

УДК 616.921.8:612.017.1-053.2

Епифанцева. Н.В., Витковский Ю.А.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНОЙ АДГЕЗИИ С ЦИТОКИНАМИ У ДЕТЕЙ ПРИ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

У 60 детей с неосложненным и осложненным течением коклюша исследована реакция лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и взаимосвязь с провоспалительными и противовоспалительными цитокинами. Установлено, что течение как осложненной, так и неосложненной коклюшной инфекции сопровождается повышенным образованием лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов. Выявлена прямая связь ИЛ-1 β и ФНО- α с ЛТА при неосложненном течении и обратная при осложненном пневмонией. Взаимосвязь ИЛ-4, ИЛ-10, рецепторного антагониста ИЛ-1 с ЛТА во всех случаях обратная.

Ключевые слова: взаимосвязь, дети, иммунитет, коклюш, ЛТА, цитокины.

Epifanцева Н.В., Витковский Ю.А.

THE LINK BETWEEN LYMPHOCYTE-PLATELET ADHESION AND CYTOKINES IN CHILDREN WITH PERTUSSIS INFECTION

Lymphocyte-platelet adhesion (LPA) and links with inflammatory and anti-inflammatory cytokines in 60 children with complicated and uncomplicated pertussis studied. It is shown, that pertussis infection is accompanied by an increased LPA function. The direct link between IL-1 β , TNF- α levels and LPA in uncomplicated pertussis found. The indirect link between IL-1 β , TNF- α levels and LPA in complicated by pneumonia pertussis infection revealed. The links between IL-4, IL-10, IL-1 receptor antagonist was indirect in all cases.

Key words: link, children, immunity, pertussis, LPA, cytokines.

Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) представляет собой одну из физиологических функций, присущую различным субпопуляциям лимфоцитов, реализуемую посредством адгезивных молекул [6]. Реакция ЛТА широко изучается при различной патологии, так как взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами являются важными звенями механизмов, обеспечивающих миграцию лейкоцитов в зону повреждения и развития там иммунных и репаративных процессов. Тромбоциты могут адгезировать к нейтрофилам, эозинофилам, моноцитам и лимфоцитам [4, 10]. Лимфоциты являются главными участниками иммунного ответа, а тромбоциты обеспечивают взаимосвязь иммунитета и гемостаза [2]. Образование

лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов регулируется цитокинами и индукторами агрегации тромбоцитов. Ингибиторами ЛТА являются противовоспалительные цитокины ИЛ-4, ИЛ-10 и ИНФ- α ; провоспалительные ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-16 цитокины значительно повышают ЛТА-адгезию [1, 11, 7].

При коклюшной инфекции одним из звеньев патогенеза является повреждение эндотелия сосудов в результате действия токсинов и прогрессирующей гипоксии. При этом коклюшный токсин, продуцируемый *Bordetella pertussis*, вызывает лимфоцитоз, препятствуя миграции лимфоцитов в очаг инфекции, подавляет функцию нейтрофилов, макрофагов, моноцитов и лимфоцитов [3].

В задачу нашего исследования входило изучение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при неосложнённом и осложнённом пневмонией коклюше и взаимосвязь с провоспалительными (ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-1РА) и противовоспалительными цитокинами (ИЛ4, ИЛ-10).

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 60 детей, больных коклюшем, проходивших лечение в Краевой детской инфекционной больнице, г. Чита. Диагноз коклюш определялся на основании клинико-эпидемиологических (контакт с больными коклюшем; характерный приступообразный кашель, преимущественно в ночное время, наличие рецидивов и т.д.) данных и лабораторных (данные гемограммы - лейкоцитоз лимфоцитарного характера, моноцитоз; бактериологическое и серологическое исследования) показателей. Серологически, методом реакции агглютинации, диагноз коклюш был подтверждён в 64,8%. Первую группу составили дети от 1 до 12 мес. (33 ребёнка), из которых у 15 детей имело место неосложнённое течение и у 18 - осложнённое пневмонией. Вторая группа - больные старше 1 года (27 детей), из них в 20 случаях благоприятное течение, в 7 - осложнённое пневмонией. Контрольную группу 20 человек составили условно здоровые дети: 10 - до года и 10 - старше одного года.

Для исследования ЛТА использовалась оригинальная методика предложенная Витковским Ю.А. и соавт. (1999). Свежую цитратную кровь насыщали на градиент урографин-фиков (плотность 1,077) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 минут. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты, забирали пастеровской пипеткой. Однократно промывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3-4 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток. Степень адгезии определяли как число кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита.

