

УДК 618.9..616.428

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ЛИМФАДЕНОПАТИИ
Попов Н.Н., Савво А.Н., *Романова Е.А.

Харьковский национальный университет им.
В.Н. Каразина,

*ГУ «Институт микробиологии и иммунологии
им. И.И.Мечникова АМН Украины», Харьков

По данным статистики в структуре заболеваемости детей наибольший удельный вес занимают острые респираторные инфекции (ОРИ). В Украине ежегодно регистрируется 4,5-5,0 млн. случаев заболеваний гриппом и ОРИ (1). Частота заболеваемости этими болезнями у детей в 1,5-3,0 раза выше, чем у взрослых. Частые ОРИ негативно сказываются на физическом и психо-эмоциональном развитии детей, препятствуют полноценному формированию иммунных реакций. Большинство хронических заболеваний у взрослых является результатом нарушений в созревании и становлении иммунной системы и формировании процессов иммунорегуляции. Особенно опасны осложнения ОРИ у детей. В развивающихся странах ОРИ занимают лидирующее положение среди причин смерти детей в возрасте до 5 лет (2). Особую группу составляют часто болеющие дети с синдромом лимфаденопатии (ЛАП). Характер терапии и длительность ее проведения у этих детей часто существенно отличается от проводимой у детей без ЛАП.

До настоящего времени эффективной этиотропной терапии ОРИ не разработано (2). Признано, что комплексное лечение респираторных инфекций у часто болеющих детей наряду с антибактериальными и противовирусными средствами в обязательном порядке должно включать иммуномодулирующие препараты, повышающие иммунные механизмы защиты организма. Вместе с тем, разработка эффективных схем лечения, профилактики ОРИ и иммунореабилитации часто болеющих детей невозможна без учета характера и степени иммунных расстройств.

Учитывая это, целью настоящей работы явилось изучение функциональной активности лимфоцитов часто болеющих ОРИ детей и их особенностей у детей с синдромом лимфаденопатии.

Материалы и методы

Было проведено иммунологическое обследование 40 часто болеющих детей в возрасте 9-16 лет (острые респираторные инфекции 6-8 раз в году, рецидивирующие бронхиты) с синдромом ЛАП (1 группа, основная). Группы сравнения составили 40 часто болеющих детей того же возраста (острые респираторные инфекции 6-8 раз в году, рецидивирующие бронхиты) без синдрома ЛАП (2 группа) и 40 детей с острыми респираторными инфекциями и острым бронхитом без ЛАП, относящихся к категории эпизодически болеющих детей (3 группа).

Контрольную группу составили 30 здоровых детей того же возраста.

Иммунологические исследования проводили в разгар заболевания и через 1 месяц после выздоровления.

О функциональной активности лимфоцитов судили по их бласттрансформирующей способности, состоянию ядерного хроматина, продукции ИНФ γ и ИЛ-2, содержанию в сыворотке крови ИНФ α и ИНФ γ , количественного содержания в крови активированных (CD25⁺-клеток) и активно пролиферирующих (CD71⁺) лимфоцитов.

Лимфоциты для исследования из периферической крови получали на градиенте фикола-верографа плотностью 1,078г/мл.

Спонтанную и ФГА-индуцированную бласттрансформацию лимфоцитов изучали в культуре клеток *in vitro* в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) (3). Интенсивность пролиферации клеток оценивали морфологически по относительному содержанию формируемых бластных форм лимфоцитов.

