

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ПЕДИАТРИИ

НЕ ДИАГНОСТИРОВАННЫЕ ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ МОГУТ ЯВЛЯТЬСЯ ПРИЧИНОЙ РАННЕЙ ДЕТСКОЙ СМЕРТНОСТИ!

Гордукова М.А., Давыдова Н.В., Корсунский И.А.,
Никитина И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П.

Детская Городская Клиническая Больница №9
им. Г.Н. Сперанского ДЗ Москвы, Москва, Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) - это гетерогенная группа врожденных нарушений, вызванных дефектами в различных звеньях иммунной системы. У больных ПИД, как правило, наблюдается рецидивирующие и тяжелые инфекции, в том числе вызванные оппортунистическими и условно-патогенными микроорганизмами, приводящие к смерти или инвалидности в раннем возрасте. В связи с тем, что диагноз ПИД невозможно заподозрить при стандартном физикальном обследовании, чрезвычайно важное значение для установления диагноза и направления пациента в специализированные центры помощи и назначения соответствующей терапии приобретает ранняя диагностика с использованием лабораторных методов. Иммунодефицитные состояния характеризуются снижением количества наивных Т- и В-клеток в периферической крови, что хорошо коррелирует с количеством кольцевых ДНК-молекул TREC и KREC, образующихся в ходе реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора. Ранее мы разработали и валидировали методику на основе мультиплексной ПЦР в флуоресцентной детекции в режиме реального времени с одновременным определением количества TREC, KREC и внутреннего контроля - гена человека IL17RA для цельной крови и для сухих пятен крови, применяющихся для скрининга новорожденных. В настоящей работе мы провели ретроспективный анализ архивных сухих пятен крови от детей, умерших на первом году жизни в 2014 г, с помощью предложенной методики. Из 22 пациентов у 4х детей количество TREC было снижено, причем 2-е из них родились на ранних сроках гестации. Исследование выявило одного ребенка, в сухом пятне крови которого отсутствовали TREC и были снижены KREC. В возрасте 1,5 месяцев пациенту было проведено иммунофенотипирование, подтвердившее результаты анализа TREC и KREC: 1,3% CD3+, 0% CD3+CD4+ и 3% CD19 (Т-В-NK+) и диагноз ПИД, ТКИН. Таким образом, предложенный нами метод может быть применен в качестве диагностического и может рассматриваться как скрининговый метод, простой, чувствительный и не требующий дополнительного оборудования, кроме стандартного для ПЦР-лаборатории. Его применение поможет своевременному выявлению новорожденных с ПИД, что обеспечит необходимое лечение и уменьшение детской смертности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ X-СЦЕПЛЕННОЙ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Гусева М.Н., Семенов А.В., Тотолян А.А.

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург,
Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) - группа заболеваний, связанных с наследственными нарушениями развития иммунной системы. Одной из наиболее частых форм ПИД является нарушение антителообразования (до 73,3% от общего числа). Агаммаглобулинемия - одна из наиболее изученных форм ПИД, обусловленных рецессивными мутациями в гене *btk* или гене тирозиназы Брутона (ВТК). Этот фермент играет ключевую роль в созревании В-клеток. На данный момент времени идентифицировано более 400 мутаций в экзонах *btk*-гена, имеющих клиническое значение и связанных с нарушением созревания В-клеток и, как следствие, прекращением антителообразования у больного агаммаглобулинемией. Вместе с мутациями в промотерной зоне гена и в межэкзонных областях, нарушающими его функционирование лишь частично, идентифицировано всего более 1000 значимых мутаций. Такое многообразие делает затруднительными верификацию генетического диагноза у каждого пациента с агаммаглобулинемией, в связи с чем крайне актуально найти универсальный лабораторный маркер дисфункции созревания В-клеток.

За последнее десятилетие в практику здравоохранения активно внедряется универсальный маркер Т-клеточных иммунодефицитов - TREC (T-cell receptor excision circle), используемый для скрининга ПИД у новорожденных в США, Швеции и других странах. Скрининг проводится методом количественной ПЦР, для чего существует целый ряд коммерческих наборов. Аналогичный маркер созревания В-клеток - KREC (kappa-deleting recombination excision circle) пока не внедрен в широкую практику скрининга ПИД. Поэтому определение KREC у пациентов с агаммаглобулинемией может дать дополнительную информацию о ценности скрининга по KREC для раннего выявления этой формы ПИД.

Материалы и методы: Использовали набор для количественного определения TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени, разработанный сотрудниками ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск) и ДГКБ №9 (г. Москва), ДНК выделяли коммерческим набором «РИБО-преп» (ИЛС, Россия). Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Проанализирована кровь 5 пациентов с диагнозом X-сцепленная агаммаглобулинемия. Диагноз был вы-

ставлен на основе клинических и лабораторных данных, а также результатов генетического исследования *btk*-гена, выполненного в лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии НИИЭМ имени Пастера

Результаты: Основные результаты исследования представлены в таблице.

Пациент, возраст	TREC (копий/мл)	KREC (копий/мл)
Л.С. 34г	18024,24	131,06
С.В. 6л	40009,46	366,47
Х.Я 6л	19000,00	0,00
Ш.А 6л	4353,37	0,00
Ш.В 6л	4333,64	0,00

В данной группе пациентов отмечается выраженное снижение KREC (норма $1,0 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^5$ копий/мл) при содержании TREC в пределах нормальных значений ($4 \cdot 10^3 - 7 \cdot 10^4$ копий/мл).

