

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕСТАЦИОННОГО ВОЗРАСТА

**Ремизова И.И.¹, Чистякова Г.Н.¹, Ляпунов В.А.¹, Черешнев В.А.²,
Устьянцева Л.С.¹, Газиева И.А.¹**

¹ ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. С целью выявления особенностей фенотипического состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток пуповинной крови в зависимости от гестационного возраста (ГВ) проведено исследование 102 проб пуповинной крови детей, родившихся в 25-28 недель, 29-32 недели, 33-36 недель ГВ и 31 образец пуповинной крови группы сравнения – с ГВ 37-41 недель. Методом проточной цитометрии определяли количество CD3⁺, CD19⁺/CD3⁻, CD4⁺/CD3⁺, CD8⁺/CD3⁺, CD16/56⁺/CD3⁻ клеток; уровень экспрессии рецепторов маркеров активации моноцитов и лимфоцитов (HLA-DR⁺/CD14⁺, CD71⁺/CD14⁺, CD25⁺/CD4⁺, CD95⁺/CD3⁺); рецептор адгезии (CD11b⁺), определение содержания цитокин-продуцирующих клеток (IL-4/CD4, IFN γ /CD4) и сывороточных цитокинов IFN γ и IL-4. У всех детей основных групп на фоне лейкопении установлено повышение относительного числа лимфоцитов, а также снижение способности гранулоцитов поглощать опсонизированные бактерии. Выявлено сниженное процентное содержание HLA-DR⁺/CD14⁺ клеток, увеличение количества CD3⁺CD95⁺ популяций и IFN γ – цитокин-продуцирующих клеток у детей с гестационным возрастом (ГВ) 25-28 недель. Наблюдается снижение уровня натуральных киллеров у новорожденных до 32 недели гестационного возраста (ГВ). Определена повышенная концентрация сывороточного IFN γ при сниженном уровне IL-4 у детей с ГВ 25-28 и 33-36 недель. Сниженное процентное содержание CD3⁺CD11b⁺ клеток в 29-32 и 33-36 недель ГВ. В 33-36 недель ГВ уменьшение количества CD3⁺CD95⁺ лимфоцитов и повышение уровня экспрессии рецептора CD25⁺ на CD4⁺ лимфоцитах. В целом полученные данные свидетельствуют об особенностях состояния иммунной системы, характерных для определенного гестационного возраста недоношенных детей. Ряд исследованных параметров дает возможность говорить о частичном достижении иммунологической готовности к ответу на потенциальный антиген, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, пуповинная кровь, маркеры активации моноцитов и лимфоцитов, фагоцитоз, цитокины

Адрес для переписки:

Ремизова Ирина Ивановна
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт
материнства и младенчества» Министерства
здравоохранения РФ
620089, Россия, г. Екатеринбург, ул. Родонитовая, 3/1-45.
Тел.: 8 (343) 371-28-30.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Address for correspondence:

Remizova Irina I.
Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ministry of
Healthcare of the Russian Federation
620089, Russian Federation, Ekaterinburg, Rodonitovaya str.,
3/1, apt 45.
Phone: 7 (343) 371-28-30.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Образец цитирования:

И.И. Ремизова, Г.Н. Чистякова, В.А. Ляпунов,
В.А. Черешнев, Л.С. Устьянцева, И.А. Газиева,
«Особенности фенотипического состава
и функциональной активности иммунокомпетентных
клеток пуповинной крови в зависимости
от гестационного возраста» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 291-298.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-291-298

For citation:

I.I. Remizova, G.N. Chistyakova, V.A. Lyapunov,
V.A. Chereshev, L.S. Ustyantseva, I.A. Gazieva, "Features
of phenotypic structure and functional activity of cord blood
immune cells depending on gestational age", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 3, pp. 291-298.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-291-298

FEATURES OF PHENOTYPIC STRUCTURE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF CORD BLOOD IMMUNE CELLS DEPENDING ON GESTATIONAL AGE

