апоптозу, з них (14,7 ± 1,47) % на початковій стадії, що вказує на терапевтичну потребу у використанні додаткових імуномодулювальних засобів з метою кількісного та якісного відновлення імунокомпетентних клітин.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження, редагування тексту — О.С. Шевченко, О. А. Наконечна; збір та обробка матеріалу, статистичне опрацювання даних, написання тексту — О.О. Говардовська.

Список літератури

1. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина // Инфекция и иммунитет. — 2012. — № 2 (3). — С. 581–590. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-301-305.
2. Рясенский Д.С., Асеев А.В., Эльгали А.И. Состояние мембран мононуклеарных лейкоцитов у больных туберкулезом легких // Клини. лабораторная диагностика. — 2018. — № 63 (5). — Р. 301–305. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-301-305.
3. Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни // Инфекция и иммунитет. — 2014. — № 4 (4) — Р. 303–318.
4. Тодоріко ЛД, Єременчук ІВ, Давиденко ІС. Дослідження проліферативної активності та інтенсивності апоптозу епітеліоцитів бронхів при МРТБ. Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. 2015;23(4):42-7.
5. Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г. Противотуберкулезный иммунитет. Часть I // Укр. пульмонол. журн. — 2010. — № 4. — С. 53–58.
6. Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г. Противотуберкулезный иммунитет. Часть II // Укр. пульмонол. журн. — 2011. — № 1. — С. 29–32.
7. Elliott T.O., Owolabi O., Donkor S. et al. Dysregulation of Apoptosis Is a Risk Factor for Tuberculosis Disease Progression // J. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 212 (9). — P. 1469–1479. doi: 10.1093/infdis/jiv238.
8. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis // Blood. — 1994. — Vol. 84 (5). — P. 1415–1420.
9. Liu C.H., Liu H., Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion // Cell Mol. Immunol. — 2017. — Vol 14 (12). — P. 963–975. doi: 10.1038/cmi.2017.88.
10. Mohareer K., Asalla S., Banerjee S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in Mycobacterium tuberculosis infection // Tuberculosis (Edinb). — 2018. — Vol. 113. — P. 99–121. doi: 10.1016/j.tube.2018.09.007.
11. WHO Global tuberculosis report 2018 Geneva: World Health Organization; 2018.

О.С. Шевченко, О.А. Наконечная, О.О. Говардовская
Харьковский национальный медицинский университет

Исследование видов клеточной смерти и стадий апоптоза лейкоцитов у больных туберкулезом легких на фоне антимикобактериальной терапии

Цель работы — оценка состояния цитоплазматических мембран лейкоцитов и изучение их жизнеспособности, определение разновидности и стадии клеточной смерти лейкоцитов крови больных туберкулезом (ТБ) легких с различной эффективностью лечения в интенсивную фазу (ИФ) антимикобактериальной терапии (АМБТ).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 30 пациентов с установленным диагнозом ТБ легких, которые находились на лечении в Областной туберкулезной больнице № 1 г. Харькова. Пациенты были поделены на группы сравнения в зависимости от эффективности лечения в ИФ АМБТ. Первую группу составили 12 пациентов с эффективным лечением. У них после 60 доз ИФ АМБТ определялись конверсия бактериовыделения. Положительная динамика определена согласно результатам клинических и лучевых исследований. Вторую группу составили 18 пациентов с замедленным и/или отрицательным результатом лечения, у которых после 60–90–120 доз ИФ АМБТ сохранилось бактериовыделение. Определялась стабильная или негативная динамика и/или была установлена неудача лечения. Контрольную группу составили 12 практически здоровых доноров. Исследование проводили по методу проточной цитометрии на проточном цитофлуометре FACS Calibur. Оценку стадий клеточной смерти проводили путем добавления маркеров CD45⁺, Annexin V FITC detection KIT I, 7AAD.