Заключение: Скрининговое определение KREC может быть рекомендовано для выявления группы В-клеточных иммунодефицитов у пациентов имеющих настораживающие клинические признаки этих состояний.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РОЛИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ

Дударева М.В., Сизязкина Л.П., Линде В.А., Дударев И.В.

Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В последнее время в мировой практике усилен поиск иммунологических диагностических тестов инфекционного процесса у новорожденных в критических состояниях, особенно для ранней диагностики с целью назначения превентивной терапии.

Целью данной работы явилось изучение цитотоксической системы лимфоцитов с высоким цитотоксическим потенциалом у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе отделения реанимации и интенсивной терапии научно-исследовательского института акушерства и педиатрии. Обследованы 222 доношенных новорожденных с гестационным возрастом от 39 до 41 недели, с оценкой по шкале Апгар $3,2 \pm 1,6$ баллов. Тяжесть состояния новорожденных была обусловлена преимущественно тяжелой дыхательной недостаточностью. У новорожденных детей при поступлении не было зарегистрировано клинических признаков бактериального инфицирования. При наблюдении в динамике на основании клинико-лабораторных данных было установлено, что к 3-5 суткам пребывания в реанимационном отделении у 17 – ти новорожденных детей развился неонатальный сепсис. При постановке диагноза сепсиса клинико-anamnestические и лабораторные данные были подтверждены положительной гемокультурой. В 5-х случаях одновременно выделялись возбудители в крови и ликворе, в 12-ти случаях – в крови и в аспирате из трахеи. Наиболее часто выявлялись *Pseudomonas aeruginosa*, *Kl. pneumoniae*, *Strept. epidermidis*.

Исследования проводили на 3-х цветном проточном цитометре “BeckmanCoulter” (США) с использованием реагентов фирмы “BeckmanCoulter”. Лизис осуществляли ручным методом раствором “OptiLyseC” “BeckmanCoulter”.

Натуральные киллеры (НК) являются третьей популяцией лимфоцитов иммунной системы, это клетки врожденного иммунитета. Механизм действия НК-клеток заключается в индукции апоптоза и перфорин-зависимом лизисе. Т-НК (CD3+CD16+56+) – уникальный подкласс как Т-клеток, так и НК-клеток, которые регулируют продукцию, а также сами являются продуцентами важнейших цитокинов, направляющих течение иммунной реакции. Их значение важно у детей раннего возраста, когда система адаптивного иммунитета только формируется.

Следует отметить, что у анализируемой группы новорожденных детей было достоверно снижено как абсолютное, так и относительное содержание НК(CD3-CD16+56+) и Т-НК(CD3+CD16+56+) по сравнению с таковыми в группе здоровых новорожденных (CD3-CD16+56+ - $2,15 \pm 0,22\%$ против $7,44 \pm 0,31\%$ и $0,05 \pm 0,01 \times 10^9/л$ против $0,25 \pm 0,01 \times 10^9/л$; CD3+CD16+56+ - $0,76 \pm 0,05\%$ против $2,52 \pm 0,06\%$ и $0,02 \pm 0,004 \times 10^9/л$ против $0,08 \pm 0,002 \times 10^9/л$) ($p < 0,05$). На 3-5-е сутки динамического наблюдения и к 20-м суткам заболевания не наблюдалось увеличения содержания в периферической крови НК(CD3-CD16+56+) и Т-НК(CD3+CD16+56+). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженной редукции клеток, обладающих киллерной активностью.

Как показали результаты проведенных нами исследований, цитотоксический потенциал клеток иммунной системы новорожденных детей с РДС и документированным сепсисом оказался сниженным по сравнению с таковыми без сепсиса. У новорожденных с РДС и документированным сепсисом отмечалось достоверно значимое снижение абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров - НК(CD3-CD16+56+) и Т-НК(CD3+CD16+56+) по сравнению с таковыми без септических осложнений ($p < 0,05$).

В процессе динамического наблюдения продолжалось достоверное снижение НК(CD3-CD16+56+) и Т-НК(CD3+CD16+56+) во все сроки наблюдения.

Резюмируя вышеизложенное можно заключить, что эта особенность эффекторного звена иммунологического реагирования, по-видимому, свидетельствует о напряжении защитной функции натуральных киллеров на фоне бактериальной инфекции и может лежать в основе сниженной резистентности новорожденных детей к инфекционным агентам.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С НЕИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Ильмамбетова З.Р.², Штепо М.В.², Бахмутова Л.А.², Палкина Е.В.³

¹ ГБУЗ АО АМОКБ, Областной перинатальный центр, Астрахань, Россия

² ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

³ Клинический родильный дом, Астрахань, Россия

Введение. Избыточная или недостаточная экспрессия цитокинов значима при многих заболеваниях, а не только как причина инфекционной патологии.

Цель и задачи. Сопоставить уровни экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов у новорожденных детей с неинфекционной патологией.

Материалы и методы. В нашей работе были обследованы 3 группы новорожденных детей (n=27). В 1 группу вошли дети с врожденными аномалиями развития, в основном, сердечно-сосудистой системы и почек. Во 2 группу включены дети с конъюгационными желтухами. 3 группу составили новорожденные с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС и задержкой внутриутробного развития. Клинический диагноз данным детям был установлен в роддоме на основании анамнеза, клинического осмотра, лабораторных и инструментальных исследований. Продукцию цитокинов ФНО- α , ИЛ-4 и ИЛ-6 определяли методом ИФА с использованием тест систем компании ЗАО «Вектор-Бест».

