

- [Forecasting and early diagnosis of severe cerebral disorders in preterm infants] // *Pediatrics*. 2015; 1: 13–18. (In Russ)
8. Давыдова И.В., Яцык Г.В., Бершова Т.В., и др. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей // *Пульмонология*. 2009; 4: 80–84. Davydova I.V., Yatsyk G.V., Berhova T.V., et al. [Matrix metalloproteinases biomarkers formation of bronchopulmonary dysplasia in children] // *Pulmonology*. 2009; 4: 80–84. (In Russ)
 9. Хворостов И.Н., Дамиров О.Н., Смирнов И.Е., и др. Кальпротектин и матриксные металлопротеиназы при язвенно-некротическом энтероколите у новорожденных детей // *Российский педиатрический журнал*. 2013; 6: 37–44.
 10. Yang Y., Hill J.W., Rosenberg G.A. [Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders] // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 99: 241–263.
 11. Собчак Д.М., Волский Н.Е., Свинцова Т.А., и др. Иммунная система человека и особенности патогенеза герпетической инфекции (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2014; 6(3): 118–127. Sobchak D.M., Volsky N.E., Svintcova T.A., et al. [The human immune system and especially the pathogenesis of herpes infection (Review)] // *Modern Technologies in Medicine*. 2014; 6(3): 118–127. (In Russ)
 12. Bostikova V., Salavec M., Smetana J., Sleha R., Coufalova M., Splina M., Bostik P. [Infections caused by human alpha herpes viruses] // *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 2014; 63(3): 205–212.
 13. Аникина А.Г., Потапова О.В., Шкурупий В.А., Шаповалов А.М. Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибитора в развитии раннего фиброза легких при гриппе А/Н5N1 А/Goose/Krasnoozersoye/627/05 у мышей // *Бюллетень экспериментальной*
 - newborn infants.] // *Russian Journal of Pediatrics*. 2013; 6: 37–44. (In Russ)
 14. Paim L.R., Schreiber R., Matos-Soura J.R., Silva A.A., Campos L.F., Azevedo E.R. [Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and cecotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects] // *Atherosclerosis*. 2013; 231(2): 341–345.

Metadata citation

Изменение структуры хромосом лимфоцитов при персистирующих инфекциях у детей

В. С. СЕВРЮКОВА¹, Е. О. ХАЛТУРИНА², П. Е. ДОБРЯКОВ¹, В. С. КОЖЕВНИКОВ¹

АО «ДиЛУЧ» Санаторно-курортный комплекс¹, Анапа,
ГБОУ ВПО Первый московский медицинский университет им. И.А. Сеченова², Москва, РФ

Дети с хроническими заболеваниями респираторного тракта были обследованы на наличие IgM и IgG антител в сыворотке крови против вирусов (Herpes simplex, Epstein-Barr, Cytomegalovirus) и бактерий (*Chlamydia trachomatis + pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) методом ELISA. Параллельно определяли длину теломер лимфоцитов периферической крови с помощью гибридизации *in situ* и проточной цитометрии (FlowFISH) с целью сравнения длины теломер у серопозитивных и серонегативных пациентов. Применение регрессионного анализа и анализа альтернативных признаков (в процентах) позволило нивелировать возрастные отличия серопозитивной и серонегативной групп и установить, что теломеры лимфоцитов детей, имеющих антитела против вирусов в различных сочетаниях, в том числе в сочетаниях с антителами против бактерий, короче теломер лимфоцитов серонегативных детей того же возраста.

Ключевые слова: теломеры, лимфоциты, вирусные инфекции, дети

Changes in the Structure of the Chromosomes of Lymphocytes during Persistent Infection in Children

V. S. Sevryukova¹, E. O. Khalturina², P. E. Dobryakov¹, V. S. Kozhevnikov¹

The Joint Stock Company «DiLUCH» Health Resort Complex¹, Anapa,
First Moscow State Medical University after I.M. Sechenov², Moscow, Russia

Children with chronic diseases of respiratory tract were investigated for IgM and IgG serum antibodies to viruses (Herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus) and bacteria (*Chlamydia trachomatis + pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) by ELISA and for telomere length of their lymphocytes by fluorescent hybridization *in situ* followed by flow cytometry (FlowFISH). The purpose of the study was to compare the lymphocyte telomere length of these seropositive and seronegative children. Regression analysis and analysis of percent distribution relative to the regression line have compensated age differences between seropositive and seronegative groups and demonstrated shorter telomeres in lymphocytes of children those have serum antibodies to viruses in all combinations (including combinations with antibodies to bacteria) in contrast to seronegative children of the same age.

