

На правах рукописи

**Карпова Нина Владимировна**

**СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ И ЦИТОКИНОВОЙ СИСТЕМ У ЧАСТО  
БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ И МЕТОДЫ КОРРЕКЦИИ ВЫЯВЛЕННЫХ  
НАРУШЕНИЙ**

14.00.36 – Аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор  
Бляхер Мария Сергеевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор  
Краснопрошина Людмила Ивановна

доктор медицинских наук  
Суслов Анатолий Петрович

Ведущая организация: Государственное предприятие  
Государственный научный центр  
«Институт иммунологии  
Федерального медико-биологического  
агентства»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008г. в \_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г. Москва

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

Л.И.Новикова

## **Общая характеристика работы.**

### **Актуальность проблемы.**

Проблема часто и длительно болеющих детей (ЧБД) привлекает внимание педиатров и иммунологов тем, что контингент таких детей составляет весьма распространенную группу, а разработанные программы реабилитации часто неэффективны (Щербакова Б.В., 2000). Об актуальности данной проблемы говорит то, что каждый 4-5 ребенок Российской Федерации может быть отнесен к этой группе (Балаболкин И.И., 2003; Гаращенко Т.И., 2001; Рылеева И.В., 2003). Следует отметить, что зарубежные школы не используют термин «часто болеющие дети», нет его и в МКБ 10 (международной классификации болезней), так как это не диагноз в медицинском понимании слова (Самсыгина Г.А., 2004). В практике зарубежных педиатров принято считать, что обычно здоровые дети переносят до 8 - 10 ОРЗ в год, и это не является свидетельством иммунной недостаточности. Если частота респираторных инфекций составляет 8 и более раз в год, то используется термин «возвратные, рекуррентные респираторные инфекции» (Calvo Rey C. et al., 2006; Daele J., Zicot A.F., 2000; Kemp A.S., Shelton M.J., 1992; Nokso-Koivisto J. et al., 2002).

В основе частых ОРЗ у детей лежат состояния, характеризующиеся нарушением нормального функционирования одного или нескольких звеньев иммунитета (Петрук Н.И. и др., 1999; Daele J., Zicot A.F., 2000). Функциональное состояние иммунокомпетентных клеток и способность к формированию полноценной межклеточной кооперации определяют возможность сопротивления иммунной системы частым ОРЗ, при недостаточности этих звеньев иммунной системы развиваются хронические заболевания (Запруднов А.М., 1996). Таким образом, возрастная относительная незрелость механизмов иммунной реактивности и других адаптивных систем при отсутствии достаточного уровня неспецифических и специфических факторов защиты создают предпосылки для формирования приобретенного иммунодефицита.

Нужна ли и эффективна ли иммунокоррекция у ЧБД? Этот вопрос постоянно привлекает внимание как клиницистов, так и иммунологов, но остается до конца не разрешенным (Коровина Н.А. и др., 2003; Таточенко В.К., Озерецковский Н.А., 2003; Tricarico D. et al., 2004; Pessey J.J. et al., 2003). Поскольку частые эпизоды ОРЗ в детстве могут приводить к негативным последствиям в виде хронизации заболеваний, задача сокращения числа ОРЗ, в частности с помощью адекватной иммунокоррекции, остается актуальной.

### **Цель настоящего исследования**

Целью данной работы является исследование состояния иммунной и цитокиновой систем часто болеющих детей и подбор адекватной иммуномодулирующей терапии, корригирующей выявленные нарушения.

### **Задачи исследования**

1. Получение данных о продукции цитокинов у здоровых детей.
2. Оценка состояния иммунной и цитокиновой систем у ЧБД в сравнении со здоровыми детьми.
3. Выявление наиболее информативных показателей состояния иммунной и цитокиновой систем у ЧБД, влияющих на возникновение у них ОРЗ.
4. Сравнение влияния препаратов Ацилакта, ИРС 19 или их сочетанного применения на иммунную и цитокиновую системы у ЧБД в зависимости от исходного состояния этих систем.

### **Научная новизна**

В работе проведено широкое комплексное обследование ЧБД по показателям состояния численности субпопуляций лимфоцитов, уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови, интерфероногенеза (в биологических тестах и методом иммуноферментного анализа), сывороточного содержания и продукции ряда цитокинов.

Выявлено, что иммунный и цитокиновый статусы здоровых и часто болеющих детей одного возраста отличаются. Эти различия заключаются в снижении у ЧБД численности ряда субпопуляций лимфоцитов, индуцированной продукции ИФН $\gamma$ , спонтанной продукции ФНО $\alpha$ , соотношения Тх1/Тх2 и повышении индуцированной продукции ИЛ4.

Показано, что хотя у ЧБД в среднем численность субпопуляций лимфоцитов, особенно Т-субпопуляций, снижена по сравнению со здоровыми детьми, риск возникновения очередного ОРЗ от этого мало зависит. В то же время у детей со сниженной продукцией ИФН $\gamma$  и ИФН $\alpha$ , а также снижением соотношения Тх1/Тх2, ОРЗ возникало чаще, чем у детей с нормальными показателями.

Впервые прослежено влияние препарата Ацилакт и его сочетания с ИРС 19 на состояние иммунной и цитокиновой систем у ЧБД. Их применение оказывает влияние как на численность субпопуляций лимфоцитов, так и на цитокиновый профиль у ЧБД. Сниженные показатели под влиянием указанных иммуномодуляторов повышались или нормализовались.