Основные результаты. В результате исследования выявлено, что для новорожденных с врожденными аномалиями развития характерна высокая экспрессия провоспалительных цитокинов: ФНО- α и ИЛ-6. В группе с конъюгационными желтухами обнаружено увеличение экспрессии противовоспалительного цитокина ИЛ-4. В группе с поражениями ЦНС и относительно здоровыми детьми экспрессии этих цитокинов не отмечено.

ТАБЛИЦА. СВОДНАЯ ТАБЛИЦА СРЕДНИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

	1 группа (n=9)	2 группа (n=9)	3 группа (n=9)
ИЛ-4, пг/мл	1,214	4,089	1,131
ИЛ-6, пг/мл	100,5	30,7	5,2
ФНО- α , пг/мл	42,0	23,4	6,3

Заключение. Таким образом, высокая экспрессия провоспалительных цитокинов в 1 группе свидетельствует о том, что в этиологии врожденных аномалий развития у новорожденных детей важную роль играют иммунные механизмы.

КОЛИЧЕСТВО НАИВНЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНЫМИ ДЕФЕКТАМИ АНТИТЕЛОПРОДУКЦИИ

Каракина М.Л.^{1,2}, Пашнина И.А.^{1,2}, Криволапова И.М.^{1,2}, Махнева В.П.¹

¹ Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург, Россия

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Дефекты антителопродукции составляют большую часть пациентов регистров первичных иммунодефицитов (ПИД) во всем мире (Варнац К., 2013, Окс Г., 2014, Кондратенко И.В., 2005, Латышева Т.В., 2011). Пациенты с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) представляют одну из наиболее сложных групп в лечебном, прогностическом и организационном аспектах. Это связано с тем, что группа ОВИН разнородна, в нее входят нозологии, связанные с разными генетическими дефектами (Classification of Expert Committee on Primary Immunodeficiency of the International Union of Immunological Societies, 2014). Часть больных, по современным понятиям, имеет не только дефект В-клеток, но

и Т-клеток (комбинированный дефект). Одним из методов оценки Т-клеточного звена иммунитета является определение количества наивных Т-лимфоцитов. При нарушении процессов созревания и дифференцировки их число может значительно снижаться.

Целью нашего исследования явилось определение количества наивных Т-хелперов с фенотипом CD3+CD4+CD45RA+CD31+ у больных с дефектами антителопродукции.

Материалы и методы. Обследованы 15 больных (возраст от 18 до 58 лет, средний возраст 35,4 г.) с диагнозом ОВИН, отвечавших диагностическим критериям этой нозологии (ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID, 28.11.14) без генетического подтверждения, а также 3 больных с X-сцепленной агаммаглобулинемией с подтвержденным дефектом в гене ВТК (возраст от 18 до 22 лет, средний возраст 19,6 г.). Определение количества CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD3+CD4+CD45RA+CD31+ проведено методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США).

Результаты. Выявлено снижение абсолютного количества Т-хелперов (0,19-0,47*10⁹/л) у 7 больных с диагнозом ОВИН по сравнению с возрастными нормативными значениями (0,6-1,6*10⁹/л) (Козлов В.А. и др., 2009). У всех этих больных, а также еще у 5 пациентов с аналогичным диагнозом наблюдалась инверсия соотношения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток с превалированием последних, что свидетельствует о дисбалансе в системе Т-клеточного иммунитета. У больных с X-сцепленной агаммаглобулинемией количество CD3+CD4+ и CD3+CD8+ укладывалось в пределы возрастной нормы.

В группе с ОВИН только у четырех человек количество наивных Т-хелперов укладывалось в нормативные значения: более 33% от общего количества Т-хелперов (Oraei M. Et al., 2012). У одиннадцати больных, то есть более чем у двух третей обследованной группы, количество этих клеток было снижено. Причем у девяти человек наблюдалось умеренное снижение количества CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (от 6,7 до 29,2%), а у двух пациентов – экстремальное снижение (0,3%). При повторном обследовании четырех больных результаты были аналогичны результатам первичного обследования: у трех пациентов наблюдалось стабильно сниженное количество наивных Т-хелперов, а у одного пациента – нормальное количество.

У всех трех обследованных больных с X-сцепленной агаммаглобулинемией количество CD3+CD4+CD45RA+CD31+ укладывалось в нормативные значения, что связано с отсутствием комбинированного В- и Т-клеточного дефекта.

Выявленное снижение количества наивных Т-хелперов у большей части обследованных нами больных позволяет заподозрить комбинированный В- и Т-клеточный дефект. Полученные результаты обосновывают необходимость проведения пациентам с диагнозом ОВИН исследований, направленных на исключение комбинированного иммунодефицита.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНОЧНЫХ ФОРМ

Курбатова О.В.¹, Сурков А.Н.², Закиров Р.Ш.²,
Полякова С.И.², Самохина И.В.², Семенова Г.Ф.²,
Миروشкина Л.В., Измайлова Т.Д., Петричук С.В.²

¹ ФГБНУ НЦАГиП имени ак. В.И. Кулакова МЗ РФ,
Москва, Россия

² ФГБНУ НЦЗД, Москва, Россия

Гликогеновая болезнь (ГБ) - группа наследственных болезней, которые обусловлены недостаточностью ферментов, участвующих в обмене гликогена. ГБ характеризуется избыточным накоплением его в различных органах и тканях, в первую очередь печени и мышцах. Наиболее часто наблюдаемые клинические симптомы ГБ - это увеличение печени, мышечная слабость, гипогликемия. У пациентов с ГБ развивается выраженная метаболическая декомпенсация и вторичная митохондриальная дисфункция, это приводит к значительному ухудшению состояния больных. Прогрессирующее течение болезни с судорогами и исходом в фиброз, а в некоторых случаях и в цирроз печени, требуют ранней диагностики и целенаправленной терапии в детском возрасте. ГБ сопровождается частыми интеркуррентными заболеваниями и повышенным риском развития аутоиммунных заболеваний.

