

Т-ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЕ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Костоломова Е. Г. ¹,
Сахаров С. П. ¹,
Полянских Е. Д. ¹,
Лозовая П. Б. ¹

¹ ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия.

**PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES IN BURN INJURY IN YOUNG
CHILDREN**

Kostolomova E. G. ^a,
Sakharov S. P. ^a,
Polyanskikh E. D. ^a,
Lozovaya P. B. ^a

^a FSBEIoHE Tyumen SMU of Ministry of Health of Russian Federation, Tyumen,
Russia.

Резюме

Механизмы иммунной защиты начинают подавляться при ожоговых травмах при поражении общей площади поверхности тела от 25%. Обследован 31 больной получавший лечение в ожоговом центре г. Тюмени, из них 19 мальчиков и 12 девочек, в возрасте от 1 года до 3 лет, с площадью ожоговых ран II-IIIАБ степени от 7 до 70% поверхности тела. В 100% случаев ожог получен горячими жидкостями. Контрольную группу составили 30 условно здоровых детей в возрасте от 1 года до 3 лет. Венозную кровь, получали путем пункции периферической вены и собрали в 2 вакуумные пробирки с К₃ЭДТА в первые 24 часа на 7-е и 20-е сутки после получения травмы, что соответствовало токсической и септикотоксической стадиям ожоговой болезни. Иммунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD25 и HLA-DR. β 2-микроглобулин (β 2-m) в сыворотке крови определяли методом ИФА. Наблюдалось статистически значимое снижение абсолютного количества CD3-положительных клеток ($p < 0,001$) и соотношения CD4/CD8 ($p < 0,05$) в первые 24 часа по сравнению с контролем. Абсолютное количество клеток CD3+ увеличивалось к 20 дню заболевания ($p < 0,05$). Коэкспрессия CD25 на Т-лимфоцитах не значительно достоверно увеличивается после ожога. Относительное количество CD3+HLA-DR+ клеток увеличивается уже после 24 часов, после травмы, тогда как абсолютное значение возрастает только через 20 дней ($p < 0,001$). Кроме того, была значительная корреляция между средними значениями β 2-m и значениями экспрессии CD25 ($r = 0,58$) в первые 24 часа после полученной травмы. Значительные отрицательные корреляции были обнаружены между средними значениями β 2-m и абсолютными количеством CD3+ клеток в после 24 часов и 7 дней заболевания. Уровень β 2-m в течение всего исследования были значительно выше у пациентов с ожогами, чем у контрольной группы, но без достоверных различий между измерениями через 24 часа, 7 и 20 дней. Полученные данные свидетельствуют о постоянной активации Т-лимфоцитов в течении двадцати дней после сильных ожогов. Раннее выделение β 2-m связано с активацией лимфоцитов, увеличивая их восприимчивость к апоптозу, что свидетельствует об измененном иммунном ответе и необходимости поддерживать иммунную систему пациентов в первые часы после сильных ожогов.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, периферическая кровь, Т-лимфоциты, активационные маркеры.

Abstract

The method of flow cytometry using monoclonal antibodies CD3, CD4, CD8, CD25 and HLA-DR carried out immunophenotyping of blood lymphocytes. Using ELISA determined β 2-microglobulin (β 2-m) in blood serum. 31 patients were examined who were treated in the burn center of the city of Tyumen, including 19 boys and 12 girls, aged 1 year to 3 years, with the area of burn wounds of II-IIIAB degree from 7% to 70% of the body surface. Analyzes were performed twenty four hours, seven and twenty days after the burn, seven and twenty days after injury. There was a statistically significant decrease in the absolute number of CD3-positive cells ($p < 0.001$) and the ratio of CD4/CD8 ($p < 0.05$) in the first 24 hours compared with the control. The absolute number of CD3+ cells increased by day 20 of the disease ($p < 0.05$), but there were still fewer control numbers. The expression of CD25 on T-lymphocytes does not significantly increase after a burn, and the level of HLA-DR significantly increases after 20 burns ($p < 0.001$). In addition, there was a significant correlation between the mean values of β 2-m and the values of CD25 expression ($r = 0.58$) in the first 24 hours after the injury. Significant negative correlations were found between the average values of β 2-m and the absolute numbers of CD3+ and CD4+ cells after 24 hours and seven days of illness. The average values of β 2-m throughout the duration of the study were significantly higher in patients with burns than in the control group, but without significant differences between the measurements after 24 hours, 7 or 20 days. The data obtained indicate a constant activation of T-lymphocytes twenty days after severe burns. Early release of β 2-m is associated with activation of lymphocytes, increasing their susceptibility to apoptosis, which indicates an altered immune response and the need to maintain the immune system of patients in the first hours after severe burns.