Результаты и обсуждение. Доля неповрежденных лейкоцитов в крови больных ТБ легких составила (71,05 ± 3,66) %. В контрольной группе — (91,8 ± 0,1) %, что на 20,75 % меньше. У больных ТБ определялось увеличение количества клеток как на начальной стадии апоптоза ((14,7 ± 1,47) в сравнении с (3,8 ± 0,16) % в контрольной группе), так и на поздней стадии апоптоза/некроза ((12,35 ± 2,36) в сравнении с (3,08 ± 0,3) % в контрольной группе), что указывает на уменьшение активного лейкоцитарного пула. В крови больных ТБ легких доля мертвых некротизированных клеток уменьшается в 1,8 раза ((0,95 ± 0,07) в сравнении с (1,78 ± 0,32) % в контрольной группе), что может свидетельствовать о включении компенсаторных механизмов иммунной системы организма. Все пока-

зателі достовірно значимо ($p < 0,05$) відрізняються між групами. В кожному з аналізованих станів лейкоцитів не визначено достовірних ($p > 0,05$) відмінностей між групами порівняння при достовірних ($p < 0,05$) відмінностях з контрольною групою.

Висновки. Туберкульоз супроводжується глибокими порушеннями імунної відповіді, оскільки спостерігається екстерналізація фосфоліпіда фосфатидилсерина в фосфоліпідний бішар цитоплазматическої мембрани лейкоцитів периферическої крові. Частка абсолютно живих і функціонально стійких лейкоцитів на 20,75% менше у хворих ТБ, ніж у практично здорових донорів. Оскільки дослідження проводилося на фоні АМБТ, причиною такого дефіциту клітин лейкоцитарного пула може бути не тільки прогресування захворювання, а й використання АМБТ, що потребує дальнішого вивчення. Достовірних відмінностей між станом цитоплазматических мембран лейкоцитів в групах хворих ТБ з різною ефективністю лікування в ІФ АМБТ не визначено. В периферическій крові хворих ТБ легких ($27,1 \pm 1,9$)% лейкоцитів знаходилися в стані апоптозу, з них ($14,7 \pm 1,47$)% на початковій стадії апоптозу, що вказує на терапевтичну потребу в використанні додаткових імуномодулюючих засобів з метою кількісного і якісного відновлення імунокомпетентних клітин.

Ключові слова: туберкульоз, клітинна смерть, апоптоз лейкоцитів.

O.S. Schevchenko, O.A. Nakonechna, O.O. Hovardovska
Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Study of cell death kinds and stages of leukocytes apoptosis in pulmonary tuberculosis patient during antimycobacterial therapy

Objective – to evaluate the condition of cytoplasmic membranes of leukocytes and to study their viability, to determine the varieties and stages of cell death of leukocytes in patients with pulmonary tuberculosis (TB) with different treatment efficacy in the intensive phase (IP) of antimycobacterial therapy (AMBT).

Materials and methods. The study involved 30 patients with an established diagnosis of pulmonary TB who were treated at the Regional Tuberculosis Hospital N 1 (Kharkiv). Patients were divided into groups depending on the effectiveness of treatment in the IP AMBT. The first group included 12 patients with effective treatment – after 60 doses of IP AMBT conversion of bacteriaexcretion and positive dynamics according to the results of clinical and radiological studies were determined. The second group included 18 patients with a delayed and/or negative result of treatment – after 60–90–120 doses of IP AMBT persistent bacteriaexcretion was detected and stable or negative dynamics were determined and/or treatment failure was established. The control group consisted of 12 healthy donors. The study was performed by flow cytometry on a flow cytometer FACS Calibur. Assessment of cells death stages was performed by adding markers CD45⁺, Annexin V FITC detection KIT I, 7AAD.

Results and discussion. The proportion of live intact leukocytes in the blood of patients with pulmonary TB was (71.05 ± 3.66)%, compared with the control group (91.8 ± 0.1)%, which is less for 20.75%. In the blood of TB patients an increasing of damaged cells was determined at the initial stage of apoptosis ((14.7 ± 1.47) vs (3.8 ± 0.16) % in the control group) and at the late stage of apoptosis/necrosis ((12.35 ± 2.36) vs (3.08 ± 0.3) % in the control group), which indicates a decrease in the active leukocyte pool. In the blood of patients with pulmonary TB, the proportion of dead necrotic cells decreases in 1.8 times ((0.95 ± 0.07) vs (1.78 ± 0.32) % in the control group), which may indicate the inclusion of compensatory mechanisms of the immune system. Each indicator studied was significantly ($p < 0.05$) different between groups. Comparing the stages of cell death in groups with different treatment efficiencies in IP AMBT showed that in each of the analyzed conditions of leukocytes, no significant ($p > 0.05$) differences between the comparison groups were identified, with significant ($p < 0.05$) differences with control group.