Цель работы: выявить особенности иммунного статуса и оценить активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в популяциях лимфоцитов (лф.) у детей с печеночными формами ГБ.

Материалы и методы: Обследовано 54 ребенка с печеночными формами ГБ, из них с ГБ I типа - 19 детей (N наблюдений n=51), с ГБ III типа - 16 детей (N наблюдений n=28), с ГБ VI типа - 19 детей (N наблюдений n=35). Контрольную группу составили 34 условно здоровых ребенка (N наблюдений n=107). Всем детям было проведено иммуноцитохимическое исследование лф. периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). Оценивали следующие популяции лимфоцитов: Т-лф (CD3+CD45+), Т-хелперы (CD3+CD4+CD45+), цитотоксические Т-лф (CD3+CD8+CD45+), В-лф (CD3-CD19+CD45+), NK-клетки (CD16+ CD56+). В связи с возрастными особенностями иммунного статуса детей, данные иммунограммы были пересчитаны в процентах отклонения от соответствующего референсного интервала с расчетом ошибки (m) для доли вариант. Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica6.0. Достоверность полученных результатов оценивалась непараметрическим критерием Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде среднего (M) ± ошибка среднего (m). Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты: У детей с ГБ были выявлены изменения в субпопуляционном составе лф. периферической крови, отличающиеся у пациентов с разными типами. Наиболее выраженные изменения выявлены при I типе заболевания, что соотносится со степенью выраженности клинических проявлений ГБ. Изменения касались как абсолютного числа клеток, так и их процентного соотношения. Для большинства пациентов с ГБ, вне зависимости от типа, характерно повышение абсолютного количества

Т-лф. (I тип - 45,1%, III тип - 46,4%, VI тип - 42,9%). Повышение общего числа Т-клеток в большем проценте случаев обусловлено увеличением количества Т-хелперов и, в меньшей степени, за счет увеличения цитотоксических Т-лимфоцитов, что справедливо для всех типов ГБ. Количество Т-хелперов соответствовало референсному интервалу в 33% при I типе, в 39% при III типе и в 63% при VI типе ГБ. Увеличение их количества было характерно для 37%, 57% и 34% пациентов соответственно для I, III и VI типа. Количество цитотоксических Т-лф. соответствовало референсному интервалу в 33% при I типе, в 57% при III типе и в 65% при VI типе ГБ. Повышение их числа было характерно для 29% пациентов с I типом, для 28% с III типом и для 23% с VI типом ГБ. Степень снижения содержания цитотоксических Т-лимфоцитов не превышала 15% у пациентов с III и VI типами заболевания, при этом подобные изменения выявлялись более чем у трети пациентов с I типом. Исследование В-клеточного звена выявило, что при III и VI типе количество В-лф соответствовало референсному интервалу в 42,9% и 57,1% случаев соответственно, а при I типе только в 21,6% наблюдений. У пациентов с I типом ГБ в 47,1% случаев количество В-лф было повышено, при III и VI типе повышение наблюдалось только у 14% обследованных детей. Количество NK-клеток у большинства пациентов соответствовало нормативным значениям (I тип - 51%, III тип - 78%, VI тип - 83%), и только при I типе наблюдалось увеличение их числа в 15,7% случаев.

Активность СДГ в популяциях лимфоцитов отличалась от показателей контрольной группы, причем степень выраженности этих изменений зависела от типа заболевания (табл.). Было выявлено, что активность в В-лф при I типе заболевания была снижена - на 22%, при VI типе - на 16% относительно значений контрольной группы (p < 0,05), при III типе достоверно не отличалась от соответствующего значения контрольной группы. В популяциях Т-лф снижение составило 17% при I типе, 4% при III типе и 11% при VI типе (p < 0,05). Снижение активности в Т-лф было как за счет ее снижения в Т-хелперах, так и за счет снижения в цитотоксических Т-лф. Активность СДГ в NK-клетках статистически не отличалась от показателя активности контрольной группы.

Выводы. Показатели иммунного статуса и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов у пациентов с ГБ значимо отличались от показателей контрольной группы. Требуется проводить регулярное исследование показателей иммунограммы и активности СДГ в лимфоцитах с целью своевременной коррекции выявленных изменений и профилактики интеркуррентных заболеваний.

РОЛЬ ПРЕНАТАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ДЕТЕЙ НА ПЕРВОМ ГОДУ ЖИЗНИ

Лаптева Л.В., Терещенко С.Ю.

НИИ Медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

Введение. Глобальный рост распространенности аллергических заболеваний является результатом воздействия множества факторов: изменения образа жизни, окружающей среды и наследственной предрасположенности. Одной из актуальных гипотез роста атопии является «гигиеническая гипотеза» (1989). Не исключено, что возможна и внутриутробная Th1/Th2 поляризация иммунного ответа.