При сравнении разных схем иммуномодулирующей терапии у ЧБД впервые показано, что Ацилакт оказался более эффективным в плане коррекции выявленных нарушений, т.к. он нормализовал численность субпопуляций, повышал продукцию как ИФН $\alpha$ , так и ИФН $\gamma$ , повышал соотношение Тх1/Тх2, не оказывая негативного влияния на эти показатели, если исходно они были в норме, в отличие от ИРС 19 или его сочетания с Ацилактом.

### **Практическая значимость работы**

Показана эффективность применения препарата Ацилакт у ЧБД для коррекции нарушений состояния иммунной и цитокиновой систем. Продемонстрирована необходимость проведения анализа состояния указанных систем перед началом лечения, т.к. иммунокоррекция у ЧБД с нормальными показателями может привести к существенному снижению последних.

## **Внедрение результатов работы**

Материалы диссертации использованы при написании медицинской технологии «Использование иммуномодуляторов для коррекции показателей иммунной и цитокиновой систем при оздоровлении детей, часто болеющих острыми респираторными и вирусными заболеваниями верхних дыхательных путей» (утверждена на заседании Ученого Совета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского 11.12.05, протокол №9) и «Инструкции по применению Ацилакта, таблетки 1 доза, 5 доз» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко 26.06.07 №01- 11/104 - 07).

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Состояние иммунного и цитокинового статуса здоровых и часто болеющих детей одного возраста отличаются. Некоторые из этих изменений – сниженный уровень индуцированной продукции ИФН $\gamma$ , ИФН $\alpha$  и соотношения Тх1/Тх2 - способствуют возникновению у ЧБД очередного ОРЗ.
2. Препарат Ацилакт имеет ряд преимуществ перед ИРС 19 в плане коррекции иммунного и цитокинового статуса у ЧБД, т.к. он нормализует численность субпопуляций лимфоцитов, соотношение Тх1/Тх2, повышает продукцию как ИФН $\alpha$ , так и ИФН $\gamma$ .
3. Применение указанных иммуномодуляторов наиболее показано детям со сниженными показателями состояния иммунной и цитокиновой систем.

## **Апробация материалов диссертации**

Апробация диссертационной работы проведена на заседании Секции Ученого Совета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского "Общая и прикладная иммунология» 24 октября 2008 г.

Результаты работы доложены и обсуждены на Международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты

питания. Современное состояние и перспективы » (Москва, июнь 2004 г.), на Всероссийском научном симпозиуме «Цитокины. Стволовая клетка. Имму- нитет» (Новосибирск, июль 2005 г.), на Конгрессе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге, 2006», на Объединенном иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, июнь 2008).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 100 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты собственных исследований», обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Ра- бота иллюстрирована 7 рисунками и 21 таблицами. В список литературы во- шли 188 работ, из которых 79 отечественных и 109 зарубежных авторов.

### **Содержание работы**

#### **Материалы и методы исследования**

Исследование было проведено в лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в сотрудничестве с сотрудниками детского санатория общего типа «Кратово».

#### **Материалы исследования**

Материалом для иммунологических исследований служили сыворотки крови, лимфоциты периферической крови, супернатанты стимулированных культур лейкоцитов периферической крови.

В ходе работы было обследовано 177 детей в возрасте от 4 до 7 лет.

Группа из 160 детей, однородная по клиническим показателям и про- водимому лечению, была сформирована из часто болеющих детей, посту- пивших в санаторий «Кратово» для прохождения реабилитационно-

оздоровительных мероприятий. Кровь для исследования бралась до начала применения препаратов и через 21 день.

Контрольная группа из 17 детей, обследованная в тот же период, была сформирована из детей, находившихся в санатории и не относящихся к группе длительно и часто болеющих детей.

Обе группы детей были обследованы по одинаковой схеме, с использованием одних и тех же иммунологических реагентов.

Для изучения влияния на иммунную и цитокиновую системы в данном исследовании были использованы следующие иммуномодуляторы.

1. ИРС 19 - Solvey Pharma, Франция, рег. номер: П № 012103/01-2000 - спрей для интраназального применения. Препарат применялся по 1 дозе интраназально 2 раза в день в течение двух недель.

2. Ацилакт - Витафарма, Россия, рег. № 000062/01- 2000, 19.10.2000 - применялся в виде таблеток per os по 5 таблеток (по 5 доз каждая) 2 раза в день в течение двух недель.

Вид лечения	Санаторное лечение	Ацилакт	ИРС 19	Ацилакт + ИРС 19
Количество детей	50	57	39	14

### Методы исследования

**Имунофенотипирование CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+ лимфоцитов** проводили на проточном цитофлюориметре «Beckman Coulter FC 500», США, или «Fax Calibur», США, с использованием моноклональных антител фирмы «Beckman Coulter», США.

**Определение интерферонов статуса человека** проводили микрометодом в цельной гепаринизированной крови по методике С.С. Григорян (Григорян С.С., 1989; Ершов Ф.И., 1996). Определяли уровень интерферона в сыворотке крови, способность лейкоцитов периферической крови к спонтанной продукции интерферонов и под действием индукторов ИФНа (вирус болезни Ньюкасла, штамм Канзас, предоставленный сотрудниками ГУ «Науч-

но-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН, Москва) и ИФНγ (ФГА Р, «DIFCO», США). Биологическая активность интерферонов определялась по их способности отменять цитопатогенный эффект вируса болезни Ньюкасла *in vitro*, и выражалась в единицах, обратных логарифму (lg) титра, на мл сыворотки или супернатанта.

