

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.98:579.881.13]-074-078.33

С. Ф. Карпенко, Х. М. Галимзянов, Н. Б. Касимова, О. В. Рубальский

**СОДЕРЖАНИЕ РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ И ЛИЗОЦИМА У БОЛЬНЫХ ЛИХОРАДКОЙ КУ**

НИИ краевой инфекционной патологии ГОУ ВПО Астраханская государственная медицинская академия

*Представлены результаты обследования 35 больных лихорадкой Ку и 30 доноров, у которых определяли содержание розеткообразующих нейтрофилов, а также лизоцимную активность крови и слюны. На 2-й неделе болезни выявлена активация компенсаторных иммунных механизмов, а на 3–4-й неделе – угнетение.*

**Ключевые слова:** лихорадка Ку, нейтрофилы, лизоцим

*S.F. Karpenko, Kh.M. Galymzyanov, N.B. Kasymova, O.V. Rubalsky*

**THE CONTENT OF ROSETTE-FORMING NEUTROPHILS AND LYSOZYME IN PATIENTS WITH Q-FEVER**

*The article deals with the results of study of 35 patients with Q-fever and 30 do-nors to determine the content of rosette-forming neutrophils, lysozyme activity of blood and saliva. On the second week of disease it was revealed the activation of compensative immune mechanisms and on third and fourth week inhibition of the-se mechanisms.*

**Key words:** Q-fever, neutrophils, lysozyme

Нейтрофилы играют важную роль в естественной резистентности организма при многих заболеваниях. Функция нейтрофилов многогранна и не ограничивается только фагоцитозом [6]. Так, они способны к образованию и выделению из лизосом лизоцима, лактоферрина, катионных и других белков, обладающих бактериостатическими и бактерицидными свойствами [1, 2]. Выяснено, что нейтрофилы периферической крови человека способны к спонтанному розеткообразованию с эритроцитами барана. Количество ранних розеткообразующих нейтрофилов (Е-РОНр) служит показателем активности воспалительного процесса. Увеличение содержания поздних розеткообразующих нейтрофилов (Е-РОНп) при снижении ранних позволяет определить наличие осложнений [7]. Ряд авторов отмечали, что изменения иммунитета играют основную роль в развитии клинических форм лихорадки Ку [9]. Представляет несомненный интерес изучение содержания розеткообразующих нейтрофилов и лизоцима у больных лихорадкой Ку.

Целью настоящего исследования было изучение содержания розеткообразующих нейтрофилов крови и уровней лизоцима крови и слюны у больных лихорадкой Ку.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находилось 35 больных со среднетяжелым течением лихорадки Ку в возрасте от 17 до 68 лет (10 женщин и 25 мужчин), госпитализированных в Областную инфекционную клиническую больницу Астрахани в 2006–2009 гг. При постановке диагноза использовали эпидемиологические, клинические и лабораторные критерии. Диагноз подтверждали результатами применения специальных методов исследования: реакции связывания компонента (РСК) с антигеном Бернета и иммуноферментного анализа для выявления антител класса G к антигенам коксиселл Бернета (Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера).

Для корреспонденции:

Карпенко Светлана Федоровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. клин.-иммунол. лаб.  
Адрес: 414004, Астрахань, Покровская роща, ул. 2-я Загородная, 2а  
Телефон: (8512) 38-50-66

Количество лейкоцитов и их отдельных форм определяли унифицированным способом [3]. Содержание розеткообразующих нейтрофилов исследовали методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана [4]: гепаринизированную венозную кровь в объеме 5 мл отстаивали 40 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость разводили двукратным объемом среды 199 и насливали на градиент плотности фиколл-верографин ( $d = 1,077$ ) в соотношении 3:1. Центрифугировали при 1000 об/мин в течение 40 мин. Лимфоциты собирали в кольцевом слое над фиколлоном. Для выделения нейтрофилов к оставшемуся после сбора лимфоцитов осадку добавляли 0,4 мл 4,5% декстрана-500, перемешивали и отстаивали 40 мин. Затем собирали надосадок, трижды отмывали его средой 199 до конечной концентрации нейтрофилов  $3 \cdot 10^6$  в 1 мл. К 0,3 мл нейтрофильной фракции добавляли 0,3 мл 2,5% раствора эритроцитов барана, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Из осадка готовили мазки, предварительно фиксируя 0,6% раствором глутарового альдегида (0,05 мл на 0,1 мл осадка). Так получали Е-РОНр. Для определения Е-РОНп взвесь нейтрофилов с эритроцитами барана помещали в холодильник при 4°C на 40 мин, повторяя впоследствии все вышеперечисленные действия. Мазки окрашивали сафранином, бриллиантовым зеленым и просматривали под световым микроскопом (ув.  $100 \times 12$ ) с иммерсией [8]. Затем подсчитывали не менее 200 нейтрофилов и определяли среди них процент розеткообразующих. За розетку принимали нейтрофил, фиксирующий не менее 3 эритроцитов. При этом проводили гематологический анализ крови для пересчета на абсолютное количество Е-РОН в 1 мкл.

