

© Л.М. КУРТАСОВА, Т.В. ЛУБНИНА, 2012

УДК 616.2-022-053.2-092:612.017.01-078.33

Л.М. Куртасова<sup>1</sup>, Т.В. Лубнина<sup>2</sup>

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФЕРМЕНТНЫЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; <sup>2</sup>Краевой центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, 660049, Красноярск, ул. Карла Маркса, 45

*Обследованы 84 ребенка, часто болеющие острыми респираторными инфекциями, в возрасте от одного года до трех лет. Изучены параметры клеточного и гуморального иммунитета, фагоцитарная активность нейтрофилов крови, показатели НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови. Установлены изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов крови, снижение уровня IgA и тенденция к повышению концентрации IgM в сыворотке крови. Обнаружено увеличение содержания ЦИК в сыворотке крови. Выявлено уменьшение количества «активно работающих» нейтрофилов периферической крови. Наблюдаются изменения ферментного статуса лимфоцитов крови: повышение активности синтетических процессов и напряженность внутриклеточного энергетического обмена.*

Ключевые слова : иммунитет, фагоцитоз, ферменты, респираторная инфекция

L.M. Kurtasova<sup>1</sup>, T.V. Lubnina<sup>2</sup>

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND BLOOD LYMPHOCYTE ENZYME PROFILE IN BABIES WITH RECURRENT RESPIRATORY INFECTIONS

*<sup>1</sup>State educational institution of higher professional education Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V. F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health care and Social Development of the Russian Federation, 1, Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022; <sup>2</sup>Treasury State Budgetary Institution of healthcare Krasnoyarsk Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and other infectious diseases, 45, Karla Marksa Str., Krasnoyarsk, Russian Federation*

*84 babies aged 1 to 3 years suffered from recurrent respiratory infections were studied. Cellular and humoral immunological parameters, phagocytic activity of neutrophils and activities of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes were estimated. Immunophenotypic changes found in blood lymphocytes included decreased IgA levels and a tendency of serum IgM to increase. An elevated level of circulating immune complexes was revealed in the blood serum. Decreased levels active neutrophils in the peripheral blood were detected. In the enzyme status of blood lymphocytes such changes as increased levels of synthetic processes and intense intracellular energy metabolism can be observed.*

Key words : immunity, phagocytosis, enzymes, respiratory infection

В структуре инфекционной заболеваемости на долю острых респираторных инфекций приходится от 60 до 80% всей детской инфекционной заболеваемости [5, 6]. Необходимо отметить, что проблема инфекций дыхательных путей остается ведущей в педиатрической практике.

Детей с частыми респираторными инфекциями условно называют «часто болеющие дети» (ЧБД) и относят в группу диспансерного учета [3].

Последствиями рецидивирования респираторных заболеваний может быть снижение функциональной активности иммунной системы. Одним из перспективных направлений, позволяющих оценить функциональное состояние лимфоцитов – основного структурно-функционального элемента иммунной системы, является изучение их метаболических показателей. Действительно, все модуляторы функциональной активности прежде всего изменяют метаболизм клетки, переключая субстратный поток с одного метаболического пути

на другой, влияя на энергетику клетки и синтетические процессы.

В то же время именно в клетке начинается формирование ответных реакций на внешнее воздействие (в том числе и инфекционной природы), что позволяет составить представление об иммунологической стратегии, избранной организмом.

Кроме того, в настоящее время доказано, что функциональные проявления лимфоцитов происходят только при соответствующем изменении их метаболизма [8, 13, 17]. Следовательно, изменения иммунореактивности не могут не иметь метаболической основы.

Особенно актуальным представляется изучение метаболизма иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста. Именно у них можно ожидать наиболее значимые динамические изменения в клетке, связанные с бурными темпами процессов роста и дифференцировки, с одной стороны, и быстротой возникновения обменных нарушений на клеточном уровне вследствие воздействия патогенных факторов – с другой.

