

УДК 616.112.94-008-153.32

DOI: 10.17816/pmj36627-32

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

*И.В. Майден, Е.М. Спивак***Ярославский государственный медицинский университет Минздрава России, Россия*

CHARACTERISTIC FEATURES OF FUNCTIONAL STATUS OF LYMPHOCYTES IN PREMATURE NEWBORNS

*I.V. Maiden, E.M. Spivak***Yaroslavl State Medical University, Russian Federation*

Цель. Дать характеристику функциональных свойств лимфоцитов периферической крови во взаимосвязи с особенностями периода неонатальной адаптации недоношенных новорожденных.

Материалы и методы. Обследованы 61 условно здоровый недоношенный ребенок со сроком гестации 28–37 недель, матери этих детей, а также 12 доношенных новорожденных. Функциональное состояние малых лимфоцитов оценивали по активности хроматина их ядер. С этой целью использовали цитохимический и флуорометрический методы с окраской мазков, полученных из лейкоцитарной взвеси, акридиновым оранжевым с последующим измерением интенсивности свечения в диапазоне световой волны 530–580 нм. Исследование проводили трижды: на 6-й, 16-й и 26-й дни жизни.

Результаты. В неонатальном периоде у недоношенных наблюдается рост абсолютного и относительного числа лимфоцитов. Указанные показатели имеют обратную зависимость от срока гестации. Активность хроматина ядер малых лимфоцитов у новорожденных значительно выше, чем у взрослых. Максимальные ее значения регистрируются у преждевременно родившихся детей. Малые лимфоциты недоношенных характеризуются выраженной функциональной гетерогенностью. Неблагоприятное течение неонатального периода у этих пациентов сопровождается более низкими значениями абсолютного числа лимфоцитов и активности хроматина их ядер.

Выводы. Показатель активности хроматина ядер малых лимфоцитов можно использовать для прогнозирования течения неонатального периода у преждевременно родившихся детей.

Ключевые слова. Недоношенные дети, лимфоциты.

Aim. To characterize the functional properties of peripheral blood lymphocytes in association with peculiarities of the period of neonatal adaptation of premature newborns.

Materials and methods. Sixty-one conditionally healthy premature infants with gestation period of 28-37 weeks and their mothers as well as 12 full-term newborns were examined. The functional status of small lymphocytes was assessed by the activity of chromatin of their nuclei. For this purpose, there were used cytochemical and fluorometric methods with acridine orange staining of the smears obtained from leukocytic suspension that was

© Майден И.В., Спивак Е.М., 2019

тел.: +7 903 829 15 15

e-mail: spivak58@mail.ru

[Майден И.В. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры педиатрии № 1; Спивак Е.М. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор кафедры педиатрии № 1].

followed by measuring intensity of luminescence in the light wave diapason of 530-580 nm. The study was implemented thrice – on the days 6th, 16th, and 26th of infants' life.

Results. During the neonatal period, premature infants demonstrated the growth of the absolute and relative number of lymphocytes. The mentioned indices have an inverse dependence on the period of gestation. Activity of chromatin of small lymphocyte nuclei in newborns is significantly higher than in adults. Its maximum values are registered in prematurely born infants. Newborn small lymphocytes are characterized by marked functional heterogeneity. Unfavorable course of neonatal period in these patients is accompanied by lower values of the absolute number of lymphocytes and activity of their nuclei chromatin.

Conclusions. The index of activity of small lymphocyte nuclei chromatin can be used to predict the course of neonatal period in prematurely born infants.

Key words. Premature infants, lymphocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным эпидемиологических исследований, частота преждевременных родов составляет в среднем 10 % [1, 4]. Необходимым условием совершенствования выхаживания недоношенных детей является знание функциональных особенностей их физиологических систем, которые оказывают решающее влияние на процесс постнатальной адаптации [2]. Важность детального изучения становления клеточного иммунитета определяется высоким уровнем инфекционной заболеваемости среди этой категории пациентов [3].

