

висимой хемилюминесценции в нейтрофилах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины не выявило изменений показателей фоновой хемилюминесценции. Оценка стимулированной опсонизированным зимозаном хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови обнаружила сокращение времени реагирования на стимул, снижение максимума «дыхательной вспышки» и уменьшение площади под хемилюминесцентной кривой. Таким образом, в группе детей с бронхообструктивным синдромом нарушена кинетика спонтанного хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови. При стимуляции нейтрофилов *in vitro* сохраняются изменения кинетики хемилюминесцентного ответа и наблюдается тенденция к понижению резервных возможностей кислородзависимого метаболизма. В группе детей с гипертрофией глоточной миндалины изменения хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови отмечаются только при индукции опсонизированным зимозаном. Наблюдается сохранение компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови в нагрузочных тестах с опсонизированным зимозаном.

Результаты исследования показали однонаправленные изменения показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе детей с бронхообструктивным синдромом и в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины с рецидивирующей респираторной инфекцией. Изменения параметров люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови зависели от варианта осложненного течения рецидивирующей респираторной инфекции. Показатели хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови были более выраженными в группе детей с бронхообструктивным синдромом.

Ключевые слова: нейтрофилы, фагоцитоз, хемилюминесценция, дети, рецидив, респираторная инфекция

CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN YOUNG CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY INFECTION

Kurtasova L.M.^a, Lubnina T.V.^b, Safontseva E.V.^c

^a V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Interdistrict City Pediatric Hospital No. 4, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Neutrophils characterized by high mobility and ability for quick and accurate reresponse upon homeostatic changes. These changes primarily occur at the inflammation site. The pathogen elimination depends on the phagocytic activity of neutrophils. The data from past decades have revisited the role of neutrophils and their involvement in changing the human cellular and humoral immunity. Neutrophils are not only effector cells, but also regulatory cells of both innate and adaptive immunity.

Our purpose was to study phagocytic activity and parameters of oxygen-dependent metabolism of peripheral blood neutrophils in young children with recurrent respiratory infections. We examined 111 children aged 1-3 years with recurrent respiratory infections over the period of clinical remission. The control group consisted of 24 healthy children aged 1-3 years. Phagocytic activity of peripheral blood neutrophils was studied by the latex test. Luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils was studied according to de Sole et al. (1983).

The study of phagocytic indexes of peripheral blood neutrophils in the children with recurrent respiratory infections has revealed a decrease in the number of actively phagocytizing cells and preservation of their absorptive capacity. Studies of luminol-dependent chemiluminescence in peripheral blood neutrophils in children with recurrent respiratory infections revealed changes in oxygen-dependent metabolism depending on the clinical variant of complicated infection. In the group of children with broncho-obstructive syndrome, the background chemiluminescence parameters of peripheral blood neutrophils were characterized by faster time to chemiluminescence curve peak. Chemiluminescence indices induced by opsonized zymosan showed a lower time of reaction to stimuli, decreased intensity of “respiratory burst”-associated luminescence, and decreased trend for activation index of peripheral blood neutrophils. Study of luminol-dependent chemiluminescence

peripheral in blood neutrophils in children with hypertrophy of pharyngeal tonsils did not reveal changes in the background chemiluminescence levels. Chemiluminescence evaluation upon stimulation of peripheral blood neutrophils by opsonized zymosan caused a decrease in the stimulated response time, lower maximal “respiratory burst”, and decrease in AUC chemiluminescence. Thus, kinetics of spontaneous chemiluminescent response in peripheral blood neutrophils is impaired in children with broncho-obstructive syndrome. Similarly, the *in vitro* neutrophil stimulation showed changes in chemiluminescent response kinetics and decreased reserve of oxygen-dependent metabolic capacity. In the children with hypertrophy of pharyngeal tonsil, we observed changes in chemiluminescent response of peripheral blood neutrophils only after opsonized zymosan induction. Compensatory metabolic capacity of peripheral blood neutrophils was retained in the opsonized zymosan stress tests.