Keywords: burn disease, peripheral blood, T-lymphocytes, activation markers.

1 Введение

При ожоговой травме инфекционные осложнения по-прежнему являются важной причиной заболеваемости и смертности. Механизмы иммунной защиты начинают подавляться при ожоговых травмах при поражении общей площади поверхности тела от 25%. В научной литературе факт антиген-неспецифической активации Т-лимфоцитов активно обсуждается с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа [1,2,3]. На основании исследований *in vitro* маркеры активации Т-лимфоцитов были классифицированы как ранние (CD25), поздние (HLA-DR) в зависимости от их экспрессии во времени после активации [5]. В связи с этим, логичным является выяснение роли активированных Т-лимфоцитов в патогенезе ожоговой болезни, предполагается, что антигены HLA могут модулировать функцию лимфоцитов путем ингибирования через блокаду их рецепторов или путем индукции апоптоза вызывая тем самым послеожоговый иммунодефицит [6].

Цель работы: изучить иммунологические показатели, оценить уровень экспрессии активационных маркеров CD25 и HLA-DR Т-лимфоцитами и их связь с $\beta 2$ -микроглобулином ($\beta 2$ -m) у детей раннего возраста с ожоговой болезнью.

2 Материалы и методы исследования

Были обследованы 31 больной, лечившийся в ожоговом центре г. Тюмени, из них 19 мальчиков и 12 девочек, в возрасте от 1 года до 3 лет, с площадью ожоговых ран II-IIIАБ степени от 7 до 70% поверхности тела. В 100% случаев ожог получен горячими жидкостями. Венозную кровь, получали путем пункции периферической вены и собрали в 2 вакуумные пробирки с КзЭДТА в первые 24 часа на 7-е и 20-е сутки после получения травмы, что соответствовало токсической и септикотоксической стадиям ожоговой болезни. Контрольную группу составили 30 условно здоровых детей в возрасте от 1 года до 3 лет. Все исследования выполнены в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2013г.). Общий анализ крови выполняли с использованием автоматического анализатора Mindray BC 5500 (Китай). Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили с учетом рекомендаций Хайдукова с соавторами [4]. Анализ субпопуляционного состава проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения CXP 2.0. Для окрашивания клеток цельной крови использовали моноклональные антитела CD4, CD8, CD3, CD25, HLA-DR (Beckman Coulter, США). Лизис эритроцитов проводили по с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). Обнаружение $\beta 2$ -m проводили с использованием набора для иммуноферментного анализа (ORGENTEC Diagnostika, США). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsistem, Финляндия).

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistika 10.0 (StatSoft, США). Сравнительные исследования

проводились с использованием t-критерия Стьюдента. Корреляции между количественными переменными были выполнены с использованием корреляции Пирсона.

3 Результаты

При анализе субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у детей раннего возраста с ожоговой болезнью наблюдалось статистически значимое снижение относительного ($40,7 \pm 7,0$ и $66,8 \pm 6,3$ соответственно ($p < 0,05$)) и абсолютного ($5,8 \pm 1,3$ и $19,5 \pm 1,2$ соответственно ($p < 0,001$)) количества CD3+ клеток и соотношения CD4/CD8 ($p < 0,05$) в первые 24 часа по сравнению с контрольной группой. Абсолютное и относительное количество CD3+ клеток увеличивалось к 20 дню заболевания ($58,5 \pm 5,1$ и $66,8 \pm 6,3$ соответственно) и абсолютного ($12,3 \pm 3,9$ и $19,5 \pm 1,2$ соответственно ($p < 0,05$)), но все еще оставалось меньше контрольных цифр. Однако соотношение CD4/CD8 достоверно снижаясь в первые 24 часа, в последующем не отличалось от показателей контрольной группы на протяжении всего периода исследования.