Цель и задачи. Изучить клинко-патогенетическую взаимосвязь иммунологических показателей пуповинной крови новорожденных с пренатальными факторами риска формирования иммунного ответа на первом году жизни. Проанализировать связь иммунологических параметров пуповинной крови с общим числом эпизодов гипертермии и ОРВИ на первом году жизни.

Материалы и методы. На базе родильных домов г. Красноярск проведен забор пуповинной крови у 153 доношенных новорожденных, у которых внутриутробное развитие и ранний период адаптации протекали физиологически. Информированное согласие на проведение исследования было получено. Определяли абсолютное и относительное содержание лимфоцитов с различными поверхностными маркерами (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+). Использовались статистические методы анализа.

Основные результаты. В возрасте 12 месяцев у детей были проанализированы некоторые ретроспективные данные (частота встречаемости эпизодов гипертермии, ОРВИ и диареи), касающиеся особенностей развития детей на первом году жизни и их связи с формированием АД с расчетом показателя отношения шансов (OR) и его доверительного интервала. У детей с 5 и более эпизодами гипертермии на первом году жизни в пуповинной крови было зарегистрировано увеличение общего количества Th1 лимфоцитов (субтип CD4+/INF γ +, $p=0,009$) и активированных Th1 лимфоцитов (субтип CD4+/INF γ + / CD69+, $p=0,040$). Одновременно, у детей с 5 и более эпизодами ОРВИ на первом году жизни в пуповинной крови было зарегистрировано увеличение общего количества Th1 лимфоцитов (субтип CD4+/INF γ +, $p=0,020$) и активированных Th1 лимфоцитов (субтип CD4+/INF γ + / CD69+, $p=0,020$). Кроме того, при анализе факторов микроокружения беременной и их связи с внутриутробной продукцией интерферона нами было установлено, что размер семьи беременной положительно коррелировал с активированными Th1 лимфоцитами пуповинной крови ребенка (субтип CD4+ / INF γ + / CD69+ – $r=0,22$, $p=0,038$). Таким образом, большее количество активированных Th1 лимфоцитов в пуповинной крови может прямо отражать степень инфекционной (прежде всего, вирусной) нагрузки в семье, так как оно связано и с размером семьи во время беременности и с количеством эпизодов гипертермии у ребенка на первом году жизни. Только фактор полного отсутствия эпизодов гипертермии был частично ассоциирован с формированием АД у обследованных нами детей. У детей с аллергическим поражением кожи почти в 2 раза чаще было зарегистрировано отсутствие каких-либо указаний на наличие эпизодов повышенной температуры ($p=0,08$). Дополнительный анализ показал, что у детей с АД статистически значимо ниже общее количество эпизодов гипертермии, чем у детей без АД.

Заключение. Высокое содержание в пуповинной крови новорожденных общих (CD4+/INF γ +) и активированных (CD4+/INF γ + / CD69+) Th1-лимфоцитов, продуцирующих интерферон- γ , ассоциировано с большим количественным составом семьи беременной и большим количеством эпизодов ОРВИ на первом году жизни ребенка, что, вероятно, отражает влияние суммарной инфекционной нагрузки в семье на формирование Th1 звена иммунитета плода и грудного ребенка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ НОРМЫ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Гордукова М.В.¹, Корсунский И.А.¹, Филипенко М.Л.², Тоголян А.А.

ФБУН НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

¹ Детская городская клиническая больница №9, Москва, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Введение. Первичный иммунодефицит представляет собой врожденные нарушения иммунной системы, которые развиваются вследствие генетических нарушений. Заболевание приводит к развитию тяжелых хронических инфекций и воспалительному поражению органов и тканей. При этом первичные иммунодефициты относятся к редким болезням, поэтому осведомленность о данной патологии как в медицинском сообществе, так и среди больных крайне низкая, что приводит к несвоевременной диагностике и неадекватному лечению пациентов. Иммунодефициты характеризуются полным или частичным отсутствием Т- или В-клеток, а также натуральных киллеров или ослаблением функций этих клеток. Особый научный интерес представляет исследование содержания у людей «Т-рецепторных эксцизионных колец» – TREC (T-cell receptor excision circles – TREC). TREC формируются в процессе V(D)J-реарранжировки, когда часть генетического материала вырезается, замыкается в кольцо. TREC служат маркерами созревания Т-клеток, недавно эмигрировавших из тимуса и слабо вовлекавшихся в процесс пролиферации или не делившихся совсем. В связи с этим концентрацию TREC в периферической крови рассматривают как показатель функциональной активности тимуса – его способности продуцировать Т-лимфоциты. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать их определение как показатель пролиферации лимфоцитов и суррогатный маркер нормального развития иммунной системы. Аналогично образуются KREC (kappa-deleting recombination excision circles) – В-клеточные эксцизионные кольца. Содержание KREC в периферической крови является также суррогатным маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза. Определение TREC и KREC можно применять для ранней диагностики иммунодефицитных состояний.

Цель исследования: Изучение концентрации TREC и KREC в крови условно здоровых доноров.

Материалы и методы. Материалом служила кровь 32 новорожденных обоого пола (18 девочек и 14 мальчиков). По стандартной методике с помощью коммерческого набора «Рибо-преп» по рекомендации фирмы-производителя (Интерлабсервис, РФ) выделяли ДНК из образцов крови. Далее проводили количественный анализ концентрации TREC и KREC с помощью ПЦР в реальном времени. Тест-система для анализа концентрации TREC и KREC любезно предоставлена Институтом химической биологии и фундаментальной медицины. Кровь новорожденных любезно предоставлена ФБУН «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта».

