**Введение.** Были проведены исследования образцов крови у пациентов до 1 года с катарактой, глаукомой и ретинопатией недоношенных и у доношенных, соматически здоровых детей до 1 года, с целью количественного определения Т-регуляторных клеток CD4+CD25highFoxp3+CD127low. Объединены и структурированы данные собственных исследований, представленные в ранее опубликованных статьях по отдельным патологиям, для полноценного сравнения их в комплексе наиболее распространенных глазных заболеваний у детей до 1 года, какими являются катаракта, глаукома и ретинопатия недоношенных.

 **Целью** исследованияявилось сравнительное исследование количества Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxp3+CD127low) в крови детей до 1 года жизни с РН, катарактой, глаукомой и здоровых доношенных детей (по данным собственных исследований в ранее опубликованных работах по отдельным патологиям).

**Материал и методы.**

 Всего было обследовано 131 ребенок (262 глаза) в возрасте до 1 года. Из них 79 детей (158 глаз) детей с ретинопатией недоношенных, 12 детей (20 глаз) с катарактой, 13 детей (21 глаз) - с глаукомой, 9 парных глаз детей с катарактой и глаукомой и 27 здоровых доношенных детей (54 глаза) того же возраста. Детям были произведены стандартное офтальмологическое обследование.

 Особое внимание нами было уделено исследованию количества Т-регуляторных клеток CD4+CD25highFoxp3+CD127low (табл. 1).

Произведено иммунофенотипирование клеток периферической крови (1-10), включая Т регуляторные клетки (Т-рег):

1. Забор крови у детей из вены на операционном столе во время оперативного вмешательства под общим обезболиванием. Периферическую кровь отбирали в пробирки с антикоагулянтом K3 EDTA (GreinerBioOne, Austria).

2. Лизирование эритроцитов производили при помощи лизирующего буфера RedBloodCellLysing buffer (Life technologies; США) по протоколу произво-дителя. Клетки в количестве 5 x 106 из осадка ресуспендировали в 200 мкл фосфатного буферного раствора.

3. Т-рег клетки периферической крови пациентов и доноров метили при помощи Treg detection staining cocktail (MiltenyiBiotec, Германия) по протоколу производителя. Количество Трег определяли методом проточной цитометрии на цитометре MACS Quant (MiltenyiBiotec).

 При статистической обработке полученных результатов использовался модуль «Вероятностный калькулятор» и критетии Стьюдента (Statisnica 7)

**Результаты и их обсуждение.**

 По данным ранее произведенных нами исследований (работы 1-10, их сравнительных характеристик (табл.1) и при сопоставлении результатов в представленном исследовании у детей до 1 года, были обнаружены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxp3+CD127low) между недоношенными и доношенными детьми, а также внутри групп пациентов по весовой категории при катаракте и глаукоме.

 Таблица 1

Т-регуляторы при разных стадиях ретинопатии недоношенных, врожденной катаракте и доношенных, соматически здоровых детей.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  ПризнакПодгруппа | Возраст (мес.) | Срок гестации (нед.) | Масса тела при рождении (г) | Иммунофенотип CD4+CD25highFoxp3+CD127low (%) |
| РН I стадия (n=9)M±s(Std.Dev.) |  2,9+1,6 |  28,9+2,1 | 1110+396,2 |  2,3+1,1 |
| РН II стадия (n=10)M±s(Std.Dev.) |  2,9+1,1 |  29,1+1,8 | 1150+380,0 |  2,2+1,2 |
| РН III+стадия (n=20)M±s(Std.Dev.) |  3,1±1,4 |  28,7±2,8 | 1284,5±394,6 |  2,4±1,2 |
| РН IV стадия (n=12)M±s(Std.Dev.) |  3,4±1,3 |  29,0±2,2 | 1345,0±405,5 |  2,6±0,9 |
| РН V стадия (n=19) M±s(Std.Dev.) |  6,1±3,2\*\* |  27,7±2,0 | 985,0±317,2\* |  2,4±1,0 |
| ЗАРН (n=9)M±s (Std.Dev)  |  2,4±1,3\* |  29,4±1,6 | 1297,1±455,6 |  3,6±0,7\*\* |
| Доношенныесоматически здоровые дети (n=27)M±s (Std.Dev) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_Врожденная катаракта (n=12,доношенные) M±s (Std.Dev)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_Врожденная глаукома (n=13,доношенные)M±s (Std.Dev)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ р |  4,8±2,1\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 5,0+1,8\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 4,4+3,0\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_р<0,05 (междустадиями РН) |  39,3±0,9\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 39,5+1,0\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 3,+1,2\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_р>0,05 (между стадиями РН) | 3524,5±705,4\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_3786+900,4\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 3684+1,1\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_р<0,05 (между стадиямиРН) |  3,24±1,0\*\*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 3,1+0,6\*\*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2,8+0,7(без 1 высоковесного-5300г, T-рег=5,7))\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_р<0,01  |

