ДИСФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА

Митропанова М.Н., Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В.

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются основными клетками иммунной системы, которые в большом количестве рекрутируются в ответ на контакт с патогенами и отвечают за обеспечение здоровья полости рта. Ключевым фактором поддержания гомеостаза является взаимодействие между микробиотой полости рта и НГ [9, 10, 18]. Важнейшей функцией НГ является мгновенное реагирование на бактериальные, вирусные и грибковые патогены. Рецепторы поверхностной цитоплазматической мембраны НГ являются чувствительными сенсорами, которые способствуют реализации важных функций НГ и опосредуют взаимосвязь гранулоцитов с экстрацеллюлярным окружением [4-6]. У детей с пороками развития челюстно-лицевой области формирование воспалительного процесса связано с анатомо-топографическими особенностями при врожденной расщелине губы и неба (ВРГН), облегчающими проникновение патогенной микрофлоры с последующими нарушениями микробиоценоза слизистой ротовой полости и слизистой носа, и, как следствие, с негативными изменениями состояния иммунной системы [2, 3]. Необходимость использования антибактериальных препаратов приводит к появлению микроорганизмов с выраженными патогенными свойствами, обладающих высокой резистентностью к антибиотикам, что дополнительно усугубляет изменения микробного пейзажа при ВРГН [1]. Дисфункции НГ при ВРГН препятствуют элиминации возбудителей и поддерживают их персистенцию. С одной стороны, нарушение элиминации возбудителей может возникать на фоне ранее имевшихся дефектов функционирования системы НГ, с другой стороны несостоятельность НГ усугубляется значительным по патогенности и массивности воздействием различных инфекционных агентов.

Известно, что функциональная активность НГ, в частности, их фагоцитарная функция и микробицидная активность находится в непосредственной зависимости от фенотипических особенностей, - количества и плотности экспрессируемых рецепторов [8]. Так показано что, CD64(FcγRI), CD16(FcγRIII), CD32(FCγRII) – триггерные молекулы, запускающие иммунный фагоцитоз и процессы киллинга. Экспрессия на мембране НГ CD32, CD16 важна в осуществлении как фагоцитарной функции, так и антителозависимой цитотоксичности (АЗКЦ), что ассоциируется с CD11b/CD18-зависимым повышением адгезии, дегрануляцией и киллингом [7]. Раннее распознавание микробных продуктов иммунной системой является необходимым условием для эффективного воспалительного ответа, приводящего к привлечению НГ к месту инфекции и бактериальному клиренсу. Рецепторы распознавания PAMP, включая TLR4, а также рецептор CD14, играют существенную роль в этом процессе [16]. CD14 представляет собой липополисахарид связывающий белок (LPS), и функционирует как рецептор эндотоксина. CD14 и рецепторы распознавания образов Toll-подобного рецептора (TLR) участвуют в ответе на LPS и другие микробные продукты, компоненты грамотрицательных и грамположительных бактерий, микобактерий, спирохет и дрожжей [13]. Роль CD14 и TLR4 ранее была обнаружена при распознавании респираторно-синцитиального вируса (RSV) [15], что позволяет предположить, что эти рецепторы могут иметь более широкое участие в иммунном ответе, чем считалось ранее. CD14 слабо экспрессируется на НГ, однако после активации НГ экспрессия молекулы CD14 на поверхностной плазматической мембране увеличивается за счет транслокации из цитоплазматических гранул [17]. При длительной стимуляции НГ LPS молекулы CD14 синтезируются *de novо*[19]. НГ реагируют на комплексы LPS/LBP через CD14, высвобождая TNF-альфа [11]. Определение особенностей функционирования НГ при ВГРН у детей имеет важное значение в мониторинге таких пациентов на разных этапах комплексной реабилитации. Полноценная диагностика дисфункций НГ необходима для дальнейшего осуществления их своевременной иммунокоррекции с целью предотвращения развития патологического хронического воспаления в ответ на длительно присутствующую на слизистой ротовой полости и носа патогенную микрофлору. Вместе с тем функциональная активность и фенотипические особенности НГ при ВГРН у детей на разных этапах комплексной реабилитации остаются мало изученными.

**Целью исследования** явилось изучение особенностей фенотипа и функциональной активности НГ у детей с врожденными расщелинами губы и неба на различных этапах комплексной реабилитации.

**Материалы и методы**. В исследование были включены 56 детей с ВРГН находящихся на разных этапах комплексной реабилитации.

