

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ДЫХАТЕЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ИНФЕКЦИОННОГО И НЕИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА

Жукова А.С., Ванько Л.В., Балашова Е.Н., Никитина И.В., Ионов О.В., Кречетова Л.В.
ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PRETERM NEWBORNS WITH INFECTIOUS AND NONINFECTIOUS RESPIRATORY DISORDERS

Zhukova A.S., Vanko L.V., Balashova E.N., Nikitina I.V., Ionov O.V., Krechetova L.V.
«Research center for obstetrics, gynecology and perinatology» Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Механизмы иммунной системы новорожденных детей направлены на сдерживание избыточного и постепенное формирование нормергического иммунного ответа. Иммуносупрессивная направленность иммунных механизмов на фоне морфо-функциональной незрелости у недоношенных новорожденных обуславливает их высокую чувствительность к бактериальным и вирусным инфекциям [1]. Развитие высокоэффективной антиген-специфической иммунной реакции на патогены возможно лишь при участии эффекторов адаптивной иммунной системы, ключевыми из которых являются Т-лимфоциты. Преимущественная дифференцировка CD4+ Т-клеток у здоровых новорожденных в Th2 лимфоциты обуславливает важную роль гуморального звена неонатальной иммунной системы в защите от возбудителей инфекционных заболеваний. Однако синтез собственных иммуноглобулинов клетками новорожденных находится на низком уровне, интенсивность их продукции во многом определяется степенью дифференцировки В-лимфоцитов. Целью данной работы была оценка содержания субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в пуповинной и периферической крови недоношенных детей в зависимости от наличия или отсутствия у них инфекционного заболевания.

Были обследованы 64 ребёнка, родившихся в ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова». Родителями новорожденных было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

По гестационному возрасту, дети были разделены на 2 группы: основную, включавшую 45 новорожденных с гестационным возрастом 27-36 недель и группу сравнения, которую составили здоровые доношенные дети от матерей с физиологическим течением беременности. В возрасте 3 суток жизни детям из основной группы проводилось обследование, по результатам которого устанавливался окончательный клинический диагноз, согласно которому недоношенные новорожденные были разделены на подгруппу I (без признаков инфекции, n=17) и подгруппу II (с врожденной пневмонией, n=28). Материалом для исследования в основной группе послужила кровь из вены пуповины и периферическая венозная кровь детей в возрасте 3 суток, у детей из группы сравнения забиралась только пуповинная кровь. Критериями исключения были гемотрансфузии, врожденные пороки развития, сепсис, иммунодефицитные состояния. Данное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова». Фенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с применением флуоресцентно меченных моноклональных антител. Данные анализировали, используя программное обеспечение CellQuest (Becton Dickinson, США). Статистическую обработку полученных

результатов проводили с применением программы MedCalc (Бельгия). Проверку нормальности распределения данных осуществляли с применением критерия Шапиро-Уилка. Для оценки различий применяли критерий Стьюдента для данных с нормальным распределением (t-тест), для оценки различий в выборках, где распределение данных отличалось от нормального, применяли непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок и критерий Вилкоксона – для связанных. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$. Корреляционные связи оценивали, исходя из показателей коэффициента корреляции Пирсона для значений, которые подчиняются нормальному распределению, и коэффициента корреляции Спирмена – для показателей, не подчиняющихся нормальному распределению.

Новорожденные из основной группы имели более низкую массу и длину тела при рождении, чем дети из группы сравнения. Средняя оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах, отражающая состояние ребёнка и его потребность в реанимационных мероприятиях, также была ниже в подгруппах недоношенных новорожденных ($P < 0,001$). Дети с врождённой пневмонией (подгруппа II) имели более низкий гестационный возраст ($P < 0,001$), массо-ростовые показатели ($P < 0,01$), более выраженную степень асфиксии на 1-й ($P < 0,0001$) и 5-й ($P < 0,001$) минутах и наблюдались в условиях стационара существенно дольше ($P < 0,0001$), чем недоношенные без признаков инфекции (подгруппа I). Состояние новорожденных из данной подгруппы оценивалось как тяжёлое и крайне тяжёлое за счёт респираторных нарушений и течения инфекционно-воспалительного процесса: трое детей находились на искусственной вентиляции легких с первых суток жизни, два ребёнка потребовали применения высокочастотной осцилляционной вентиляции легких. В основной группе новорожденных была отмечена прямая корреляционная зависимость между гестационным возрастом и массо-ростовыми показателями ($P < 0,01$) и обратная корреляционная зависимость между гестационным возрастом и продолжительностью пребывания в стационаре ($P < 0,01$).

Оценка содержания исследуемых субпопуля-

ций Т-лимфоцитов в пуповинной крови не выявила существенных различий между подгруппой I и группой сравнения ($P > 0,05$). Однако было установлено, что в I подгруппе недоношенных детей лимфоциты с большей интенсивностью экспрессировали рецепторную молекулу CD4 (1098,2 (1060,06-1157,32) против 898,7 (862,92-966,68), $P = 0,0014$) и рецептор $\gamma\delta$ TCR (81,1 (64,60-101,76) против 57,5 (52,97-61,35), $P = 0,0038$) по сравнению с детьми, родившимися в срок. Интенсивность экспрессии данных маркеров обратно коррелировала с гестационным возрастом: $r = -0,396$, $P = 0,03$ и $r = -0,385$, $P = 0,039$. В процессе развития Т-клеток вначале на них экспрессируется $\gamma\delta$ TCR, экспрессия $\alpha\beta$ TCR обнаруживается позднее. Ранее было показано, что в крови плода число $\gamma\delta$ Т-клеток значительно сокращается к доношенному сроку [2].