Conclusions. TB is accompanied by profound impaired immune response, since externalization of phospholipid phosphatidylserine in the phospholipid bilayer of the cytoplasmic membrane of peripheral blood leukocytes is observed. The proportion of alive and functionally well-off leukocytes is 20.75% less in TB patients than in practically healthy donors. Since the study was conducted on the background of

AMBT, the reason for such a deficiency of cells of the leukocyte pool can be not only the progression of TB, but also the use of AMBT, which requires further study. Significant differences between the states of cytoplasmic membranes of leukocytes in groups of patients with TB with different efficacy of treatment in IP AMBT is not defined. (27.1 ± 1.9) % of peripheral blood leukocytes in patients with pulmonary TB were in a state of apoptosis, of which more than half (14.7 ± 1.47) % in the initial stage of apoptosis, indicating a therapeutic need for using additional immunomodulating drugs with the purpose of quantitative and qualitative recovery of immunocompetent cells.

Key words: tuberculosis, cell death, leukocytes apoptosis.

Keywords: tuberculosis, cell death, leukocytes apoptosis.

Study of cell death kinds and stages of leukocytes apoptosis in pulmonary tuberculosis patient during antimycobacterial therapy

Objective – to evaluate the condition of cytoplasmic membranes of leukocytes and to study their viability to determine the varieties and stages of cell death of leukocytes in patients with pulmonary tuberculosis (TB) with different treatment efficacy in the intensive phase (IP) of antimycobacterial therapy (AMBT). **Materials and methods.** The study involved 30 patients with an established diagnosis of pulmonary TB who were treated at the Regional Tuberculosis Hospital N 1 (Khar'kov). Patients were divided into groups depending on the effectiveness of treatment in the IP AMBT. The first group included patients with effective treatment – after 60 doses of IP-AMBT conversion of bacterial culture and radiological changes according to the criteria of clinical and radiological analysis determined. The second group included 18 patients with a delayed and/or negative result of treatment – after 60–90 doses of IP-AMBT persistent bacteriostasis was detected and stable or negative sputum culture was observed and/or treatment failure was established. The control group consisted of 12 healthy donors. The study was performed by flow cytometry on a flow cytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) which was performed by adding markers CD45-AlexaV500 and FITC-Annexin V-FITC (Becton Dickinson) to TBMA-Phi 4 reagents. **Results and discussion.** The proportion of live intact leukocytes in the blood of patients with pulmonary TB was (71.35 ± 3.03) % compared with the control group (81.8 ± 0.1) % which was less than 10% in the blood of TB patients in the intensive phase of AMBT. The proportion of leukocytes in the initial stage of apoptosis in TB patients in the intensive phase of AMBT was (14.7 ± 1.47) % compared with the control group (4.7 ± 0.14) % which was less than 10% in the blood of TB patients in the intensive phase of AMBT. The proportion of leukocytes in the initial stage of apoptosis in TB patients in the intensive phase of AMBT was (27.1 ± 1.9) % compared with the control group (14.7 ± 1.47) % which was less than 10% in the blood of TB patients in the intensive phase of AMBT. Each indicator studied was significantly ($p < 0.05$) different between the compared groups of cell death in groups with different treatment efficacy in the intensive phase of AMBT. The study showed that in the intensive phase of AMBT the proportion of leukocytes in the initial stage of apoptosis in TB patients in the intensive phase of AMBT was significantly ($p < 0.05$) different between the compared groups of cell death in groups with different treatment efficacy in the intensive phase of AMBT.

Контактна інформація:

Говардовська Ольга Олександрівна, асист. кафедри фізіотерії та пульмонології
61022, м. Харків, просп. Науки, 4
E-mail: olgasencheva98@gmail.com.

Стаття надійшла до редакції 26 квітня 2019 р.