Возрастные различия структурно-метаболических параметров иммунокомпетентных клеток детей

Артемиев С.А.¹, Булыгин Г.В.², Камзалакова Н.И.²

Age-related differences in structural-metabolic parameters of immunocompetent cells of children

Artemiyev S.A., Bulygin G.V., Kamzalakova N.I.

¹ Красноярская краевая клиническая больница, г. Красноярск

² Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

© Артемиев С.А., Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И.

Иммунохимическими методами изучено состояние липидного спектра и активность внутриклеточных ферментов лимфоцитов у детей 1—5 и 6—10 лет. Установлено, что функциональные особенности лимфоцитов детей разных возрастных групп обусловлены не только количественными различиями, но и структурно-метаболическими характеристиками иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: иммунитет, метаболизм лимфоцитов, ферменты лимфоцитов, липидный спектр лимфоцитов, иммунокомпетентные клетки.

The state of the lipid spectrum and activity of intracellular ferments of lymphocytes have been studied in children 1—5 and 6—10 years old by immunochemical methods. The results suggest that functional peculiarities of lymphocytes in children of different age groups are caused not only by qualitative differences, but also by structural-metabolic characteristics of immunocompetent cells.

Key words: immunity, lymphocyte metabolism, lymphocyte ferments, lipid spectrum of lymphocytes, immunocompetent cells.

УДК 612.017.11:611.083.3

Введение

Из современных данных известно, что при рождении здоровый ребенок имеет сформированную систему иммунитета, состоящую из центральных органов и различных иммунокомпетентных клеток, но в то же время функционирование иммунной системы в процессе роста и развития организма ребенка имеет ряд особенностей. В процессе развития наблюдаются определенные критические периоды [6], когда на воздействие чужеродных агентов иммунная система дает неадекватный или даже парадоксальный ответ. Он может носить очень слабый, недостаточный для защиты характер или, наоборот, чрезмерный, гиперергический [2].

Исходя из вышесказанного, цель настоящего исследования — выявление функциональных

особенностей иммунокомпетентных клеток в различные периоды онтогенеза.

Материал и методы

Обследованы 50 практически здоровых детей обоего пола: 25 детей в возрасте 1—5 лет и 25 детей в возрасте 6—10 лет. Фенотип лимфоцитов оценивался методом непрямой флюоресценции с мышиными моноклональными антителами на люминесцентном микроскопе «Люмам И-1». На лимфоцитах определялось наличие молекул различных CD-рецепторов [1, 3, 7]. Моноклональные антитела, использованные при проведении этой методики, выпускаются ЗАО «Сорбент» (Россия).

Для характеристики функции фагоцитов наиболее информативным оказался показатель времени выхода на пик графика индуцированной

хемилюминесценции (ХЛ), который оценивался по методике P. De Soli и соавт. [8] с опсонизированным зимозаном в качестве активатора индуцированной хемилюминесценции. Фагоцитарный индекс устанавливался методом определения фагоцитарной активности нейтрофилов с использованием латекса.

Состояние гуморального звена иммунной системы оценивалось следующими методами:

1) определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов проводилось после инкубации сыворотки крови с раствором ПЭГ-6000 и последующим учетом результатов на фотоэлектрокалориметре [10];

2) концентрация сывороточных иммуноглобулинов (Ig) A, M, G, определялась по методике радиальной иммунодиффузии G. Mancini и соавт. [9];

3) содержание общего IgE в сыворотке крови определялось с помощью моноклональных антител (инструкция по применению иммуноферментной тест-системы ЗАО «Биоиммуноген», г. Москва).

Изучение липидного спектра лимфоцитов периферической крови проводилось методом тонкослойной хроматографии. Липидные экстракты из лимфоцитов ($4,0 \pm 6,0 \cdot 10^6$ клеток) готовились по Folch и соавт., разгонка фракций проводилась на силуфолевых пластинках UV-254 (Чехия) с последующим их проявлением 5%-м раствором фосфорно-молибденовой кислоты в 96%-м этаноле. Для определения размеров пиков пластины сканировались на денситометре «Chromoscan-200» (Великобритания). Идентификация липидных фракций осуществлялась при помощи стандартов фирмы «Sigma» (США), а также по относительной подвижности фракций [4]. Определялись следующие фракции липидов: фосфолипиды (ФЛ), холестерин (ХС), свободные жирные кислоты (СЖК), триацилглицериды (ТАГ), эфиры холестерина (ЭХС); их соотношения (ХС/ФЛ, СЖК/ТАГ).

Активность внутриклеточных ферментов в об-щей популяции лимфоцитов периферической крови ($400 \pm 500 \cdot 10^3$ клеток) определялась биолюминесцентным методом с бактериальной лю-

циферазой [5]. Активность вычислялась по наработке восстановленного или окисленного кофермента в избыточно обогащенной субстратом среде. Были изучены внутриклеточные НАДФ-зависимые ферменты: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

(Г-3-ФДГ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), малатдегидрогеназы (НАДМДГ и НАДФМДГ), глутамат- и изоцитратдегидрогеназы (НАДГДГ, НАДФГДГ, НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ), обратные НАДФ- и НАД-зависимые глутаматдегидрогеназы, а также глутатионредуктаза (ГР). Показатели активности ферментов рассчитывались в мКЕ/ 10^4 клеток.