Определение концентрации провоспалительных, противовоспалительных цитокинов проводили методом ИФА с использованием реактивов ООО "Вектор-Бест" (г. Новосибирск). Метод основан на твёрдофазном "сэндвич" - варианте иммуноферментного анализа. Специфическими реагентами набора являются моноклональные антитела, сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета, конъюгат поликлональных антител с биотином и калибровочные образцы.

Полученные результаты обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США) с определением статистической значимости различий при $p < 0,05$. Для сравнения частот применялся критерий Стьюдента (t-тест). При расчёте корреляционных связей использовали коэффициент Пирсона, $r = -1+1$ ($r=0-0,3$ - слабая связь, $r=0,3-0,7$ - связь средней силы, $r=0,7-1$ - сильная связь).

Результаты и обсуждения.

В результате наших исследований установлено повышение лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, как при благоприятном, так и при осложнённом течении коклюша в сравнении с группой контроля в 1,5 раза ($p < 0,001$). Абсолютное число лимфоцитов, участвующих в адгезии, статистически значимо увеличено у детей до года и в группе старше года с неосложнённым течением. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс соответствовал показателю контрольной группы ($p > 0,05$). При этом не отмечено зависимости данных показателей от варианта течения и возраста (таблица 1).

При коклюшной инфекции концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-1RA, ИЛ-8 и ФНО- α) превышает показатели здоровых детей в 2-3 раза. При этом уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в возрасте до года не превышал уровня группы контроля ($p > 0,05$), а в группе старше года продукция ИЛ-4 достоверно снижена ($p < 0,05$). Что же касается ИЛ-10, то данный интерлейкин повышался незначительно ($p < 0,05$). В сравниваемых группах, больных до года и

Таблица 1.

Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных коклюшем, ($M \pm SD$)

Клиническая форма	ЛТА		ЛТИ
	отн. %	абс. $\times 10^9/\text{л}$	
Контроль (n=20)	Дети до года (n=10)	14±0,33	579±67 2,19±0,22
	Дети старше года (n=10)	13,4±0,3	462,25±58,3 2,16±0,16
Дети до года (n=33)	Неосложненное течение (n=15)	19,84±1,41 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	1338,2±273,7 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ 2,8±0,38 $p_1 > 0,05$
	Осложнённое пневмонией течение (n=18)	20,34±1,34 $p_1 < 0,001$	1302,8±253,4 $p_1 < 0,01$ 2,8±0,35 $p_1 > 0,05$
Дети старше года (n=27)	Неосложненное течение (n=20)	20,06±1,2 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	1327±229 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ 2,78±0,32 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
	Осложнённое пневмонией течение (n=7)	20,05±2,7 $p_1 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	1313,98±522 $p_1 < 0,01$ $p_4 > 0,05$ 2,8±0,73 $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$

Примечание: p_1 - статистическая значимость различий абсолютных показателей ЛТА, ЛТИ у больных коклюшем с неосложнённым и осложнённым пневмонией течением и группой контроля, p_2 -достоверность различий ЛТА, ЛТИ между неосложнённым и осложнённым течением в каждой группе, p_3 - достоверность различий ЛТА, ЛТИ между неосложнённым течением среди детей до года и старше года, p_4 - достоверность различий ЛТА, ЛТИ между осложнённым течением среди детей до года и старше года.

старше года, с неосложнённым и осложненным пневмонией течением, концентрация цитокинов не отличается ($p > 0,05$) (таблица 2).

При корреляционном анализе взаимосвязи между числом ЛТА и содержанием провоспалительных цитокинов обнаружена обратная связь между содержанием ИЛ-1RA и числом ЛТА во всех группах больных различной силы. Отрицательная корреляция с ИЛ-1 β , ФНО- α при осложненном течении, при благоприятном течении установлена прямая взаимосвязь, при этом у детей до года выражена сильнее ($r = 0,47$ и $r = 0,28$). Что же касается противовоспалительных цитокинов, то у больных до года с неосложнённым течением отмечалась положительная корреляция средней силы между ЛТА и концентрацией ИЛ-4 и ИЛ-10, в остальных исследуемых группах взаимосвязь обратная (таблица 3).

В наших исследованиях повышение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии отмечалось во всех исследуемых группах, особенно у детей до года с осложнённым пневмонией течением, где данный показатель самый высокий. При этом абсолютное число лимфоцитов, участвующих в адгезии с тромбоцитами, значительно увеличивалось при неосложнённом течении. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс незначительно отличался от группы контроля. При патологических процессах сдвиги ЛТА протекают в 2 фазы [5]. Увеличение числа ЛТА свидетельствует о напряжении клеточного иммунитета, их уменьшение - о его угнетении или истощении [4]. Учитывая высокий уровень ЛТА, мы заключили, что при коклюше реакция клеточного иммунитета достаточная и соответствует первой фазе развития.

