

ШВЕЦ ОЛЕСЯ ВАСИЛЬЕВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
СИНДРОМА DEL22q11.2 (СИНДРОМА ДИДЖОРДЖИ)
У ДЕТЕЙ**

14.01.08 - педиатрия
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2016 год

Работа выполнена в ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева” Минздрава России

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Продеус Андрей Петрович

Доктор медицинских наук, профессор

Щербина Анна Юрьевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Зайцева Ольга Витальевна

Заслуженный врач России

Заведующая кафедрой педиатрии

ФГБОУ ВО “Московский государственный

медико-стоматологический университет

имени А.И. Евдокимова”

Минздрава России

Доктор медицинских наук, профессор

Латышева Татьяна Васильевна

Заслуженный врач России

Заведующая отделением иммунопатологии взрослых

ФГБУ “Государственный научный центр

“Институт иммунологии” ФМБА России

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО “Первый Московский государственный медицинский университет имени

И.М. Сеченова” Минздрава России

Защита состоится « 29 » ноября 2016 г. в «_12_» часов

на заседании диссертационного совета при ФГБУ “ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева” Минздрава России по адресу:

117997, Москва, ул Саморы-Машела, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ “ФНКЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева” Минздрава России (117997, Москва, ул. Саморы-Машела, д. 1) и на сайте www.fnkc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

В.М. Чернов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Синдром ДиДжорджи (ОМIM 188400, МКБ-Х D82.1) – это целый симптомокомплекс, вызванный гетерогенной субмикроскопической делецией длинного плеча 22 хромосомы – del22q11.2. Основными признаками синдрома являются гипоплазия или аплазия тимуса с дальнейшим развитием иммунодефицитного состояния, гипокальциемия, вследствие нарушения развития паращитовидных желез, врожденные пороки сердца, главным образом конотрункальные, и определенные дисморфические черты лица (K. Sullivan et al., 2005).

С развитием генетики было установлено, что в подавляющем большинстве случаев при синдроме ДиДжорджи (СДД) имеет место субмикроскопическая делеция длинного плеча 22 хромосомы (del22q11.2). Этот генетический дефект также был обнаружен и при ряде других, описанных в литературе, синдромов. Самыми известными из них являются велокардиофациальный синдром или синдром Шпринцена (Velocardiofacial syndrome, VCFS, Shprintzen syndrome), синдром третьего и четвертого фарингеальных мешков (Third and fourth pharyngeal pouch syndrome), синдром конотрункальной аномалии лица (Conotruncal anomalies face syndrome, СТАФ), а также синдром Кайлера (Cayler syndrome), синдром Такао (Такао syndrome), синдром Седлаковой (Sedlackova syndrome).

Ранее считалось, что среди вышеперечисленных синдромов только СДД являлся истинным первичным иммунодефицитом (ПИД), имеющим в основе дефект Т-клеточного звена, вследствие аплазии тимуса. Однако, с развитием лабораторной диагностики и иммунологии в целом, даже при отсутствии значимых изменений, связанных с Т-лимфоцитами, все чаще выявляются отклонения в других звеньях иммунитета у детей с делецией del22q11.2, показывая и доказывая, что такие пациенты являются иммунокомпроментированными, а следовательно, имеют более высокий риск развития тяжелых инфекционных осложнений и аутоиммунных заболеваний в анамнезе.

Актуальность работы

Вопрос гиподиагностики ПИД остается важным до настоящих дней, несмотря на постоянный прогресс в развитии иммунологии, генетики и педиатрии в целом. Особенно эта проблема актуальна для детей с синдромальной патологией, сочетающей в себе не только различные соматические заболевания, но и иммунодефицитные состояния, проявляющиеся в той или иной степени. Ярким примером такого сочетания является СДД, где наряду с широким спектром соматической патологии имеет место врожденный дефект иммунной системы. Степень выраженности иммунодефицита при данном синдроме варьирует от незначительных

лабораторных изменений в иммунограмме до клинических и лабораторных проявлений тяжелого комбинированного иммунодефицита, который бывает редко (Р.М. Хаитов, Н.И. Ильина, 2014). СДД, как правило, дебютирует с проявления пороков развития, преимущественно сердечно-сосудистой системы (ССС). Выявление изменений в иммунном статусе и верификация диагноза имеют место в большинстве случаев только после консультации иммунолога, спустя несколько месяцев или лет после рождения.

Современный уровень развития кардиохирургии позволяет сохранить жизнь пациента в большинстве случаев развития различных пороков сердца, в том числе и конотрункальных пороков, среди которых пациенты с СДД занимают не менее 8,3% (В. Г. Антоненко, О.А. Мутафьян, 2009). Тем не менее, качество и продолжительность дальнейшей жизни у пациентов с СДД зависят не только от топика порока и мастерства хирурга, но и от катамнестического наблюдения и обследования этой группы детей у специалистов. В настоящее время не всегда удачно прооперированные дети с данной патологией имеют благоприятный прогноз по основному заболеванию (В.Г. Антоненко, 2015), что главным образом обусловлено отсутствием оценки иммунного статуса у пациентов. Обследование таких детей без изучения иммунологического профиля приводит к задержке верификации диагноза, что определяет недостаточный объем проводимой терапии. Последнее увеличивает риск развития тяжелых рецидивирующих инфекционных осложнений. Этого можно было бы избежать при комплексном иммунологическом обследовании ребенка на ранних этапах онтогенеза, установив правильный диагноз, что, соответственно, определило бы необходимый объем медицинского обеспечения пациента. Ранняя диагностика врожденного иммунодефицитного состояния может не только определить прогноз заболевания и качество жизни пациента, но также предотвратить развитие тяжелых инфекционных осложнений впоследствии (Patel K., Akhter J., Kobrynski L, 2012).