В связи с чем целью исследования явилось изучение иммунологических параметров и показателей НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с частыми острыми респираторными инфекциями.

Для корреспонденции: Куртасова Людмила Михайловна, д-р мед. наук, проф., каф. клинической иммунологии, e-mail: aids@kktk.ru

## Материалы и методы

Проведены наблюдения за 84 детьми в возрасте от одного года до трех лет, часто болеющими острыми респираторными инфекциями, в периоде клинического благополучия. Для включения ребенка в группу ЧБД использовали критерии, разработанные В.Ю. Альбицким и А.А. Барановым [1]. Контрольную группу составили 20 практически здоровых детей аналогичного возраста.

Лимфоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина [9]. Затем осуществляли биоллюминесцентное определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАДГДГ и НАДФГДГ соответственно), малатдегидрогеназы декарбокксилирующей (НАДФМДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР) [4]. Активность ЛДГ, МДГ, НАДГДГ и НАДФГДГ определяли как по прямым реакциям (по восстановлению НАД (Ф) до НАД(Ф)Н, так и по обратным (по окислению НАД(Ф)Н до НАД(Ф)). Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах (1 Е = 1 мкмоль/мин) на  $10^4$  клеток. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD (P): FMN оксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (полученном в Институте биофизики СО РАН, Красноярск). Измерение уровня биоллюминесценции осуществляли на биоллюминиметре БЛМ 8801 (Россия).

Методом непрямой иммунофлюоресценции, используя FITC-меченые моноклональные антитела серии CD фирмы «ДАКО», изучали содержание  $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_{19}^+$ -клеток в периферической крови. Концентрацию иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле [14]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом селективной преципитации [12].

Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови изучали в реакции с частицами латекса. Рассчитывали процент фагоцитирующих нейтрофилов и фагоцитарное число, т. е. среднее число поглощенных одним нейтрофилом частиц.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 («StatSoft, Inc.», США). Производили расчет средней арифметической величины ( $M$ ) и ошибки средней арифметической ( $\pm m$ ). Оценка достоверности различий средних величин производилась с использованием  $t$ - критерия Стьюдента. Критический уровень значимости ( $p$ ) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных выявил увеличение абсолютного числа лимфоцитов периферической

крови в группе ЧБД по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). Исследование иммунофенотипического спектра лимфоцитов крови установило статистически значимое снижение процентного содержания  $CD_4^+$ -клеток в группе ЧБД относительно контрольных величин. Кроме того, обнаружено повышение относительного и абсолютного количества  $CD_8^+$ -лимфоцитов крови в группе ЧБД по сравнению с параметрами контрольной группы (см. табл. 1). Изменения процентного соотношения  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ -клеток периферической крови в группе ЧБД приводили к статистически значимому снижению индекса дифференцировки относительно показателей контрольной группы (см. табл. 1).

Изучение показателей концентрации IgA, IgM и IgG в сыворотке крови выявило понижение уровня IgA и тенденцию к увеличению продукции IgM в группе ЧБД по сравнению с параметрами контрольной группы (см. табл. 1). Следует отметить в группе ЧБД увеличение концентрации ЦИК в сыворотке крови относительно значений контрольной группы (см. табл. 1).

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови показала, что в группе ЧБД снижено количество «активно работающих» клеток на фоне сохраненной ими поглотительной способности (см. табл. 1).

Анализ показателей НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови выявил изменения активности исследуемых ме-

Таблица 1

Иммунологические показатели у ЧБД ( $M \pm m$ )