Remizova I.I.^a, Chistyakova G.N.^a, Lyapunov V.A.^a, Chereshev V.A.^b, Ustyantseva L.S.^a, Gazieva I.A.^a

^a Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The aim of our study was to identify phenotypic composition and functional activity of immune cells from umbilical cord blood (UCB) as a function of gestational age. We analyzed 102 UCB samples of babies born at 25-28 weeks, 29-32 weeks, and 33-36 weeks of gestation, and 31 samples of UCB from the full-term infants taken as a comparison group (gestational age of 37 to 41 weeks). Using flow cytometry approach, we determined representation of cells with CD3⁺-, CD19⁺/CD3⁻, CD4⁺/CD3⁺, CD8⁺/CD3⁺, CD16/56⁺/CD3⁻ phenotypes, along with expression of activation markers among populations of monocytes and lymphocytes (HLA-DR⁺/CD14⁺, CD71⁺/CD14⁺, CD25⁺/CD4⁺, CD95⁺/CD3⁺), as well as adhesion receptors (CD11b⁺). Contents of cytokine-producing cells (IL-4/CD4, IFN γ /CD4) and serum IFN γ and IL-4 cytokines were also determined. All premature babies with existing leukopenia exhibited an increase in relative numbers of lymphocytes, and diminished ability of the granulocytes to absorb opsonized bacteria. Reduced percentage of HLA-DR⁺/CD14⁺ cells, increase in CD3⁺CD95⁺ cell population and IFN γ producing cells have been shown in a subgroup of children at a gestational age of 25-28 weeks. Decreased levels of natural killer cells was observed among infants < 32 weeks of gestation. Increased concentration of serum IFN γ , along with reduced levels of IL-4 was determined in children born at 25 to 28 and 33 to 36 weeks. A reduced percentage of CD3⁺CD11b⁺ cells were revealed in UCB at 29-32 and 33-36 weeks of gestation. Reduced numbers of CD3⁺CD95⁺ lymphocytes and increased CD25⁺ receptor expression on the CD4⁺ cell population was registered at 33 to 36 weeks of gestation. In summary, the findings suggest some features of immune system, which may be specific to particular gestational age of preterm infants. A number of the parameters under study allow us to presume a development of partial immunological response to potential antigens, thus requiring further research aimed for investigation of functional activity of immunocompetent cells.

Keywords: newborns, premature, umbilical cord blood, monocytes, lymphocytes, activation markers, phagocytosis, cytokines

Организм новорожденного, прошедшего все стадии внутриутробного развития, нельзя считать иммунологически незрелым или наивным [7]. Иммуные клетки новорожденных пролиферируют в ответ на множество антигенов, в том числе на аллергены, аутоантигены и паразитарные агенты. Антиген-специфичные антитела, обнаруживаемые в пуповинной крови, также свидетельствуют о том, что Т- и В-клетки обладают направленным ответным механизмом. Наряду с этим, большинство исследований функциональных аспектов иммунной системы плода основаны на использовании пуповинной крови, собранной после рождения доношенных детей (более 37 недель беременности).

В литературе достаточно подробно описано анатомическое становление органов, а также раз-

витие основных клеточных популяций иммунной системы [3, 5]. Вместе с тем источников, содержащих информацию с подробным описанием развития разных субпопуляций клеток врожденного иммунитета в динамике роста плода, крайне мало, и лишь в последние годы эти вопросы стали изучаться активно [1, 10, 11, 13, 14].

В ранний период онтогенетического развития человека происходит дифференцировка и формирование клеточных популяций. Плюрипотентные предшественники эритроцитов и гранулоцитов могут обнаруживаться в желточном мешке эмбриона на 3-4 неделе онтогенеза. Незрелые, бластные формы клеток находятся в циркуляции начиная с 4-й недели беременности, после чего они мигрируют в печень, которая становится главным органом гемопоэза в 5-6 не-