Топологические свойства ядер лимфоцитов изучали методом поляризационной микроскопии. С этой целью из суспензии лимфоцитов готовили каплю-препарат на предметном стекле, фиксировали его смесью этанола и ацетона (1:1, 20 мин), проводили гидролиз (5 Н.НСL, 20°, 30 мин), блокировали альдегидные группы раствором гидроксилamina солянокислого (по Лилли, 37°, 3 ч). Приготовленный препарат окрашивали 0,05% толуидиновым синим в 0,001 М цитратном буфере рН 5,0 (20 мин). После отмывки цитратным буфером препараты высушивали и определяли уровень анизотропии, используя поляризационный микроскоп МП-8 (объектив ПЛАН-АПО-МИ 100 \times 1,25; окуляр К10х) при скрещенном анализаторе и поляризаторе. Для учета интенсивности анизотропного эффекта в ядрах лимфоцитов использовали модификацию полуколичественного метода Астальди и Верга, адаптированного для изучения ядер. Все ядра были разделены по степени анизотропии на 5 групп, каждой из которых были присвоены определенная величина анизотропии (цитохимический индекс) – от 0 (полное ее отсутствие) до 4 (анизотропно все ядро) (4,5). Уровень анизотропии является критерием пространственной упорядоченности ДНК, которая при активации хроматина уменьшается пропорционально снижению анизотропного эффекта. Учитывая наличие обратной связи между степенью анизотропии хроматина и его биологической активностью, показатель активации лимфоцитов (ПАЛ) рассчитывали по формуле:

ПАЛ = 4 - X, где 4 – максимальный возможный средний цитохимический индекс, а X – средний цитохимический индекс, подсчитанный в приготовленном препарате крови.

Количественное содержание CD3⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD71⁺ лимфоцитов в крови определяли методом непрямой иммунофлюоресценции, используя соответствующие наборы моноклональных антител («Сорбент», Москва).

Активность продукции мононуклеарами ИЛ-2 и ИНФ γ изучали в культуре *in vitro* (6). Выделенные из периферической крови мононуклеары в

количестве 2×10^6 /мл культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в среде RPMI-1640 с добавлением 5% телячьей сыворотки, 2 мМL-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина в течение 18 часов. Стимуляцию продукции цитокинов вызывали ФГА (5 мкг/мл). Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли с помощью ИФА, используя коммерческие тест-системы (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург).

Концентрацию в сыворотке ИНФ α и ИНФ γ определяли с помощью ИФА.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для этой цели использовали пакет прикладных программ Statgraphics. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значений $p < 0,05$. Показатели в таблице приведены в виде $M \pm \sigma$, где M - среднее арифметическое значение, а σ - среднеквадратичное отклонение.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что острые респираторные инфекции у детей 1 и 2 групп протекают на фоне низкой функциональной активности лимфоцитов. Так, в реакции бласттрансформации уровень ответа лимфоцитов детей 1 и 2 групп на ФГА был значительно ниже, чем у детей контрольной группы (табл.1). При этом в период заболевания у таких детей отмечалась повышенная спонтанная пролиферация лимфоцитов. У детей 1 группы она была достоверно выше, чем у детей 2 группы. После выздоровления ФГА-зависимая бласттрансформирующая активность клеток у обеих групп детей (1 и 2) нормализовывалась. Наряду с этим спонтанная пролиферация лимфоцитов у детей 1 группы оставалась выше значений нормы и показателей детей 2 и 3 групп (Табл.1). В отличие от детей 1 и 2 групп,

Таблица 1. Бласттрансформирующая активность лимфоцитов крови детей основной группы (1) и групп сравнения (2,3) в остром периоде заболевания и после выздоровления

Показатели	Группы детей			Контрольная
	1	2	3	
Спонтанная БТЛ, %	$22,6 \pm 2,0^{*,***,**}$	$11,6 \pm 1,5^{*,**}$	$9,3 \pm 0,9^*$	7,5 \pm 0,5
	$15,6 \pm 1,4^{*,***,**}$	$8,8 \pm 0,9$	$7,5 \pm 0,5$	
ФГА-индуцированная БТЛ, %	$39,9 \pm 4,0^{*,**}$	$43,0 \pm 4,1^{*,**}$	$64,1 \pm 3,9$	63,3 \pm 3,1
	$54,8 \pm 5,6$	$56,1 \pm 5,7$	$63,4 \pm 3,1$	

Примечания: над чертой приведены показатели в остром периоде заболевания, под чертой – показатели после выздоровления; * $p < 0,05$ – достоверность отличий показателей детей с острыми респираторными заболеваниями от контрольной группы; *** $p < 0,05$ – достоверность отличий показателей детей 1 и 2 групп; ** $p < 0,05$ – достоверность отличий показателей детей 1, 2 группы и 3 группы.