Показатель	Контрольная группа ( $n = 20$ )	Группа ЧБД ( $n = 84$ )	$p$
Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	8,42 $\pm$ 0,15	9,35 $\pm$ 0,54	
Лимфоциты, %	45,1 $\pm$ 1,49	47,40 $\pm$ 1,82	
Лимфоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	3,43 $\pm$ 0,10	4,42 $\pm$ 0,33	< 0,01
$CD_3^+$ , %	61,9 $\pm$ 2,11	60,43 $\pm$ 1,78	
$CD_3^+$ , $\cdot 10^9/\text{л}$	2,10 $\pm$ 0,05	2,60 $\pm$ 0,17	
$CD_4^+$ , %	44,7 $\pm$ 1,73	36,07 $\pm$ 1,94	< 0,001
$CD_4^+$ , $\cdot 10^9/\text{л}$	1,52 $\pm$ 0,07	1,52 $\pm$ 0,11	
$CD_8^+$ , %	16,2 $\pm$ 1,35	20,87 $\pm$ 1,44	< 0,02
$CD_8^+$ , $\cdot 10^9/\text{л}$	0,54 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,09	< 0,001
$CD_4^+/CD_8^+$	2,92 $\pm$ 0,19	2,12 $\pm$ 0,25	< 0,01
$CD_{19}^+$ , %	11,45 $\pm$ 1,23	13,60 $\pm$ 1,59	
$CD_{19}^+$ , $\cdot 10^9/\text{л}$	0,38 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,04	
ФИ, %	58,75 $\pm$ 2,71	49,27 $\pm$ 2,46	< 0,001
ФЧ, усл. ед.	6,09 $\pm$ 0,29	6,55 $\pm$ 0,25	
IgA, г/л	0,97 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,10	< 0,01
IgM, г/л	0,9 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,13	0,1 > $p$ > 0,05
IgG, г/л	7,95 $\pm$ 0,39	9,18 $\pm$ 0,72	
ЦИК, усл. ед.	42,05 $\pm$ 3,32	53,70 $\pm$ 3,88	< 0,02

Примечание: Здесь и в табл. 2:  $p$  – достоверность различий с показателями.

Таблица 2

Показатели активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (в мкЕ) лимфоцитов крови у ЧБД ( $M \pm m$ )

Показатель	Контрольная группа ( $n = 20$ )	Группа ЧБД ( $n = 84$ )	$p$
Г-6-ФДГ	2,09 ± 0,36	13,86 ± 0,88	< 0,001
Г-3-ФДГ	2,56 ± 0,59	4,06 ± 0,22	< 0,05
ЛДГ	41,37 ± 4,07	18,80 ± 1,42	< 0,001
МДГ	20,14 ± 1,26	26,88 ± 1,94	< 0,01
НАДФМДГ	5,16 ± 0,77	7,56 ± 0,42	< 0,01
НАДФГДГ	1,92 ± 0,16	0,05 ± 0,002	< 0,001
НАДГДГ	6,22 ± 0,63	6,87 ± 0,85	
НАДИЦДГ	1,25 ± 0,10	4,17 ± 0,10	< 0,001
НАДФИЦДГ	10,22 ± 1,04	16,04 ± 1,78	< 0,01
НАДН-ЛДГ	66,20 ± 6,41	24,75 ± 1,81	< 0,001
НАДН-МДГ	123,04 ± 9,47	57,36 ± 5,92	< 0,001
ГР	12,37 ± 1,23	9,39 ± 0,93	0,1 > $p$ > 0,05
НАДН-ГДГ	174,52 ± 14,29	17,41 ± 1,67	< 0,001
НАДФН-ГДГ	151,94 ± 11,68	44,78 ± 4,30	< 0,001

Примечание: Здесь и в табл. 2:  $p$  – достоверность различий с показателями.

таблических ферментов в группе ЧБД (табл. 2). Так, установлено увеличение в 6,6 раза ( $p < 0,001$ ) активности Г-6-ФДГ-ключевого фермента пентозофосфатного цикла, продукты которого используются в реакциях макромолекулярного синтеза [16]. Кроме того, отмечалось повышение уровня Г-3-ФДГ-энзима, участвующего в передаче продуктов липидного катаболизма на гликолиз, что свидетельствует о возможном увеличении субстратного питания за счет продуктов липидного обмена, обычно происходящего при необходимости быстрой мобилизации энергии в клетке [15]. В то же время повышенный уровень активности Г-3-ФДГ в лимфоцитах крови предполагает и более активную работу в них глицерофосфатного шунта, обеспечивающего цикл Кребса водородом [11].