**Определение концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG)** в сыворотке крови было выполнено методом радиальной иммунодиффузии в агарозном геле по Манчини (Чернохвостова Е.В., Герман Г.П., 1984; Manchini G. et al., 1964).

**Определение цитокинов в сыворотке крови или в супернатантах культуры клеток крови** проводилось иммуноферментным методом с помощью тест-систем фирм «Цитокин» и «Вектор-Бест» (Россия).

**Внутриклеточное мечение:** количество Т-хелперов 1 и 2 типа среди Т-лимфоцитов крови (CD3 положительных) определяли по находящимся внутри них ИФНγ или ИЛ-4, соответственно. Внутриклеточное иммунофлуоресцентное мечение CD3+ИФНγ+ и CD3+ИЛ4+ лимфоцитов в крови обследуемых детей проводилось с помощью реагентов фирмы «Becton Dickinson», США.

**Статистическая обработка результатов исследования** была выполнена с помощью компьютерных программ MS EXCEL. Статистически достоверное различие результатов определялось с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между параметрами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Проведено исследование состояния иммунного, интерферонового статуса и продукции цитокинов у часто болеющих детей, а также воздействия на эти показатели иммуномодуляторов - ИРС 19 и Ацилакта.

На рисунках 1 и 2 приведены результаты исследования численности субпопуляций лимфоцитов у ЧБД. У этих детей наблюдалась некоторая лимфопения и значимое ( $p \leq 0,05$ ) снижение численности (абсолютной и от-

носителем) практически всех основных субпопуляций лимфоцитов по сравнению с возрастной нормой; только количество CD8+ лимфоцитов значительно не отличалось.

Рис.1 Абсолютная численность субпопуляций лимфоцитов у ЧБД (—) в процентах от нормы (——) – обследовано 160 детей.

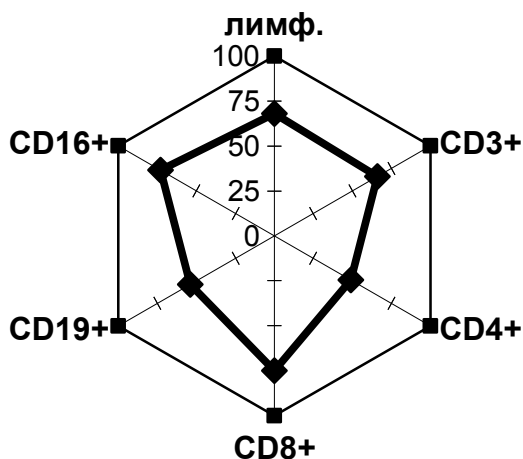
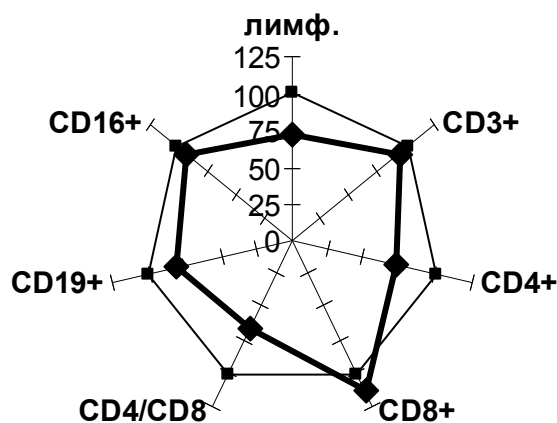


Рис.2 Относительная численность субпопуляций лимфоцитов у ЧБД (—) в процентах от нормы (——)



Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови ЧБД была изменена по сравнению со здоровыми детьми следующим образом - IgG был несколько снижен, IgM оставался в пределах нормы, концентрация IgA у большинства детей была на нижней границе возрастной нормы, таким образом, функция В-лимфоцитов у ЧБД несколько снижена.

При применении различных схем оздоровительной терапии наблюдалась следующая картина (табл. 1). Санаторное лечение не оказывало существенного действия на субпопуляционный состав лимфоцитов.

Табл.1. Влияние иммуномодуляторов на относительную (%) и абсолютную ( $\times 10^6/\text{л}$ ) численность субпопуляций лимфоцитов ( $M \pm tm$ )

