

Богданова Л.В., Фомин В.В., Чеснакова О.А., Хаманова Ю.Б., Шарова А.А., Бейкин Я.Б., Савинова Т.Л., Удилова Е.Е.

Межклеточные иммунологические реакции у здоровых и больных детей дошкольного возраста

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра инфекционных болезней и клинической иммунологии, г. Екатеринбург; ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра профилактической и семейной медицины, г. Екатеринбург; МУ Центр лабораторной диагностики, г. Екатеринбург; Управление здравоохранения, г. Екатеринбург

Bogdanova L.V., Fomin V.V., Chesnakova O.A., Khamanova Y.B., Sharova A.A., Beykin J.B., Savinova T.L., Udilova E.E.

Intercellular immunologic reactions at healthy and sick children of pre-school age

Резюме

Целью работы являлась оценка межклеточных адаптивных иммунных реакций в норме и при острых инфекционных заболеваниях у детей. Проанализированы возможные межклеточные связи CD3+ Т-лимфоцитов, содержащих эндоплазматические цитокины, и фагоцитарноактивных моноцитов с субпопуляциями лимфоцитов у 19 здоровых детей и у 130 больных острыми инфекциями. На основании клинико-иммунологических данных и корреляционного анализа предложена гипотеза образования адаптивно-компенсаторных межклеточных реакций, сохраняющих гомеостаз у здоровых и больных детей. У здоровых детей отмечена реакция между спонтанными Т-лимфоцитами, содержащими цитокины IL2 и IFN γ , с натуральными киллерами (NK) и Т-цитотоксическими лимфоцитами (CD8+Т-клетками). У детей при энтеровирусной и герпетической инфекции наблюдалась реакция между фагоцитарноактивными моноцитами (ФАМ) с NK и CD8+Т-клетками, у больных скарлатиной наблюдалась реакция между ФАМ с фагоцитарноактивными нейтрофилами. **Ключевые слова:** дети, цитокины, фагоцитарноактивные моноциты, инфекции

Summary

Possible cellular interactions of CD3+ T-lymphocytes, containing endoplasmatic cytokines and phagocytically active monocytes with lymphocytes subsets of 19 healthy children and 130 children with acute infections were analysed. Based on clinico-immunologic data and correlation analysis the authors suggest the hypothesis of generation of adaptive-compensatory intercellular reactions, preserving homeostasis at healthy and sick children. At healthy children the reaction of spontaneous T-lymphocytes, containing cytokines IL2 and IFN γ with natural killers (NK) and T-cytotoxic lymphocytes (CD8+ T-cells) was noted. At children with enteroviral and herpetic infections was observed a reaction of phagocytically active monocytes (FAM) with NK and CD8+ T-cells. When scarlet fever the reaction was registered between FAM and phagocytically active neutrophils. **Key words:** children, cytokines, phagocytically active monocytes, infections

Введение

Лейкоциты крови постоянно взаимодействуют друг с другом контактным путем (временное сближение) или путем адгезии (длительное воздействие) [1,2]. Для распознавания антигенов нужен длительный контакт В-и Т-лимфоцитов с макрофагом при участии цитокинов [3,4]. Цитокины вырабатываются клетками иммунной системы и обеспечивают связь между клетками. IL2 активирует натуральные киллеры, которые на ранних этапах противoinфекционной защиты обеспечивают киллинг пораженных клеток-мишеней, что

поддерживает врожденный иммунитет. IFN γ обладает противовирусным действием, регулирует клеточный адаптивный иммунитет и совместно с МНС I активирует цитотоксические клетки (CD8+лимфоциты), которые уничтожают пораженные антигеном клетки [4]. Взаимодействие между клетками является важной проблемой для физиологии и патологии, и нуждается в дальнейшем изучении.