дель беременности. В литературе отмечено, что по своему функциональному состоянию гранулоциты плода отличаются сниженной способностью к адгезии (прилипанию) и хемотаксису [4]. Считается, что фагоцитоз у плода незавершенный, что связано с недостаточностью высвобождения лизосомальных ферментов. С 5 по 10-ю неделю печень претерпевает морфологические изменения с повышением доли клеточных элементов. Протимоциты выявляются в фетальной печени и желточном мешке плода на 7-й неделе внутриутробного развития. Лимфоциты, несущие поверхностные маркеры CD4⁺ и CD8⁺ появляются в фетальной печени и селезенке плода уже на 14-й неделе гестации [3]. После 15 недели гестационного возраста (ГВ) развитие иммунной системы в основном связано с ростом органов и с темпами дифференцировки различных популяций лимфоидных клеток [8, 16], а также с деятельностью компонентов системы фагоцитирующих мононуклеаров [6, 9] и с трансплацентарным переносом иммуноглобулинов [12, 15]. На сроке 16-19 недель ГВ обнаруживается экспрессия активационных маркеров Т-клеток кишечника плода (HLA-DR, CD25, CD69, CD62L) и значительная экспрессия примированных лимфоцитов по маркеру CD45RO [8]. С 18-й по 24-ю неделю гестации в брыжеечных лимфатических узлах происходит накопление числа CD45RA⁺ («наивных») Т-клеток на фоне малого процента В-клеток и моноцитов. В селезенке плода в этот период доля Т-, В-клеток и моноцитов/макрофагов примерно равна. Максимальная лейкопоэтическая активность обнаруживается на 5-м месяце внутриутробного развития. К 22-й неделе большую часть иммунных клеток составляют лимфоциты [4].

Данные по сравнительной характеристике содержания лимфоцитов основных субпопуляций в пуповинной крови недоношенных новорожденных с гестационным возрастом ниже 37 недель описаны в литературе [2]. Вместе с тем отсутствуют значения параметров врожденного и адаптивного иммунитета в зависимости от конкретного гестационного возраста, что и определило **цель настоящего исследования** — оценить особенности фенотипического состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток пуповинной крови в зависимости от гестационного возраста.

Проведено исследование 102 образцов пуповинной крови новорожденных, из них: 23 ребенка с гестационным возрастом 25–28 недель (1-я основная группа), 21 новорожденный с ГВ 29–32 недели (2-я группа), 27 детей с ГВ 33–36 недель

ГВ (3-я группа) и 31 образец пуповинной крови новорожденных с ГВ 37–41 недель. Критерии включения: новорожденные дети различного гестационного возраста. Критерии исключения: новорожденные с различными хромосомными заболеваниями.

Определение численности клеточных популяций основывалось на идентификации специфических рецепторов, экспрессирующихся на поверхности клеток. Исследуемые образцы анализировались методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), в ходе которого устанавливалось процентное содержание изучаемой популяции от числа всех лейкоцитов, гейтируемых на цитометре. При помощи набора BD Simultest IMK-Lymphocyte было проведено определение уровня экспрессии рецепторов стандартного иммунного статуса на поверхности лимфоцитов (CD3⁺, CD19⁺/CD3⁻, CD4⁺/CD3⁺, CD8⁺/CD3⁺, CD16/56⁺/CD3⁻).

Для исследования функциональной активности иммунокомпетентных клеток проводили оценку уровня экспрессии рецепторов ранней и поздней активации лимфоцитов и моноцитов: HLA-DR⁺/CD14⁺, CD71⁺/CD14⁺, CD25⁺/CD4⁺, CD95⁺/CD3⁺; рецептора адгезии (CD11b). Количество цитокин-продуцирующих клеток (IL-4⁺/CD4⁺, IFN γ ⁺/CD4⁺) устанавливалось с использованием системы BD FastImmune Cytokine с набором специфических антител. Определение концентрации сывороточных цитокинов IFN γ и IL-4 проводилось методом ИФА (Вектор-Бест, Россия) с детекцией на иммуноферментном анализаторе «Multiskan MCC/340» фирмы Labsystems (Финляндия). Выявление особенностей функционального состояния иммунной системы — определение фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов (Phagotest). Для активации фагоцитоза в методике использовались FITC-меченые опсонизированные бактерии (*E. coli*-FITC). На проточном цитофлуориметре измеряли общее количество фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов (поглощение одной или более бактерий одной клеткой). Описательная статистика материала проводилась с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel 2007» и «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft, США). Статистическая обработка заключалась в определении медианы (Me) с нижним и верхним квартилями (25-го и 75-го процентилей, Q_{0,25} и Q_{0,75}). Для проверки статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков использовался непараметрический критерий Краске-