**Группу 1** составили 20 детей от 1 года до 3 лет на этапе подготовке к хирургической операции по устранению дефекта мягкого неба (велопластики), или ранней щадящей операции по устранению дефектов твёрдого нёба (уранопластики); в **группу 2** вошло 20 детей от 4-6 летперед хирургической операцией по устранению и коррекции дефектов твёрдого нёба и закрытием остаточного дефекта неба (поздняя уранопластика), коррекции верхней губы и преддверия полости рта - ортодонтическая реабилитация; **группу 3** составили 16 детей от 7 до 12 лет на этапе подготовки к ранней аутоостеопластике с коррекцией альвеолярного отростка верхней челюсти и хрящевого отдела носа, удалением временных и постоянных зубов по ортодонтическим показаниям, рассечением послеоперационных рубцов, устранением нёбно-глоточной недостаточности (компактостеотомия). Из ортодонтических мероприятий - применение лицевой маски, небных винтов для расширения верхней челюсти с одновременной протракцией, съемных и несъемных конструкций. Группы контроля составили условно-здоровые дети соответствующих возрастных диапазонов (по 10 человек в каждой группе). Проводили микробиологические исследования полости рта, носоглотки и носовой полости у детей с ВГРН на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов стандартными методами.

Проводилась оценка количества НГ, экспрессирующих CD64, CD16, CD32, CD14 рецепторы (Becton Dickinson FACScan, США) и конъюгатов моноклональных антител CD64-FITC , СD16-FITC, CD32-PE , CD14-FITC («Beckman Coulter International S.A.», Франция). Исследование фагоцитарной функции НГ проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6] тестировали содержание активно-фагоцитирующих НГ – относительное (%ФАН) и абсолютное количество (ФАН абс.); для характеристики объема захваченного бактериального материала (S.aureus, штамм 209) определяли фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности и переваривания определялся процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП). Активность микробицидных систем НГ, с оценкой их способности к реализации цитотоксического и цитолитического потенциала, тестировалась с использованием нагрузочных тестов в системе *in vitro*. В зависимости от уровня активности NADРН-оксидазы в спонтанном и стимулированном NBT-тесте (индукция S.aureus, штамм 209) определялся средний цитохимический индекс – СЦИ, рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ) – %ФПКcт/%ФПКсп.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ MicrosoftExel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) (Me[Q1;Q3]). Достоверность различия определяли при p < 0,05.

**Результаты и обсуждение**

По результатам микробиологических и бактериологических исследований идентифицировано 10 культур грамположительных и грамотрицательных бактериальных микроорганизмов, а также *Candida albicans* и *Candida krusei*. Изучение микробного пейзажа у детей с ВГРН позволило выявить определенную закономерность – слизистые были заселены не монокультурами, а ассоциациями микроорганизмов, колонизирующими различные биотопы. Также выявлено, что с увеличением возраста во всех изученных биотопах наблюдаются значительные изменения, как в качественном, так и в количественном составе микробов. Нарушение микробиоценоза слизистых ротовой и носовой полости может явиться причиной или следствием снижения антибактериального иммунитета, и прежде всего дисфункций НГ.

Анализ показателей фагоцитарной и микробицидной активности, фенотипического профиля НГ у детей с ВГРН разных возрастных групп на различных этапах комплексной реабилитации продемонстрировал ряд особенностей.

Так выявлено, что у детей группы 1 на фоне снижения относительного и абсолютного содержания НГ, отмечается незначительное увеличение количества НГ экспрессирующих СD16 и СD32 рецепторы (р1>0,05; р2>0,05), достоверное снижение в 2,5 раза уровня CD64+НГ и появление НГ 0,97[0,44; 2,30]%, экспрессирующих на поверхности цитоплазматической мембраны CD14 антигены в сравнении с показателями контрольной группы детей от 1 - 3 лет (Рисунок 1, Таблица 1).

*Рисунок 1. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

*Таблица 1. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей с врожденной расщелиной губы и неба (Ме[Q1; Q3]).*

Анализ результатов исследования фагоцитарной функции у детей 1 группы, прежде всего, показал более низкий уровень активно фагоцитирующих НГ (%ФАН, ФАН абс) относительно таковых у здоровых детей (Рисунок 2).