Следует отметить в группе ЧБД увеличение в лимфоцитах крови активности МДГ, НАДФМДГ, НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ относительно показателей контрольной группы (см. табл. 2). Это определяет повышение субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, вносящего наибольший вклад в процессы внутриклеточного энергообразования.

Наряду с этим отмечается недостаточная активность обратной реакции МДГ, что может отрицательно сказываться на работе малатаспартатного шунта. Снижение его работы отражается не только на энергетической функции митохондрий (через понижение поступления водорода в митохондрии), но и на состоянии окислительно-восстановительного потенциала цитоплазмы [7, 10].

Исследование активности прямой и обратной реакций ЛДГ в лимфоцитах крови выявило статистически значимое снижение уровня ЛДГ как по прямой, так и по обратной реакции в группе ЧБД по сравнению с контрольными величинами (см. табл. 2). Необ-

ходимо отметить в данной группе детей тенденцию к понижению уровня активности глутатионредуктазы в лимфоцитах крови относительно параметров группы контроля (см. табл. 2).

Полученные данные установили, что в группе ЧБД показатели активности НАДФГДГ, обр. НАДГДГ, обр. НАДФГДГ в лимфоцитах крови были ниже, чем у детей контрольной группы (см. табл. 2).

Таким образом, ферментный профиль лимфоцитов периферической крови у часто болеющих острыми респираторными инфекциями детей раннего возраста характеризуется активацией аэробного дыхания, высокой наработкой рибозо-5-фосфат и НАДФН-зависимых реакций макромолекулярного синтеза, снижением анаэробной реакции ЛДГ, что отражает понижение субстратного потока по гликолизу. Вероятно, компенсаторно увеличивается активность Г-3-ФДГ, способствующая более насыщенному поступлению продуктов метаболизма липидов и жиров на гликолиз, снижается роль малатаспартатного шунта в энергетике клетки, понижается через НАДФГДГ окисление продуктов аминокислотного обмена в реакциях цикла Кребса. Наблюдается ингибирование оттока интермедиатов через обр. НАДГДГ и обр. НАДФГДГ с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Кроме того, отмечается тенденция к понижению уровня глутатионредуктазы – фермента, который входит в систему антиоксидантной защиты клетки и в определенной мере модулирует пролиферативную активность лимфоцитов [2].

