

6. Safiullina A.R., Yakovleva, L.V. Analysis of risk factors of development of congenital septal heart diseases // the Modern problems of science and education. – 2012. –

№ 4. (Electronic magazine) URL: www.science-education.ru/104-6678.

Координаты для связи с авторами: Медведева Светлана Викторовна – канд. мед. наук, ассистент кафедры детских болезней факультета последипломного образования АГМА, тел. +7-962-285-39-64, e-mail: fpkamurgma@list.ru; Заболотских Татьяна Владимировна – д-р мед. наук, профессор, ректор, зав. кафедрой детских болезней факультета последипломного образования АГМА, e-mail: amurgma@list.ru; Данилова Наталья Борисовна – зав. кардиологическим отделением Амурской областной детской клинической больницы, главный внештатный кардиоревматолог.



УДК 612: 616.921.0.51

Л.П. Малежик, М.С. Малежик, Д.Ц. Нимаева

КЛЕТОЧНЫЕ АССОЦИИИ В КРОВИ ПРИ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ TOLL-4 (ASP299GLY) И TOLL-6 (SER249PRO) РЕЦЕПТОРОВ

Читинская государственная медицинская академия, 672090, ул. Горького, 39а,
тел. 8-(3022)-32-00-85, e-mail: macadam@mail.chita.ru, г. Чита

Резюме

В статье приведены данные об интенсивности образования клеточных агрегатов в крови детей часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией. Показано, что при полиморфизме генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов количество образованных коагрегатов зависит от сочетания аллелей. При мутациях в гене Toll-4 лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА) выражена у носителей генотипа Asp/Asp. Количество тромбоцитарно-эритроцитарных (ТЭА) и лейкоцитарно-эритроцитарных (ЛЭА) розеток увеличено при всех полиморфных вариантах изучаемого гена.

При полиморфизме Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов высоки ЛТА и ЛТИ в группе больных детей носителей мутантной гомозиготы Pro/Pro. Количество ТЭА и ЛЭА увеличено во всех изучаемых генотипах.

Ключевые слова: ОРВИ, полиморфизм, Toll-рецепторы, ауторозеткообразование.

L.P. Malezhik, M.S. Malezhik, D.T. Nimaeva

CELLULAR ASSOCIATIONS IN THE BLOOD DURING ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION OF CHILDREN WITH GENE POLYMORPHISM TOLL-4 (ASP299GLY) AND TOLL-6 (SER249PRO) RECEPTORS

Chita State Medical Academy, Chita

Summary

The article presents data on the intensity of cell aggregates formation in the blood of children frequently ill with acute respiratory viral infection. It is revealed that with the gene polymorphism of Toll-4 (Asp299Gly) and Toll-6 (Ser249Pro) receptors number of formed co-aggregates depends on a combination of alleles. With mutations in the Toll-4 lymphocyte-platelet adhesion (LPA) is expressed in genotype Asp/Asp. The number of platelet-erythrocyte (TEA) and leukocyte-erythrocyte (LEA) outlets increased under all polymorphic variants of the studied gene.

With Toll-6, polymorphism (Ser249Pro) receptors is high LPA and LTI of children with mutant homozygous Pro/Pro. Number of TEA and LEA increased in all studied genotypes.

Key words: SARS, polymorphism, Toll-receptor, cellular associations.

Эндогенное ауторозеткообразование (АОР) – процесс формирования в периферической крови ассоциаций из форменных элементов, имеющих вид розеток. У здоровых людей в капиллярной крови регистрируются единичные ауторозетки. При патологии – анемиях [2], лептоспирозе [14], ишемической болезни сердца [12], артериальной гипертензии [3], инфекционном эндокардите [7], пневмонии [10], псориазе [9] их число увеличивается.

Клеточные кооперации разнообразны по структуре. Они могут состоять либо из одиночных элементов (эритроцитов либо тромбоцитов) [13], либо включать дополнительные клетки, формируя гетеророзетки [1, 8].

В кооперацию вступают активированные форменные элементы крови, поэтому клеточные агрегаты являются косвенными свидетелями иммунных реакций, гиперкоагуляции и состояния микроциркуляции в организме [11]. Резкое их увеличение является не-

благоприятным признаком, свидетельствующим об интоксикации и осложнённом течении основного заболевания [10].

В настоящей работе впервые исследуется внутрисосудистое розеткообразование у детей при острой респираторной вирусной инфекции. Особый интерес вызывают часто болеющие дети с точечными (SNP) дефектами рецепторов врождённого иммунитета (Toll-подобных рецепторов), воспринимающих действие патогенного вируса. Эти дети отличаются низкой противинфекционной защитой и более тяжёлым течением заболевания [8].

Цель работы – изучить интенсивность и характер эндогенного розеткообразования в крови детей носителей полиморфизма генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов при острой респираторной вирусной инфекции.