У детей 3 группы в остром периоде заболевания в периферической крови наблюдалось достоверное увеличение числа только Т- и В-лимфоцитов, несущих

Таблица 2. Содержание в периферической крови обследованных детей числа Т- и В-лимфоцитов, несущих активационные молекулы CD25 и CD71 в острый период заболевания и после выздоровления

Показатели	Группы детей			Контрольная
	1	2	3	
CD3 $^+$, CD25 $^+$ -клетки, %	$18,9 \pm 1,4^{*,***,**}$	$15,0 \pm 1,2^*$	$14,6 \pm 1,1^*$	9,8 \pm 0,7
	$12,6 \pm 1,0^{*,***,**}$	$10,3 \pm 0,9$	$9,8 \pm 0,7$	

у детей 3 группы лимфоциты крови в острый период заболевания в РБТ на ФГА проявляли высокую пролиферативную активность, значения которой соответствовали уровню контрольной группы детей.

Топологическое исследование ядер лимфоцитов показало, что в острый период заболевания у часто болеющих детей 1 и 2 групп активность ядерного хроматина является достоверно более низкой, чем у детей 3 группы.

Показатель активации лимфоцитов (ПАЛ) в этот период в 1 группе составлял $1,61 \pm 0,08$, 2 группе – $1,64 \pm 0,08$, 3 группе – $1,85 \pm 0,07$ ($p < 0,05$ между показателями детей 1, 2 и 3 групп). После выздоровления у детей 1 группы этот показатель снижился до $1,53 \pm 0,07$, 2 группы – $1,38 \pm 0,05$, 3 группы – $1,34 \pm 0,04$, в контрольной группе он составлял $1,33 \pm 0,04$ ($p < 0,05$ между показателями детей 1, 2, 3 групп и контрольной группой). При фенотипировании лимфоцитов было установлено, что в остром периоде заболевания у детей 1 и 2 групп достоверно повышено содержание в крови Т- и В-лимфоцитов (CD3 $^+$ и CD19 $^+$), экспрессирующих молекулы CD25 и CD71, по сравнению с контрольной группой детей (Табл.2).

Молекула CD25 представляет собой α -цепь ИЛ-2 рецептора, участвует в передачи активационного сигнала внутрь клетки; молекула CD71 – рецептор трансферрина, который экспрессируется на пролиферирующих лимфоцитах.

После выздоровления доля клеток, экспрессирующих эти рецепторы, у детей 2 группы снижалась до нормальных значений, у детей 1 группы оставалась достоверно выше нормы (Табл.2).

CD25. После выздоровления число этих клеток, как и у детей 2 группы, нормализовывалось.

Показатели	Группы детей			Контрольная
	1	2	3	
CD19 ⁺ , CD25 ⁺ -клетки, %	14,5 ± 1,1 ^{*,***,**}	10,6 ± 0,9 ^{*,**}	7,7 ± 0,6 [*]	5,4 ± 0,5
	10,9 ± 0,9 ^{*,***,**}	6,1 ± 0,6	5,4 ± 0,5	
CD71 ⁺ -клетки, %	11,9 ± 0,7 ^{*,***,**}	6,7 ± 0,5 ^{*,**}	4,8 ± 0,4	4,3 ± 0,3
	7,8 ± 0,6 ^{*,***,**}	4,8 ± 0,4	4,3 ± 0,3	

Примечания: над чертой приведены показатели в остром периоде заболевания, под чертой – показатели после выздоровления; * p<0,05 – достоверность отличий показателей детей с острыми респираторными заболеваниями от контрольной группы; *** p<0,05 – достоверность отличий показателей детей 1 и 2 групп; ** p<0,05 – достоверность отличий показателей детей 1, 2 групп и 3 группы.