Результаты. Были проанализированы образцы крови 32 новорождённых. Концентрация TREC составила от 8955 до 88761 копий/ 10^6 лимфоцитов, среднее значение 34976 ± 3061 копий/ 10^6 лимфоцитов. Концентрация KREC составила от 11552 до 89533 копий/ 10^6 лимфоцитов, среднее 37866 ± 3472 копий/ 10^6 лимфоцитов. Не было достоверных межполовых различий концентрации TREC и KREC. По литературным данным количество TREC у детей 0-1 лет, проживающих в Москве, составило 120000-160000 (140000 в среднем) копий/ 10^6 лимфоцитов, количество KREC было 22000-88000 (39300) копий/ 10^6 лимфоцитов. По данным шведских авторов у новорождённых нормальным считается количество TREC > 10000 копий/мл, KREC > 8000 копий/мл; однако в этом случае использовали сухие кровяные пятна, а не цельную кровь. Нормальное значение TREC для израильских новорождённых было 32-212 копий/3 мм сухого пятна крови и 8-56 копий/3 мм сухого пятна крови для KREC. Чешские авторы установили нижнюю границу нормы 1400 копий/1 мкл ДНК для TREC и 700 копий/1 мкл ДНК для KREC. Для выяснения причин таких межпопуляционных различий требуется проведение дополнительных экспериментов.

Выводы. В работе впервые была определена концентрация TREC и KREC на популяции здоровых новорождённых Санкт-Петербурга.

ОЦЕНКА УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ CD45RA И CD45RO В ПУПОВИННОЙ КРОВИ У ВЫЖИВШИХ И УМЕРШИХ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ГЛУБОКОНЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

Чистякова Г.Н., Устьянцева Л.С., Ремизова И.И., Ляпунов В.А., Газиева И.А.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

У детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ), в отличие от доношенных новорожденных, иммунокомпетентные клетки имеют признаки незрелости, свойственные клеткам плода, и, следовательно, являются функционально неполноценными для адекватной защиты ребенка в период массивной антигенной нагрузки при переходе из внутриутробного состояния во внеутробное. Цель: оценить уровень рецепторов CD45RA и CD45RO пуповинной крови у выживших и умерших детей с экстремально низкой массой тела, рожденных в сроке сверхранных преждевременных родов (22-27,6 недель). Материалы и методы: 1-ю группу составили 18 новорожденных с ЭНМТ имеющих благоприятный исход, 2-ю группу – 10 детей с ЭНМТ умерших в раннем неонатальном периоде. Группу сравнения (3-я группа) составили 18 доношенных новорожденных с неосложненным течением раннего периода адаптации, родившихся от условно здоровых женщин. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием наборов моноклональных антител того же производителя. Уровень значимости (p) межгрупповых различий с учетом поправки Бонферрони принимали $\leq 0,017$. Результаты исследования. Проведенные исследования показали, что в пуповинной крови детей основных групп отмечается снижение абсолютного количества лейкоцитов ($6,2 (5,05 - 6,92) \times 10^9/л$) и $4,9$

($4,05 - 5,6$) $\times 10^9/л$ против $12,84 (10,26-12,83) \times 10^9/л$, сопряженное с повышением относительного числа лимфоцитов (76 (70,5 – 82,0)% и 89,0 (86,5 – 90,5)% против 36 (32,5-45)%), более выраженное у детей 2-й группы (p1-3, 2-3<0,010, p1-2<0,04 и p1-2, 1-3, 2-3<0,010 во всех случаях). У глубоконедоношенных новорожденных с летальным исходом процентное содержание CD45RA+-клеток статистически значимо превышало показатели детей 1-й и 3-й групп (91 (90,5 – 91,5)%) против 88 (85,5 – 91,5)% и 86,5 (84,25-89,25)%, p1-2, 2-3<0,017), абсолютное количество было сопоставимо с таковыми доношенных детей $4,11(4,09 - 4,13) \times 10^9/л$ против $4,07 (3,45-4,57) \times 10^9/л$, хотя в 1,6 раза превышало параметры новорожденных 1-й группы (2,62 (2,43-3,92) $\times 10^9/л$, p1-2<0,017). В относительном и абсолютном количестве клеток памяти (CD45RO+) у детей основных групп достоверных различий не выявлено (8 (8 – 8)% и $0,36 (0,36 - 0,36) \times 10^9/л$ против 7 (5,5 – 8,5)% и $0,26 (0,17 - 0,45) \times 10^9/л$, p>0,05), однако у новорожденных с летальным исходом значения данного показателя превышали таковые группы сравнения (5 (3,25- 6,75)% и $0,23 (0,13-0,32) \times 10^9/л$ против, p1-2, 2-3<0,017). **Заключение.** Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что для новорожденных детей с ЭНМТ и летальным исходом характерна выраженная активация адаптивного иммунитета, что проявляется лимфоцитозом, повышением пролиферативной активности лимфоцитов и увеличением количества коммитированных лимфоцитов, сопряженного со снижением факторов врожденного иммунитета (лейкопения). У новорожденных с ЭНМТ и благоприятным исходом несмотря на лейкопению и относительный лимфоцитоз количество CD45RA+- и CD45RO+-клеток сопоставимо с параметрами доношенных детей, что свидетельствует о большей зрелости лимфоцитов и отсутствии антигенной внутриутробной стимуляции.