Материалы и методы

Обследовано 190 детей обоего пола от 1 до 3 лет, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ), поступивших в стационар детской инфекционной больницы г. Читы. Критериями включения в группу обследуемых были: число эпизодов заболевания не менее 6 раз в году, острота проявления в первые 3 дня заболевания (лихорадка, интоксикация, выраженные катаральные явления). В исследование не вводили детей с хроническими бронхолёгочными заболеваниями, пороками развития и опухолями дыхательной системы. Контрольную группу составили 25 здоровых детей, у которых количество эпизодов ОРВИ было не более 4 раз в году. 90 часто болеющих детей (ЧБД) являлись носителями полиморфизма гена Toll-4 (Asp299Gly) рецептора, 100 ЧБД являлись носителями полиморфизма гена Toll-6 (Ser249Pro) рецептора.

У детей в крови определяли лимфоцитарно-тромбоцитарные агрегаты (ЛТА) по методу Витковского Ю.А. [5]. При этом за коагрегат принимали лимфоциты, адгезирующие на своей поверхности 1 и более тромбоциты. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ) оценивали как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединённых к 1 лимфоциту. В мазках, окрашенных по Романовскому – Гимза, подсчитывали общее количество эритроцитов, лейкоцитов, число лейкоцитарно-эритроцитарных коагрегатов – ЛЭА. При этом за ЛЭА принимали ассоциации, состоящие из 2 и более эритроцитов, контактирующих с центрально расположенным лейкоцитом. В этих же мазках считали количество тромбоцитарно-эритроцитарных агрегатов (ТЭА) из 200 тромбоцитов, присоединившихся к себе эритроциты.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных между собой наблюдений с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности отличий сравниваемых величин осуществляли по t-критерию Стьюдента (p). Показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением ($M \pm SD$). При ненормальном распределении признака применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Для сравнения количественных показателей использовался критерий χ^2 (Пирсона).

Результаты и обсуждение

В более ранних работах [8] нами было показано, что среди часто болеющих детей 55,6 % являются носителями мутантной аллели в гене Toll-4 рецептора (Asp299Gly) и 75 % в гене Toll-6 рецептора (Ser299Pro). В крови этих детей выражена коагрегация форменных элементов, причём число образованных клеточных ассоциаций зависит от сочетания аллелей в области точечных мутаций анализируемого гена. Так, у детей с полиморфизмом Toll-4 (Asp299Gly) рецептора лимфоцитарно-тромбоцитарная агрегация увеличена максимально в группе больных ОРВИ детей носителей генотипа Asp/Asp (табл. 1). Увеличение ЛТИ и ЛТА являются косвенным показателем состояния иммунитета и гемостаза у этих больных [4, 5, 6].

Таблица 1

Содержание ауторозеток у пациентов носителей полиморфных вариантов Asp299Gly в гене Toll-4 рецепторов

Показатели	Контроль – здоровые дети (n=25)	Больные ОРВИ с полиморфизмом гена Asp299Gly Toll-4 рецептора		
		299Asp/Asp (n=40)	Asp299Gly (n=18)	299Gly/Gly (n=32)
ЛТА, %	14±0,9	16,9±7,3*	13±7,1 #	14,4±6,6#
ЛТИ, отн. ед.	3,5±0,5	4,4±1,9*	3,4±2,1#	3,2±1,2#
ТЭА, %	5,0 (4,8-6,4)	37,1* (34,5-42,3)	30,3*# (20,8-31)	33,8*# (29,5-40)
ЛЭА, %	5,3 (4,9-6,5)	17,5* (11,8-18,8)	23,5*# (17,5-25,8)	26,3*# (17,8-33,5)

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с контролем; # – достоверность различий по сравнению с группой носителей гомозигот Asp299. Значения для ЛТА и ЛТИ приведены в виде $M \pm SD$. Значение для ТЭА и ЛЭА представлены в виде медианы и 25-75 перцентили.

Тромбоциты образуют клеточные кооперации не только с лимфоцитами, но и эритроцитами (тромбоцитарно-эритроцитарные ассоциации – ТЭА). В контрольной группе здоровых детей без учёта изучаемых мутаций только 5 % тромбоцитов присоединяют к себе эритроциты (ТЭА – 5 %). У больных ОРВИ детей этот показатель увеличен от 30,3 % у гетерозигот (Asp/Gly), до 37,1 % у гомозигот (Asp/Asp и до 33,8 % у гомозигот Gly/Gly. В этих контактах тромбоциты ведут себя довольно агрессивно и вызывают лизис эритроцитов в 70 % у здоровых детей и в 100 % розеток у больных ОРВИ. Вероятно, адгезии подвержены эритроциты с пониженной резистентностью и деформированной мембраной. Эти эритроциты адгезируются не только тромбоцитами, но и лейкоцитами с образованием лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов – ЛЭА. При вирусной инфекции число ЛЭА увеличено при всех вариантах изучаемого полиморфизма гена Toll-4 рецептора, особенно у носителей аномальных гомозигот Gly/Gly (26,3 %) и гетерозигот Asp/Gly (23,5 %).