Было установлено, что в остром периоде заболевания мононуклеары крови детей 1 и 2 групп обладали более низким потенциалом в индуцированной продукции ИЛ-2 и ИНФγ, чем клетки детей 3 и контрольной групп (Табл.3). Известно, что ИЛ-2

является важным фактором активации иммунокомпетентных клеток и иммунного ответа; ИНФγ – обладает антипролиферативным и иммунорегуляторным действием, способен индуцировать продукцию ИНФα и ИНФβ.

Таблица 3 ФГА-индуцированная in vitro продукция ИЛ-2 и ИНФγ мононуклеарами крови детей основной группы (1) и групп сравнения (2,3) в остром периоде заболевания и после выздоровления

Показатели	Группы детей			Контрольная
	1	2	3	
ИЛ-2, пг/мл	279,5 ± 50,4 ^{*,**}	287,6 ± 50,6 ^{*,**}	462,3 ± 48,7	487,3 ± 44,5
	401,7 ± 60,8	409,7 ± 60,7	483,9 ± 31,6	
ИНФγ, пг/мл	213,7 ± 38,1 ^{*,**}	224,6 ± 38,5 ^{*,**}	381,7 ± 42,3	372,6 ± 41,6
	270,6 ± 41,2 ^{*,**}	273,5 ± 41,6 ^{*,**}	373,5 ± 40,9	

Примечания: над чертой приведены показатели в остром периоде заболевания, под чертой – показатели после выздоровления; * p<0,05 – достоверность отличий показателей детей с острыми респираторными заболеваниями от контрольной группы; * p<0,05 – достоверность отличий показателей детей 1, 2 группы и 3 группы.

После выздоровления у детей 1 и 2 групп активность индуцированной продукции клетками ИЛ-2 приближалась к значениям контрольной группы детей, а ИНФγ – оставалась достоверно ниже.

Обращает внимание, что у детей 1 группы после выздоровления, в отличие от детей 2 и 3 групп, отмечалась повышенная спонтанная продукция мононуклеарами ИЛ-2 (1 группа – 183,9 ± 31,5

пг/мл, 2 группа – 93,8 ± 17,6 пг/мл, 3 группа – 87,6 ± 14,5 пг/мл, контрольная группа – 87,3 ± 14,3 пг/мл).

В остром периоде заболевания у детей 1 и 2 групп концентрация в сыворотке крови ИНФα и ИНФγ была значительно ниже, чем у детей 3 группы (Табл.4). Более низкая концентрация ИНФα у детей этих групп регистрировалась и после выздоровления.

Таблица 4. Концентрация ИНФα и ИНФγ в сыворотке крови обследованных детей в остром периоде заболевания и после выздоровления

Показатели	Группы детей			Контрольная
	1	2	3	
ИНФα, пг/мл	5,8 ± 0,7 ^{*,**}	5,7 ± 0,7 ^{*,**}	9,8 ± 1,3	8,0 ± 1,0
	6,1 ± 0,8 ^{*,**}	6,1 ± 0,8 ^{*,**}	8,1 ± 1,1	
ИНФγ, пг/мл	7,3 ± 0,8 ^{*,**}	7,3 ± 0,8 ^{*,**}	10,9 ± 1,3	9,8 ± 1,2
	8,6 ± 0,9	8,7 ± 0,9	9,8 ± 1,2	

Примечания: над чертой приведены показатели в остром периоде заболевания, под чертой – показатели после выздоровления; * p<0,05 – достоверность отличий показателей детей с острыми респираторными заболеваниями от контрольной группы; ** p<0,05 – достоверность отличий показателей детей 1, 2 группы и 3 группы.