	№	Санатор. лечение	ИРС19	Ацилакт	ИРС19+ Ацилакт	Норма
Лейкоциты	1	7682±1460	7797±853	7125±658	6671±1192	7900 ±1000
	2	7870±997	8708±942	7586±514	<b>8936±1319*</b> ↑	
Лимфоциты	1	36±3 2630±470	28±4 2138±348	32±3 2305±226	26±4 1603±230	47±4
	2	33±3 2428±443	29±4 2430±294	34±2 3048±867	30±4 <b>2655±396</b> *↑	3900 ±600
CD3+	1	62±3 1701±278	57±3 1227±211	61±3 1399±151	65±4 1050±169	68±2
	2	62±3 1675±339	<b>60±3</b> *↑ 1306±170	64±2 <b>1672±183</b> *↑	62±4 <b>1638±258</b> *↑	2600 ±400
CD4+	1	38±3 930±172	32±2 652±107	36±2 835±94	37±3 596±103	50±2
	2	37±2 929±190	32±2 663±87	<b>40±2*</b> ↑ <b>1045±112</b> *↑	<b>30±3*</b> ↓ <b>799±137</b> *↑	1950 ±350
CD8+	1	24±2 605±113	22±2 466±93	24±2 565±71	23±2 373±70	21±2
	2	23±2 598±170	23±2 534±82	25±2 <b>681±94*</b> ↑	25±3 <b>647 ±134</b> *↑	870 ±200
CD4+/ CD8+	1	1,62 ±0,24	1,59 ±0,16	1,66 ±0,17	1,64 ±0,19	2,4 ±0,15
	2	1,66 ±0,23	<b>1,32 ±0,12*</b> ↓	1,74 ±0,16	<b>1,32 ±0,26*</b> ↓	
CD19+	1	20±2 484±95	18±2 390 ±90	21±3 491 ±82	15±2 236 ±44	22±2
	2	20±3 384±76	16±1 357 ±56	21±3 554 ±98	17±2 <b>458 ±108*</b> ↑	900 ±130
CD16+	1	13±2 350±157	15±2 498 ±113	16±2 369 ±56	13±3 219 ±57	14±2
	2	13±2 269±65	15±2 <b>299 ±52*</b> ↓	16±2 442 ±82	<b>16±3*</b> ↑ <b>414 ±82*</b> ↑	500 ±150

В графах с данными о численности лимфоцитов или их субпопуляций верхняя строка – процентное содержание, нижняя строка – абсолютное количество клеток. 1 - до лечения, 2 - после лечения

\* значимое отличие от исходного уровня ( $p \leq 0,05$ )

Применение ИРС19 приводило к увеличению относительного количества CD3+ лимфоцитов, однако так же наблюдалось снижение соотношения CD4+/ CD8+ и содержания CD16+ лимфоцитов. Ацилакт оказывал положительное влияние: увеличивалось абсолютное количество CD3+ лимфоцитов, CD4+ лимфоцитов и абсолютное количество CD8+клеток.

Так выглядело воздействие иммуномодуляторов в целом на группу, которая состояла из детей с разным исходным состоянием иммунной системы.

Был проведен анализ того, является ли влияние иммуномодуляторов на иммунную систему характеристикой только самих препаратов или зависит от состояния иммунной системы ребенка. Было рассмотрено действие иммуномодуляторов на исходно нормальную и исходно сниженную численность субпопуляций лимфоцитов (табл. 2 и 3).

Было выявлено, что при применении иммуномодуляторов у детей с исходно нормальной численностью субпопуляций лимфоцитов наблюдается более или менее выраженное снижение ряда показателей (табл. 2), причем Ацилакт снижал наименьшее количество показателей. Применение иммуномодуляторов у детей с исходно сниженной численностью субпопуляций лимфоцитов приводило к увеличению численности основных субпопуляций (табл. 3), только Ацилакт повышал и соотношение CD4+/ CD8+ клеток.

Влияет ли исходная численность субпопуляций лимфоцитов на заболеваемость детей респираторными заболеваниями? Часть детей в период пребывания в санатории перенесла очередное ОРЗ. Ретроспективный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов показал, что исходная численность субпопуляций у заболевших и не заболевших детей не различалась, но в примерно одинаковой степени была снижена по сравнению с группой здоровых детей. Это говорит о том, что на возникновение заболевания ОРЗ, вероятно, влияет не только численность субпопуляций лимфоцитов, но и другие компоненты, характеризующие состояние иммунной системы – уровень иммуноглобулинов, фагоцитоз, продукция цитокинов и др.

Табл. 2 Влияние иммуномодуляторов на исходно нормальную относительную (%) и абсолютную ( $\times 10^6/\text{л}$ ) численность субпопуляций лимфоцитов ( $M \pm tm$ )

