

П. Д. Ваганов^{1*}, А. Д. Донецкова², М. Ф. Никонова², И. М. Данько¹, А. А. Ярылин²

ОСЛАБЛЕНИЕ ЭМИГРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ТИМУСА ПРИ ТИМОМЕГАЛИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

¹РНИМУ им. Н. И. Пирогова; ²ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

*Ваганов Павел Дмитриевич, д-р мед. наук, проф. каф. детских болезней лечебного фак.; 117997, Москва, ул. Остро-вительна, д. 1

♦ У детей в возрасте до 5 лет с тимомегалией значительно (более чем 6-кратно) снижено содержание так называемых Т-рецепторных эксцизионных колец (ТРЭК) в мононуклеарах периферической крови. ТРЭК формируются в процессе перестройки генов Т-клеточного рецептора в тимоцитах. В периферическом отделе иммунной системы (включая кровь) ТРЭК присутствуют только в Т-клетках, недавно эмигрировавших из тимуса, и их содержание в мононуклеарах отражает интенсивность созревания Т-лимфоцитов и их эмиграции из тимуса. Таким образом, содержание ТРЭК в мононуклеарах крови может рассматриваться как показатель функциональной активности тимуса. С возрастом содержание ТРЭК в периферических Т-клетках неуклонно снижается. Полученные данные свидетельствуют о том, что функциональная активность тимуса у детей до 5 лет с тимомегалией снижена по сравнению с возрастной нормой.

Ключевые слова: дети, тимомегалия, Т-лимфоциты, функциональная активность тимуса

P.D. Vaganov, A.D. Donetskova, N.F. Nikonova, I.M. Danko, A.A. Yarylin

THE DECREASE OF EMIGRATION OF T-LYMPHOCYTES FROM THYMUS UNDER THYMOMEGALIA IN CHILDREN OF EARLY AGE

The N.I. Pirogov Russian research medical university, Moscow
The institute of immunology, the federal medical biologic agency of Russia, Moscow

♦ The article demonstrates that in children aged less than 5 years the content of so called T-receptor excisional rings in mononuclears of peripheral blood is significantly (more than six-fold times) decreased. The T-receptor excisional rings are formed in the process of changes of genes of T-cell receptor in thymocytes. In the peripheral part of immune system (blood included) T-receptor excisional rings are present only in T-cells, recently migrated from thymus. The content of T-receptor excisional rings in mononuclears reflects the intensity of T-lymphocytes maturation and their emigration from thymus. Therefore, the content of T-receptor excisional rings in mononuclears of blood can be considered as an indicator of thymus functional activity. With age, the content of T-receptor excisional rings in peripheral T-cells steadily decreases. The research data signify that in children aged less than 5 years with thymomegalia the thymus functional activity is decreased as compared with age norm.

Key words: children, thymomegalia, T-lymphocytes, thymus functional activity

Термином «тимомегалия» принято обозначать увеличение объема и массы тимуса выше предельных возрастных значений с сохранением нормальной гистоархитектоники органа [5, 7]. Тимомегалия чаще всего определяется у детей раннего возраста. При тимомегалии наблюдаются признаки гипофункции Т-клеточного звена иммунной системы — снижение численности Т-лимфоцитов, изменение их субпопуляционного состава, ослабление функциональной активности [1, 4, 6, 8, 9]. Характерным для этого состояния является снижение сыровоточного уровня гормонов тимуса [4], свидетельствующее об ослаблении эндокринной функции тимуса.

Увеличение численности лимфоидных клеток тимуса (timoцитов), характерное для тимомегалии, может быть результатом снижения интенсивности апоптоза, реализуемого в ходе селекции тимоцитов, или ослабления эмиграции зрелых Т-лимфоцитов из органа в периферический отдел иммунной системы. Прижизненная оценка интенсивности апоптоза внутри тимуса представляется затруднительной. В то же время существует метод определения уровня эмиграции Т-клеток по содержанию в Т-клетках крови Т-рецепторных эксцизионных колец (ТРЭК). ТРЭК представляют собой кольцевидные структуры, образованные ДНК, которые локализуются в составе эписом в цитоплазме клеток. Они образуются в ходе перестройки генов Т-клеточного рецептора, реализуемой при дифференцировке Т-лимфоцитов в тимусе [10]. В периферической крови ТРЭК определяются

только в так называемых недавних мигрантах из тимуса (RTE — Recent thymic emigrants) — Т-клетках, которые не пролиферировали после выхода из тимуса на периферию [12]. Поскольку при делении клеток эписомальная ДНК не подвергается репликации, пролиферативный процесс приводит к снижению числа ТРЭК-содержащих Т-клеток. В связи с вышесказанным уровень таких клеток в кровотоке рассматривается как показатель интенсивности процессов Т-лимфопоэза и эмиграции Т-клеток из тимуса [3, 12, 13].