Таблица 2.

Уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при неосложнённом и осложнённом пневмонией течении коклюша, ($M \pm SD$).

Цитокины	Группа контроля		Дети до года (n=33)		Дети старше года (n=26)	
	Дети до года (n=10)	Дети старше года (n=10)	Неосложнённое течение (n=16)	Осложнённое пневмонией (n=17)	Неосложнённое течение (n=20)	Осложнённое пневмонией (n=6)
ИЛ-1 β	4,4 \pm 0,5 пкг/мл	5,4 \pm 0,7 пкг/мл	14,5 \pm 1,5 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	15,11 \pm 1,49 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	14,54 \pm 1,19 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_4 > 0,05$	14,26 \pm 2,3 пкг/мл $p_1 < 0,001$
ИЛ-1RA	351,4 \pm 42,5 пкг/мл	372,2 \pm 42,06 пкг/мл	1374,8 \pm 92 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	1238,6 \pm 95,4 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	1328,4 \pm 80,5 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_4 > 0,05$	1330,3 \pm 155 пкг/мл $p_1 < 0,001$
ИЛ-8	10,24 \pm 0,46 пкг/мл	8,06 \pm 0,47 пкг/мл	24,96 \pm 6,9 пкг/мл $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	26,27 \pm 6,8 пкг/мл $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	25,72 \pm 5,7 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_4 > 0,05$	24,86 \pm 10,3 пкг/мл $p_1 < 0,01$
ФНО- α	2,26 \pm 0,42 пкг/мл	2,64 \pm 0,47 пкг/мл	12 \pm 0,9 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	11,25 \pm 0,93 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	11,76 \pm 0,77 пкг/мл $p_1 < 0,001$ $p_4 > 0,05$	11,66 \pm 1,55 пкг/мл $p_1 < 0,001$
ИЛ-4	1,41 \pm 0,17 пкг/мл	2,19 \pm 0,24 пкг/мл	1,49 \pm 0,15 пкг/мл $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	1,5 \pm 0,15 пкг/мл $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	1,5 \pm 0,13 пкг/мл $p_1 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	1,5 \pm 0,23 пкг/мл $p_1 < 0,05$
ИЛ-10	1,061 \pm 0,28 пкг/мл	1,49 \pm 0,19	3,53 \pm 1,1 пкг/мл $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	3,34 \pm 1,07 пкг/мл $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	3,44 \pm 0,9 пкг/мл $p_1 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	3,56 \pm 1,7 пкг/мл $p_1 > 0,05$

Примечание: p_1 - достоверность различий показателей цитокинов у больных коклюшем с неосложнённым и осложнённым пневмонией течением и группой контроля; p_2 - достоверность различий показателей уровня цитокинов у больных коклюшем с неосложнённым течением в возрасте до года и старше года; p_3 - достоверность различий показателей уровня цитокинов у больных коклюшем с осложнённым пневмонией течением в возрасте до года и старше года, p_4 - достоверность различий показателей цитокинов у больных коклюшем с неосложнённым и осложнённым пневмонией течением в каждой возрастной группе

Следует отметить, что на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию оказывают влияние интерлейкины. Тромбоциты, взаимодействуя с лимфоцитами, главным образом Т-хелперами, стимулируют их посредством высвобождающихся из кровяных пластинок молекул IL-1 [8, 9], IL-1 β в свою очередь повышает число лимфо-

цитарно-тромбоцитарных коагрегатов. Противовоспалительные же IL-4, IL-10 наоборот существенно ингибируют ЛТА и, следовательно, миграцию иммуноцитов в очаг повреждения [6, 5]. Оценивая взаимосвязь ЛТА с про-, противовоспалительными цитокинами при коклюше, мы отметили прямую связь ЛТА с ИЛ-1 β , ФНО- α при

Таблица 3.