	№	Санатор. лечение	ИРС 19	Ацилакт	ИРС19+ Ацилакт	Норма
Лейкоциты ( $\times 10^6/\text{л}$ )	1	8991 $\pm$ 1825	8584 $\pm$ 857	8970 $\pm$ 637	7950 $\pm$ 1515	7900 $\pm$ 1000
	2	8200 $\pm$ 1421	8632 $\pm$ 1055	<b>7894<math>\pm</math>678*</b> ↓	9288 $\pm$ 2147	
Лимфоциты	1	38 $\pm$ 4 2903 $\pm$ 530	41 $\pm$ 7 3050 $\pm$ 457	41 $\pm$ 3 2832 $\pm$ 236	37 $\pm$ 12 –	47 $\pm$ 4
	2	33 $\pm$ 3 2384 $\pm$ 511	38 $\pm$ 9 2474 $\pm$ 510	<b>34<math>\pm</math>3*</b> ↓ 2857 $\pm$ 339	32 $\pm$ 15 –	3900 $\pm$ 600
CD3+	1	70 $\pm$ 3 2072 $\pm$ 361	68 $\pm$ 4 1965 $\pm$ 261	69 $\pm$ 2 1991 $\pm$ 183	69 $\pm$ 4 –	68 $\pm$ 2
	2	70 $\pm$ 4 1635 $\pm$ 500	63 $\pm$ 3 <b>1175<math>\pm</math>318*</b> ↓	66 $\pm$ 3 1855 $\pm$ 281	<b>63<math>\pm</math>5*</b> ↓ –	2600 $\pm$ 400
CD4+	1	44 $\pm$ 8 1311 $\pm$ 470	43 $\pm$ 2 1240 $\pm$ 171	45 $\pm$ 2 1307 $\pm$ 115	44 $\pm$ 2 –	50 $\pm$ 2
	2	43 $\pm$ 6 986 $\pm$ 520	38 $\pm$ 5 <b>514<math>\pm</math>281*</b> ↓	44 $\pm$ 4 1222 $\pm$ 230	<b>34<math>\pm</math>4*</b> ↓ –	1950 $\pm$ 350
CD8+	1	23 $\pm$ 2 717 $\pm$ 126	23 $\pm$ 2 748 $\pm$ 134	26 $\pm$ 2 773 $\pm$ 76	23 $\pm$ 2 530 $\pm$ 62	21 $\pm$ 2
	2	24 $\pm$ 3 630 $\pm$ 269	23 $\pm$ 2 525 $\pm$ 193	26 $\pm$ 2 779 $\pm$ 132	24 $\pm$ 3 657 $\pm$ 530	870 $\pm$ 200
CD4+/CD8+	1	2,06 $\pm$ 0,36	2,08 $\pm$ 0,19	2,35 $\pm$ 0,23	2,03 $\pm$ 0,11	2,4 $\pm$ 0,15
	2	1,88 $\pm$ 0,40	<b>1,34<math>\pm</math>0,26*</b> ↓	<b>1,91<math>\pm</math>0,26*</b> ↓	1,82 $\pm$ 0,6	
CD19+	1	19 $\pm$ 2 604 $\pm$ 139	20 $\pm$ 2 558 $\pm$ 116	23 $\pm$ 3 670 $\pm$ 99	16 $\pm$ 2 –	22 $\pm$ 2
	2	16 $\pm$ 2 <b>344<math>\pm</math>90*</b> ↓	17 $\pm$ 2 <b>378<math>\pm</math>96*</b> ↓	21 $\pm$ 2 662 $\pm$ 155	16 $\pm$ 2 –	900 $\pm$ 130
CD16+	1	17 $\pm$ 6 624 $\pm$ 405	20 $\pm$ 3 643 $\pm$ 107	18 $\pm$ 2 505 $\pm$ 72	17 $\pm$ 2 –	14 $\pm$ 2
	2	13 $\pm$ 4 246 $\pm$ 133	17 $\pm$ 2 <b>306<math>\pm</math>68*</b> ↓	18 $\pm$ 2 498 $\pm$ 86	18 $\pm$ 5 –	500 $\pm$ 150

В графах с данными о численности лимфоцитов или их субпопуляций верхняя строка – процентное содержание, нижняя строка – абсолютное количество клеток.

1 - до лечения, 2 - после лечения

\* значимое отличие от исходного уровня ( $p \leq 0,05$ )

Табл. 3 Влияние иммуномодуляторов на исходно сниженную относительную (%) и абсолютную ( $\times 10^6/\text{л}$ ) численность субпопуляций лимфоцитов ( $M \pm m$ )

	№	Санатор. лечение	ИРС19	Ацилакт	ИРС19+ Ацилакт	Норма
Лейкоциты	1	5283±648	4300±1511	4785±275	4966±646	7900 ±1000
	2	7267±162	<b>9000±2674*</b> ↑	<b>7196±814*↑</b>	<b>8466±2065*↑</b>	
Лимфоциты	1	23±16 1744±162	22±2 1356±132	21±2 1441±131	23±3 1485±181	47±4
	2	28±14 2570±1641	<b>29±3*↑</b> <b>2393±372*↑</b>	<b>34±4 *↑</b> <b>2282±375*↑</b>	<b>30±5 *↑</b> <b>2732±454*↑</b>	3900 ±600
CD3+	1	57±5 1284±168	52±5 925±139	51±3 988±91	59±4 1006±152	68±2
	2	<b>66±8*↑</b> 1719±594	59±4 <b>1360±213*↑</b>	<b>61±4 *↑</b> <b>1546±242*↑</b>	60±8 <b>1642±284*↑</b>	2600 ±400
CD4+	1	33±4 772±85	30±2 565±75	30±2 636±61	34±2 596±103	50±2
	2	36±3 906±231	32±2 <b>686±95*↑</b>	<b>38±2 *↑</b> <b>971±126*↑</b>	<b>29±3*↓</b> <b>799±137*↑</b>	1950 ±350
CD8+	1	– 399±84	16±1 311±46	14±1 322±39	– 326±61	21±2
	2	540±164	<b>23±7*↑</b> <b>538±87*↑</b>	<b>20±3 *↑</b> <b>567±127*↑</b>	<b>644±165*↑</b>	870 ±200
CD4+/ CD8+	1	1,38±0,22	1,36±0,12	1,21±0,09	1,46±0,15	2,4 ±0,15
	2	1,54±0,30	1,31±0,14	<b>1,63±0,21*↑</b>	<b>1,1±0,18*↓</b>	
CD19+	1	– 349±37	10±2 211±51	11±2 284±38	– 236±44	22±2
	2	430±143	<b>15±3*↑</b> <b>334±69*↑</b>	19±12 <b>429±94*↑</b>	– <b>458±108*↑</b>	900 ±130
CD16+	1	8±2 200±43	9±1 142±33	9±1 249±32	8±1 204±51	14±2
	2	10±3 <b>281±87*↑</b>	<b>13±4*↑</b> <b>281±96*↑</b>	11±3 <b>390±141*↑</b>	<b>14±2*↑</b> <b>430±82*↑</b>	500 ±150

В графах с данными о численности лимфоцитов или их субпопуляций верхняя строка – процентное содержание, нижняя строка – абсолютное количество клеток.