Целью работы являлась оценка межклеточных адаптивных иммунных реакций в норме и при острых инфекционных заболеваниях у детей.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 149 детей дошкольного возраста, из них 19 детей II группы здоровья, 51 ребенок с энтеровирусной инфекцией, 23 ребенка с ветряной оспой, 37 детей с инфекционным мононуклеозом, 19 детей страдало скарлатиной. У всех больных детей была отмечена среднетяжелая форма болезни. Лейко- и иммунограмма проведена в центре лабораторной диагностики (главный врач, профессор. д.м.н. – Я.Б. Бейкин). Параметры общего анализа крови регистрировались с помощью гематологического анализатора Cobas Micros 60 («АВХ»). Определение иммунологического профиля проводилось по общепринятым протоколам 1-го и 2-го уровня. Для оценки цитокин-синтезирующей способности Т-лимфоцитов, а также идентификации функциональных субпопуляций Т-хелперов первого и второго порядков – метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICCS). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³). Спонтанную продукцию IL2, IL4, IFN γ и TNF α CD3⁺-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали комбинацию РМА («Sigma», 50 ng/ml) с иномицином («Sigma», 1 ng/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием FITC-меченных анти-CD3⁺-моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Москва) и PE-конъюгированных анти - IL2, IL4, IFN γ и TNF α -антител (Caltag).

Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности, завершенности фагоцитоза) использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии МЗ РФ.

Полученные результаты обработаны на персональном компьютере с применением пакета программ Microsoft Excel и SPSS 8. Определялись медиана (Me), интервал средних значений (25 и 75 процентиля), коэффициенты корреляции Спирмана и Пирсона.

Результаты и обсуждение

Дети II группы здоровья.

При клиничко-лабораторном исследовании у 19 детей II группы здоровья, посещающих ДЮУ, были выявлены нормоцитоз, установлены уровень четырех классов иммуноглобулинов, число иммунокомпетентных клеток (таблицы 1 и 2). Показатели лейко- и иммунограммы этих детей были приняты как нормативные.

На ранних стадиях инфицирования без нарушения гомеостаза отмечается «тихий штилевой» период, иммунологические показатели клеточного и гуморального иммунитета нормальные. Расчет коэффициентов корреляции выявил положительные корреляционные связи между CD3⁺-Т-лимфоцитами, содержащими эндоплазматические цитокины с натуральными киллерами и Т-цитотоксическими клетками (CD3⁺/IL2⁺-Т-клетки с CD16⁺-лимфоцитами: rs=0,6; p=0,03; n=12 и CD3⁺/INF γ -Т-лимфоциты с CD8⁺-Т-клетками: rs=0,8; p=0,001; n=12). Выявленные корреляционные связи CD3⁺/IL2⁺-Т-клеток с CD16⁺-лимфоцитами, также CD3⁺/INF γ -Т-лимфоцитов с CD8⁺-Т-лимфоцитами не исключают взаимодействие между данными клетками, что, возможно, и обеспечивало раннюю противoinфекционную защиту и адаптивный иммунитет, и сохраняет здоровье детей.

Группа детей, больных острыми инфекциями.

В г. Екатеринбурге при охвате вакцинопрофилактикой 95% детей до 14 лет заболевание дифтерией, корью, эпидемическим паротитом, краснухой не регистрируется