ла–Уоллиса (Kruskel–Wallis). Уровень статистической значимости межгрупповых различий p принимали равным 0,013 (с учетом поправки Бонферрони).

Проведенные цитометрические исследования показали, что у всех новорожденных основных групп отмечалось статистически значимое уменьшение абсолютного количества лейкоцитов в сравнении с новорожденными с ГВ 37-41 недель ($p < 0,001$) (табл. 1). Процентное содержание лимфоцитов у этих детей, напротив, значимо превышало показатели группы сравнения ($p < 0,002$). Уровень экспрессии рецепторов основных популяций лимфоцитов у новорожденных основных групп не отличался от аналогичных показателей доношенных детей. Необходимо отметить, что сниженное при рождении абсолютное число НК-клеток в группах с ГВ 25-28 и 29-32 недели достигало уровня детей группы сравнения с 33 неделями ГВ ($p_{1-4} = 0,01$; $p_{1-3} = 0,005$).

При исследовании функциональной активности лимфоцитов пуповинной крови у новорожденных с ГВ 25-28 недель установлено повышение процентного содержания клеток, экспрессирующих на своей мембране $CD3^+CD95^+$ маркер поздней активации ($p = 0,0001$) относительно показателей группы сравнения (табл. 2). С увеличением гестационного возраста ребенка численность данных клеток уменьшалась: в 29-31 неделю ГВ до уровня доношенных ($p \geq 0,05$) и в 33-36

недель ГВ ниже показателей группы сравнения ($p < 0,0001$).

У детей 33-36 недель ГВ отмечалось повышение относительного числа регуляторных клеток с рецептором к $IL-2$, являющимся активационным маркером ($CD25/CD4$) – в сравнении с ГВ 37-41 неделя ($p = 0,001$). У новорожденных меньшего гестационного возраста экспрессия рецептора $CD25^+/CD4^+$ не отличалась от показателей доношенных детей.

Анализ экспрессии молекул адгезии $CD3^+CD11b^+$ на лимфоцитах выявил снижение процентного содержания $CD3^+CD11b^+$ клеток ($p < 0,002$) группах детей 29-32 и 33-36 недель ГВ по сравнению с доношенными новорожденными. В 1-й группе новорожденных этот показатель по относительному значению был снижен на уровне тенденции ($p = 0,02$).

В отношении рецепторов наивных лимфоцитов $CD45RA^+/CD3^+$ и клеток, прошедших антиген-зависимое премирование $CD45RO^+/CD3^+$, не выявлено значимых изменений относительно гестационного возраста детей.

Наименьшее процентное содержание моноцитов, экспрессирующих активационный маркер $HLA-DR^+/CD14^+$, отмечалось в группе новорожденных с ГВ 25-28 недель по сравнению с показателями детей большего гестационного возраста ($p_{1-2} = 0,01$; $p_{1-3, 1-4} = 0,0001$) (табл. 2). Относительное число моноцитов, несущих трансферриновый рецептор $CD71/CD14$ в основных группах

ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ РАЗЛИЧНОГО ГЕСТАЦИОННОГО ВОЗРАСТА