Относительное количество CD25 позитивных Т-лимфоцитов после ожога увеличивалось только к 20 дню заболевания ($12,7 \pm 4,1$ и $5,3 \pm 2,5$ соответственно ($p < 0,001$)). Однако коэкспрессия позднего активационного маркера HLA-DR на Т-лимфоцитах обнаруживалась уже через 24 часа после полученной травмы ($7,3 \pm 1,7$ и $3,1 \pm 1,2$ в контрольной группе ($p < 0,05$)). Количество CD3+ HLA-DR+ лимфоцитов последовательно достоверно возрастало на 7 ($p < 0,01$) и 20 ($p < 0,001$) день заболевания. Абсолютное количество CD25 + Т-клеток у пациентов с ожогами было ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе в течение всего периода исследования, тогда как количество HLA-DR + Т-лимфоцитов достоверно увеличилось на 20 день после полученной травмы ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Средние значения $\beta 2$ -m в течение всей продолжительности исследования были значительно выше у пациентов с ожогами, чем у контрольной группы ($2,8 \pm 1,3$ мг/л; $2,9 \pm 0,7$ мг/л; $3,3 \pm 1,2$ мг/л и $0,7 \pm 0,1$ мг/л соответственно ($p < 0,001$)), но без существенных различий между измерениями через 24 часа, 7 или 20 дней. Значительные отрицательные корреляции были обнаружены между $\beta 2$ -m и абсолютными значениями CD3+ клеток через 24 часа ($r = -0,71$) и через 7 дней ($r = -0,63$) после начала заболевания. Кроме того, была значительная положительная корреляция между показателями средних значений $\beta 2$ -m и значений экспрессии CD25 ($r = 0,58$) через 24 часа после ожога.

4 Обсуждение

Иммунодефицит после ожоговой травмы может быть вызван значительным уменьшением абсолютного количества CD3+ и снижением иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 на первой неделе после ожога, что объясняет, и присоединение бактериальной коинфекции, и увеличение числа случаев сепсиса. Ожоговый токсин, характеризующийся как полимеризованный комплекс липидных белков клеточной мембраны, возможно ингибирует пролиферацию нормальных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию. Обширная деструкция тканей по механизму некроза может быть

одной из причин повышения уровня $\beta 2m$ в сыворотке крови, что приводит к значительному уменьшению количества лимфоцитов. Увеличение $\beta 2m$ в крови пациентов с ожоговой травмой может быть следствием активации клеток, участвующих в компенсаторных механизмах после ожоговой травмы таких как повышение экспрессии HLA-DR на Т –лимфоцитах уже через 24 часа. Значительная положительная корреляция между показателями $\beta 2m$ и экспрессией CD25 через 24 часа, позволяет предположить, что синтез $\beta 2m$ в первые дни заболевания вызывает гибель CD4+ лимфоцитов, что подтверждается достоверным снижением соотношения CD4/CD8 в первые 24 часа. Значительная отрицательная корреляция между $\beta 2m$ и абсолютными значениям CD3+ лимфоцитов через 24 часа и через 7 дней после полученной термической травмы, говорит о возможности $\beta 2m$ ингибировать функцию Т-клеток за счет блокады рецепторов или индукции апоптоза.

5 Вывод

Нарушение функций Т-лимфоцитов, регулирующих иммунный ответ, и их гибель может являться важным следствием системной иммуносупрессии при ожоговой болезни. Полученные данные свидетельствуют о постоянной активации Т-лимфоцитов через две недели после сильных ожогов, тогда как раннее выделение $\beta 2m$ усиливает активацию лимфоцитов, увеличивая их восприимчивость к апоптозу, что свидетельствует об измененном иммунном ответе. Результаты исследования, позволяют предположить, что поддержка иммунной системы гораздо важнее в первые часы после ожоговой травмы. Контроль за иммунологическим состоянием пациентов наряду со специфической антимикробной терапией, а также гемодинамическим и электролитным балансом позволит избежать бактериальной коинфекции с ожидаемым более быстрым заживлением ран или успешной трансплантацией кожи.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Костоломова Елена Геннадьевна, к.б.н., доцент кафедры микробиологии
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

адрес: 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, д.54;

телефоны: 8(3452) 20-21-97 / 89044930674;

e-mail: lenakost@mail.ru

Kostolomova E.G., PhD (Biology), associate professor of the Department
Microbiology of FSBEIoHE “Tyumen State Medical University” of Ministry of
Health of Russian Federation, Tyumen, Russia.;

telephones: 8(3452) 20-21-97 / 89044930674;

e-mail: lenakost@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Сахаров Сергей Павлович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой
мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

e-mail: sacharov09@mail.ru

Sakharov S.P., PhD (Medicine), associate professor, Acting Head of the
Department of Mobilization Training of Health Care and Disaster FGBOU VO
«Tyumen state medical University» of the Ministry of health of the Russian
Federation, Tyumen, Russia, Tyumen, Russia;

e-mail: sacharov09@mail.ru

Полянских Е.Д., студентка 636 группы Института материнства и детства
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