При исследовании фенотипа В-лимфоцитов пуповинной крови было установлено, что в I подгруппе недоношенных детей содержание CD19+CD5+B1 клеток и незрелых CD19+CD27-IgM+IgD- В-лимфоцитов выше, а содержание CD19+CD27+B-клеток памяти – ниже, чем у доношенных новорожденных ($P < 0,05$). Формирование В-клеток памяти при участии Т-лимфоцитов может происходить в герминативном центре и вне его. В первом случае образуются В-клетки памяти с фенотипом CD19+CD27+IgM-IgD-, в которых произошло переключение классов синтезируемых иммуноглобулинов («переключенные»). Они способны быстро синтезировать IgG высокой специфичности в ответ на повторное попадание антигена. В случае образования В-лимфоцитов памяти вне герминативного центра, формируются CD19+CD27+IgM+IgD+ «непереключенные» В-клетки памяти, продуцирующие IgM [3,4]. Следует отметить, что среди В-лимфоцитов памяти у детей из подгруппы I преобладали «непереключенные» лимфоциты ($P < 0,05$). У новорожденных отсутствует второй сигнал при кооперации В-клеток с Th-лимфоцитами за счёт низкой экспрессии костимуляторных молекул. Это снижает способность В-лимфоцитов к изотипическому переключению классов иммуноглобулинов [5].

Факторами роста, пролиферации и дифференцировки для В-лимфоцитов являются цитоки-

ны, относящиеся к семейству TNF: BAFF (B-cell activating factor) и APRIL (a proliferation-inducing ligand). На поверхности В-клеток экспрессированы рецепторы BAFF-R (CD268) для BAFF и TACI (transmembrane activator and CAML interactor, CD267) для BAFF и APRIL [6]. Нами было установлено, что число В-клеток, экспрессирующих TACI, среди всей популяции В-лимфоцитов ниже в группе недоношенных новорожденных без признаков инфекции по сравнению с детьми, родившимися в срок ($P < 0,0001$). Доля лимфоцитов, несущих BAFF-R, не различалась в исследуемых группах ($P > 0,05$). Интенсивность экспрессии CD267 и CD268 была значимо выше на лимфоцитах пуповинной крови недоношенных детей по сравнению с доношенными ($P = 0,0018$ и $P = 0,0098$).

Наличие врожденной пневмонии у недоношенных детей характеризовалось более высоким содержанием клеток с фенотипом CD3+CD16,CD56+ в пуповинной крови по сравнению с детьми сходного гестационного возраста без признаков инфекции, что может быть следствием активации клеточного звена иммунной системы при внутриутробном заражении.

Повторное обследование недоношенных новорожденных на 3 сутки жизни выявило значимо более низкое содержание В-лимфоцитов в периферической крови детей из I подгруппы по сравнению с пуповинной кровью. Число Т-клеток, в том числе Т-хелперных и Т-регуляторных, напротив, к 3 суткам увеличивалось. Это может свидетельствовать о повышении роли Т-клеточного звена в иммунных реакциях у детей без инфекционно-воспалительных заболеваний. В отличие от новорожденных без признаков инфекции, у детей с врожденной пневмонией абсолютное содержание $\gamma\delta$ Т-клеток и их доля среди CD3+ лимфоцитов, число естественных киллерных клеток, CD16+ лимфоцитов и интенсивность экспрессии данного рецептора были значимо ниже в периферической крови по сравнению с пуповинной. Напротив, иммунорегуляторный индекс, интенсивность экспрессии апоптотической молекулы CD95 на лимфоцитах и рецептора к IL-2 (CD25) на Т-регуляторных клетках существенно повышались к 3 суткам ($P < 0,05$). Выявлена тенденция к увеличению доли CD19+CD27+ В-лимфоцитов памяти в группе детей с врожденной пневмони-

ей к 3 суткам жизни ($P = 0,06$) за счёт увеличения числа В-клеток памяти, в которых не произошло переключения классов иммуноглобулинов ($P = 0,0098$).

Таким образом, лимфоциты пуповинной крови недоношенных новорожденных имеют признаки незрелости: высокое содержание В1 и $\gamma\delta$ Т-клеток, относящихся к врожденному иммунитету, низкое содержание В-клеток памяти с преобладанием «непереключенных» форм, низкая экспрессия CD95 и высокая – рецепторов к ростовым факторам на Т- и В-клетках. Более высокое содержание Т-клеток с цитотоксической активностью в пуповинной крови недоношенных детей с пневмонией может свидетельствовать об активации клеточного иммунитета. В отличие от новорожденных без инфекционно-воспалительных заболеваний, у детей с врожденной пневмонией к 3 суткам жизни обнаруживаются признаки дифференцировки и «обучения» клеток адаптивной иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. 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.
2. Dimova T., Brouwer M., Gosselin F. et al. Effector V γ 9V δ 2 T cells dominate the human fetal $\gamma\delta$ T-cell repertoire. PNAS, 2015, v. 112, № 6, p. E556-E565.
3. Kurosaki T., Kometani K., Ise W. Memory B cells. Nature reviews, 2015, v. 15, p. 149-159.
4. Shi Y., Agematsu K., Ochs H.D. et al. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. Clinical immunology, 2003, v. 108, p.128-137.
5. Kaur K., Chowdhury S., Greenspan N.S., et al. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. Blood, 2007, v. 110, p. 2948-2954.
6. Figgett W.A., Vincent F.B., Saulep-Easton D., et al. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation. Seminars in immunology, 2014, v. 26, № 3, p. 191-202.