The study results showed unidirectional changes in peripheral blood neutrophil phagocytic activity parameters both in children with broncho-obstructive syndrome, and in children with pharyngeal tonsil hypertrophy and recurrent respiratory infection.

Keywords: phagocytosis, chemiluminescence, neutrophils, respiratory infection

Введение

Нейтрофил принадлежит к наиболее реактивным клеткам крови. Он высокочувствителен к разнообразным изменениям внутренней среды, которые отражают нарушения гомеостаза во многих системах организма. В настоящее время нейтрофилы перестали считать клетками, обладающими исключительно антимикробной резистентностью. Получены данные, свидетельствующие, что нейтрофилы являются не только эффекторными, но и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета [1, 3].

Кроме того, установлено, что нейтрофилы участвуют в защите против внутриклеточных патогенов, в частности вирусов. При этом выявлено, что вирусы способны угнетать метаболизм нейтрофилов человека. Так, в остром периоде вирусной инфекции способность к активации гексозомонофосфатного шунта может снижаться на 80% и более. При острой вирусной инфекции лимфоглоточного кольца обнаружено изменение экспрессии мембранных рецепторов CD16⁺ и CD11b⁺ в популяции CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов [4, 6].

Исследования, проведенные нами ранее, показали изменение функциональной активности нейтрофилов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины [2].

Необходимо отметить, что в нейтрофилах человека обнаружена гистаминаза — фермент, разрушающий один из основных медиаторов гиперчувствительности немедленного типа — гистамин [1, 3].

При этом нейтрофилы обладают наибольшей из всех клеток организма способностью генерировать активные формы кислорода, оказывающие цитопатическое действие благодаря высокому содержанию в них NADPH-оксидазы и миелопероксидазы [3, 7].

Учитывая, вышеизложенное целью исследования явилось изучение фагоцитарной активности и показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующей респираторной инфекцией.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 111 детей с рецидивирующей респираторной инфекцией в возрасте 1-3 лет. Из них 54 ребенка с бронхообструктивным синдромом (БОС) и 57 детей с гипертрофией глоточной миндалины (ГГМ). Частота респираторных инфекций в году составляла 6 раз и более. Гипертрофию глоточной миндалины верифицировали на основании жалоб (затруднение носового дыхания, дыхание через рот, отделяемое из носа) и эндоскопической картины (наличие аденоидных вегетаций II-III степени в полости носоглотки). Бронхообструктивный синдром характеризовался приступообразным кашлем, экспираторной одышкой и приступами удушья. Исследования проводили в период клинического благополучия и отсутствия терапии в течение месяца, предшествующего обследованию.

Контрольную группу составили 24 практически здоровых детей аналогичного возраста.

Выделение нейтрофилов проводили из цельной венозной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ — для отделения лимфоцитов и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ — для выделения нейтрофилов. Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали в тесте с частицами латекса. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ).

Исследование люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов периферической крови проводили методом de Sole P. и соавт. [5] на ХЛ-анализаторе CL-3604 (Россия) в течение

90 мин. Определяли следующие показатели: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение (Imax) и площадь (S) под ХЛ-кривой. В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл (Sigma, США). Усиление стимулированной зимозаном хемилюминесценции, относительно спонтанной хемилюминесценции, оценивали соотношением S_{зим./Спон.} и определяли как индекс активации (ИА).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft, Inc., США). Описательные статистики, учитывая нормальное распределение признаков, представлены средней арифметической (M) и стандартной ошибкой среднего ($\pm m$). Для изучения статистической значимости различий применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе детей с БОС обнаружило статистически значимое снижение количества активно фагоцитирующих клеток ($45,09\% \pm 3,55$) относительно показателей контрольной группы ($58,75\% \pm 2,71$, $p < 0,001$). В то же время фагоцитарное число ($6,36$ у.е. $\pm 0,42$) в группе детей с БОС не имело статисти-

чески значимых различий с группой контроля ($6,09$ у.е. $\pm 0,29$).