При мутациях в гене Toll-6 (Ser249Pro) рецептора количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТА) увеличено при всех полиморфных вариантах (табл. 2), особенно у мутантных гомозигот Pro/Pro (29,6%) и гетерозигот Ser/Pro (21,4%). В группе полной замены аллелей увеличено в 4 раза число тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту (ЛТИ).

Таблица 2

Содержание ауторозеток у пациентов носителей полиморфных вариантов Ser249 Pro в гене Toll-6 рецепторов

Показатели	Контроль – здоровые дети (n=25)	Больные ОРВИ с полиморфизмом гена Ser249Pro Toll-6 рецептора		
		249Ser/Ser (n=25)	Ser249Pro (n=50)	249Pro/Pro (n=25)
ЛТА, %	14±0,9	17,4±5,8*	21,4±11,2*#	29,6±11,6*#
ЛТИ, отн. ед.	3,5±0,5	3,2±0,7	2,6±0,7#	12,6±0,8*#
ТЭА, %	5,0 (4,8-6,4)	33,5* (23,3-45)	32,3* (33-40)	22,8*# (11-30)
ЛЭА, %	5,3 (4,9-6,5)	21,5* (14,5-30,1)	27*# (22,6-31,2)	29,8*# (24,5-32,3)

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с контролем; # – достоверность различий по сравнению с группой носителей гомозигот 299Asp. Значения для ЛТА и ЛТИ приведены в виде $M \pm SD$. Значение для ТЭА и ЛЭА представлены в виде медианы и 25-75 перцентили.

Тромбоцитарно-эритроцитарные агрегаты в крови здоровых детей составляют 5 %. При ОРВИ у носителей Ser/Ser генотипа число подобных агрегатов увеличено до 33,5 %, у гетерозигот Ser/Pro до 32,3 %, у гомозигот Pro/Pro до 22,8 %. Одновременно нарастает и количество лейкоцитарно-эритроцитарных ассоциаций (ЛЭА). Особенно у мутантных гомозигот Pro/Pro и гетерозигот Ser/Pro.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при ОРВИ количество розеткообразующих клеток в крови увеличивается. Согласно современным представлениям, в механизме образования клеточных ассоциаций ведущую роль играют белки плазмы [1].

Литература

1. Асайчев А.В., Азизова О.А., Шуленина Л.В. Механизм образования клеточных ассоциаций в кровотоке // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 3. – С. 284-290.
2. Бельченко Д.И., Есипова А.В., Кривошеина Е.Л. Активация межклеточных взаимодействий в циркулирующей крови и микроциркуляции // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 53-57.
3. Волков В.С., Коричкина Л.Н. Динамика ауторозеткообразования в периферической крови у больных гипертонической болезнью на фоне лечения // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – Т. 7. – С. 10-12.
4. Витковский Ю.А. Состояние иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при пневмонии // Терапевтический архив. – 2009. – № 3. – С. 40-43.
5. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования // Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 35-37.
6. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелием и ДВС-синдром // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2006. – № 1 (25). – С. 15-28.
7. Долина А.Б. Особенности иммунитета, перекисного окисления липидов и лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарных взаимоотношений при вторичном инфекционном эндокардите у детей : автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Чита, 2010. – 21 с.

структурные изменения на мембране клеток и появление на их поверхности молекул адгезии [11]. Адгезивные свойства у розеткообразующих клеток индуцирует эндотоксинемия [10], которая, в значительной степени, выражена при рецидиве ОРВИ. Мы считаем, что выраженная агрегационная активность клеток крови при ОРВИ является патогенетическим звеном развития заболевания. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия способствует потоку иммунокомпетентных клеток в зону воспаления и развитию там иммунных и репаративных процессов [4, 5, 6]. Клеточные ассоциации являются одной из причин развития гиперкоагуляции при ОРВИ (8), что является следствием клеточных реакций и лизиса клеток в ассоциациях. Кроме того, образованные клеточные коагрегаты, изменяя реологические свойства крови, блокируют микроциркуляторное русло нарушают транскапиллярный обмен. Возникшая гипоксия в тканях осложняет регенерацию и способствует длительному восстановительному периоду.

Выводы

1. При ОРВИ у часто болеющих детей увеличиваются адгезивные свойства форменных элементов крови, что сопровождается нарастанием число ЛТА, лейкоцитарно-эритроцитарных и тромбоцитарно-эритроцитарных коагрегатов в сосудистом русле.
2. При носительстве полиморфизма в генах Toll-4 и Toll-6 рецепторов клеточные ассоциации выражены значительнее, чем у больных детей, не отягощенных мутациями в сигнальных рецепторах.