Проведенные исследования показали, что у часто болеющих детей 1 и 2 группы по сравнению с детьми 3 группы, относящимися к категории эпизодически болеющих, в остром периоде заболевания значительно снижены способность лимфоцитов к индуцированной бласттрансформации и продукции

ИЛ-2 и ИНФγ, активность ядерного хроматина, концентрация в сыворотке крови ИНФα и ИНФγ.

После выздоровления у детей сохраняется низкий потенциал лимфоцитов к индуцированной бласттрансформации и продукции цитокинов, сниженное содержание в сыворотке крови ИНФα. Вероятно, это обстоятельство является одной из причин неспособности организма детей развивать полноценно

ную иммунную реакцию и формировать стойкий иммунитет к инфекциям.

Отличительной чертой часто болеющих детей с синдромом ЛАП от часто болеющих детей, у которых развития ЛАП не наблюдалось, является то, что в остром периоде заболевания и после выздоровления в их периферической крови наблюдается достоверное повышение числа активированных Т- и В-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$ и $CD19^+CD25^+$) и лимфоцитов с маркером активно пролиферирующих клеток ($CD71$), увеличение количества спонтанно пролиферирующих клеток. После выздоровления у часто болеющих детей с синдромом ЛАП мононуклеары крови также проявляют повышенную способность к спонтанной продукции ИЛ-2 и более высокую активность ядерного хроматина.

Следует заметить, что факторы, с которыми связаны обнаруженные изменения в иммунном статусе детей с синдромом ЛАП, до настоящего времени не установлены. Можно предположить, что особенности иммунореагирования этой категории детей ассоциированы с несовершенством или нарушением механизма контроля и регуляции процессов иммуногенеза, формирование и окончательное становление которых происходило под влиянием различных неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе и под влиянием персистенции инфекции. В результате воздействия неблагоприятных факторов в клетках могла сформироваться и закрепиться неадекватность реакции на инфекционные воздействия и поликлональный характер реагирования на отдельный агент. В то же время нельзя исключить и генетическую предрасположенность клеток к гиперреакциям и поликлональному типу реагирования на естественные раздражители, которыми и являются инфекционные агенты. В этом случае инфекционные возбудители выступают лишь фактором, проявляющим эти особые свойства иммунокомпетентных клеток. В пользу особого иммунного статуса часто болеющих детей с синдромом ЛАП свидетельствует тот факт, что подобный характер иммунного реагирования у часто болеющих детей без синдрома ЛАП не наблюдается.

Выводы

1. У детей, страдающих частыми острыми респираторными инфекциями, в остром периоде заболевания отмечается значительное снижение blastogenesis лимфоцитов на ФГА, продукции ИЛ-2 и ИНФ γ , активности ядерного хроматина, концентрации в сыворотке крови ИНФа и ИНФ γ , сохраняющееся и после окончания заболевания.

2. Отличительной особенностью лимфоидной популяции часто болеющих ОРВИ детей с синдромом лимфаденопатии является повышенное содержание в крови Т- и В-лимфоцитов ($CD3^+$ и $CD19^+$), экспрессирующих молекулы $CD25$ и $CD71$, как в остром периоде заболевания, так и после выздоровления.

3. После выздоровления лимфоциты часто болеющих детей с ЛАП обладают повышенной активностью ядерного хроматина и способностью к усиленной спонтанной продукции ИЛ-2.

Список літератури

1. Андрейчин М.А., Чоп'як В.В., Господарский І.Я. Клінічна імунологія та алергологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 372 с.
2. Сафонова О.А., Пичугин А.В., Кожемякина Е.Ш., Малышев Н.А., Атауллаханов Р.И. Иммуноterapia острой респираторной инфекции и ее осложнений// Иммунология. - 2009. - №1. - С.30-49.
3. Клиническая иммунология / Под ред. А.В.Караулова. – М: Медицинское информационное агентство, 1999. – С.342.
4. Евглевский А.А. Способ прогнозирования течения раневого процесса. Пат. №216367. – 2000, Россия.
5. Эренпрейса Е.А., Сандоре О.Ю. Связь феномена ядерной ахроматии с активацией клеток к пролиферации// Эксп.онкол. – 1989. – Т II. – С.61-63.
6. Лыков А.П., Сахнов Л.В., Козлов В.А. Продукция цитокинов (интерлейкина 1β , фактора некроза опухоли α) мононуклеарами крови у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС// Иммунология. - 1998. - №1. – С.57-59.