### Заключение

Результаты проведенных исследований установили, что у детей раннего возраста, часто болеющих острыми респираторными инфекциями, в период клинического благополучия отмечаются изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови, снижение уровня IgA и тенденция к повышению концентрации IgM, а также увеличение содержания ЦИК в сыворотке крови. Кроме того, наблюдается уменьшение количества «активно работающих» нейтрофилов периферической крови. Следует отметить, что изменения иммунологических показателей сочетаются с изменениями энзиматической активности лимфоцитов крови. Ферментный статус лимфоцитов крови характеризуется повышением активности пластических процессов и напряженностью внутриклеточного энергетического обмена.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения у часто болеющих острыми респираторными инфекциями детей раннего возраста иммунореабилитации. Учитывая высокую значимость метаболических реакций для функциональной клеточной активности и согласно полученным нами результатам исследования, можно предположить о возможности включения в комплекс иммунореабилитационных мероприятий у данной категории детей метаболической коррекции, направленной на восстановление внутриклеточного обмена иммунокомпетентных клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Альбицкий В.Ю., Баранов А.А. Часто болеющие дети (Клинико-социальные аспекты. Пути оздоровления). – Саратов, 1986.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р. и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // Вестн. РАМН. – 2010. – № 3. – С. 46–54.
3. Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика // Научно-практическая программа Союза педиатров России. – М., 2002.
4. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биоломинесцентным методом // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 23–25.
5. Самсыгина Г.А., Казюкова Т.В., Дудина Т.А. и др. Новые технологии в профилактике острых респираторных инфекций у группы детей младшего возраста // Педиатрия. – 2008. – № 5. – С. 102–107.
6. Современные подходы к лечению и реабилитации часто болеющих детей / Под ред. Л.С. Балевой, Н.А. Коровиной. – М., 2006.
7. Abbrescia D.I., La Piana G., Lofrumento N.E. Malate- aspartate shuttle and exogenous NADH /cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 518, № 2. – P. 157–163.
8. Bortell R., Moss J., McKenna R.C. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (nad) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface nad glycohydrolase and pyrophosphatase activities // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167, № 4. – P. 2049–2059.
9. Boynt A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21, Suppl. 97. – P. 77–80.
10. Contreras L., Satrustegui J. Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter /mitochondrial dehydrogenase pathways // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, № 11. – P. – 7091–7099.
11. Garcia-Solis P., Moncada-Alvarez M.C., Martinez-Coria H. et al. Glycerol-3- Phosphate dehydrogenase (E.C.1.1.1.8) is expressed in cultured chicken embryonic adipofibroblasts and upregulated by embryonic chicken serum// Poultry Sci. – 2002. – Vol. 81, № 11. – P. 1709–1713.
12. Haskova V., Kaslik J., Riha J., Rovensky J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation // J. Immunol. – 1978. – Vol. 154. – P. 399–406.
13. Kumaraguru U., Rouse R.J., Nair S.K. et al. Involvement of an ATP- dependent peptide chaperone in cross-presentation after DNA immunization // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165, N 2. – P. 750–759.
14. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion // Immunochemistry. – 1965. – Vol. 2, N 3. – P. 235–255.
15. Nogalska A., Pankiewicz A., Goyke E., Swierczynski J. The age-related inverse relationship between ob and lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue // Exp. Gerontol. – 2003. – Vol.38, N 4. – P. 415–422.
16. Norris M.G., Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 405, N 3. – P. 388–392.
17. Sorensen M., Skov H., Austrup H. et al. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes // Sci. Total Environ. – 2003. – Vol. 309, N 1–3. – P. 69–80.

Поступила 11.05.12

### Сведения об авторе:

**Лубнина Татьяна Викторовна**, врач-педиатр лечебно-консультативного отд-ния Красноярского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.9-022:579.862.1]-053.2-078.33

**Е.В. Саматова<sup>1,2</sup>, А.Е. Друй<sup>1,2,3</sup>, Г.А. Цаур<sup>2,3</sup>, Л.Г. Боронина<sup>1,2</sup>**

## **СЕРОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДЕТЕЙ НА СРЕДНЕМ УРАЛЕ, МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР**

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3; <sup>2</sup>ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1, 620149, Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32; <sup>3</sup>ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, 620075, Екатеринбург, ул. Соболева, 25

*В статье приведены результаты исследования серотипового спектра штаммов S. pneumoniae, проведенного с помощью метода мультиплексной ПЦР у детей с инвазивными, неинвазивными инфекциями и носителей, циркулирующих в Екатеринбурге и Свердловской области. Из 129 штаммов пневмококка было типировано 118 (91,5%), которые относились к 15 серотипам: 6A, 6B (20,8%); 23F (13,9%); 19F (11,5%); 8, 9V, 9A, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 15A, 33F (11,5%); 3 (10%); 2, 15F, 17F, 22F, 23B (3,9%); 18B, 18C (3,9%); 19A (3,2%); 7F, 19B, 19C, 23A (3,2%); 5, 10A (1,6%); 20 (1,6%); 14 (1,6%); 9L, 9N, 15B, 15C (1,6%); 18F (1,6%); 18A (1,6%). Частота совпадений серотипов S. pneumoniae, выделенных у детей с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями легких с серотипами, входящими в состав конъюгированных вакцин, составляет: 7-валентной – 69,3%, 10-валентной – 98,2%, 11- и 13-валентными – 100%.*

**Ключевые слова:** ПЦР, серотипы S. pneumoniae, пневмококковые вакцины, дети