ОЦЕНКА УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ CD45RA И CD45RO ПУПОВИННОЙ КРОВИ У ВЫЖИВШИХ И УМЕРШИХ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА, РОЖДЕННЫХ В СРОКЕ СВЕРХРАННИХ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ

Чистякова Г.Н., Устьянцева Л.С., Ремизова И.И., Ляпунов В.А., Газиева И.А.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

У глубоконедоношенных детей, в отличие от доношенных новорожденных, иммунокомпетентные клетки имеют признаки незрелости, свойственные клеткам плода, и, следовательно, являются функционально неполноценными для адекватной защиты ребенка в период массивной антигенной нагрузки при переходе из внутриутробного состояния во внеутробное.

Цель: оценить уровень рецепторов CD45RA и CD45RO пуповинной крови у выживших и умерших детей с ЭНМТ, рожденных в сроке сверхранных преждевременных родов.

Материалы и методы: Основную группу (1-я группа) составили 18 выживших (1-я подгруппа) и 10 умерших (2-я подгруппа) в раннем неонатальном периоде новорожденных с ЭНМТ, рожденных в сроке сверхранных преждевременных родов (22- 27,6 недель). Группу сравнения (3-я группа) составили 18 новорожденных детей

с неосложненным течением раннего периода адаптации, родившихся от условно здоровых женщин. Общую численность популяций и субпопуляций лимфоцитов вычисляли, используя лейкоцитарную формулу общего анализа крови, взятого в день исследования иммунологического профиля новорожденных. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием наборов моноклональных антител того же производителя, конъюгированных с флуоросцеинизотиоцианатом и фикоэритрином.

Результаты исследования. В ходе проведенных исследований выявлено, что для детей с ЭНМТ характерна лейкопения ($6,2 (4,7-6,9) \times 10^9/\text{л}$) к $5,6 (5,25-5,6) \times 10^9/\text{л}$ сопряженная с лимфоцитозом ($80 (74-84)\%$ к $88 (84,5-90)\%$), более выраженные у детей 2 подгруппы. У выживших детей с ЭНМТ обнаружено сниженное по сравнению с детьми, умершими в раннем неонатальном периоде, количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры памяти CD45RA+ ($88 (85,5-91,5)\%$ против $91 (90,5-91,5)\%$) и CD45RO+ ($7 (5,5-8,5)\%$ против $8 (8-8)\%$) как в процентных, так и в абсолютных значениях ($(3,72 (2,58-4,03)$ против $4,11 (4,09-4,13)$) и $(0,26 (0,17-0,45)$ к $0,36 (0,36-0,36)$).

Показатели лейкоцитов и лимфоцитов доношенных новорожденных были статистически значимо отличны от показателей пуповинной крови детей обеих подгрупп ($p < 0,05$). Показатели пуповинной крови доношенных детей варьировали в пределах — лейкоциты $12,84 (10,26-12,83) \times 10^9/\text{л}$, лимфоциты в общем пуле клеток составляли $36 (32,5-45)\%$ и $4,58 (4,28-5,1) \times 10^9/\text{л}$ в абсолютном значении, количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры памяти CD45RA+ $86,5 (84,25-89,25)\%$ и $4,06 (3,45-4,57) \times 10^9/\text{л}$, CD45RO+ $5 (3,25-6,75)\%$ и $0,25 (0,15-0,32) \times 10^9/\text{л}$ в процентном и абсолютном значении соответственно.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что для новорожденных детей с ЭНМТ характерно повышение как абсолютного, так и процентного количества клеток, несущих рецептор CD45RA+, что свидетельствует о незрелости клеточного звена иммунной системы. Вместе с тем, увеличение количества клеток памяти (CD45+RO+), снижение содержания лейкоцитов и лимфоцитов в общем пуле клеток, более выраженное у детей, не способных пережить ранний неонатальный период, отражает активацию факторов адаптивного и врожденного иммунитета у этих детей в ответ на внутриутробную стимуляцию инфекционными агентами.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Чурина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Гусева М.Н., Тотолян А.А.

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Первичные иммунодефицитные состояния (ПИД) - многочисленная группа тяжелых, генетически обусловленных заболеваний, причиной которых становится нарушение каскада иммунного ответа организма. Частота встречаемости 1 на 400-800 человек (в европеоидной популяции), то есть в РФ ПИД больны более полуто-

ра тысяч человек. Так как заболевания имеют различные клинические проявления, низкая информированность медицинских работников приводят к большому количеству ложных диагнозов и не выявленных случаев ПИД.

Цель. Апробация молекулярно-генетического метода диагностики некоторых наиболее распространенных ПИД.

Материалы и методы. Материалом служила цельная кровь здоровых людей, а также образцы крови предположительно больных ПИД, предварительный диагноз которым был поставлен на основании ряда симптомов и результатов проточной цитометрии.

Геномную ДНК выделяли фенол-хлороформной экстракцией с модификациями, проводили серию амплификаций по экзонам исследуемых генов со специфичными праймерами, детектировали в акриламидном геле и элюировали интересующие фрагменты с последующей постановкой секвенирующей реакции и анализа на системе GenomeLab GeXP.

Результаты. Помимо уже ранее идентифицируемой нами болезни Брутона, в лабораторную практику введена идентификация следующих ПИД.