*Рисунок 2. Показатели фагоцитарной и NADРН - оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

При этом и показатели поглотительной способности НГ (ФЧ, ФИ), и показатели, характеризующие переваривающую способность НГ, были на уровне контрольных значений (Рисунок 2). В то же время наблюдалась напряженность NADРН - оксидазной микробицидной активности НГ в спонтанном NBT- тесте (СЦИсп - 0,32[0,25; 0,40], % ФПКсп-11,00[8,00; 13,00] против СЦИсп - 0,09[0,05; 0,12], % ФПКсп-2,00[1,00; 3,00] в контроле). При дополнительной антигенной нагрузке отмечался срыв резервных возможностей НГ, что отразилось в снижении КМ- 0,88[0,88; 1,33] против 2,5[1,50; 3,50] у здоровых детей соответствующей возрастной группы (Рисунок 2).

Выявленные изменения у детей этой группы характеризуют с одной стороны дефектность и напряженность врожденного иммунитета на фоне состояния физиологического воспаления слизистой десен, при прорезывании временных зубов, характерной для этого возраста, с другой стороны и, как следствие, формирование неадекватного иммунного ответа связанного с постоянной вирусной нагрузкой (персистенция респираторных и герпес вирусов, острые герпетические стоматиты), бактериальной нагрузки представленной наиболее часто регистрируемыми ассоциациями стрептококков (*Str.viridans, Str.Pneumoniae), Ent.durans, Ent.faecium, S.epidermidis, Haemophilus influenza,* при обилии мягкого зубного налета, грибковые стоматиты вызванные *Candida albicans* несмотря на отсутствие острых клинических проявлений заболеваний.

Показано, что у детей исследуемой группы 2 (4-6 лет) общее количество лейкоцитов и НГ имели тенденцию к снижению, но достоверно не отличались от значений контрольной группы условно-здоровых детей сопоставимой по возрасту (р1>0,05; р2>0,05). При анализе показателей характеризующих фенотип НГ отмечено достоверное увеличение относительного количества НГ, экспрессирующих CD32и СD14 рецепторы (р1<0,05; р2<0,05), при неизменном уровне СD64+НГ, CD16+НГ по отношению к показателям контроля (р1>0,05; р2>0,05)(Рисунок 3, Таблица 1).

*Рисунок 3. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

При этом количество активно работающих НГ (%ФАН, ФАН абс), способность захвата бактериального антигена (ФЧ и ФИ) и переваривающая активность НГ были в пределах контрольных значений (р>0,05) (Рис. 5). Однако, выявлена активация спонтанных NADРН-оксидаз с низким ответом на дополнительную антигенную нагрузку (КМ-1,13[1,00; 1,25] против 1,67[1,55; 2,00] в контроле). (Рисунок 4).

*Рисунок 4. Показатели фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

Анализ показателей определяющих состояние НГ у детей с ВРГН данной возрастной группы выявил неадекватно низкий ответ на вирусные и блокаду на бактериальные инфекции. Для этой группы детей характерны хронические герпетические стоматиты, разной степени тяжести с афтозными высыпаниями на слизистой оболочке полости рта, катаральным воспалением десен. Появляется сменный прикус (смена временных зубов на постоянные) слизистая десен в состоянии физиологического воспаления, которая является входными воротами для вирусной и бактериальной инфекции. Ухудшается гигиеническое состояние полости рта, активно появляется кариес и осложненный кариес зубов, наличие в полости рта несанируемых зубов увеличивает штаммы микроорганизмов *S.mutans. S.аureus*, значительно усиливается колонизация *Str.viridans, Str.pneumoniae, Ent.Durans, Haemophilus influenzae,* *Haemophilus parainfluenzae*. Дети этого возраста с ВГРН болеют детскими инфекциями, которые проявляются воспалением в полости рта (корь, ветряная оспа, скарлатина и т.д) - эрозиями, афтами, язвами, страдают рецидивирующими бактериальными стоматитами, катаральными и гнойными воспалениями миндалин, ринитами.

Анализ показателей группы 3 детей 7-12 лет позволил выявить следующие закономерности: на фоне тенденции снижения общего количества лейкоцитов выявлено достоверное снижение относительного и абсолютного количества НГ (Рисунок 5).

*Рисунок 5. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 7 - 12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

При этом отмечено повышение в 6,7 раза уровня CD64+НГ до 3,36[2,11; 4,65]% против 0,50[0,40; 0,68]% в контроле, появление CD14+НГ в 1,07[0,96; 1,17] % на фоне снижения уровня CD16+НГ до 92,10[91,08; 92,00]% против 98,25[96,84; 99,36]% в контроле (Рисунок 5).