Цель данной работы состояла в оценке функции тимуса путем определения уровня ТРЭК в популяции Т-лимфоцитов периферической крови у детей с тимомегалией.

Содержание ТРЭК определяли у 8 детей с тимомегалией. Возраст семи детей составлял от 6 мес до 2 лет и лишь одному ребенку было 5 лет. У всех детей был диагностирован острый бронхит — простой или обструктивный. Число ТРЭК определяли также у 19 детей без тимомегалии, из которых 10 детей в возрасте от 1 года до 5 лет с бронхитами или ОРВИ составили группу сравнения для группы детей с тимомегалией и 9 детей в возрасте от 6 до 16 лет обследовались для оценки возрастной динамики числа ТРЭК. Характеристика численности Т-клеток, их субпопуляционного состава и функциональной активности осуществлена на основе обследования 70 детей с тимомегалией и 26 детей из группы сравнения без тимомегалии.

Размер тимуса определяли рентгенологически. Мерой выраженности тимомегалии был кардио-тими-

ко-торакальный индекс (КТТИ), который рассчитывали как отношение ширины тимуса к ширине грудной клетки на уровне куполов диафрагмы.

Из периферической крови обследованных детей выделяли мононуклеарную фракцию путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикола-гипака (Sigma, США) плотностью 1,077 г/мл по методу А. Boyum. Численность и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для определения Т-клеток использовали моноклональные антитела к CD3, Т-хелперы выявляли по окрашиванию комбинацией моноклональных антител к CD3 и CD4, цитотоксические Т-клетки — с использованием антител к CD3 и CD8, регуляторные Т-клетки — антител к CD4 и CD25 (учитывали клетки с высоким уровнем экспрессии CD25). В работе использовали моноклональные антитела фирм Becton Dickinson, США (анти-CD25, меченные фикоэритрином) и «Сорбент», Москва (анти-CD3, анти-CD4, и анти-CD8, меченные флуоресцеинизотиоцианатом или фикоэритрином). Для оценки пролиферации лимфоцитов в культуру мононуклеаров крови ($0,5 \times 10^6$ /мл среды) вносили фитогемагглютинин в конечной концентрации 10 мкг/мл и культивировали в течение 72 ч. За 18 ч до завершения культивирования в лунки вносили 40 кБк ^3H -тимидина и оценивали включение тимидина на счетчике β -сцинтилляций. Методы детально описаны в публикации [8].

Для выделения нуклеиновых кислот использовали наборы «Проба НК» («ДНК-Технология»). Метод основан на лизисе образцов в 4М растворе гуанидинтиоцианата, осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом с последующими отмывками этанолом и ацетоном, подсушиванием и растворением в специальном буфере. Выделение ДНК проводили из $1 \cdot 10^6$ клеток. Объем полученной ДНК составил 25 мкл. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически, соотношение $A_{260/280}$ составляло 1,6—2,0.

Для постановки ПЦР использовали набор реагентов TaqMan Universal PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems). Для определения ТРЭК использованы следующие праймеры: прямой 5'-CGT GAG AAC GGT GAA TGA AGA GCA GAC A-3', обратный 5'-CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC T-3', а также флуоресцентно-меченный олигонуклеотид (зонд) 5'-FAM-TTT TTG TAA AGG TGC CCA CTC CTG TGC ACG GTG A-MGB-3' [11]. Количество копий ТРЭК рассчитывали с использованием стандартной кривой, полученной по разведениям плазмиды с известной концентрацией ДНК ТРЭК. Результаты выражали числом копий ТРЭК на 1 мкг ДНК. Для определения количества геномной ДНК использован β -актин (Applied Biosystems).