Филогенетически клеточные механизмы защиты возникли раньше гуморальных; уже на 3–8-й неделях гестации в организме эмбриона обнаруживаются клетки-предшественники, общие для Т- и В-лимфоцитов. Результаты ряда исследований показывают, что функционирование эмбриональных лимфоцитов имеет качественные отличия, и к моменту рождения отмечается незрелость клеточного иммунитета. Основная функция Т-лимфоцитов у плодов и новорожденных – обеспечение противовоспалительного эффекта. Это связано с тем, что материнские изоантитела могут проникать через плаценту и действовать как антигены, вызывая иммун-

ную реакцию со стороны плода [7]. По данным E. Marchant et al. (2015), у глубоко недоношенных новорожденных регистрируется высокий уровень системного воспаления, который объясняется наличием окислительного стресса из-за проведения искусственной вентиляции легких, высоких концентраций кислорода или генерализованной инфекции. При этом «преждевременное иммунное созревание» не заканчивается активным разрешением воспалительной реакции [6]. В работе M. Grespo et al. (2012) установлено, что «наивные» Т-лимфоциты новорожденных способны к специфической активации, причем у недоношенных эта особенность проявляется ярче. Подобный тип созревания Т-клеток не был обнаружен у взрослых. Авторы выдвигают гипотезу, согласно которой активация иммунной системы и воспалительные реакции у преждевременно родившихся детей могут лежать в основе патогенеза специфических для этой категории пациентов заболеваний – бронхолегочной дисплазии, респираторного дистресс-синдрома, некротического энтероколита, перивентрикулярной лейкомаляции и внутрижелудочковых кровоизлияний [5].

Важнейшую роль в регуляции активности клеток играют свойства хроматина. Он представляет собой комплекс, состоящий из ДНК, связанной со стабильным количеством

гистоновых и меняющимся числом негистоновых белков. При отсутствии позитивного стимула лимфоциты находятся в «дремлющем» состоянии, морфологическим признаком которого является пахихроматическое (в виде плотных глыбок) состояние хроматина в ядрах. При его активации из-за происходящих процессов фосфорилирования и ацетилирования связь гистонов с ДНК ослабляется, и она переходит в более открытую форму, доступную для осуществления процессов транскрипции. Изменение физико-химических свойств хроматина является начальным этапом событий, приводящих к повышению его функциональной активности, и коррелирует с увеличением активности генома и адаптивными возможностями организма в целом.

Цель работы – дать характеристику функциональных свойств лимфоцитов периферической крови во взаимосвязи с особенностями периода неонатальной адаптации недоношенных новорожденных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под нашим наблюдением находился 61 условно здоровый недоношенный ребенок со сроком гестации от 28 до 37 недель (основная группа). Одновременно обследованы их матери. К условно здоровым отнесены дети без клинико-лабораторных признаков заболеваний, в том числе инфекционных, с функциональным состоянием органов и систем, соответствующим сроку гестации. Группу сравнения составили 12 доношенных новорожденных.

Материалом для исследования служила венозная кровь, из которой после центрифугирования получали лейкоцитарную взвесь. Последняя наносилась на покровное стекло, фиксировалась без подсушивания в течение 30 мин в смеси этанол – ацетон (1:1) при

комнатной температуре. Препараты окрашивались акридиновым оранжевым по методу Rigler (1966) в модификации В.А. Колесникова и соавт. (1973). Образующийся комплекс ДНК – краситель обладает свойством флюоресценции в диапазоне световой волны 530–580 нм, при этом чем больше молекул ДНК способен связывать акридиновый оранжевый, тем выше интенсивность свечения в зеленой части спектра и, следовательно, активность хроматина. Ее измерение осуществляли на цитологических препаратах при помощи микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Оценке подвергались малые лимфоциты (диаметром менее 6 мкм), большую часть из которых составляют Т-клетки.

