



Лятос И.А. ✉, Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Цыганков А.М.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Оценка напряженности клеточного иммунного ответа у военнослужащих Вооруженных Сил Республики Беларусь с болезнями органов дыхания

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 26.08.2022
Принята: 19.09.2022
Контакты: ialjatos@gmail.com

Резюме

В настоящее время реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) используется специалистами для оценки клеточного звена иммунитета при подозрении на иммунопатологическое состояние, для оценки функциональной активности лимфоцитов, выявления клеточной сенсibilизации. Публикация посвящена вопросу оценки клеточного иммунитета у военнослужащих Вооруженных Сил Республики Беларусь как с заболеваниями органов дыхания, так и после тяжелых физических и психоэмоциональных нагрузок (учения). В ходе написания статьи использовались публикации на тему исследования. Для реализации цели исследования был использован метод РБТЛ, предложенный К.С. Азаренком наряду с анализом количества лейкоцитов и лимфоцитов. В результате наших исследований было выявлено, что напряженность клеточного иммунного ответа в образцах крови здоровых военнослужащих характеризуется более низкими показателями по сравнению с образцами крови военнослужащих с активными проявлениями заболеваний органов дыхания в легкой степени, несмотря на высокое количество лимфоцитов.

Ключевые слова: РБТЛ, военнослужащие, заболеваемость, лейкоциты, заболевания органов дыхания, физические нагрузки, психоэмоциональное напряжение

Igor A. Lyatos ✉, Vladimir M. Semyonov, Tatiana I. Dmitrachenko, Arseniy M. Tsygankov
Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Blast Lymphocyte Transformation Reaction (BLTR) in the Assessment of Cellular Immunity in Members of the Armed Forces of the Republic of Belarus with Respiratory Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 26.08.2022

Accepted: 19.09.2022

Contacts: ialjatos@gmail.com

Abstract

At present the lymphocyte blast-transformation reaction (BLTR) is used by specialists to evaluate the cellular immunity when an immunopathological condition is suspected, to evaluate the functional activity of lymphocytes, to detect cellular sensitization. The publication is devoted to the estimation of the cellular immunity of the servicemen of the Armed Forces of the Republic of Belarus both with the diseases of the respiratory organs and after hard physical and psycho-emotional labors (exercises). Publications on the topic of the research were used in the course of writing the article. In order to realize the aim of the research we used BLTR method proposed by K.S. Azarenok along with analysis of leukocyte and lymphocyte count. As a result of our studies it was revealed that the tension of the cellular immune response in blood samples of healthy servicemen was characterized by lower indices as compared to blood samples of servicemen with active manifestations of respiratory diseases in a mild degree, despite the high number of lymphocytes.

Keywords: BLTR, military personnel, morbidity, white blood cells, respiratory diseases, physical activity, psycho-emotional stress

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема заболеваний органов дыхания (ОД) для Вооруженных Сил Республики Беларусь (ВС РБ) определяется высоким уровнем заболеваемости, эпидемическими подъемами, которые возникают в периоды формирования воинских коллективов, сезонными подъемами уровня заболеваемости в стране, высокой интенсивностью боевой подготовки. На фоне интенсивных физических и психоэмоциональных нагрузок военнослужащих наблюдается рост заболеваемости органов дыхания в воинских частях, который характеризуется появлением групповых случаев, а также резким увеличением количества заболевших. Этому росту способствует также совместное проживание (скученность), особенности питания, эффект «перемешивания» и обновление коллектива. Заболевания ОД характеризуются трудностями ранней диагностики, что связано с дороговизной проводимых исследований, недостаточностью средств специфической профилактики, отсутствием четких проводимых