**Корреляция между ЛТА и уровнем цитокинов при коклюше
($p<0,05$)**

Клиническая группа		ЛТА, %	IL-1 β	IL-1RA	IL-8	ФНО- α	IL-10	IL-4
Контроль (n=20)	до года (n=10)	14,0±0,33	0,52	0,5	-0,04	-0,25	0,29	0,02
	старше года (n=10)	13,4±0,3	-0,02	-0,07	-0,04	-0,25	0,00	0,09
Дети до года (n=32)	Неосложненное течение (n=15)	19,84±1,41	0,47	-0,07	-0,42	0,28	0,26	0,41
	Осложненное течение (n=17)	20,34±1,34	-0,16	-0,11	0,57*	-0,4*	-0,28	-0,3*
Дети старше года (n=27)	Неосложненное течение (n=20)	20,06±1,2	0,09	-0,41	0,09	0,1	-0,24	-0,01
	Осложненное течение (n=7)	20,05±2,7	-0,69*	-0,52*	-0,61*	-0,58*	-0,3*	-0,25

Примечание: $r = 0-0,3$ - слабая связь, $r = 0,3-0,7$ - связь средней силы, $r = 0,7-1$ - сильная связь. В случае полученного результата со знаком "+" - связь прямая, при результате со знаком "-" - связь обратная.

неосложнённом течении и обратную - при осложнённом течении. Обратная связь разной силы также определялась с рецепторным антагонистом ИЛ-1 и противовоспалительными цитокинами ИЛ-4, ИЛ-10 во всех группах больных. Исключение составили дети до года с благоприятным течением, у которых наблюдалась прямая корреляция средней силы ЛТА и противовоспалительных цитокинов. Такая взаимосвязь могла определяться многими факторами, в том числе и действием самой бактерии, как первопричины. *B. pertussis*, попадая на слизистые оболочки ротовоглотки и продуцируя множество токсинов, повреждает ткани, в том числе эндотелий сосудов. В результате образуются лимфоцитарно-тромбоцитарные коагрегаты, стимулируется продукция провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, усиливают ЛТА. Коклюшный токсин подавляя функцию макрофагов, моноцитов и лимфоцитов провоцирует кратковременную анергию (в течении 1 мес.). Снижение продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов приводит к присоединению, активации бактериальной флоры с развитием осложнений. В случае пневмонии повреждение лёгочной ткани способствует повышенному образованию

лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов с обратной связью с про- и противовоспалительными цитокинами. А так как в процессе взаимодействия тромбоцитов и лимфоцитов, повышается стимуляция ИЛ-1, продуцируемого кровяными пластинками, то данный процесс можно рассматривать как компенсаторный при срыве механизмов регуляции иммунитета и направленный на ограничение очага повреждения.

Выводы:

- У больных коклюшем с неосложнённым и осложнённым пневмонией течением отмечалось повышение образования лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов.
- На фоне заболевания развивается первая фаза клеточного иммунитета - фаза напряжения.
- При благоприятном течении коклюша взаимодействие ЛТА с провоспалительными цитокинами находилось в прямой связи различной силы, при осложнённом пневмонией течении данная связь обратная
- Взаимосвязь противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10), рецепторного антагониста ИЛ-1 с ЛТА во всех случаях обратная, исключение составили дети до года с благоприятным течением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Витковский Ю.А. Влияние цитокинов на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Медицинская иммунология. - 2002. - Т. 4, № 2. - С. 135-136.
2. Жеребцова С.В. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия при ишемической болезни сердца : автореф. дисс... канд. мед. наук / С.В. Жеребцова. -2008. - 21с.
3. Инфекционные болезни у детей : пер. с англ. / под ред. Марри. - М. : Практика, 2006. - 928 с.
4. Кузник Б.И. Молекулы и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия / Б.И. Кузник, Ю.А. Витковский, А.В. Солпов // Вестник гематологии. - 2006. - №2. - С. 42-52.
5. Параконский А.П. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Фундаментальные исследования. - 2008. - №1. - С. 112-113.
6. Солпов А.В. Механизмы лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.В. Солпов. - 2005. - 24с.
7. Солпов А.В. Влияние цитокинов на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2002. - №1. - С. 34-36.
8. Hawrylowich C.M. Platelet-derived interleukin-1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production / C.M. Hawrylowich, G.L. Howells, M. Feldmann // J. Exp. Med. - 1991. - Vol. 174. - № 4. - P. 785-790.
9. Kuijupes T.W. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and plateletactivating factor in neutrophil adherence to IL-1-mediated prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation/T.W. Kuijupes [et al.] // J. Immunol. 1991. - Vol. 147. - № 4. - P. 1369 - 1376.
10. Solpov A. Influence of monocyte on lymphocyte-platelet adhesion / A. Solpov // Thrombosis and Haemostasis. - Suppl. - Abstr. XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Birmingham,UK July, 2003. - P. 60.
11. Vitkovsky Yu. Cytokine influence on lymphocyte-platelet adhesion/Yu. Vitkovsky, A. Solpov, B. Kuznik // Thrombosis and Haemostasis. - 2001. - P. 2711.