Показатели	1-я группа (n = 23)	2-я группа (n = 21)	3-я группа (n = 27)	4-я группа (n = 31)	Уровень значимости различий (p)
	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	
Лейкоциты, $10^9/л$	5,9 (4,62-7,4)	5,6 (4,6-8,62)	7,4 (5,85-9,87)	10,85 (9-13,55)	$p_{1-4} = 0,0002$ $p_{2-4, 3-4} = 0,001$
Лимфоциты, %	74 (67,25-80,75)	68 (56-74)	50 (40,5-52,5)	38 (30,5-46)	$p_{1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4} \leq 0,002$
Лимфоциты, $10^9/л$	4,52 (2,98-5,84)	3,76 (3,33-7,62)	3,34 (2,72-4,61)	4,41 (3,24-5,33)	
CD3, $10^9/л$	1,92 (1,53-2,8)	1,56 (1,37-2,84)	1,9 (1,4-2,46)	2,03 (1,2-3,05)	
CD19, $10^9/л$	0,67 (0,44-1)	0,59 (0,35-0,88)	0,58 (0,39-0,74)	0,34 (0,29-0,74)	
CD4, $10^9/л$	1,38 (1,17-1,75)	1,1 (0,83-1,98)	1,34 (0,97-1,77)	1,56 (0,88-2,11)	
CD8, $10^9/л$	0,52 (0,32-1)	0,57 (0,32-0,81)	0,63 (0,44-0,77)	0,59 (0,4-0,79)	
CD16/56, $10^9/л$	0,26 (0,14-0,56)	0,3 (0,21-0,59)	0,42 (0,22-1,16)	0,59 (0,34-0,72)	$p_{1-3} = 0,005$ $p_{1-4, 2-4} = 0,01$

ТАБЛИЦА 2. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ, %

Показатели	1-я группа (n = 23)	2-я группа (n = 21)	3-я группа (n = 27)	4-я группа (n = 31)	Уровень значимости между группами (p)
	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	
CD25/CD4	2 (1,75-4,25)	4 (3,25-5,75)	5 (4-5)	3,5 (2,25-4)	$p_{3-4} = 0,001$
CD95/CD3	5,5 (3,75-9,25)	0,39 (0,19-2,75)	0,8 (0,32-1)	1 (1-1,35)	$p_{1-2, 3-4} \leq 0,01$ $p_{1-3, 1-4} \leq 0,0001$
CD45RA/CD3	32 (18-51)	17 (6-27)	19,5 (16-39,5)	14 (11-33)	$p_{1-4} = 0,03$
CD45RO/CD3	5 (3-7)	3 (1,5-4)	4,5 (3,25-5)	3 (2-5)	
CD11b/CD3	2 (2-3)	2 (1,5-2)	2 (2-2)	4 (2-9)	$p_{1-4} = 0,024$ $p_{2-4} = 0,002$ $p_{3-4} = 0,011$
CD71/CD14	14,5 (11,5-15,8)	17 (11-25,5)	16 (11-19)	17,5 (11,8-20,8)	
HLA-DR/CD14, %	26 (20-45)	61,5 (44,5-66,2)	56 (51,50-66)	55 (47-64)	$p_{1-3, 1-4} = 0,0001$ $p_{1-2} = 0,01$

детей соответствовало значениям доношенных новорожденных.

Функциональная активность мононуклеаров пуповинной крови играет важную роль в поддержании постоянства внутренней среды организма. Способность специфических клеток к фагоцитарной функции необходима уже на раннем этапе формирования организма. Согласно полученным данным, процент фагоцитирующих клеток у детей обследованных групп был не однороден. Установлено, что моноциты и нейтрофильные гранулоциты пуповинной крови детей 25-28 недель ГВ уже включаются в процесс фагоцитоза. По данным анализа функциональной активности клеток, опсонированные бактерии поглощают до трети клеток.

Число активно фагоцитирующих гранулоцитов в образцах пуповинной крови у всех недоношенных новорожденных было значимо ниже показателей группы сравнения (11,8 (6,12-20,61)% в 1-й группе; 13,32 (9,83-16,81)% во 2-й группе; 17,1 (16,8-17,4)% в 3-й группе против 49,4 (33,53-57,55)% в группе сравнения, $p = 0,001$), а содержание активированных моноцитов не отличалось от такового доношенных детей и составляло в 1-й группе 17 (6,3-33,04)%; во 2-й группе 29,65 (23,87-35,42)% ; в 3-й группе 28,32 (14,58-42,06)% против 27,4 (13,36-40,92)% в группе сравнения ($p \geq 0,05$).