При оценке фагоцитарной активности у детей 3 группы на фоне снижения абсолютного количества НГ до 2,11[1,67; 3,17] против 4,3[4,27; 4,64] в контроле, выявлено снижение и доли среди них активно фагоцитирующих НГ до 44,0[42,50; 45,50]% против 54,67[51,00; 57,00]%, что особенно показательно при оценке абсолютных показателей ФАН (0,87[0,44; 1,30]х109/л против 2,35[2,17; 4,64] х109/л) (Рисунок 6).

*Рисунок 6. Показатели фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 7-12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы).*

Процессы захвата (ФИ, ФЧ) так же имели тенденцию снижения (р1>0,05; р2>0,05), а показатели переваривания (%П, ИП) не отличались от контрольных значений. При этом выявлено повышение спонтанной активности NADPH-оксидаз как по %ФПК-4,00[3,00;5,00] против 1,00 [1,00; 1,75] (р<0,05), так и по СЦИ – 0,15 [0,13; 0,18] против 0,05 [0,04; 0,11] (р<0,05) в контроле. При дополнительной антигенной нагрузке в NBTcт - тесте сохранялся резервный микробицидный потенциал НГ – КМ 1,34 [1,26; 1,42] (Рисунок 6). Данные изменения можно оценить как неадекватную реакцию НГ. Синтез *de novo* CD14, усиление экспрессии CD64, при снижении экспрессии CD16 демонстрируют фенотип НГ, характерный для наличия инфекции [19]. В 3 группе детей также выявлен неэффективный ответ НГ на постоянную микробную нагрузку, преимущественно бактериальную, так как выявленный количественный дефицит НГ, в том числе активно фагоцитирующих НГ, недостаточен для элиминации патогена. У детей группы 3 увеличивается частота встречаемости микроорганизмов и их видовое разнообразие, кроме обнаруженных в других группах ассоциаций стрептококков, стафилококков появляются в большом количестве *C. krusei* и *C. albicans, Ent. durans, Kl. pneumonia*. В этот возрастной период у детей отмечается склонность к пролиферативным и гипертрофическим воспалительным процессам в области десневого сосочка и маргинальной десны (отечно-воспалительные и фиброзные формы гипертрофического гингивита), а также аллергические риниты, аллергические стоматиты.

Таким образом, сравнительный анализ уровня экспрессии рецепторов СD64, CD16, CD32, СD14 НГ в изучаемых группах детей c ВГРН и детей разных возрастных контрольных групп демонстрирует разную оснащенность, предопределяющую несостоятельность фагоцитарной и микробицидной функции НГ во все изучаемые возрастные периоды. Несмотря на появление корецепторных молекул CD14на НГ, свидетельствующих об активации паттернраспознающих рецепторов TLR2 и TLR4 в целях обеспечения процессов адекватной элиминации микроорганизмов, по всей вероятности, высокая микробная нагрузка и её увеличение в различных группах с ВГРН, вызывает блокаду взаимодействия CD16-CR3 под действием Mac-1-подобного белка GAS [12], продуцируемого микроорганизмами, в частности стрептококками, что приводит к нарушению передачи сигналов и ингибированию антимикробного ответа НГ.

Обнаружены общие для всех возрастных групп детей с ВРГН дисфункции НГ:

- появление НГ, экспрессирующих CD14 рецепторы, отсутствующие у детей всех трех контрольных групп условно-здоровых детей и свидетельствует о высокой вирусной и бактериальной нагрузке на слизистых даже в период отсутствия острых клинических проявлений;

- дефекты фагоцитоза, выраженные в той или иной степени, в первую очередь связанные со снижением количества активно фагоцитирующих НГ, нарушением функций захвата;

- напряженность NADPH-оксидаз с частичной или полной блокадой ответа на дополнительную антигенную нагрузку.

Выявленные особенности нарушений функционирования НГ у детей различных возрастных групп с ВГРН свидетельствуют об их неспособности к реализации адекватной противоинфекционной защиты, что может приводить к нетипично-протекающим вирусно–бактериальным инфекциям и возникновению различных, в том числе гнойных осложнений в послеоперационном периоде. Очевидна необходимость разработки таргетной иммунотерапии, направленной на восстановление нарушенных функций НГ и включаемой в программу комплексной реабилитации детей с ВГРН.