Исследование показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе пациентов с ГГМ установило статистически значимое снижение количества активно фагоцитирующих нейтрофилов ($49,27 \pm 2,46$) по сравнению с показателями контроля ($58,75\% \pm 2,71$, $p < 0,001$). При этом значения фагоцитарного числа ($6,55$ у.е. $\pm 0,25$) статистически значимо не отличались от величин контрольной группы ($6,09$ у.е. $\pm 0,29$).

Анализ показателей люминолзависимой ХЛ в группе детей с БОС выявил статистически значимое сокращение времени выхода на максимум свечения спонтанной ХЛ нейтрофилов периферической крови по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 1).

При индукции хемилюминесцентной реакции опсонизированным зимозаном установлено статистически значимое уменьшение времени реагирования на стимул, снижение максимального уровня «дыхательной вспышки», а также выраженную тенденцию к понижению индекса активации в группе детей с БОС относительно показателей в группе контроля (табл. 1).

Известно, что функциональные возможности нейтрофилов проявляются только на фоне стимулирующих воздействий. При этом стимуляция радикально меняет метаболический профиль нейтрофила. В то же время одним из универсальных проявлений реактивности нейтрофила явля-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХООБСТРУКТИВНЫМ СИНДРОМОМ (M $\pm$ m)

TABLE 1. INDICATORS CHEMILUMINESCENCE BLOOD NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH BROCHOOBSTRUCTIVE SYNDROME (M $\pm$ m)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 24)	Бронхообструктивный синдром Brochoolstructive syndrome (n = 54)	p
Спонтанная хемилюминесценция Spontaneous chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2220,62 $\pm$ 181,63	1797,10 $\pm$ 85,20	0,05
Imax, о.е. $\times 10^3$	2,99 $\pm$ 0,24	2,85 $\pm$ 0,33	
S, о.е. $\times 10^5$	3,58 $\pm$ 0,30	3,13 $\pm$ 0,33	
Индукцированная хемилюминесценция Induced chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2460,00 $\pm$ 81,24	2181,80 $\pm$ 84,20	0,05
Imax, о.е. $\times 10^3$	11,51 $\pm$ 1,03	6,71 $\pm$ 1,00	0,05
S, о.е. $\times 10^5$	11,27 $\pm$ 1,08	11,05 $\pm$ 1,94	
S _{зим./Спон.} Ssim./Sspon.	3,94 $\pm$ 0,38	2,83 $\pm$ 0,33	0,1 > p > 0,05

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ (M±m)

TABLE 2. INDICATORS CHEMILUMINESCENCE BLOOD NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PHARYNX GEAL TONSE (M±m)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 24)	Гипертрофия глоточной миндалины Hypertrophy of the pharynx geal tonse (n = 57)	p
Спонтанная хемилюминесценция Spontaneous chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2220,62±181,63	1886,00±132,41	
Imax, о.е. × 10³	2,99±0,24	3,66±0,37	
S, о.е. × 10⁵	3,58±0,30	2,87±0,28	
Индукцированная хемилюминесценция Induced chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2460,00±81,24	2150,66±73,91	0,01
Imax, о.е. × 10³	11,51±1,03	7,38±0,66	0,01
S, о.е. × 10⁵	11,27±1,08	5,99±0,58	0,001
Sзим./Сспон. Ssim./Sspon.	3,94±0,38	3,05±0,32	

ется респираторный взрыв [2, 3]. Важно отметить, что метаболический взрыв нейтрофил использует для «вооружения» против микробов и других объектов, которые воспринимаются им как факторы, нарушающие структурный гомеостаз.

Результаты проведенного нами исследования отметили в группе детей с БОС нарушение способности нейтрофилов периферической крови к выработке активных форм кислорода (АФК) в ответ на стимуляцию *in vitro*, о чем свидетельствует снижение интенсивности респираторного взрыва в нагрузочных пробах и выраженная тенденция к уменьшению величины индекса активации клеток в тесте с зимозаном, отражающего понижение компенсаторных возможностей АФК-продуцирующих систем клетки.