Развитие иммунного ответа по пути Th1-зависимого провоспалительного или Th2-

противовоспалительного реагирования напрямую зависит от индукции цитокинового сигнала, получаемого клетками. Как следует из проведенных исследований, независимо от наличия или отсутствия стимуляции в продукции цитокинов клетками у детей 25-28 и 29-32 недели ГВ, преобладала провоспалительная направленность иммунного ответа (табл. 3). Повышение индекса поляризации ($IFN\gamma/IL-4$) более 1,0 регистрировалось в этих группах детей в 92,3 и 66% случаев соответственно. У новорожденных 33-36 недель и доношенных новорожденных доминировало смещение баланса цитокин-продуцирующих клеток в сторону Th2-зависимого иммунного ответа в 60 и 66,6% наблюдений соответственно.

Содержание внутриклеточного $IFN\gamma$ в образцах пуповинной крови недоношенных новорожденных 1-й группы было значимо выше в сравнении с аналогичными показателями групп с ГВ 33-36 недель и ГВ более 37 недель ($p = 0,01$ в обоих случаях) (табл. 3). Спонтанная и стимулированная продукция внутриклеточного $IL-4$ у детей различного гестационного возраста не отличалась.

Достоверные изменения были обнаружены при исследовании уровня цитокинов в сыворотке пуповинной крови. Содержание $IFN\gamma$ в группах недоношенных детей с ГВ 25-28 и 33-36 недели статистически значимо превышало таковые группы сравнения ($p = 0,0001$), а концентрация сыво-

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК И СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕСТАЦИОННОГО ВОЗРАСТА

Показатели	1-я группа (n = 23)	2-я группа (n = 21)	3-я группа (n = 27)	4-я группа (n = 31)	Уровень значимости различий (p)
	Q _{0,25} -Q _{0,75}				
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ спонтанный, %	3,95 (1,74-8,03)	1,89 (1,57-3,18)	3,77 (0,31-7,24)	1,01 (0,65-2,25)	p _{1-2,1-4} = 0,01
CD4 ⁺ IL-4 ⁺ спонтанный, %	1,45 (1,25-4,18)	2,08 (0,68-5,68)	3,02 (2,06-3,99)	1,45 (0,65-4,65)	
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ / CD4 ⁺ IL-4 ⁺ спонтанный, у.е	1,51 (1,2-3,02)	1,53 (0,27-2,78)	0,92 (0,15-1,7)	0,79 (0,53-1,05)	p ₁₋₃ = 0,003 p ₁₋₄ = 0,01
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ стимулированный, %	6,67 (2,84-9,17)	5,25 (4,06-9,06)	4,39 (0,57-8,22)	2,26 (1,64-4,21)	
CD4 ⁺ IL-4 ⁺ стимулированный, %	2,93 (1,97-5,18)	3,32 (1,42-3,5)	4,17 (3,89-4,45)	2,55 (1,19-5,14)	p ₂₋₃ = 0,0003
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ / CD4 ⁺ IL-4 ⁺ стимулированный, у.е.	1,5 (1,3-3,03)	2,58 (1,22-3,69)	0,99 (0,14-1,84)	1,09 (0,67-1,57)	p ₂₋₃ = 0,0007 p ₁₋₃ = 0,002
IFN γ , пг/мл	10,34 (4,9-12,0)	6 (1,17-10,4)	9 (8,18-9,29)	3,11 (1,57-4,4)	p _{1-4, 3-4} = 0,0001
IL-4, пг/мл	1,69 (0,38-2,3)	3,55 (2,94-4,15)	0,57 (0,52-0,77)	2,78 (2,33-3,25)	p ₁₋₂ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,02 p _{1-4, 2-3, 3-4} < 0,001

роточного IL-4 была статистически достоверно ниже доношенных новорожденных (p = 0,001) (табл. 3). Вне зависимости от гестационного возраста у всех детей наблюдалось изменение цитокинового баланса в сторону Th1-иммунного ответа, наиболее выраженного у новорожденных с ГВ 25-28 и 33-36 недель.