Данные приведены в виде среднего значения M и стандартной ошибки среднего значения m . Достоверность различий определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В младшей возрастной группе определяется достоверно большее количество лейкоцитов ($p < 0,05$) в периферической крови (табл. 1). При этом среди лейкоцитов преобладают молодые и пролиферирующие клетки: палочкоядерные гранулоциты ($p < 0,05$), лимфоциты ($p < 0,001$) и моноциты ($p < 0,05$), являющиеся предшественниками макрофагов.

Таблица 1

Показатели клинического анализа крови и иммунокомпетентных клеток у детей в возрасте 1–5 и 6–10 лет, $M \pm m$

Показатель	Возраст, лет	
	1–5	6–10
Лейкоциты, мкл	5 918,75 $\pm$ 218,90	5 205,26 $\pm$ 160,82
Полиморфоядерные, %	2,50 $\pm$ 0,30	1,62 $\pm$ 0,15
Сегментоядерные, %	36,38 $\pm$ 1,27	48,68 $\pm$ 0,75
Эозинофилы, %	3,13 $\pm$ 0,28	3,58 $\pm$ 0,29
Моноциты, %	6,94 $\pm$ 0,62	5,11 $\pm$ 0,35
Лимфоциты, %	51,06 $\pm$ 0,98	41,53 $\pm$ 0,77
Лимфоциты, мкл	3 004,69 $\pm$ 90,36	2 159,26 $\pm$ 72,15
CD3, %	60,19 $\pm$ 0,71	62,37 $\pm$ 0,71
CD3, мкл	1 804,87 $\pm$ 50,55	1 343,35 $\pm$ 42,38
CD4/CD8	1,33 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,04
CD19, %	12,88 $\pm$ 0,51	11,26 $\pm$ 0,40
CD19, мкл	388,22 $\pm$ 22,22	244,75 $\pm$ 13,29
IgA, Г/Л	2,72 $\pm$ 0,17	3,39 $\pm$ 0,15
IgM, Г/Л	0,95 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,06

IgG, Г/Л	11,06 ± 0,39	12,87 ± 0,41
IgE, МЕ	61,88 ± 5,73	46,68 ± 3,08
ФИ, %	56,88 ± 2,65	64,37 ± 1,85
ХЛ, мин	29,13 ± 0,89	22,84 ± 0,71

Среди различий в показателях иммунного статуса (табл. 1) следует отметить у детей 1–5 лет более высокое абсолютное содержание лимфоцитов ($p < 0,001$), В-клеток ($p < 0,001$) и Т-лимфоцитов ($p < 0,001$). При этом если уровень последнего параметра обусловлен только более высоким количеством лейкоцитов в периферической крови, то первые два — и большими относительными показателями соответствующих клеток.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что, несмотря на повышенное у этих детей содержание В-лимфоцитов, функция их невысока — концентрации IgA и IgG ниже, чем у детей 6–10 лет ($p < 0,01$). Более высокий в младшей группе уровень IgE соответствует известной из литературы повышенной аллергической «готовности» в этом возрасте [6].

Необходимо отметить и различия в функциональных показателях фагоцитарной системы детей обследованных групп. Меньшие возможности этой системы в младшем возрасте подтверждаются снижением ФИ ($p < 0,05$) и большим временем выхода на пик кривой, индуцированной ХЛ ($p < 0,001$).

Перечисленные выше онтогенетические различия иммунного статуса обследованных сочетались с особенностями структурно-метаболических параметров их лимфоцитов (табл. 2). Последние заключались в меньшем содержании в клетках детей 1–5 лет основных структурных компонентов — холестерина ($p < 0,01$) и фосфолипидов ($p < 0,05$), а также ТАГ ($p < 0,001$). В то же время показатели ЭХХС и суммарного ХС превышали таковые в старшей возрастной группе ($p < 0,01$ — в обоих случаях). Интегративный показатель СЖК/ТАГ, отражающий баланс процессов липолиза и липогенеза, был выше у младших детей ($p < 0,01$), что свидетельствует о смещении внутриклеточных реакций в сторону липолиза.