e-mail: polyanskih.li@mail.ru

Polyanskikh E.D. student of group 636 of the Institute of Motherhood and
Childhood FSBEIoHE Tyumen SMU of Ministry of Health of Russian Federation,
Tyumen, Russia;

e-mail: polyanskih.li@mail.ru

Лозовая П.Б., студентка 515 группы ФГБОУ ВО «Тюменский
государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

e-mail: p.lozovaya@yandex.ru

Lozovaya P.B. student of group 515 of the Institute of Clinical Medicine FSBEIoHE
Tyumen SMU of Ministry of Health of Russian Federation, Tyumen, Russia;

e-mail: p.lozovaya@yandex.ru

Блок 3. Метаданные статьи

Т-ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЕ
У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА
PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES IN BURN INJURY IN YOUNG
CHILDREN

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

CD3-ЛИМФОЦИТЫ ПРИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ
CD3 LYMPHOCYTES IN BURN DISEASE

Ключевые слова: ожоговая болезнь, периферическая кровь, Т-лимфоциты, активационные маркеры.

Keywords: burn disease, peripheral blood, T-lymphocytes, activation markers.

Школа Клинической Иммунологии "Сочи-2025".

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 0.

30.04.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядк овый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Жданова Е.В., Костоломова Е.Г., Волкова Д.Е., Зыков А.В. Клеточный состав и цитокиновый профиль синовиальной жидкости при ревматоидном артрите. <i>Медицинская иммунология</i> . 2022;24(5):1017-1026.	Zhdanova E.V., Kostolomova E.G., Volkova D.E., Zykov A.V. Cellular composition and cytokine profile of synovial fluid in rheumatoid arthritis. <i>Medical Immunology</i> (Russia). 2022;24(5):1017-1026. (In Russ.)	https://doi.org/10.15789/1563-0625- CCA-2520
2	Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Кривоносова О.А., Зенкова Т.В., Макеева О.В., Швец О.Ю. Цитометрический анализ экспрессии маркеров активации на CD4 Т-лимфоцитах при ревматоидном артрите // <i>Российский иммунологический журнал</i> , 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 332- 334.	Kostolomov E.G., Sukhovey Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V., Krivonosova O.A., Zenkova T.V., Makeeva O.V., Shvets O.Yu. Cytometric analysis of the expression of activation markers on CD4 T- lymphocytes in rheumatoid arthritis // <i>Russian Journal of Immunology</i> , 2019. Vol. 13 (22), No. 2. P. 332-334. .	https://doi.org/10.31857/S102872210006 618-4
3	Костоломова Е.Г., Стрелин С.А., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Марков А.А., Полянских Е.Д.	Kostolomova E.G., Strelin S.A., Sukhovei Y.G., Unger I.G., Akuneeva T.V., Markov A.A., Polyanskikh E.D.	doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

	Функция Т-лимфоцитов кожи человека в заживлении ран в эксперименте in vitro // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26. - №2. - С. 115-122.	Function of human skin T cells in wound healing in the in vitro experimental setting // Russian Journal of Immunology. - 2023. - Vol. 26. - N. 2. - P. 115-122.	
4	Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект). <i>Медицинская иммунология</i> . 2012;14(3):255-268.	Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A. Methods. <i>Medical Immunology (Russia)</i> . 2012;14(3):255-268. (In Russ.)	https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268
5	Moore TL. Immune Complexes in Juvenile Idiopathic Arthritis. <i>Front Immunol</i> . 2016 May 20;7:177. PMID: 27242784, PMCID: PMC4873492,	Moore TL. Immune Complexes in Juvenile Idiopathic Arthritis. <i>Front Immunol</i> . 2016 May 20;7:177. PMID: 27242784, PMCID: PMC4873492,	DOI: 10.3389/fimmu.2016.00177
6	Puppo F, Contini P, Ghio M, Brenzi S, Scudeletti M, Filaci G, Ferrone S, Indiveri F. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. <i>Int Immunol</i> . 2000	Puppo F, Contini P, Ghio M, Brenzi S, Scudeletti M, Filaci G, Ferrone S, Indiveri F. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. <i>Int Immunol</i> . 2000	DOI: 10.1093/intimm/12.2.195

	Feb;12(2):195-203. 10.1093/intimm/12.2.195. 10653855.	doi: PMID:	Feb;12(2):195-203. 10.1093/intimm/12.2.195. 10653855.	doi: PMID:	
--	---	---------------	---	---------------	--