специфических противоэпидемических мероприятий [1, с. 17]. Для проведения комплекса специфических противоэпидемических мероприятий могут понадобиться своевременные данные о коллективном иммунитете воинского подразделения, а в идеальном случае – об иммунном статусе отдельного военнослужащего. Для каждого индивида в тот или иной момент времени иммунный статус зависит от многих факторов. Оценить иммунный статус с позиций клеточного иммунитета можно с помощью общего анализа крови (количество лейкоцитов и лимфоцитов) с использованием метода РБТЛ, когда исследуют общую способность лимфоцитов человека к бласттрансформации под действием митогенов (фитогемагглютинаина (ФГА) конканавалин А (Кон-А), липополисахарида (ЛПС)) или специфического антигена. Данный метод является трудоемким и недешевым для организаций здравоохранения, однако полученные результаты исследования на этой выборке исследуемых не вызывают сомнения в их достоверности. В свою очередь, военнослужащие, испытывающие физические и психоэмоциональные нагрузки, демонстрируют снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов [2, 3].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед авторами стояли следующие задачи: анализ уровня заболеваемости военнослужащих за отчетный период времени; исследование функциональной активности лимфоцитов у здоровых военнослужащих, перенесших тяжелые физические и психоэмоциональные нагрузки, и военнослужащих с легким течением заболеваний органов дыхания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходными данными послужила отчетная документация Министерства обороны Республики Беларусь за 2017–2021 годы, материалы публикаций по изучаемой проблематике. Для обработки полученных результатов использовался пакет статистики Statistica 13.3. Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили в соответствии с требованиями, предъявляемыми к проведению исследований. Для проведения РБТЛ использовалась свежая гепаринизированная кровь в объеме 10 мл, полученная из периферической вены. Постановку РБТЛ проводили по методике К.С. Азаренка [4]. Для осуществления реакции у обследуемого пациента брали 10 мл крови в стерильную пробирку с гепарином (4–5 ЕД гепарина на 1 мл крови). Эритроциты осаждали в термостате при температуре 37 °С в течение 1–2 часов в положении пробирки под углом в 45°. Надосадочную плазму с лейкоцитами объемом 1,0 мл на одну культуру (из расчета 2+0,5 тысячи лимфоцитов на одну культуру) вводили в 3 стерильных пенициллиновых флакона (2 опытных, 1 контрольный), содержащих 4 мл среды 199, 5 ЕД гепарина, 500 мкг канамицина, 2 мг L-глутамина. В два опытных образца, направленных на исследование оценки клеточного звена иммунитета, добавляли один из митогенов (ФГА или ЛПС) в объеме 0,1 мл. В контрольный образец вносили 0,1 мл 0,9% раствора NaCl. Газовую среду во флаконах насыщали углекислым газом, флаконы герметически закрывали резиновыми пробками и ставили в термостат при температуре 37 °С на 72 часа. По истечении срока культивирования надосадочную жидкость удаляли пастеровской пипеткой, соединенной с вакуумным насосом. Клетки, расположенные на дне флаконов в виде белой пленки, ресуспензировали в 5 мл гипотонического раствора хлористого калия.



После инкубации в течение 5 минут клетки осаждали центрифугированием 5 минут при 1000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость отсасывали, осажденные клетки ресуспендировали в 0,2 мл оставшейся надосадочной жидкости и смешивали с 3 мл фиксатора (ледяная уксусная кислота : этиловый спирт – 1:3). Фиксацию проводили не менее 30 минут. При избыточном количестве кристаллов гематина фиксатор меняли несколько раз до появления прозрачной надосадочной жидкости. Клетки осаждали центрифугированием, фиксатор удаляли. Клетки, ресуспендированные в 0,5 мл фиксатора, наносили на покровные стекла. Окраску мазков проводили 1% раствором орсеина (Calbiochem, Великобритания) в фиксаторе непосредственно перед подсчетом препаратов. В мазках при увеличении об. 90 (иммерсионная система) × ок. 10 подсчитывали лимфобласты – лимфоидные клетки, достигшие размеров 20–22 мкм, с округлым ядром, имеющим нежносетчатое строение и правильное равномерное распределение хроматиновых нитей и содержащими от 1 до 3 ядрышек. Количество обнаруженных бластов выражали в процентах. Полученный результат сравнивали с контрольными образцами, культивированными при аналогичных условиях без добавления антигенов.

Формула расчета:

$$I (\%) = \text{Бл} / (\text{Лц} + \text{Бл}),$$

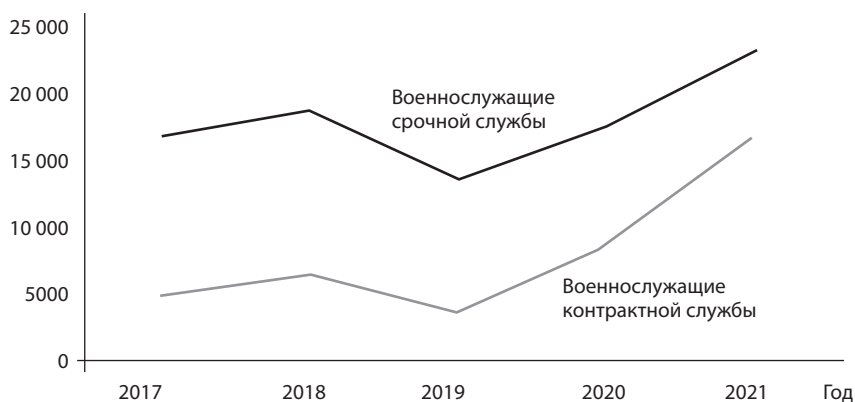
где: I (%) – индекс процентного соотношения бластных клеток в образце;

Бл – бластные клетки в образце;

Лц – лимфоциты в образце.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования были получены результаты анализа заболеваемости органов дыхания среди военнослужащих ВС РБ за 2017–2021 гг. (см. рисунок). Для детального сравнения военнослужащие были разделены на 2 группы по возрасту: первая группа – военнослужащие, проходящие срочную военную службу, в возрасте от 18 до 27 лет; вторая группа – военнослужащие, проходящие военную службу по контракту, в возрасте от 20 до 48 лет.