Таблица 1. Показатели лейкограммы и иммунограммы детей II группы здоровья

Показатели гемограммы и иммунограммы	Дети II группы здоровья (n=19)	
	Me	P25 – P75
Лейкоциты, (*10 ⁹ /л)	7,100	6,500 – 7,900
Лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	3,480	3,275 – 3,680
Гранулоциты, (*10 ⁹ /л)	3,470	3,045 – 3,975
Моноциты, (*10 ⁹ /л)	0,250	0,150 – 0,375
Фагоцитарная активность нейтрофилов (%)	92,650	90,625 – 95,350
Фагоцитарная активность нейтрофилов (10 ⁹ /л)	3,215	2,888 – 3,797
Фагоцитарная активность моноцитов (%)	74,400	69,700 – 83,100
Фагоцитарная активность моноцитов (10 ⁹ /л)	0,240	0,134 – 0,279
Бактерицидная активность лейкоцитов (%)	43,200	24,050 – 45,000
Спонтанный НСТ-тест (%)	18,000	10,500 – 26,000
CD20 ⁺ - лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	0,580	0,460 – 0,740
Иммуноглобулины А, г/л	0,800	0,550 – 1,450
Иммуноглобулины М, г/л	1,200	1,050 – 1,700
Иммуноглобулины G г/л	8,400	7,350 – 9,900
Иммуноглобулины E ME/мл	15,200	2,900 – 34,450
ЦИК, ед.оп.пл.	33,000	17,000 – 51,000
CH50	50,400	46,600 – 52,900
CD3 ⁺ -Т- лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	2,370	2,080 – 2,510
CD4 ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	1,290	1,015 – 1,540
CD8 ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	0,790	0,695 – 0,880
CD16 ⁺ -лимфоциты, (*10 ⁹ /л)	0,430	0,320 – 0,498

Таблица 2. Число CD3+/-Т-лимфоцитов, содержавших эндоплазматические цитокины, у детей II группы здоровья.

Показатели	Дети II группы здоровья (n=19)	
	Me	P25 – P75
Спонтанные CD3 ⁺ /INFg ⁺ -Т- лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,020	0,010 – 0,030
Стимулированные CD3 ⁺ /INFg ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,480	0,393 – 0,543
Коэффициент стимуляции CD3 ⁺ /INFg ⁺ -Т-лимфоцитов	24,250	16,900 – 38,500
Спонтанные CD3 ⁺ /TNFα ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,030	0,018 – 0,050
Стимулированные CD3 ⁺ /TNFα ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,550	0,490 – 0,785
Коэффициент стимуляции CD3 ⁺ /TNFα ⁺ -Т-лимфоцитов	15,900	13,375 – 30,050
Спонтанные CD3 ⁺ /IL2 ⁺ -Т- лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,025	0,010 – 0,040
Стимулированные CD3 ⁺ /IL2 ⁺ -Т-лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,520	0,408 – 0,683
Коэффициент стимуляции CD3 ⁺ /IL2 ⁺ -Т-лимфоцитов	23,250	13,150 – 40,750
Спонтанные CD3 ⁺ /IL4 ⁺ -Т- лимфоциты, (*10 ⁹ г/л)	0,015	0,010 – 0,023

с 2003 г. Среди детей дошкольного возраста часто регистрируются энтеровирусная инфекция, инфекционный мононуклеоз, ветряная оспа и скарлатина, при которых и изучались возможные межклеточные связи между иммунокомпетентными клетками.

Каждые из этих инфекции имеет клинико-иммунологические и возрастные особенности, хорошо описанные на протяжении последних десятилетий в научной монографической литературе. Между тем не изучались общие закономерности межклеточных взаимосвязей иммунокомпетентных клеток.

Энтеровирусная инфекция, менингеальная форма.

В стартовой лейко- и иммунограмме на 4-7 день болезни наблюдается незначительный лейкоцитоз, нейтрофилез без палочкоядерного сдвига, моноцитоз, лимфопения, число функционально активных моноцитов и нейтрофилов, натуральных киллеров, спонтанных Т-клеток, содержащих эндоплазматические цитокины INFγ, TNFα, IL2 было повышено. Положительный коэффициент корреляции наблюдался между ФАМ и натуральными киллерами, Т-цитотоксическими лимфоцитами и CD3+/INFγ+-Т-клетками (r=0,5; p<0,01; n=51).

Ветряная оспа.

Общей иммунологической закономерностью у детей с ветряной оспой является транзиторная Т- и Th- лимфопения, повышение уровня IgM, ЦИК, числа спонтанных CD3+/INFγ+- Т- лимфоцитов, что сопровождалось супрессией супероксидных нейтрофилов. Установлены положительные коэффициенты корреляции между числом ФАМ и CD8+-Т-клеток (r=0,5; p<0,01;n=23), чис-

лом ФАМ и содержанием натуральных киллеров (r=0,5; p<0,01;n=23), числом CD3+/INFγ+- Т и CD8+-Т-клеток(r=0,5; p<0,01;n=23).