8. Карпова Н.И., Малежик Л.П., Кузник Б.И. Некоторые патогенетические особенности нарушения микроциркуляции у детей с респираторной вирусной инфекцией // Забайкальский медицинский вестник. – 2010. – № 4. – С. 24-29.
9. Кашутин С.Л. Адгезия и фагоцитоз агрегатов тромбоцитов нейтрофилами и моноцитами у больных псориазом // Цитокины и воспаление. – 2008. – № 7. – С. 54-57.
10. Коричкина Л.Н. Феномен эндогенного ауторозеткообразования в периферической крови у больных пневмонией // Терапевтический архив. – 2011. – № 3. – С. 37-40.
11. Кузник Б.И. Клеточные и гуморальные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 827 с.
12. Соколов Е.И. Динамика морфологических структур тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от уровня жирных кислот крови // Кардиология. – 2011. – № 1. – С. 29-33.
13. Тихомирова И.А., Муравьев А.В. Физиологическая роль и механизмы объединения эритроцитов в агрегаты // Российский физиологический журнал. – 2007. – № 12. – С. 1382-1393.
14. Шубич М.Г., Авдеева Д.Л., Мойсова Д.Л. Взаимосвязь цитохимической активности лейкоцитов с феноменом ауторозеткообразования и его клиническое значение у больных лептоспирозом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 5. – С. 13-14.

Literature

1. Asaychev A.V., Azizov O.A., Shulenina L.V. The mechanism of formation of cell association in the bloodstream // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 147. – № 3. – P. 284-290.
2. Belchenko D.I., Esipova A.V., Krivosheina E.L. Activation of intercellular interactions in the blood circulation and microcirculation // *Regional blood circulation and microcirculation*. – 2005. – Vol. 4. – № 2. – P. 53-57.
3. Volkov V.S., Korichkina L.N. Dynamics of autorosette formation in peripheral blood in patients with essential hypertension during treatment // *Cardiovascular therapy and prevention*. – 2007. – Vol. 7. – P. 10-12.
4. Witkowski J.A. State of immunity and lymphocyte-platelet adhesion in patients with pneumonia // *Therapeutic Archives*. – 2009. – № 3. – P. 40-43.
5. Witkowski J.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. The phenomenon of platelet-lymphocyte rosette formation // *Immunology*. – 1999. – № 4. – P. 35-37.
6. Witkowski J.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. The interaction of leukocytes and platelets with endothelium and DIC // *Thrombosis, hemostasis and rheology*. – 2006. – № 1 (25). – P. 15-28.
7. Dolina A.B. Special features of immune system, lipid peroxidation and platelet-leukocyte-erythrocyte relationships with secondary infective endocarditis in children: author c.m.s. – Chita, 2010. – 21 p.
8. Karpov N.I., Malezhik L.P., Kuznik B.I. Some pathogenetic features of microcirculatory disorders of children with respiratory viral infection // *Zabaikalskii medical vestnik*. – 2010. – № 4. – P. 24-29.
9. Kashutin S.L. Adhesion and phagocytosis of platelet, leucocyte and monocyte aggregates in patients with psoriasis and inflammation Cytokines. – 2008. – № 7. – P. 54-57.
10. Korichkina L.N. The phenomenon of endogenous autorosette formation in peripheral blood in patients with pneumonia // *Therapeutic archive*. – 2011. – № 3. – P. 37-40.
11. Kuznik B.I. Cellular and humoral mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease: a monograph. – Chita.: Express Publishing, 2010. – 827 p.
12. Sokolov E.I. The dynamics of morphological structures of platelets in patients with coronary heart disease, depending on the levels of fatty acids in blood // *Cardiology*. – 2011. – № 1. – P. 29-33.
13. Tikhomirov I.A., Muravyov A.V. The physiological role and mechanisms of association of red blood cells in physiological units // *Russian Journal*. – 2007. – № 12. – P. 1382-1393.
14. Shubich M.G., Avdeev D.L., Moysova D.L. Relationship between cytochemical activity of leukocytes and the phenomena of autorosette formation and clinical significance in patients with leptospirosis // *Clinical laboratory diagnostics*. – 2007. – № 5. – P. 13-14.

Координаты для связи с авторами: *Малежик Лидия Павловна* – д-р мед. наук, профессор кафедры нормальной физиологии ЧГМА; *Малежик Маргарита Сергеевна* – канд. мед. наук, ассистент кафедры ОБЖ и МК ЧГМА, тел. +7-924-271-41-45, e-mail: rita.malezhik@mail.ru; *Нимаева Дулма Цыбеневна* – канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной физиологии ЧГМА, тел. +7-924-276-8938, e-mail: dulmanimaeva@yandex.ru.