1 - до лечения, 2 - после лечения – \* значимое отличие от исходного уровня ( $p \leq 0,05$ )

Поскольку по сравнению со здоровыми детьми иммунная система ЧБД характеризуется снижением численности ряда субпопуляций лимфоцитов, их увеличение после приема ИРС 19 или Ацилакта может расцениваться как положительный фактор. Однако на основании только данных о субпопуляционном составе лимфоцитов невозможно делать какие-либо определенные выводы. В следующей части работы исследовалась функциональная активность лимфоцитов.

Ее исследование дало нам возможность понять особенности продукции цитокинов у часто болеющих детей по сравнению со здоровыми детьми и констатировать различия в воздействии иммуномодуляторов на продукцию цитокинов. Исследованию функциональной активности клеток – продукции цитокинов и действию различных иммуномодуляторов на этот процесс - посвящены следующие разделы.

Исследование цитокинового статуса детей проводилось по схеме, приведенной на рис. 3.

Рис.3 Структура исследования цитокинового статуса



Оценка влияния иммуномодуляторов на продукцию цитокинов требовала предварительно установить пределы нормальных колебаний параметров этой продукции. Оказалось, что у здоровых детей они варьируют, но поддаются статистической обработке и могут быть использованы для сравнения с этими показателями у ЧБД и для сравнения данных до лечения и после. Результаты обследования здоровых детей представлены в табл.4.

Табл.4 Продукция цитокинов у здоровых детей ( $M \pm tm$ ),  $n = 17$ .

Цитокин	Концентрация в сыворотке крови (пг/мл)	Спонтанная продукция (пг/мл)	Индукцированная продукция (пг/мл)
ИЛ 2	$3,2 \pm 1,5$	$2,3 \pm 1,1$	$28,3 \pm 5,6$
ИЛ 4	$0,04 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,3$	$4,1 \pm 2,3$
ИЛ 6	$1,4 \pm 0,7$	$1380 \pm 700$	$6000 \pm 2200$
ИЛ 8	$2,3 \pm 1,6$	$8500 \pm 4100$	$17500 \pm 5300$
ИЛ 10	$0,1 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,2$	$27,4 \pm 13,1$
ИФН $\gamma$	$1,7 \pm 0,8$	$51,0 \pm 7,6$	$1077 \pm 109$
ФНО $\alpha$	$0,3 \pm 0,14$	$5,7 \pm 2,2$	$180 \pm 53$

Готовность организма адекватно реагировать на возникающую инфекцию зависит, в частности, от баланса между Т-хелперами 1 и 2 типа. В настоящей работе состояние этого баланса оценивалось по соотношению клеток, продуцирующих ИФН $\gamma$  (Тх1) или ИЛ4 (Тх2), и обозначалось как Тх1/Тх2. Оказалось, что у ЧБД это соотношение ниже, чем у здоровых детей (табл. 5). Эти данные подтверждают широко распространенное мнение, что относительное преобладание Тх2-иммунного ответа может быть связано с ухудшением иммунной защиты против вирусных и бактериальных инфекций.

Табл.5 Соотношение Tх1/Tх2 у здоровых и часто болеющих детей (M±tm).

Tх1/Tх2	Норма n = 17	ЧБД n = 51
		18,7 ± 12,2

\* значимое отличие от нормы ( $p \leq 0,05$ )

Полученные нами данные (табл. 6) свидетельствуют, что показатели функционирования цитокиновой сети у ЧБД отличаются от таковых у здоровых детей. Методом ИФА была определена концентрация цитокинов в сыворотке крови и в супернатантах культур клеток цельной крови. Сывороточная концентрация и спонтанная продукция характеризовали текущее состояние, а индуцированная продукция – функциональный резерв цитокиновой сети.

Табл.6 Продукция цитокинов у ЧБД и здоровых детей ( M±tm, пг/мл)

Цитокин		ЧБД	Здоровые дети n=17
ИФН $\gamma$	концентрация в сыворотке крови	1,1±0,1	1,7 ± 0,8
	спонтанная продукция	-	51,0 ± 7,6
	индуцированная продукция	849 ±146	1077 ± 109
ИЛ 4	концентрация в сыворотке крови	0	0,04 ± 0,01
	спонтанная продукция	0	1,2 ± 0,3
	индуцированная продукция	<b>9.5 ±5,7*</b>	4,1 ± 2,3
ФНО $\alpha$	концентрация в сыворотке крови	0	0,3 ± 0,14
	спонтанная продукция	<b>2,3 ±0,7*</b>	5,7 ± 2,2
	индуцированная продукция	173 ±26,3	180 ± 53

\* значимое отличие от показателей здоровых детей ( $p \leq 0,05$ )

ИФН $\gamma$  исследован у 87 ЧБД, ИЛ 4 и ФНО $\alpha$  – у 43 ЧБД.

У ЧБД снижена спонтанная продукция ФНО $\alpha$  и повышена индуцированная продукция ИЛ4.