Амплификацию проводили на приборе 7300 Applied Biosystems Real-time PCR System. Реакцию ставили в объеме 25 мкл (в реакцию брали 100 нг ДНК)

Таблица 1

Численность Т-клеток и их субпопуляций в составе мононуклеаров крови и ответ Т-клеток на действие митогена у детей с тимомегалией в сопоставлении с контрольной группой соответствующего возраста

Показатель	Группа сравнения	Тимомегалия
CD3 ⁺ клетки		
%	79,8 ± 9,0	71,0 ± 12,1*
10 ⁹ /л	4,59 ± 0,93	3,19 ± 1,25*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ клетки		
%	56,9 ± 10,7	51,2 ± 12,1*
10 ⁹ /л	3,23 ± 0,72	2,35 ± 1,04*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ клетки		
%	21,4 ± 7,3	19,2 ± 6,1
10 ⁹ /л	1,25 ± 0,55	0,96 ± 1,03*
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} клетки		
%	4,19 ± 0,8	3,95 ± 1,49
10 ⁹ /л	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,09*
Включение ^3H -тимидина, имп/мин		
спонтанное	4390 ± 2320	3900 ± 2200
ФГА-индуцированное	138 140 ± 58 600	115 040 ± 39 060*

Примечание. * — $p < 0,05$.

по следующей программе: 1 цикл — 50°C 2 мин, 95°C 10 мин; 50 циклов — 94°C 30 с, 60°C 30 с. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 60°C.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием параметрических (с использованием t -критерия Стьюдента) и непараметрических (с использованием U -критерия Манна—Уитни) методов.

Ранее нами подробно охарактеризовано состояние популяции Т-лимфоцитов у детей с тимомегалией разной степени выраженности [2, 8]. Здесь мы ограничимся суммарными (без учета степени тимомегалии) данными о численности, субпопуляционном составе и функциональной активности Т-клеток у детей с тимомегалией в сопоставлении с показателями возрастной нормы. Данные табл. 1 свидетельствуют о значимом снижении относительного и абсолютного содержания Т-клеток (CD3⁺-лимфоцитов), в частности, Т-хелперов (CD4⁺CD3⁺), а также абсолютного содержания цитотоксических (CD3⁺CD8⁺) и регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}).

Значимо снижен уровень пролиферативного ответа мононуклеаров на Т-клеточный митоген фитогемагглютинин, что свидетельствует об ослаблении функциональной активности Т-лимфоцитов.

Оценка содержания ТРЭК в мононуклеарах крови детей с тимомегалией в возрасте от 6 мес до 5 лет и детей без тимомегалии той же возрастной группы показала, что при тимомегалии число копий ТРЭК в пересчете на 1 мкг ДНК снижено в 6,18 раз (табл. 2).

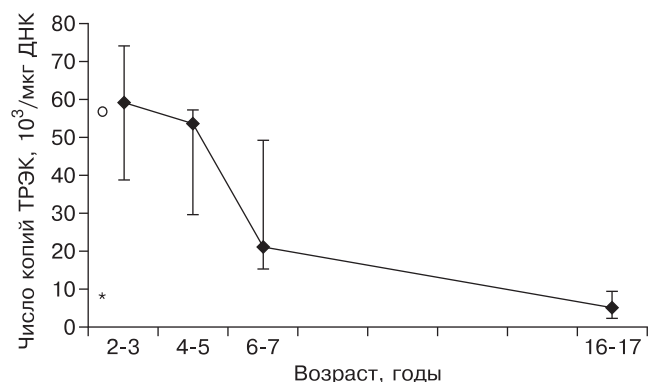
Наблюдаемые различия высоко достоверны. Даже если сделать поправку на более низкое содержание

Таблица 2

Численность ТРЭК в мононуклеарах крови детей возрастом до 4 лет с тимомегалией и без тимомегалии

Группа	Средняя	Медиана	Минимум	Максимум	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Группа сравнения ($n = 10$)	61 066	57 866	38 979	94 126	53 282	66 563
Тимомегалия ($n = 8$)	9 884	9 491	772	17 265	6 115	13 712

Примечание. $p = 0,00078$.



Зависимость содержания ТРЭК в мононуклеарах периферической крови от возраста детей.

Слева отмечены величины, характеризующие численность ТРЭК у обследованных детей по данным этой работы: * — с тимогалией; о — без тимогалии.

Т-клеток у детей с тимогалией (3,19 млрд Т-клеток в 1 л крови против 4,49 млрд Т-клеток в группе сравнения, т. е. в 1,44 раза меньше), умножив число копий у детей с тимогалией на 1,44, полученная величина все равно будет многократно ниже, чем в группе сравнения — 4 461 против 13 304 копий на 1 мкг ДНК.