 На рисунке 1 построенная линия тренда указывает на значительное снижение количественного показателя Т-регуляторных клеток практически во всех стадиях, кроме ЗАРН по сравнению с контрольной группой, и особенно во II (как далее будет представлено, во II+) и V стадиях заболевания (10). Обращает на себя внимание, что у больных с задней агрессивной формой заболевания, развивающейся в достоверно более ранние сроки (р<0,01-0,05) по сравнению с другими стадиями РН, Т-регуляторные клетки CD4+CD25highFoxp3+СD127low чаще выявляются в несколько повышенных и формально нормальных для доношенных детей этого возраста количествах, в отличие от остальных стадий ретинопатии (р<0,05), хотя встречаются больные и с пониженными значениями по сравнению с возрастной нормой у доношенных детей (табл. 1, рис.1-3). Задняя агрессивная форма РН предположительно может иметь и другие ведущие патогенетические механизмы, например, связанные с генетическими нарушениями.

Рис. 1. Линейная линия тренда Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxp3+CD127low) для всех форм РН по сравнению с контролем у детей до 1 года

 На рисунке 2 в виде усиковой диаграммы представлены количественные значения Т-регуляторов при стационарных и прогрессирующих I и II стадиях ретинопатии недоношенных (РПН) (10-две диаграммы отдельно по I и II стадиям РН).



Рис.2. Количество Т-регуляторных клеток с начальными (I, I+ и II, II+) стадиями ретинопатии недоношенных у детей до 1 года

 При использовании критерия Стьюдента (рис.2) определяется пограничная достоверность при сравнении количества Т-регуляторов при сравнении не прогрессирующих и прогрессирующих I и II стадий РН (р<0,046 и p<0,07), которые представлены на коробчатых (усиковых) диаграммах. Определилась достоверная разница между этими значениями (p=0,02 и p=0,03) при использовании модуля «Вероятностный калькулятор».

 На рисунке 3 (9) у детей различного веса при рождении с катарактой представлены выявленные количества Т-регуляторов



Рис.3. Количество Т-регуляторных клеток при катаракте у доношенных детей различного веса при рождении до 1 года.

 Обнаруживаются статистически достоверные различия (р<0,01) у больных с низким и нормальным (р=0,04), нормальным и высоким (р=0,02) весом при рождении у доношенных детей с катарактой. Количество детей в группах представлено в равных соотношениях (33,3%; 33,3%; 33,4%).

 На рисунке 4, на усиковой (коробчатой) диаграмме (9) представлены выявленные количества Т-регуляторных клеток у детей с глаукомой, различного веса при рождении



Рис.4. Количество Т-регуляторных клеток у доношенных детей с глаукомой, различного веса при рождении

 Как показано на рисунке 4, выявлено статистически достоверное различие в сторону повышения количества Т-регуляторов (р=0,0001) при высоком весе доношенных новорожденных и понижению количества Т-регуляторов (р=0,07) при низком весе при рождении у доношенных детей с глаукомой. Количество детей в группах представлено в неравных соотношениях (маловесные – 30,8%; нормовесные – 61,5%; высоковесные – 7,7% ).

 На графических рисунках 5 и 6 представлено количество Т-регуляторов при всех прогрессирующих стадиях РН (рис.5) и начальных прогрессирующих стадиях РН (рис.6) по сравнению с общими значениями количества этих клеток у доношенных детей с катарактой, глаукомой, и доношенными соматически здоровыми детьми.

Рис. 5 Количество Т-регуляторных клеток у доношенных детей с катарактой, глаукомой различного веса и здоровых детей в сравнении со всеми прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных.

Рис.6. Количество Т-регуляторных клеток у доношенных детей с катарактой, глаукомой и здоровых в сравнении с начальными прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных.

Рис.7. Количество Т-регуляторных клеток у доношенных детей с катарактой, глаукомой и доношенных здоровых детей. Не учитывается 1 ребенок с глаукомой и высоким весом.

 Из представленных данных (рис. 7) видно, что при исследовании по Стьюденту нет достоверных различий между доношенными детьми: здоровыми, с катарактой и глаукомой.