Лизоцим в крови и слюне больных лихорадкой Ку определяли микрометодом И. В. Маянской [5]. Метод основан на определении степени просветления тест-культуры *M. lysodeicticus* под влиянием лизоцима, содержащегося в исследуемой биологической жидкости. Готовили взвесь суточной агаровой культуры *M. lysodeicticus* на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с pH 7,2–7,4, которая должна соответствовать 20% светопропускания или 0,5 ед. оптической плотности (КФК-2, 650 нм). Лизоцим для построения калибровочного графика разводили ФСБ с 50 мкг на 1 мл до 0,25 мкг.

**Среднесуммарные показатели нейтрофилов крови, лизоцима крови и слюны у больных лихорадкой Ку и здоровых лиц ( $\bar{X} \pm m$ )**

Исследуемые показатели	Здоровые лица (n = 30)	Больные лихорадкой Ку (n = 35)	p
Нейтрофилы, %	61,5 ± 1,8	43,2 ± 3,6	< 0,001
Е-РОНр, в 1 мкл	1379,3 ± 117,7	919,0 ± 114,6	< 0,01
Е-РОНр, %	41,6 ± 3,3	48,8 ± 4,2	*
Е-РОНп, в 1 мкл	1481,8 - 104,7	817,1 ± 110,7	< 0,001
Е-РОНп, %	43,3 ± 2,9	43,2 ± 3,6	*
Лизоцим крови, мкг/мл	10,3 ± 0,2	14,7 ± 0,7	< 0,001
Лизоцим слюны, мкг/мл	26,3 ± 1,2	23,5 ± 2,9	*

Примечание. p – достоверность различий по отношению к здоровым лицам; \* – различие между показателями недостоверно.

Во все лунки 96-луночного полистиролового планшета, кроме 1-го вертикального ряда, раскапывали по 196 мкл взвеси тест-культуры, затем во 2-й и 3-й вертикальный ряд – по 4 мкл раствора лизоцима в возрастающих двукратных концентрациях, в остальные – по 4 мкл испытуемых образцов. При этом 1-й вертикальный ряд, заполненный ФСБ (200 мкл), служил бланком, показатели которого вычитались из показателей опытных образцов. После раскапывания всех компонентов планшет встряхивали и измеряли исходные показатели на фотометре при длине волны 530 нм (Униплан "Пикон"). Затем планшет закрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации проводили встряхивание исследуемого материала на шейкере в течение 3 мин и немедленно снимали показатели оптической плотности, вычитая их из исходных значений. Выполняли построение калибровочного графика концентраций стандартного раствора лизоцима, по которому определяли показатели лизоцимной активности испытуемых образцов в мкг/мл.

Все больные лихорадкой Ку поступали в стационар в период разгара заболевания на 1-й неделе болезни (6,0 ± 0,6 дня болезни), получали комплексное лечение, включавшее этиотропную (доксикалин), патогенетическую и симптоматическую терапию. Обследование больных проводили в динамике болезни (1–4 нед болезни).

Контрольную группу составили 30 взрослых здоровых жителей Астраханской области, обследованных с использованием описанных выше методов.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Excel. Определяли среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ), среднюю ошибку среднего арифметического (m). Для оценки статистической значимости различий между сопоставляемыми средними величинами использовали критерий Стьюдента (t).

**Результаты и обсуждение.** Как показали исследования, содержание нейтрофилов в крови больных лихорадкой Ку за весь период болезни оказалось в 1,4 раза ниже такового у здоровых лиц (p < 0,001) (см. таблицу).

Абсолютное количество Е-РОНр и Е-РОНп было соответственно в 1,5 и 1,8 раза ниже нормальных значений (p < 0,01; p < 0,001). Относительное содержание Е-РОНр и Е-РОНп не отличалось от аналогичных показателей у доноров. Отмечено повышение в 1,4 раза уровня лизоцима в сыворотке крови больных лихорадкой Ку по сравнению с контрольными значениями (p < 0,001). Среднесуммарные показатели лизоцима слюны за весь период болезни не отличались от нормальных значений.