Keywords: telomeres, lymphocytes, viral infections, children

Контактная информация: Кожевников Владимир Сергеевич - д.м.н., профессор, консультант клинико-иммунологической лаборатории, АО «ДиЛУЧ» Санаторно-курортный комплекс; 353440, Краснодарский край, г-к Анапа, улица Пушкина, 22; 8(861)335-09-78; kvsiki@mail.ru
Kozhevnikov Vladimir, Ph.D., professor, consultant at laboratory of clinical immunology, The Joint Stock Company «DiLUCH» Health Resort Complex; 353440, Krasnodarskiy Krai, g-k Anapa, 22 Pushkina str.; kvsiki@mail.ru

УДК 616.9-005

Каждое деление соматической клетки сопровождается укорочением ДНК, входящей в состав концевых структур хромосом — теломер [1]. Потеря части теломерной ДНК проявляется, в частности, тем, что с воз-

растом укорачиваются теломеры клеток периферической крови, при этом у детей укорочение теломер происходит наиболее быстро [2–4].

Хронические воспалительные заболевания сопровождаются повышенной продукцией активных форм кислорода (оксидативный стресс), что является одной из универсальных причин укорочения теломер при патологии [5, 6]. Изменения длины теломер лимфоцитов описаны у детей при хронической ВИЧ-инфекции, инфекционном мононуклеозе [7, 8], и других «моноинфекциях», однако на практике часто выявляется сочетание двух и более инфекций вирусной и бактериальной этиологии. Это определило **цель** работы — сравнительное исследование длины теломер лимфоцитов детей, страдающих хроническими заболеваниями респираторного тракта, серонегативных и серопозитивных в отношении вирусных и бактериальных антигенов. Быстрое возрастное укорочение теломер у детей приводит к трудностям подбора соответствующих возрастных групп сравнения даже при сравнительно больших объёмах исследования. В связи с этим, в задачи исследования входил поиск адекватных статистических приёмов, позволяющих нивелировать возрастные различия при сравнении длины теломер клеток детей неоднородных возрастных групп.

Материалы и методы исследования

Венозную кровь забирали у детей с хроническими воспалительными заболеваниями респираторного тракта (синуситы, тонзиллиты, бронхиты и пр.) строго по показаниям и с информированного согласия родителей для исследования наличия антител к инфекционным агентам. Антитела классов IgM и IgG к вирусу простого герпеса, к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр, к цитомегаловирусу и к *Chlamydia trachomatis*, *pneumoniae* определяли с помощью иммуноферментных тест-систем производства НПО «Диагностические системы» (Россия), а антитела к *Mycoplasma pneumoniae* — с помощью IgM и IgG ELISA производства DRG (Германия).

Параллельно проводили определение количества теломерной ДНК лимфоцитов методом Flow-FISH, подробно описанным нами ранее [9].

Пробы исследовали на цитофлуориметре FACScan в программе CellQuest (Beckton Dickinson, США), оценивая интенсивность флуоресценции PNA, соответствующую количеству TTAGGG-повторов теломерной ДНК, в единичных клетках лимфоцитарного «поля» (агрегаты из двух и более клеток идентифицировали с помощью флуоресценции 7-ААД и в счёт не включали). За показатель флуоресценции PNA принимали разницу между величиной средней интенсивности флуоресценции исследованных клеток в опыте (PNA+) и таковой в контроле (PNA-). Параллельно клеткам лей-

ковзвеси исследуемых пациентов точно так же обрабатывали клетки линии 1301 в качестве стандарта. Интенсивность флуоресценции исследованных образцов сравнивали с таковой стандарта и высчитывали абсолютное содержание теломерной ДНК, выраженное в количестве тысяч пар нуклеотидов (ТПН), опираясь на предварительно полученные результаты исследования длины терминальных ДНК повторов (TRF) в клетках 1301 и лимфоцитах 5-ти разных доноров крови методом Southern Blotting.