Инфекционный мононуклеоз.

На первой неделе болезни развивался лимфомоноцитоз, гипериммуноглобулинемия G₂M₄, происходило увеличение числа натуральных киллеров, Т-цитотоксических лимфоцитов и концентрации ЦИК, что не позволяло исключить развитие на первой неделе иммунного воспаления. В остром периоде наблюдались положительные коэффициенты корреляции между числом ФАМ и Т-цитотоксических лимфоцитов, между числом CD3+/INFγ+-Т-лимфоцитов и числом фагоцитарно-активных моноцитов.

Скарлатина.

В первые 3-4 дня болезни у детей больных скарлатиной наблюдался нормоцитоз, число нейтрофилов соответствовало норме, отмечалось повышение ФАМ и фагоцитарноактивных нейтрофилов (ФАН), спонтанных CD3+/INFγ+-Т-клеток и высокий уровень IgM. Отмечены положительные коэффициенты корреляции между числом ФАМ и ФАН, числом ФАМ и числом спонтанных CD3+/INFγ+-Т-клеток.

Таким образом, в работе установлено, что общей иммунологической закономерностью в остром периоде вирусных и бактериальных инфекций у детей дошкольного возраста является повышение числа ФАМ, спонтанных Т-лимфоцитов, содержавших провоспалительные цитокины INFγ, TNFα, IL2, уровня ЦИК и положительные коэффициенты корреляции между ФАМ с клетками-эффекторами (NK, CD8+-Т-лимфоциты, ФАН).

Выявленная иммунная перестройка и межклеточные связи при энтеровирусной, герпетической и стрептококковой инфекции отражали два параллельных процесса: развитие воспаления и формирование иммунного ответа. Главной и основной клеткой был макрофаг. Под влиянием антигенного воздействия активируется рецепторы макрофага, что способствует увеличению численности спонтанных CD3⁺-Т-лимфоцитов, содержащих провоспалительные цитокины, что отражает развитие острого воспаления. Однако INF γ обладает регулирующим влиянием на развитие адаптивного и врожденного клеточного иммунитета, что в дальнейшем обеспечивало благоприятное течение болезни.

При расчете коэффициентов корреляции у здоровых детей дошкольного возраста установлена положительная корреляционная связь между иммунокомпетентными клетками, которая могла быть случайной. Однако у больных детей инфекционными заболеваниями данная связь не наблюдалась, что позволило нам принять связь между спонтанными Т-лимфоцитами и эффекторными клетками как характерную для здоровых детей.

Заключение

Таким образом, выявленные корреляционные связи позволяют уточнить иммунопатогенез сохранения гомеостаза у здоровых и больных детей вирусными и бактериальными инфекциями. Полученные нами результаты не противоречат клиническим и лабораторным данным, являются лишь гипотезой предполагаемых событий. ■

Богданова Л.В., Фомин В.В., Чеснакова О.А., Хаманова Ю.Б., Шарова А.А., Бейкин Я.Б., Савинова Т.Л., Удилова Е.Е., ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра инфекционных болезней и клинической иммунологии, г. Екатеринбург; ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра профилактической и семейной медицины, г. Екатеринбург; МУ Центр лабораторной диагностики, г. Екатеринбург; Управление здравоохранения, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - проф. Фомин В.В. Екатеринбург, ул. А. Валека, 12-184. E-mail: fominvv@e1.ru.

Литература:

1. Поликар А., Беси М. Элементы патологии клетки, М: Мир; 1970. 248.
2. Уолмор К., Де Мелло. Межклеточные взаимодействия. М: Медицина; 1980. 175-197.
3. Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина; 1970. 67-85.
4. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб: Фолиант; 2008. 412-441.