Важным фактором защищенности человека от инфекций является полноценное функционирование системы интерфероногенеза. Оценка этого процесса недостаточна, если изучается только концентрация интерферонов методом ИФА. Важно оценивать биологическую активность продуцируемых клетками интерферонов, т.е. их способность предотвращать цитопатогенное действие вирусов. Именно это было исследовано у ЧБД (интерфероновый статус), и результаты этого исследования приведены далее.

Средняя величина биологической активности интерферонов, определенная нами у 76 обследованных ЧБД, указана в таблице 7.

Индуцированная продукция интерферонов у ЧБД отличалась от нормы. Если биологическая активность продуцируемого ИФН $\alpha$  была в пределах возрастной нормы, то для ИФН $\gamma$  она была значимо снижена.

Табл.7 Биологическая активность интерферонов у ЧБД (ед/мл, среднее и 95%-ный доверительный интервал )

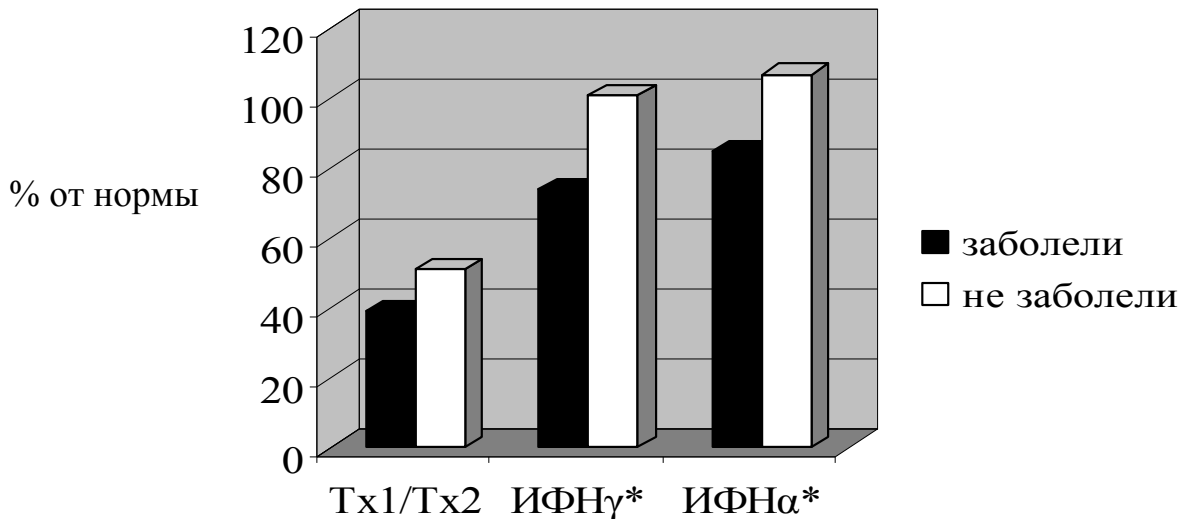
Вид интерферона	ЧБД n = 76	Норма n = 13
ИФН $\alpha$	186 (151 ÷ 229)	186 (145 ÷ 240)
ИФН $\gamma$	<b>12*</b> (10 ÷ 39)	30 (20 ÷ 44)

\* значимое отличие от нормы ( $p \leq 0,05$ )

Все приведенные выше данные о состоянии иммунной и цитокиновой систем у ЧБД свидетельствуют о наличии у ЧБД ряда изменений в показателях клеточного и гуморального иммунитета. Была проведена попытка выяснить, имеется ли связь между наличием этих нарушений и склонностью к заболеванию ОРЗ. Наблюдение за возникновением ОРЗ у детей проводилось на протяжении 7 – 10 дней после поступления их в санаторий и первичного

иммунологического обследования. Оказалось, что у детей, заболевших ОРЗ в санатории, по сравнению с оставшимися здоровыми было снижено соотношение  $Tx1/Tx2$ , продукция как ИФН $\gamma$ , так и ИФН $\alpha$ .

Рис.4 Заболеваемость ОРЗ в зависимости от исходного уровня  $Tx1/Tx2$  и продукции интерферонов (n = 85)



Показатели выражены в % от нормы

\* - значимое отличие показателя у заболевших и не заболевших детей при  $p \leq 0,05$

В связи с тем, что выявлена четкая взаимосвязь заболеваемости ОРЗ в санатории со сниженными показателями интерферогенеза, было прослежено их изменение в результате иммунокорректирующей терапии у ЧБД. Результаты этой работы приведены в табл. 8.

Для унифицированной оценки влияния иммуномодуляторов на продукцию цитокинов было введено понятие изменения уровня продукции цитокина в процентах к исходному уровню у каждого конкретного ребенка.

Табл.8 Изменение цитокинового статуса у детей, получавших в санатории лечение иммуномодуляторами, в % к исходному уровню ( $M \pm t_m$ ).