Исследование активности хроматина ядер малых лимфоцитов проводилось трижды. Учитывая то обстоятельство, что первая декада жизни преждевременно родившихся детей соответствует фазе дезадаптации их функциональных систем и метаболических процессов, первый забор крови проводили на 6-й день жизни, а в дальнейшем во второй (16-й день) и третьей декадах (26-й день).

Статистическая обработка цифрового материала выполнялась с применением пакета прикладных программ StatPlus 2009 в среде Windows XP. Вариационные ряды анализировались на соответствие закону нормального распределения по Шапиро – Уилку. Достоверность различий средних величин при нормальном распределении определялась по критерию Стьюдента, в остальных случаях использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Значимость различий относительных величин (%) оценивали с помощью углового преобразования Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что на протяжении первого месяца постнатального развития у преждевременно родившихся детей наблюдается повышение количества лимфоцитов периферической крови (табл. 1). Во второй декаде жизни их средний прирост по отношению к возрасту 6 дней составляет 21,66 %, а в третьей – 32,49 %. Относительное содержание этих форменных элементов белой крови меняется в меньшей степени: на 3,7 и 13,9 %

соответственно. Следовательно, можно сделать заключение о том, что адаптационные возможности недоношенного новорожденного в большей степени отражает именно абсолютное число лимфоцитов. Это подтверждается также анализом особенностей течения неонатального периода у преждевременно родившихся детей, о чем будет сказано ниже. Показатели как абсолютного, так и относительного количества лимфоцитов обнаруживают обратную зависимость от гестационного возраста.

Таблица 1

Количество лимфоцитов периферической крови у недоношенных новорожденных в зависимости от постнатального и гестационного возраста

Возраст детей	Количество лимфоцитов	
	абсолютное, $10^9/л$	относительное, %
Постнатальный возраст		
6 суток	$3,97 \pm 0,16$	$44,36 \pm 1,36$
16 суток	$4,83 \pm 0,18^{***}$	$46,00 \pm 1,08$
26 суток	$5,26 \pm 0,18^{***}$	$50,52 \pm 0,96^{***}$
Гестационный возраст		
28–31 неделя	$4,25 \pm 0,34$	$47,89 \pm 2,95$
32–37 недель	$3,53 \pm 0,21^*$	$39,57 \pm 2,12^*$

Примечание: здесь и далее знаками *, ** и *** обозначены различия средних величин при значении $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,005$ соответственно.

Выявлено, что у новорожденных детей, как доношенных, так и недоношенных, активность хроматина малых лимфоцитов значительно превышает таковую у взрослых (табл. 2), при этом у преждевременно родившихся детей данный показатель достоверно выше, чем в группе сравнения. Еще одной особенностью пациентов основной группы является выраженная функциональная гетерогенность лимфоцитов, что проявляется большим разбросом значений интен-

сивности флюоресценции, обнаружением в цитологических препаратах единичных клеток с ее увеличением в 2–4 раза. Активность хроматина имеет прямую корреляцию с постнатальным возрастом и обратную со сроком гестации. Таким образом, повышение данного показателя является, с одной стороны, свойством внутриутробного периода онтогенеза, а с другой – отражает процесс адаптации недоношенного ребенка к условиям внеутробного существования.

Таблица 2

**Активность хроматина ядер малых лимфоцитов
у новорожденных детей**

Группа обследованных	Нормализованный показатель интенсивности флюоресценции, усл. ед.
Взрослые	100,1 ± 0,4
Доношенные новорожденные	120,0 ± 0,5***
Недоношенные новорожденные (общая группа)	137,9 ± 1,0***
По постнатальному возрасту	
6 дней	131,8 ± 1,9
16 дней	138,3 ± 1,2**
26 дней	144,8 ± 2,0**
По гестационному возрасту	
28–31 неделя	145,1 ± 1,1
32–37 недель	140,9 ± 1,5*