Проведенное исследование в широком возрастном диапазоне недоношенных новорожденных позволило выявить некоторые закономерности механизмов формирования врожденного и адаптивного иммунитета. У всех недоношенных детей в 25-36 недель ГВ на фоне лейкопении установлено повышение относительного числа лимфоцитов, что отражает физиологический процесс «обучения» множества клонов Т- и В-клеток, несущих TCR-рецепторы для распознавания чужеродных антигенов. Отсутствие различий в количестве CD3-, CD19-, CD4- и CD8-популяций, а также «наивных» клеток (CD45RA) и клеток, прошедших антиген-зависимое примирование (CD45RO), свидетельствует о достижении в становлении клеточного звена иммунитета необходимого числа зрелых клеток по основным популяциям лимфоцитов к 25 неделе ГВ.

Выявлены изменения в абсолютной численности НК-клеток, сниженной у детей, родив-

шихся на 25-32 неделе гестации в сторону их повышения с 33 недели ГВ, а также включение компенсаторных механизмов, ограничивающих экспансию активированных клонов, путем усиления экспрессии Fas-рецептора (маркера «негативной» активации лимфоцитов) с 25 недели ГВ, с последующим снижением активированных Т-лимфоцитов у детей большего гестационного возраста (свыше 29 недель).

По достижении 33 недель эмбрионального развития акцент в формировании иммунного ответа смещается на повышение экспрессии активационных молекул (CD25), способствующих осуществлению ускоренной дифференцировки регуляторных популяций лимфоцитов.

Формирование иммунной системы плода идет неразрывно со становлением фагоцитоза, однако изменения числа активных клеток обнаруживаются только между показателями основных групп и группы сравнения и выражаются в увеличении числа фагоцитирующих гранулоцитов при ГВ более 37 недель. Снижение уровня экспрессии молекул адгезии CD11b⁺Т-лимфоцитами крови на уровне относительных показателей, особенно выраженной у детей с ГВ 29-32 и 33-36 недель, отражает сниженную готовность эффекторных клеток к участию в процес-

сах межклеточного взаимодействия и антигенной презентации. Полученные нами результаты по оценке уровня CD14⁺HLA-DR⁺ клеток свидетельствуют об уменьшении количества активированных моноцитов пуповинной крови у детей с ГВ 25-28 недель и об их полноценной антиген-презентирующей функции начиная с 29 недели ГВ относительно показателей доношенных новорожденных. С другой стороны, по данным фаготеста нейтрофилов прослеживается нарушение координации между врожденным и адаптивным иммунитетом, что выражается в сниженной способности гранулоцитов поглощать опсонизированные бактерии.

Особенностью врожденного иммунитета является преобладание в сыворотке пуповинной крови провоспалительных цитокиновых факторов, определяющих характер иммунного реагирования (Th1-зависимый ответ). Вместе с тем

выявлены черты продукции и баланса провоспалительных и регуляторных цитокинов в основных группах: повышенное содержание сывороточного IFN γ при снижении уровня IL-4 у новорожденных с ГВ 25-28 и 33-36 недель и отсутствие нарушений в продукции цитокинов у детей с ГВ 29-32 недели. Полученные результаты согласуются с данными литературы [1, 2].