Синдром Вискотта-Олдрича, являющийся следствием мутаций в гене WAS (12 экзонов), кодирующем белок WASp, дефектная форма или отсутствие которого ведет к развитию нарушений иммунитета и гемостаза. Хронической гранулематозной болезнью, причиной которой в большинстве случаев становятся мутации в гене CYBB (13 экзонов), кодирующем 3-субъединицу цитохрома B558, участвующего в выработке супероксидных радикалов в фагоцитах, недостаточность которых приводит к угрожающему жизни ослаблению иммунитета к бактериальным и грибковым инфекциям. Синдром Оменна, развивающийся вследствие нарушений в генах RAG1 и/или RAG2 (13 и 7 экзонов соответственно), продукты которых играют ключевую роль в процессах V(D)J-рекомбинации, обеспечивающих разнообразие вариабельных доменов иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов.

Методы были успешно применены в работе с клиническими случаями.

1. Пациенты 2008 г.р., близнецы, предположительно болезнь Брутона. Проведен генетический анализ образца крови методами ПЦП и SSCP с последующим секвенированием фрагментов. Выявлена точечная мутация в 17 экзоне в положении 1877 C->T, представляющая собой миссенс-мутацию с заменой кодона CGG->TGG (Arg->Trp).

2. Пациент 2004 г.р., проведена трансплантация красного костного мозга, наблюдается снижение функции белка WASp. Проведен генетический анализ образца крови методами ПЦП и SSCP с последующим секвенированием фрагментов. Выявлена точечная мутация в 4 экзоне в положении 397 G->A, представляющая собой миссенс-мутацию с заменой кодона GAC->AAC (ASP->ASN). Показано наличие одновременно как собственной ДНК пациента, так и ДНК донора. Обсуждаются проблемы трансплантации.

Заключение. Секвенирование ДНК у конкретного индивидуума остается единственным методом, позволяющим однозначно ответить на вопрос, какая вариация последовательности гена может привести или не привести к развитию генетического заболевания.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КАТЕЛИЦИДИНА У ГЛУБОКОНЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Шилова Н.А., Родина М.А., Чаша Т.В., Попова И.Г.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства
им. В.Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Актуальность. Кателицидин LL 37 (КЦ LL 37) является важным компонентом врожденного иммунитета. В настоящее время кателицидин активно изучается как потенциальный иммунотерапевтический и антимикробный препарат, так как он обладает иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами.

Цель исследования: определить содержание кателицидина LL 37 в фарингеальном аспирате у глубоконедоношенных новорожденных при различных исходах врожденной пневмонии.

Объем и методы исследования. В исследование был включен 61 ребенок с врожденной пневмонией. Гестационный возраст детей составил 23-31 неделя. Масса при рождении 500-1499 грамм. Выделены 3 группы наблюдения: 1 группа – 37 (60,6%) пациентов выздоровевших от пневмонии, 2 группа – 12 (19,7%) умерших младенцев, 3 группа – 12 (19,7%) детей, у которых сформировалась бронхолегочная дисплазия (БЛД).

Исследование фарингеального аспирата (ФА), забор которого проводился в 1-2 день жизни ребенка. Содержание КЦ LL37 (нг/мл) определяли методом иммуноферментного анализа реактивами фирмы Нусcult biotech (Нидерланды) на автоматическом анализаторе ELx808, фирма «BIO-TEK INSTRUMENTS» (США). Статистический анализ полученных данных проводился с учетом ненормального распределения признака с определением медианы (Me) и интерквартильных размеров – UQ-LQ (25%-75% процентиля). Уровень значимости различий между исследуемыми показателями (p) определялся по существующим непараметрическим критериям: Колмогорова-Смирнова, Вальда-Вольфовица, Манна-Уитни.

Результаты исследования. Нами впервые было установлено, что содержание КЦ LL 37 в фарингеальном аспирате у глубоконедоношенных новорожденных с врожденной пневмонией сопряжено с исходами заболеваниями. Уровень данного пептида в группе умерших детей был значимо ниже по сравнению с выжившими (12,8; 7,9, и 26,6 нг/мл в 1, 2 и 3 группах соответственно; $p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} > 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$), что, по нашему мнению, может являться результатом недостаточности факторов врожденного иммунитета у умерших от пневмонии младенцев.

Путем проведения индивидуального и ROC-анализа мы установили, что низкий уровень КЦ LL 37 в фарингеальном аспирате у глубоконедоношенных детей с врожденной пневмонией является прогностическим признаком неблагоприятного исхода данного заболевания.

На основании данных, полученных при проведении ROC-анализа, мы рассчитали относительный риск (Relative Risk) летального исхода врожденной пневмонии у глубоконедоношенных новорожденных с более низким содержанием (менее 10,2 нг/мл) КЦ LL 37 в фарингеальном аспирате по сравнению с детьми, имеющими более высокий его уровень (более 10,2 нг/мл). Данный показатель составил 13,5 (1,9 – 96,5), что соответствует $p = 0,0002$. Следовательно, вероятность смерти от врожденной пневмонии глубоконедоношенных детей с более низкой концентрацией КЦ LL 37 в фарингеальном аспирате выше в 13,5 раз.

В настоящее время осуществляется искусственный синтез антимикробных пептидов, в том числе кателицидина. Рассматривается возможность перспективы их использования в качестве нового класса антимикробных препаратов (Steinstraesser L. et al.). Определение содержания кателицидина LL 37 в фарингеальном аспирате у глубоконедоношенных новорожденных с врожденной пневмонией имеет перспективы, потому что низкое содержание кателицидина в этом случае может быть обоснованием для назначения синтетических пептидов.