Статистическую обработку полученных данных проводили в приложении MS Office Excel, оценивая вариационные ряды, достоверность показателей регрессии, различий средних величин и процентов (способом с использованием угловой трансформации) с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Возраст обследованных детей и количество теломерной ДНК (тДНК) лимфоцитов у них представлены в таблице 1. В зависимости от наличия антител, все дети были разделены на две группы. В группу 1 были включены дети без выявленных антител (серонегативные), в группу 2 — дети, у которых были выявлены антитела к бактериальным и (или) вирусным антигенам (серопозитивные). В этой группе антитела к хламидиям обнаружены у 4 детей, к микоплазме — у 20, к вирусу простого герпеса — у 14, вирусу Эпштейн-Барр — у 21, к цитомегаловирусу — у 23; при этом у 41 ребёнка определялись антитела против двух и более инфекционных агентов. Как видно из таблицы 1, среднее количество тДНК лимфоцитов в группе 2 (серопозитивные) было достоверно меньше, чем в группе 1. При этом средний и максимальный возраст детей в группе 2 был больше, чем в группе 1, в связи с чем мы попытались выяснить возможность зависимости различий длины теломер от возраста.

Для этого был проведён регрессионный анализ зависимости длины теломер от возраста в каждой исследуемой группе. Как видно из таблицы 1, математически ожидаемая величина (МОВ) количества тДНК в каждой группе до 3-го знака совпадает со средней величиной тДНК, полученной опытным путём. Это свидетельствует о том, что сравнение средних величин количеств тДНК групп 1 и 2 выявляет их различия, во многом зависящие от возраста, что не позволяет сделать однозначный вывод о различиях длины теломер лимфоцитов между детьми этих групп в зависимости от наличия антител.

Зависимость длины теломер лимфоцитов от возраста всех обследованных детей, выявленная с помощью регрессионного анализа, описывалась формулой: $y = 11,553 - 0,3768x$; где y — тДНК (ТПН), x — возраст (лет); $p = 0,001$. Результаты анализа количества «попаданий» индивидуальных значений количества тДНК выше или ниже математически ожидаемой величины (линии регрессии), вычисляемой с помощью

Таблица 1. Количество тДНК лимфоцитов и возраст обследованных детей

Параметр	Группа 1, (n = 13)	Группа 2, (n = 49)
Количество тДНК (ТПН)	11,624 ± 0,302	8,989 ± 0,285, $p_{1-2} = 0,002$
Возраст в годах, (min — max)	4,2 ± 0,34 (2–7)	5,6 ± 0,36 (2–14)
МОВ* тДНК (ТПН)	11,624 (для 4,2 лет)	8,989 (для 5,6 лет)

* — МОВ — математически ожидаемая величина

Таблица 2. Процент детей с количеством тДНК (ТПН) лимфоцитов меньше математически ожидаемой величины для их возраста

Показатель	Все дети	Группа 1	Группа 2
% детей с количеством тДНК ниже МОВ	48,4 ± 6,35 (30 из 62)	7,7 ± 7,39 (1 из 13)	59,2 ± 7,02 (29 из 49)
Достоверность различий			$p_{1-2} < 0,01$

Таблица 3. Процент детей с количеством тДНК (ТПН) лимфоцитов меньше МОВ в группах с антителами к разным видам инфекции

Показатель	Группа 1	Группа 2А	Группа 2Б	Группа 2В
% детей с количеством тДНК ниже МОВ	7,7 ± 7,39	25,0 ± 15,31	60,7 ± 6,70	76,9 ± 11,69
Количество наблюдений	13	8	28	13
Достоверность различий с группой 1		$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$

данной формулы, для каждого возраста с интервалом в 1 год, представлены в таблице 2. Они демонстрируют достоверно больший процент индивидуумов, имеющих длину теломер лимфоцитов меньше МОВ для их возраста, в группе 2 (серопозитивных) по сравнению с группой 1 (серонегативных).