В целом полученные данные свидетельствуют об особенностях состояния иммунной системы, характерных для определенного гестационного возраста недоношенных детей. Ряд исследованных параметров дает возможность говорить о частичном достижении иммунологической готовности к ответу на потенциальный антиген, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Список литературы / References

1. Чарипова Б.Т., Чистякова Г.Н., Тарасова М.Н. Оценка некоторых параметров клеточного иммунитета у детей с экстремально низкой массой тела // Медицинская иммунология, 2011. С. 442-443. [Charipova B.T., Chistyakova G.N., Tarasova M.N. Estimation of some parameters of cellular immunity at children with an extremely low birth weight. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, pp. 442-443. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2011-4-5>
2. Каракушикова А.С., Рахимова К.В., Абдуллаева Г.М. Особенности иммунного статуса недоношенных детей с перинатальной патологией в раннем неонатальном периоде // Педиатрия, 2012. Т. 91, № 1. С. 20-25. [Karakushikova A.S., Rakhimova K.V., Abdullaeva G.M. Features of the immune status of preterm infants with perinatal pathology in the early neonatal period. *Pediatriya = Pediatrics*, 2012, Vol. 91, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]
3. Титов Л.П., Кирильчик Е.Ю., Канашкова Т.А. Особенности строения, развития и функционирования иммунной системы детского организма // Медицинские новости, 2009. № 5. С. 7-16. [Titov L.P., Kiril'chik E.Yu., Kanashkova T.A. Features of the structure, development and functioning of the child organism's immune system. *Meditsinskie novosti = Medical News*, 2009, no. 5, pp. 7-16. (In Russ.)]
4. Титова Н.Д. Развитие системы иммунитета плода, новорожденного и детей раннего возраста // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2007. № 4. С. 38-46. [Titova N.D. Development of the immune system of a fetal, newborn and young children. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2007, no. 4, pp. 38-46. (In Russ.)]
5. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.
6. Härtel C., Adam N., Strunk T., Temming P., Müller-Steinhardt M., Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, Vol. 142, no 3, pp. 446-453.
7. Holt P.G., Jones C.A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, 2000, Vol. 55, pp. 688-697.
8. Howie D., Spencer J., DeLord D. Extrathymic T cell differentiation in the human intestine in early life. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, pp. 5862-5872.
9. Levy E., Xanthou G., Petrakou E., Zacharioudaki V., Tsatsanis C., Fotopoulos S., Xanthou M. Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS-induced inflammatory responses of neonates. *Pediatr Res.*, 2009, Vol. 66, no 2, pp. 179-184.
10. Li Y., Wei Q.F., Pan X.N. Cellular and humoral immunity in preterm infants of different gestational ages. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.*, 2014, Vol. 16, no 11, pp. 1118-1121.
11. Melville J.M., Moss T.J. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci.* 2013, Vol. 7, p. 79.

12. Palfi M., Selbing A. Placental transport of maternal immunoglobulin G. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1998, Vol. 39, no. 1, pp. 24-26.
13. Peng H.B., Hou Z.H., Long W. Changes in T lymphocyte subsets in preterm infants with intrauterine growth retardation. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 31-34.
14. Pérez A., Bellón J.M., Gurbindo M.D., Muñoz-Fernández M.A. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum. Immunol.*, 2010, Vol. 71, no 2, pp. 151-157.
15. Van den Berg J.P. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum. Dev.*, 2011, Vol. 87, no. 2, pp. 67-72.

Авторы:

Ремизова И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник отделения биохимических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Чистякова Г.Н. — д.м.н., профессор, руководитель отделения иммунологии и клинической микробиологии «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Ляпунов В.А. — младший научный сотрудник отделения иммунологии и клинической микробиологии ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — профессор, академик РАН, директор ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Устьянцева Л.С. — младший научный сотрудник отделения физиологии и патологии новорожденных и детей раннего возраста ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Газиева И.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения антенатальной охраны плода ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Remizova I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology and Microbiology, Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Chistyakova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Clinical Microbiology, Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Lyapunov V.A., Junior Research Associate, Department of Immunology and Microbiology, Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Ustyantseva L.S., Junior Research Associate, Department of Pediatric Physiology and Pathology, Ural Research Institute of Mother and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Gazieva I.A., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Antenatal Protection of Fetus, Ural Research Institute of Mother and Child Care, Russian Federation

Поступила 29.12.2015
Принята к печати 18.01.2016

Received 29.12.2015
Accepted 18.01.2016