Таблица 3

**Количество лимфоцитов периферической крови
и активность хроматина у недоношенных новорожденных
при различном течении неонатального периода**

Показатель	Течение неонатального периода	
	благоприятное	неблагоприятное
Абсолютное количество лимфоцитов, 10 ⁹ /л	6,7 ± 0,8	3,4 ± 0,5 **
Относительное количество лимфоцитов, %	49,3 ± 7,8	49,5 ± 5,5
Нормализованный показатель интенсивности флюоресценции ядер малых лимфоцитов, усл. ед.	135,5 ± 1,5	130,7 ± 1,6*

Был проведен ретроспективный анализ изучаемых показателей лимфоцитарной системы в двух подгруппах недоношенных новорожденных по пять человек в каждой. Первая подгруппа включала детей с благоприятным, вторая – с неблагоприятным течением неонатального периода (возникновение инфекционно-воспалительной патологии). С целью нивелирования влияний гестационного и постнатального возраста для выполнения этой части работы были отобраны пациенты, родившиеся при практически равном сроке беременности (в среднем

32,4 ± 0,4 и 32,8 ± 0,5 недели, $p > 0,05$); забор крови у них проводился на 6-е сутки.

Установлено (табл. 3), что у недоношенных новорожденных с неблагоприятным течением неонатального периода отмечаются достоверно более низкие цифры общего числа лимфоцитов и активности хроматина их ядер. Одновременно различия в процентном содержании этих элементов белой крови отсутствуют, что является еще одним подтверждением большей диагностической и прогностической значимости показателя абсолютного количества лимфоцитов по

сравнению с относительным у данной категории пациентов.

Выводы

1. В течение периода новорожденности у недоношенных детей регистрируется рост абсолютного и в меньшей степени относительного числа лимфоцитов. Указанные показатели имеют обратную зависимость от срока гестации.

2. Активность хроматина ядер малых лимфоцитов в период новорожденности значительно выше, чем у взрослых. Максимальные значения этого показателя регистрируются у преждевременно родившихся детей, достоверно превышая таковые у доношенных новорожденных. Малые лимфоциты недоношенных характеризуются выраженной функциональной гетерогенностью.

3. Неблагоприятное течение неонатального периода у недоношенных новорожденных сопровождается более низкими значениями абсолютного числа лимфоцитов и активности хроматина их ядер. Это позволяет использовать указанные показатели для прогнозирования возникновения инфекционно-воспалительных заболеваний у данной категории пациентов.

Библиографический список

1. Деев И.В., Куликова К.В., Кобякова О.С., Куликов Е.С. и др. Особенности физического и нервно-психического развития детей с

низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении в различные периоды жизни. Педиатрическая фармакология 2016; 5 (13): 448–451.

2. Карпова А.Л., Бокерия Е.Л., Николаева Т.Н. и др. Скрининговые технологии выявления врожденных пороков сердца у новорожденных. Неонатология: новости, мнения, обучение 2016; 2 (12): 40–49.

3. Михалев Е.В., Саприна Т.В., Рафикова Ю.С. и др. Недоношенные дети: причины, последствия, прогноз. Красноярск 2016; 124.

4. Рафикова Ю.С., Саприна Т.В., Лошкова Е.В., Михалев Е.В. Недоношенность и ее отдаленные метаболические последствия у детей и подростков. Педиатрия 2015; 5 (94): 132–142.

5. Crespo M., Martinez D., Cerissi A. Neonatal T-cell maturation and homing receptor responses to Toll-like receptor ligands differ from those of adult naive T cells: relationship to prematurity. Basic Science Investigation, Pediatric Research 2012; 71: 136–143.

6. Marchant E., Kan B., Sharma A. Attenuated innate immune defenses in very premature neonates during the neonatal period. Pediatric Research 2015; 78: 492–497.

7. Zusman I. Immune systems and human intrauterine development. Transworld Research Network 2010; 342.

Материал поступил в редакцию 01.10.2019