Оценка параметров люминолзависимой хемилюминесценции в группе детей с ГГМ не обнаружила статистически значимых различий показателей фоновой ХЛ нейтрофилов периферической крови с величинами контрольной группы (табл. 2).

При стимуляции хемилюминесцентной реакции нейтрофилов крови опсонизированным зимозаном в группе детей с ГГМ наблюдается статистически значимое сокращение времени реагирования на стимул, снижается уровень респираторной вспышки и уменьшается площадь под ХЛ-кривой по сравнению с контрольными показателями (табл. 2). В то же время необходимо отметить, что показатели индекса активации в

группе детей с ГГМ не имеют статистически значимых различий с параметрами группы контроля (табл. 2). Данные результаты отражают сохранение компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови в группе детей с ГГМ.

Сравнительный анализ показал, что в группе детей с БОС отмечаются нарушения кинетики фоновой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови, в то время как в группе детей с ГГМ изменений не было обнаружено. При стимуляции ХЛ-ответа опсонизированным зимозаном в группе детей с БОС наблюдается выраженная тенденция к снижению адаптивных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови. В группе детей с ГГМ компенсаторные возможности АФК-продуцирующей системы нейтрофилов крови сохранены.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлены изменения ХЛ-ответа нейтрофилов периферической крови у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией. При этом выявленные изменения зависят от варианта осложненного течения рецидивирующей респираторной инфекции.

Заключение

Результаты проведенного исследования обнаружили у детей с рецидивирующей респиратор-

ной инфекцией на фоне снижения количества активно фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови сохранения ими поглотительной способности. Кроме того, полученные нами данные установили изменение показателей люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у детей с рециди-

вирующей респираторной инфекцией, которые зависели от варианта осложненного течения инфекции. Данное обстоятельство, безусловно, необходимо учитывать при разработке иммунокорректирующих мероприятий у детей с осложненным течением рецидивирующей респираторной инфекции.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю. Секреторные функции нейтрофилов // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 2. С. 210-212. [Dolgushin I.I., Savochkina A.Yu. Secretory functions of neutrophils. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 2, pp. 210-213. (In Russ.)]
2. Куртасова Л.М., Лубнина Т.В. Изменения функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Сибирское медицинское обозрение, 2014. № 4. С. 44-47. [Kurtasova L.M., Lubnina T.V. Changes in the functional-metabolic activity of peripheral blood neutrophils in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsil. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2014, no. 4, pp. 44-47. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология, 2015. № 4. С. 257-265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at "Old players" on the immunological field 1 sbei. *Immunologiya = Immunology*, 2015, no. 4, pp. 257-265. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Русина Т.В. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекции // Иммунология, 2016. № 4. С. 199-204. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Rusinova T.V. Differentiation of variants subpopulations transformed phenotype CD16⁺CD11b⁺ neutrophils in acute viral and acute bacterial infections 1 sbei HPE. *Immunologiya = Immunology*, 2016, no. 4, pp. 199-204. (In Russ.)]
5. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.
6. Hung S.L., Chiang Y.T. Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *J. Periodont. Res.*, 2012, Vol. 4, pp. 1600-1665.
7. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, Vol. 18, no 6, pp. 642-660.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии и иммунологии с курсом после дипломного образования ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Лубнина Т.В. — врач-инфекционист лечебно-консультативного отделения КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Сафонцева Е.В. — врач-оториноларинголог, заведующий приемно-диагностическим отделением КГБУЗ «Межрайонная городская детская больница № 4», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy and Immunology with a Course of Postgraduate Education, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Lubnina T.V., Clinical Infectiologist, Medical Counseling Department, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Safontseva E.V., ORL Doctor, Head, Ambulance and Diagnostic Department, Interdistrict City Pediatric Hospital No. 4, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 24.07.2021

Отправлена на доработку 05.01.2022

Принята к печати 29.01.2022

Received 24.07.2021

Revision received 05.01.2022

Accepted 29.01.2022