Известно, что интенсивность эмиграции тимокитов на периферию неуклонно снижается с возрастом [3, 10]. Нами рассчитана динамика числа ТРЭК в клетках крови здоровых детей в возрасте до 16 лет. При сопоставлении числа копий ТРЭК у детей от 6 мес до 5 лет с тимогалией с показателями возрастной нормы (см. рисунок) оказывается, что оно со-

ответствует нормальным показателям, свойственным примерно 15-летним детям, у которых функциональная активность тимуса снижена по сравнению с детьми более раннего возраста.

Таким образом, нами впервые получены прямые свидетельства ослабления эмиграции Т-клеток из тимуса в периферический отдел иммунной системы у детей первых лет жизни с тимогалией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ваганов П. Д., Мартынова М. И., Арион В. Я. // Рос. вестн. перинатол. и педиат. — 2001. — Т. 46, № 3. — С. 59—60.
2. Донецкова А. Д., Никонова М. Ф., Данько И. М. и др. // Рос. иммунол. журн. — 2008. — № 4. — С. 427—432.
3. Донецкова А. Д., Фроленко А. Л., Трошина В. В. и др. // Иммунология. — 2010. — Т. 31, № 6. — С. 329—334.
4. Зайратьянц О. В., Серов В. В., Кузьменко Л. Г. // Арх. пат. — 1990. — Т. 52, № 6. — С. 33—39.
5. Зайратьянц О. В. // Арх. пат. — 1991. — Т. 53, № 10. — С. 3—12.
6. Зайратьянц О. В. Синдром увеличенной вилочковой железы у детей. — М., 1993.
7. Ивановская Т. Е., Катасонова Л. П. // Арх. пат. — 1986. — Т. 48, № 1. — С. 3—9.
8. Никонова М. Ф., Данько И. М., Ваганов П. Д., Ярилин А. А. // Иммунология. — 2008. — Т. 29, № 4. — С. 201—206.
9. Тюрин Н. А., Арион В. Я., Пушко Л. В. и др. // Педиатрия. — 1991. — № 6. — С. 39—42.
10. Douek D. C., Mc Farland R. D., Keiser P. H. et al. // Nature. — 1998. — Vol. 396. — P. 690—695.
11. Hochberg E. P., Chillemi A. C., Wu C. J. et al. // Blood. — 2001. — Vol. 98. — P. 1116—1121.
12. Kong F.-K., Chen C. L., Cooper M. // Immunity. — 1998. — Vol. 8. — P. 97—104.
13. Ribeiro R. M., Perelson A. S. // Immunol. Rev. — 2007. — Vol. 216. — P. 21—34.

Поступила 22.04.12

Обмен опытом

© В. А. ВЕРХНЕВ, 2012

УДК 616.24-002-022.6-08:614.2

В. А. Верхнев*

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

ГБУ РМЭ Йошкар-Олинская городская больница, отделение анестезиологии-реаниматологии
Казанского государственного медицинского университета

*Верхнев Валентин Александрович, канд. мед. наук, зав. отд-нием анестезиологии и реаниматологии, ассистент каф. общей врачебной практики № 2. 424035, Республика Марий Эл, Йошкар-Ола, ул. Карла Либкнехта, д. 55.
E-mail: gorbol@mari-el.ru

♦ Цель исследования — разработка тактики интенсивной терапии больных вирусными пневмониями, находившихся в отделении реанимации в 2009—2011 гг. Среди 75 госпитализированных пациентов преобладали лица в возрасте 22—45 лет — 41 (55%), из них 4 беременные женщины (сроки беременности 16, 29, 38 и 39 нед). Сроки пребывания в реанимации составили 6,2 койко-дня. Срочный перевод на искусственную вентиляцию легких потребовался 33 (44%) больным. Основу противовирусной терапии составил осельтамивир. Эмпирическая антибактериальная терапия проводилась меропенемом, цефепимом, левофлоксацином. Умерли 18 (24%) больных, из них у 11 (61%) был выделен вирус гриппа А(H1N1)2009. Летальных исходов среди беременных не было.

Ключевые слова: грипп А(H1N1)2009, пневмония, реанимация, интенсивная терапия

V.A. Verkhnev

THE EXPERIENCE OF ORGANIZATION OF TREATMENT OF PATIENTS WITH VIRAL PNEUMONIA

The Kazan state medical university, Kazan

♦ The article discusses the intensive therapy policy in patients with viral pneumonia in the department of reanimation in 2009-2011. Among 75 hospitalized patients prevailed persons aged 22-45 years (41 patients, 55%), including 4 pregnant women