Показатели цитокинового статуса		Санатор. лечение	ИРС 19	ИРС 19 +Ацилакт	Ацилакт
Tx1/Tx2		125±52	145±42	106±70	<b>317±174↑</b>
Концентрация цитокинов в супернатантах после стимуляции клеток крови ФГА	ИФН $\gamma$	126±37	<b>262±94*↑</b>	<b>314±195*↑</b>	<b>182±102</b>
	ИЛ4	104±24	<b>290±97*↑</b>	144±95	—
	ФНО $\alpha$	109±44	<b>193±66*↑</b>	<b>197±66*↑</b>	88±27
Биологическая активность интерферонов	ИФН $\gamma$	100± 19	<b>261±88*↑</b>	<b>164±30*↑</b>	<b>183±47*↑</b>
	ИФН $\alpha$	91±15	<b>68±13*↓</b>	<b>35±22*↓</b>	<b>186±29*↑</b>

\* значимое отличие от исходного уровня  $p \leq 0,05$

- каждая группа включала от 10 до 30 человек

Санаторное лечение в отличие от иммуномодуляторов не оказывало значимого влияния на показатели цитокинового статуса. У детей, получавших ИРС 19, значительно увеличивалась продукция ИФН $\gamma$ , ИЛ 4 и ФНО $\alpha$ .

При применении сочетания ИРС 19 вместе с Ацилактом изменения в цитокиногенезе были аналогичны, однако не наблюдалось повышения индуцированной продукции ИЛ 4.

В результате лечения Ацилактом у детей повышалась продукция как ИФН $\gamma$ , так и ИФН $\alpha$ , соотношение Tx1/Tx2; важно, что у них не повышалась продукция ФНО $\alpha$ .

Анализ полученных в ходе исследования данных позволил сделать следующие выводы.

## ВЫВОДЫ

1. Состояние иммунного и цитокинового статуса здоровых и часто болеющих детей одного возраста отличаются. Эти отличия заключаются в снижении у ЧБД численности ряда субпопуляций лимфоцитов, индуцированной продукции ИФН $\gamma$ , соотношения Тх1/Тх2 и повышении индуцированной продукции ИЛ 4.
2. Выявленное снижение численности субпопуляций лимфоцитов не влияло на возникновение ОРЗ во время наблюдения у ЧБД, а снижение индуцированной продукции ИФН $\alpha$  и ИФН $\gamma$ , а также соотношения Тх1/Тх2 способствовало возникновению ОРЗ в тот же период.
3. Исследованные показатели цитокинового статуса (ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИФН $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , Тх1/Тх2) у здоровых детей имеют индивидуальные различия, но поддаются статистической обработке, а ряд из них (ИФН $\gamma$ , ФНО $\alpha$ ) сохраняются на одном уровне в течение 30 дней наблюдения.
4. Применение иммуномодуляторов (Ацилакта, ИРС 19 или их совместно) оказывает влияние как на численность субпопуляций лимфоцитов, так и на цитокиновый профиль у ЧБД. Это воздействие наиболее выражено у ЧБД со сниженными показателями, характеризующими иммунную и цитокиновую системы.
5. При сравнении разных схем иммуномодулирующей терапии у ЧБД Ацилакт оказался наиболее эффективным в плане коррекции выявленных изменений, т.к. он нормализовал численность субпопуляций лимфоцитов, повышал продукцию как ИФН $\alpha$ , так и ИФН $\gamma$ , увеличивал соотношение Тх1/Тх2.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Сочетанное применение пробиотиков и других иммуномодуляторов //Вестник РАМН, 2005, № 12, с.32–35 (М.С.Бляхер, Т.К.Лопатина, И.М.Федорова, Н.В.Карпова и др.)
2. Анализ эффективности комплексной иммунотерапии у часто болеющих детей // Медицинская иммунология, 2005, т.7, № 2-3, с. 290-291 (Бляхер М.С., Лопатина Т.К., Федорова И.М., Капустин И.В., Карпова Н.В., Котелева С.И. Шарапов Н.В., Иванов В.А.)
3. Цитокиновый статус детей, часто и длительно болеющих респираторными заболеваниями, до и после очередного ОРЗ //Труды Международного Междисциплинарного симпозиума «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине», Судак, 17-27 сентября 2006, с.83 (Федорова И.М., Бляхер М.С., Алешкин В.А., Карпова Н.В., Капустин И.В.)
4. Цитокиновый статус – возможность и необходимость существования понятия. // Медицинская Иммунология, 2006, т. 8, № 2-3. с. 415 (Бляхер М.С., Федорова И.М., Капустин И.В., Карпова Н.В.)
5. Состояние иммунной системы и продукция цитокинов у часто болеющих детей и подходы к коррекции их нарушений // Российский иммунологический журнал, 2008, т.2, №2-3, апрель-сентябрь 2008, стр.329 (Н.В.Карпова, Т.К.Лопатина, М.С.Бляхер, И.М.Федорова)
6. Сравнение иммунологической эффективности разных схем иммунокоррекции у часто болеющих детей материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные представления об иммунокоррекции», Пенза, 2008,с.50 (Н.В.Карпова, Т.К.Лопатина, М.С.Бляхер)

### **Список сокращений**

ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10 – интерлейкины

ИФН $\alpha$  – альфа-интерферон

ИФН $\gamma$  – гамма-интерферон

CD3 $+$ , CD4 $+$ , CD8 $+$ , CD16 $+$ , CD19 $+$  - субпопуляции лимфоцитов крови

IgA, IgG и IgM – иммуноглобулины классов A, G и M

Tx1 и Tx2 – Т-хелперы 1 и 2 типа

ИФА – иммуноферментный анализ

Ед – единицы противовирусной активности интерферонов

ОРЗ – острое респираторное заболевание

ФГА - фитогемагглютинин

ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухолей-альфа

ЧБД – часто болеющие дети