Проведено сравнение уровней изучаемых факторов неспецифической резистентности у больных лихорадкой Ку с показателями доноров в динамике болезни. Оказалось, что на 1-й неделе болезни содержание Е-РОНр было в 1,8 раза

ниже нормальных значений (p < 0,05). На 2-й неделе отмечалось повышение уровня Е-РОНр до нормальных значений при понижении в 1,6 раза общего количества нейтрофилов по сравнению с контрольными значениями (p < 0,001). На 3-й неделе болезни наблюдалась тенденция к достоверному понижению показателя Е-РОНр в 1,7 раза по сравнению с контролем (p < 0,1). При этом общее содержание нейтрофилов в лейкоцитарной формуле не отличалось от такового у доноров. Количество Е-РОНр на 4-й неделе болезни было в 2,3 раза ниже нормы (p < 0,001).

Содержание Е-РОНп на 1, 2, 3 и 4-й неделях болезни было в 3,5, 1,5, 2,2 и 2 раза ниже нормы (p < 0,05; p < 0,05; p < 0,001; p < 0,01).

Уровень лизоцима в сыворотке крови больных лихорадкой Ку на 1-й неделе болезни был в 1,2 раза, а на 2-й неделе в 1,5 раза выше такового у здоровых лиц (p < 0,001). При этом наблюдалась тенденция к достоверному увеличению в 1,2 раза данного показателя на 2-й неделе болезни по сравнению с таковым на 1-й неделе (p < 0,1). На 3-й и 4-й неделях заболевания показатели лизоцима крови в 1,3 раза превышали контрольные значения (p < 0,001). На 1-й и 2-й неделях содержание лизоцима в слюне больных лихорадкой Ку не отличалось от нормы. В динамике болезни отмечено понижение изучаемого показателя. На 3-й неделе болезни выявлена тенденция к достоверному понижению в 1,6 раза, а на 4-й неделе – достоверное понижение в 2,2 раза лизоцима слюны по сравнению с контрольными значениями (p < 0,1; p < 0,05). При этом на 4-й неделях уровень лизоцима слюны оказался в 2,3 раза ниже такового на 2-й неделе (p < 0,05).

Таким образом, в период разгара заболевания на 2-й неделе у больных лихорадкой Ку наблюдались компенсаторные иммунные механизмы. Увеличение количества Е-РОНр до нормальных значений сопровождалось усилением их функциональной активности. Наблюдалось повышение секреции лизоцима крови и слюны. В период ранней реконвалесценции на 3-й и 4-й неделях болезни отмечено угнетение неспецифической резистентности, проявляющееся прогрессирующим понижением уровней Е-РОН и лизоцима слюны.

**Выводы.** 1. У больных лихорадкой Ку наблюдалось понижение содержания розеткообразующих нейтрофилов.

2. Лизоцимная активность крови у больных коксиселлезом была повышена во все периоды заболевания.

3. Активность лизоцима слюны у больных лихорадкой Ку зависела от стадии инфекционного процесса и изменялась от нормальных показателей на 1–2-й неделе болезни до пониженных показателей на 3–4-й неделе.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Базарный В. В., Левчик Н. К. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 2. – С. 21–24.
2. Баранов А. А., Дорофейчук В. Г. Лизоцим: теория и практика. – М.; Н. Новгород, 1999. – С. 18–26.
3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. – М., 1987. – С. 123–125.
4. Лопаткин Н. А., Дзержинская Н. Н. // Иммунология. – 1984. – № 1. – С. 68–71.
5. Маянская И. В., Ашкинази В. И., Савельева Г. А., Ардаков Е. А. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 4. – С. 31–33.
6. Маянский Д. Н., Цырендоржиев Д. Д., Маянская Н. Н. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1998. – № 2. – С. 17–25.
7. Петрова И. В., Васильева Л. Л. // Лаб. дело. – 1983. – № 11. – С. 26–28.
8. Фильчаков Ф. В., Золотковская О. З., Полинская В. И., Хинзицкая Е. Ф. // Лаб. дело. – 1985. – № 10. – С. 631.
9. Dellacasagrande J., Ghigo E., Capo C. // Infect. and Immun. – 2000. – Vol. 68, N 1. – P. 160–164.

Поступила 08.02.11