Далее подобный анализ был проведён для групп детей, различающихся по специфичности антител. В группу 2А включили детей с антителами к антигенам бактерий, в группу 2Б — к вирусам и в группу 2В — как к бактериям, так и к вирусам. Как видно из таблицы 3, по сравнению с группой 1, достоверно больший процент детей, имеющих теломеры лимфоцитов короче МОВ для своего возраста, выявлен для группы 2Б и 2В (соответственно, с антителами к вирусам и к бактериям в сочетании с антителами к бактериям). В группе 2А (антитела только к бактериям) подобных изменений не выявлено.

Полученные нами данные касаются только больных детей и демонстрируют их гетерогенность по показателям серопозитивности и длине теломер, укорочение которых оказалось ассоциированным не только с возрастом, но и с наличием антител против исследованных вирусов. Укорочение теломер лимфоцитов детей, инфицированных вирусами, вполне объяснимо, если принять во внимание способность вирусных компонентов вызывать укорочение теломер, взаимодействуя непосредственно с теломерной ДНК, белками, участвующими в организации структуры теломер и формировании гетерохроматина, а также с теломеразой [10]. Большое значение имеет также накопление массы вирус-специфических клеток с укороченными теломерами за счёт их большей репликативной активности [8, 11]. Укорочение теломер обеспечивает и оксидативный стресс, сопровождающий хроническое воспаление, присутствующее у обследованных нами детей, однако вклад этого фактора мы оценить не можем, поскольку не можем сравнить длину теломер серонегативных и серопозитивных детей с хронической патологией с длиной теломер здоровых детей, которые не участвовали в исследовании по этическим соображениям.

Заключение

Результаты наших исследований свидетельствуют об укорочении теломер лимфоцитов детей с хроническими заболеваниями респираторного тракта, у которых выявлены антитела к цитомегаловирусу, вирусу простого

герпеса и Эпштейна-Барр в разных сочетаниях, в том числе в сочетании с антителами к бактериям *Chlamydia (trachomatis + pneumoniae)* и (или) *Mycoplasma pneumoniae*, по сравнению с серонегативными детьми того же возраста. Такой вывод сделан на основе регрессионного анализа в сочетании с анализом альтернативных признаков, что позволило нивелировать возрастные различия групп серопозитивных и серонегативных детей. Анализ позволил также оценить «вклад» типа персистирующей инфекции, в данном случае вирусной, в качестве определяющего фактора укорочения теломер лимфоцитов детей с хроническими заболеваниями респираторного тракта.

Литература/References:

- Blackburn E.H. Structure and function of telomeres // *Nature*. 1991; 350: 569–572.
- Aubert G., Lansdorp P.M. Telomeres and Aging // *Physiol. Rev*. 2008; 88: 557–579.
- Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry // *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 743–747.
- Zeichner S.L., Palumbo P., Feng Y.R., Xiao X. et al. Rapid Telomere Shortening in Children // *Blood*. 1999; 93: 2824–2830.
- Effros R.B. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress // *Experimental Gerontology*. 2011; 46: 135–140.
- Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabha F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 4917312–4917315.
- Côté H.C.F., Soudeyns H., Thorne A. et al. Leukocyte Telomere Length in HIV-Infected and HIV-Exposed Uninfected Children: Shorter Telomeres with Uncontrolled HIV Viremia // *PLOS ONE*. 2012; July 16 (online).
- Plunkett F.J., Soares M.V.D., Annels N., Hislop A., Ivory K, Lowdell M., Salmon M., Rickinson A, Akbar A.N. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8 T cells during acute Epstein-Barr virus infection // *Blood*. 2001; 97: 700–707.
- Борисов В.И., Кожевников В.С., Сеньюков В.В., Сизиков А.Э. и др. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите // *Мед. иммунология*. 2006; 1: 87–90. Borissov V.I., Kozhevnikov V.S., Senyukov V.V., Sizikov A.E. et al. [Shortening Telomere Length of Monocytes in Rheumatoid Arthritis] // *Med. Immunology*. 2006; 1: 87–90. (In Russ).
- Deng Z., Wang Z. and Paul M. Lieberman P.M. Telomeres and viruses: common themes of genome maintenance // *Front. Oncol*. 2012; 31 December (online).
- Van de Berg P.J., Griffiths S.J., Yong S.-L., Macaulay R. et al. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere // *J. Immunol*. 2010; 184: 3417–3423.