 Выявлено достоверное различие между всеми прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных и доношенными здоровыми детьми (р<0,05; рис.5), а также ранними прогрессирующими стадиями и здоровыми детьми (р=0,055; рис.6).

 На графике (рис.8) представлены все исследуемые значения больных катарактой, глаукомой, ретинопатией недоношенных по сравнению с контрольной группой доношенных, соматически здоровых детей.

Рис. 8 Количество Т-регуляторных клеток у доношенных детей с катарактой, глаукомой в сравнении со всеми детьми, страдающими ретинопатии недоношенных. Не учитывается 1 ребенок, страдающий глаукомой, с высоким весом.

 Как показано на рисунке 8, отмечается статистически достоверное различие (p<0,03) при сравнении всех детей с разной степенью активности ретинопатии недоношенных и доношенных, соматически здоровых детей.

 При объединении всех доношенных детей с катарактой и глаукомой по весу были выявлены статистически достоверные различия между детьми с дефицитом веса, нормальным и повышенным весом при рождении (р<0,05).

 **Заключение.** Данное исследование является подтверждением возможного участия аутоиммунного ответа в патогенезе прогрессирующих стадий ретинопатии недоношенных. Об этом свидетельствует выявленное достоверное уменьшение количества Т-регуляторных клеток CD4+CD25highFoxp3+CD127low между недоношенными и доношенными детьми, а также внутри групп по весовой категории а пациентов с катарактой и глаукомой. Прогрессирующие стадии ретинопатии недоношенных сопровождаются более низкими значениями Т-регуляторов, чем стационарные. Выявлены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток при основных офтальмологических заболеваниях детей в возрасте до 1 года – катаракте, глаукоме и ретинопатии недоношенных.

Авторам удалось определить различия между стадиями ретинопатии недоношенных по количеству Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxp3+CD127low), выделяя заднюю агрессивную ретинопатию недоношенных в особую форму данной патологии.

**Выводы.** 1**.** Данное исследование является подтверждением возможного участия аутоиммунного ответа в патогенезе прогрессирующих стадий ретинопатии недоношенных. Об этом свидетельствует выявленное достоверное уменьшение количества Т-регуляторных клеток CD4+CD25highFoxp3+CD127low у данной категории больных. При проведении сравнительных исследований прогрессирующие стадии РН сопровождаются, как правило, более низкими значениями Т-регуляторов, чем стационарные.

2. Задняя агрессивная ретинопатия недоношенных это «другая» форма, которая, как правило, протекает на фоне показателей Т-регуляторов CD4+CD25highFoxp3+CD127low несколько повышенных или мало отличающихся от нормальных значений по общепринятым нормам доношенных детей, и этим отличается от остальных стадий ретинопатии недоношенных (р<0,05). Причина этой молниеносной формы заболевания, возможно, кроется, в том числе, в генетике.

3. У доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой и соматически здоровых по сравнению с недоношенными детьми, страдающими РН обнаружено существенное различие по количеству Т-регуляторов CD4+CD25highFoxp3+CD127low (р<0,03).

4. По данным ранее проведенных собственных исследований выявлены статистически достоверные различия (р<0,01) по количеству Т-регуляторов CD4+CD25highFoxp3+CD127low у больных с низким и нормальным (р=0,04), нормальным и высоким (р=0,02) весом при рождении у доношенных детей с катарактой. Внутри группы разные дети по весу оказались в неравных соотношениях (30,8% - низковесные; 61,5% - нормовесные; 7,7% - высоковесные). Учитывая тот факт, что 61% детей с катарактой до 1 года – нормовесные дети, нельзя исключить, что появление катаракты у детей до года сопровождается также изменением обмена веществ, в том числе генетического характера, либо явлется причиной инфекционных заболеваний (в том числе внутриутробных).

5. По нашим предыдущим исследованиям определено достоверное различие (р=0,0001) в сторону понижения количества Т-регуляторных клеток (р=0,07) при низком весе при рождении и в сторону повышения количества Т-рег (CD4+CD25highFoxp3+CD127low) при высоком весе при рождении у доношенных больных с глаукомой. Процентное оотношение детей по весу в подгруппах получилось в равных соотношениях (33,3%).

6. Данное исследование позволило выявить достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxp3+CD127low) в сравнении при основных офтальмологических заболеваниях детей в возрасте до 1 года – катаракте, глаукоме и ретинопатии недоношенных.

**Дополнительные графики, если потребуются**