Заболеваемость органов дыхания среди военнослужащих ВС Республики Беларусь за 2017–2021 гг.
Respiratory diseases among servicemen of the Armed Forces of the Republic of Belarus for 2017–2021

На рисунке отчетливо указана тенденция роста первичной обращаемости по поводу болезней органов дыхания среди военнослужащих ВС Республики Беларусь за пятилетний период. Что подталкивает к дальнейшим исследованиям в этой области. Рост заболеваемости болезнями органов дыхания среди военнослужащих ВС Республики Беларусь обусловлен COVID-19 [5, с. 61].

Следующим этапом нашей работы стало исследование клеточного иммунитета у военнослужащих методом РБТЛ. Реакцию можно считать положительной при 5–35% бластных клеток от общего числа клеток по сравнению с контрольным (отрицательным) образцом.

Были обследованы 106 военнослужащих, которые были разделены на две группы. Первая группа – 46 здоровых военнослужащих в возрасте от 18 до 27 лет, перенесших тяжелые физические и психоэмоциональные нагрузки; вторая группа состояла из 60 военнослужащих с легким течением заболеваний органов дыхания. У всех обследованных исследовалась кровь в реакции бласттрансформации лейкоцитов в ответ на активацию митогенами ФГА и ЛПС, а также проведен общеклинический анализ крови.

Полученные результаты отражены в таблице, в которой указаны медианные значения и верхний и нижний порог значений для индекса процентного соотношения бластных клеток и количества клеток системы иммунитета.

Оценка функциональной активности клеточного звена иммунитета, осуществляемой Т-лимфоцитами в ответ на активацию ФГА, позволила выявить более низкий индекс процентного соотношения бластных клеток в образцах крови 1-й группы по сравнению со 2-й, но результаты статистически незначимы при $p \leq 0,05$.

Оценка функциональной активности клеточного звена иммунитета, осуществляемой Т-лимфоцитами в ответ на активацию ЛПС, не позволила выявить различия между 1-й и 2-й группами.

Индекс процентного соотношения бластных клеток в контрольных образцах при спонтанной бласттрансформации в отсутствии митогенов сопоставим в обеих группах (результаты статистически незначимы при $p \leq 0,05$).

Количество лейкоцитов в образцах крови 1-й группы не отличалось по сравнению со 2-й группой. Количество лимфоцитов в образцах крови 1-й группы выше по сравнению со 2-й, но результаты статистически незначимы при $p \leq 0,05$.

Таким образом, полученные результаты подтверждают необходимость дальнейших исследований воинских коллективов в области эпидемиологии, инфектологии и иммунологии.

Индекс процентного соотношения бластных клеток и количество клеток системы иммунитета для двух групп

Index of the percentage of blast cells and the number of immune system cells for the two groups

Индекс процентного соотношения бластных клеток			
Митоген	1-я группа (n=46), Me (Min; Max)	2-я группа (n=60), Me (Min; Max)	p
ФГА, %	66,7 (36,2; 83,6)	71,4 (21,8; 88,0)	$\leq 0,05$
ЛПС, %	32,2 (20,0; 45,6)	30,8 (10,2; 62,4)	$\leq 0,05$
Контроль, %	4,8 (2,6; 18,0)	4,2 (1,6; 23,6)	$\leq 0,05$
Лейкоциты	6,2 (4,2; 8,7)	6,2 (4; 19,8)	$\leq 0,05$
Лимфоциты	32,0 (25; 40)	27,5 (9; 51)	$\leq 0,05$

■ ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты исследования указывают на продолжающийся рост первичных обращений по поводу заболеваний органов дыхания у военнослужащих Вооруженных Сил Республики Беларусь.
2. Метод РБТЛ может быть использован в подготовке к проведению противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение уровня заболеваемости органов дыхания у военнослужащих Вооруженных Сил Республики Беларусь.
3. В результате наших исследований было выявлено, что напряженность клеточного иммунного ответа в образцах крови здоровых военнослужащих характеризуется более низкими показателями по сравнению с образцами крови военнослужащих с активными проявлениями заболеваний органов дыхания в легкой степени даже при более высоких средних значениях количества лимфоцитов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Aminev R.M. et al. Peculiarities of formation of morbidity of servicemen's acute respiratory infections of the upper respiratory tract. *Proceedings of the Russian Military Medical Academy*, 2021;40(2):9–17.
2. Kubasov R.V. et al. Impact of Extreme Factors of Military Service on Adaptive Capabilities and Health of Personnel of Power Departments of Russia. *Bulletin of Russian Military Medical Academy*, 2015;2:217–223.
3. Zaitseva N.S., Sizyakina L.P. Changes of the immune status in servicemen-participants of special operations. *Medical Immunology*, 2017;19:286–287.
4. Azarenok K.S. *Clinical aspects of application of lymphocyte blast-transformation reaction and its use for study of pathogenesis and differential diagnosis of infectious and serum hepatitis with other diseases: D. in medical sciences*. M., 1978. 412 p.
5. Tsygankov A.M., Lyatos I.A. Analysis of morbidity and labor losses in the Armed Forces of the Republic of Belarus for 2017–2020. *Bulletin of Vitebsk State Medical University*, 2022;21(2):55–62. DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.2.55>.