УДК 618.9..616.428

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ЛИМФАДЕНОПАТИИ

Попов Н.Н., Савво А.Н., *Романова Е.А.

Изучены характеристики лимфоидной составляющей периферической крови детей, страдающих частыми острыми респираторными инфекциями (ОРИ) без и с синдромом лимфаденопатии (ЛАП). Характерными нарушениями часто болеющих ОРВИ детей являются значительное снижение индуцированной РБТЛ на ФГА, продукции лимфоцитами ИЛ-2 и ИНФ γ , активности их ядерного хроматина, концентрации в сыворотке крови ИНФа и ИНФ γ в период и после заболевания. Отличительными особенностями лимфоидной составляющей крови часто болеющих детей с ЛАП являются увеличение доли Т- и В-лимфоцитов, несущих маркеры активированных ($CD25^+$) и активно пролиферирующих ($CD71^+$) клеток как в остром периоде заболевания, так и после выздоровления, а также повышенная активность ядерного хроматина и способность к усиленной спонтанной продукции ИЛ-2 мононуклеарами после окончания болезни.

Ключевые слова: лимфоциты, острые респираторные инфекции, лимфаденопатия.

УДК 618.9..616.428

FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOCYTES OF OFTEN BEING ILL CHILDREN WITH THE SYNDROME OF LYMPHADENOPATHY

Popov N.N., Savvo A.N., Romanova E.A.

Descriptions of lymphoid constituent of peripheral blood of children sufferings by frequent acute respiratory infections (ARI) without and with the syndrome of lymphadenopathy (LAP) are studied. By characteristic violations of often being ill ARI children are considerable decline of stimulation RBTL on PHA, to the

products by lymphocytes IL-2 and INF γ , to activity of their nuclear chromatin, to the concentration in the serum of blood of INF α and INF γ in a period and after the disease. Increase the part of T- and B-lymphocytes, bearings markers activated (CD25⁺) and actively proliferated (CD71⁺) cells both in the acute period of disease and after convalescence, and also overactivity of nuclear chromatin and capacity for the increased spontaneous products IL-2 by mononuclears after completion of illness are the distinctive features of lymphoid part of blood of often being ill children.

Key words: lymphocytes, acute respirators infections, lymphadenopathy.

УДК 618.9..616.428

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ
ЛІМФОЦИТІВ ЧАСТО ХВОРИЮЧИХ ДІТЕЙ З
СИНДРОМОМ ЛІМФАДЕНОПАТІЇ**

Попов М.М., Савво О.М., *Романова О.А.

Вивчено характеристики лімфоїдної складової периферичної крові дітей, які потерпають від частих гострих респіраторних інфекцій (ГРІ) без та з синдромом лімфаденопатії (ЛАП). Характерними зрушеннями часто хворіючих на ГРІ дітей є значне зниження індукованої РБТЛ на ФГА, продукції лімфоцитами ІЛ-2 та ІНФ γ , активності їх ядрового хроматину, концентрації у сироватці крові ІНФ α та ІНФ γ в період та після захворювання. Відмітними особливостями лімфоїдної складової крові часто хворіючих дітей з ЛАП є збільшення частки Т- та В-лімфоцитів, що несуть маркери активованих (CD25⁺) та активно проліферуючих (CD71⁺) клітин як під час гострого періоду захворювання, так і після одужання, а також підвищена активність ядрового хроматину і здатність до посиленої спонтанної продукції ІЛ-2 мононуклеарами після закінчення хвороби.

Ключові слова: лімфоцити, гострі респіраторні інфекції, лімфаденопатія.