Таблица 2

Экспериментальные и клинические исследования

Показатели метаболизма лимфоцитов у детей в возрасте 1–5 и 6–10 лет, $M \pm m$

Показатель	Возраст, лет	
	1–5	6–10
ХС, %	14,20 ± 0,57	16,50 ± 0,46
ФЛ, %	22,09 ± 0,85	25,00 ± 0,76
СЖК, %	8,71 ± 0,49	8,40 ± 0,46
ТАГ, %	9,12 ± 0,31	11,08 ± 0,37
ЭХС, %	45,89 ± 1,67	39,02 ± 1,21
ХОЛ/ФЛ	0,65 ± 0,01	0,67 ± 0,02
СЖК/ТАГ	0,96 ± 0,05	0,77 ± 0,04
Общий ХС, %	60,09 ± 1,24	55,52 ± 1,02
Г-6-ФДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	8,47 ± 0,70	5,47 ± 0,66
Г-3-ФДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	24,59 ± 2,29	16,98 ± 2,08
ЛДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	31,79 ± 2,22	28,26 ± 2,46
НАДМДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	44,93 ± 2,69	41,11 ± 3,55
НАДФМДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	7,09 ± 0,83	4,73 ± 0,42
НАДИЦДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	1,38 ± 0,14	1,56 ± 0,17
НАДФИЦДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	19,76 ± 1,99	14,87 ± 1,20
НАДГДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	1,60 ± 0,19	1,74 ± 0,15
НАДФГДГ, мкЕ/10 ⁴ клеток	4,07 ± 0,16	2,94 ± 0,28
ГР, мкЕ/10 ⁴ клеток	6,23 ± 0,61	3,81 ± 0,30

Последнее обстоятельство подтверждалось и более высокой активностью фермента Г-3-ФДГ ($p < 0,01$), контролирующего подачу избытка субстратов с липидного обмена на гликолиз. Характерной чертой метаболизма лимфоцитов детей 1–5 лет является более высокая активность всех НАДФ-зависимых ферментов (табл. 2): Г-6-ФДГ ($p < 0,01$), НАДФИЦДГ ($p < 0,1$), НАДФГДГ ($p < 0,001$), НАДФМДГ ($p < 0,01$) и ГР ($p < 0,01$). Такой метаболический профиль клеток свидетельствует о высокой интенсивности в них реакций синтеза и способности к пролиферации.

Заключение

Обобщая представленный материал, можно сделать вывод о том, что онтогенетические особенности функционирования иммунной системы детей разных возрастных групп обусловлены не только количественными различиями показателей иммунитета, но и структурно-метаболическими характеристиками иммунокомпетентных клеток. Последние у детей 1–5 лет свидетельствуют о том, что в клетках более интенсивно протекают реакции холестеринового и жирнокислотного обмена (в сочетании с повы-

Артемов С.А., Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И. Возрастные различия структурно-метаболических параметров...

шенными затратами на реакции обмена энергетических субстратов — ТАГ) с перераспределением избытка липидных субстратов на гликолиз. Высока и способность внутриклеточного метаболизма их лимфоцитов к процессам синтеза и пролиферации за счет выработки повышенного количества НАДФН⁺. Совокупность этих характеристик, как известно, свойственна активно пролиферирующим, быстро обновляющимся клеточным популяциям. Однако возможности гуморального звена, вероятно, в связи с преобладанием в популяции В-лимфоцитов молодых и функционально незрелых клеток несколько ограничены, что подтверждается меньшим количеством наиболее высокоспецифичных IgA и IgG у младших детей. Менее высоки в возрасте 1—5 лет и возможности фагоцитарного звена иммунитета, которые лимитируются как снижением поглотительной способности фагоцитов, так и их презентационной функции.

Литература

1. *Иммунология*: В 3 т.: Пер. с англ. / Под ред. У.

- Пола. М.: Мир, 1987—1988. Т. 2. 456 с.
2. *Коротяев А.И., Бабичев С.А.* Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб.: Спец. лит., 1998. С. 216—229.
 3. *Лесков В.П., Чередеев А.Н., Горлина Н.К.* Клиническая иммунология для врачей. М., 1997. 125 с.
 4. *Ростовцев В.Н., Резник Г.Е.* Количественное определение липидных фракций плазмы крови // Лаб. дело. 1982. № 4. С. 218—221.
 5. *Савченко А.А., Сунцова Л.Н.* Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биolumинесцентным методом // Лаб. дело. 1989. № 11. С. 23—25.
 6. *Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е.* Иммунология и иммунопатология детского возраста. М.: Медицина, 1996. 364 с.
 7. *Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В.* Интерпретация лабораторных показателей при оценке иммунного статуса человека // Лаб. дело. 1991. № 2. С. 6—14.
 8. *De Soli P., Lippa S., Lixxarru G.* Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to assess oxygen-dependent microbial activity of granulocytes // J. Clin. Lab. Autom. 1983. V. 3. P. 391—400.
 9. *Manchini G., Carbonara A.O., Heremas J.F.* Immunochemical quantitation of antigens by single radical immunodiffusion // Immunochimistry. 1965. V. 2. P. 235—254.
 10. *Haskova V. et al.* Simple method of circulating immune complex // Z. Immunol. Forsch. 1978. Bd. 154. S. 399—406.

Поступила в редакцию 27.08.2008 г.

Сведения об авторах

С.А. Артемов — канд. мед. наук, анестезиолог-реаниматолог Красноярской краевой клинической больницы (г. Красноярск).

Г.В. Булыгин — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

Н.И. Камзалакова — д-р мед. наук, профессор кафедры клинической иммунологии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

Для корреспонденции

Артемов Сергей Александрович, тел. (391-2) 97-96-97; e-mail: asa@24kr.ru