В российской литературе широко представлен спектр морфологических особенностей детей с СДД и положительные результаты хирургических вмешательств. Однако недостаточно освещены вопросы, затрагивающие функционирование иммунной системы, а также варианты инфекционных и аутоиммунных осложнений у детей с СДД.

Своевременная диагностика, включающая оценку благополучия иммунной системы и соответствующий объем терапии, во многом определяют прогноз заболевания и качество жизни пациентов с СДД. Специализированная помощь данному контингенту пациентов недостаточно отработана и требует совершенствования. Поэтому изучение иммунологических аспектов у детей с синдромом del22q11.2 (СДД) представляется современным и актуальным как для педиатров, так и для иммунологов. Вышеизложенное определило цель и задачи данного исследования.

Цель проведенного исследования:

охарактеризовать иммунологические дефекты у группы детей с СДД и провести их корреляцию с клиническими проявлениями заболевания для совершенствования реабилитации пациентов на дальнейших этапах онтогенеза.

Задачи исследования:

1. дать характеристику клиническим особенностям состояния здоровья детей и вариантам течения СДД с позиции выявления корреляции между имеющимися пороками развития у пациентов и степенью тяжести иммунодефицита, а также прогнозом заболевания в целом;
2. описать спектр инфекционных осложнений и аутоиммунной патологии у детей с СДД;
3. провести анализ показателей гуморального и клеточного иммунитета у детей с СДД;
4. определить корреляции между процентным содержанием субпопуляций Th1- и Th17-лимфоцитов и наличием del 22q11.2, а также риском развития аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД;
5. оценить количество TREC (T-cell Receptor Excision Circles, эксцизионных колец T-клеточного рецептора) и KREC (Kappa-deleting Recombination Excision Circle, рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента) у пациентов с СДД, определить корреляции со степенью выраженности иммунодефицита;
6. определить прогностические маркеры развития аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД;

Научная новизна исследования

1. В данной работе впервые в России выявлена и разносторонне изучена по клинико-иммунологическим аспектам группа из 30 пациентов детского возраста с синдромом микроделеции del22q11.2 (СДД). Исследованы клинико-морфологические особенности систем пациентов. Проведена комплексная оценка инфекционных и аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД. Выявлены следующие виды аутоиммунных осложнений: цитопении (хроническая иммунотромбоцитопеническая пурпура (хр.ИТП), аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА)) и воспалительные заболевания кишечника (язвенный колит (ЯК), болезнь Крона). Инфекционные осложнения были представлены рецидивирующими бактериальными (пневмонии, в том числе с формированием ателектазов и пневмофиброза легких, стоматиты, фурункулез), вирусными (генерализованная цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ)), и грибковыми инфекциями (рецидивирующий кандидоз кожи и слизистых).

2. Проведена разносторонняя характеристика иммунологических нарушений у детей с СДД. Исследован гуморальный и клеточный иммунитет. Выявлено, что концентрация IgA значительно снижена у 30% пациентов, концентрация IgM снижена у 46,7% пациентов. Концентрация IgG находилась в пределах нормальных значений в 90% случаев. При исследовании клеточного иммунитета обнаружено, что у 73,3% пациентов абсолютное количество Т-лимфоцитов было ниже нормы. Было выявлено, что количество CD4⁺Т-лимфоцитов и CD8⁺Т-лимфоцитов снижено у 73,3 и 76,7% пациентов с СДД, соответственно. Снижение количества В-лимфоцитов отмечалось в 20% случаев.
3. У пациентов с СДД исследован митогенный ответ: только в 9,5% случаев он был в норме. Остальные пациенты имели сниженный, в различной степени, митогенный ответ.
4. Проведена корреляция между количеством TREC и KREC и степенью тяжести иммунодефицита у пациентов с СДД. Установлено, что наихудший прогноз в виде летальности имели пациенты со сниженным количеством TREC и KREC (менее 10³ копий на 10⁵ клеток). Пациенты с удовлетворительными значениями TREC и KREC, или близкими к таковым, не имели тяжелых инфекционных проявлений и аутоиммунных заболеваний.
5. Исследованы субпопуляции Th1-лимфоцитов (синтезирующие IFN- γ) и Th17-лимфоцитов (синтезирующие IL17) у детей с СДД. Выявлено, что количество Th17-лимфоцитов у детей с СДД практически одинаково вне зависимости от развития аутоиммунных осложнений. Не установлено статистически значимых различий в количестве Th17-лимфоцитов у детей с аутоиммунными проявлениями без генетической патологии по сравнению со здоровыми детьми и с пациентами с СДД. При исследовании количества Th1-лимфоцитов обнаружено, что у пациентов с СДД без аутоиммунных осложнений и у здоровых детей количество Th1-лимфоцитов практически не отличается. Однако было выявлено статистически значимое увеличение Th1-лимфоцитов у пациентов с СДД и аутоиммунными осложнениями по сравнению с пациентами с СДД без аутоиммунных осложнений, а также по сравнению с пациентами без генетических отклонений и имеющими цитопению, и со здоровыми детьми. Этот вывод подтверждает наши предположения о том, что Th1-лимфоциты имеют непосредственное отношение к аутоиммунным проявлениям. Установлено, что пациенты с СДД и повышенным количеством Th1-лимфоцитов (выше 27,8%) составляют группу риска по развитию аутоиммунных процессов в катамнезе.

Практическая значимость работы

Настороженность в отношении иммунологических дефектов и знание результатов разностороннего обследования, включая лабораторные показатели иммунной системы у детей с СДД, позволяют на максимально ранних этапах онтогенеза выявлять наличие первичного иммунодефицитного состояния. Это помогает осуществлять своевременную и правильную диагностику заболевания и минимизировать развитие тяжелых инфекционных и аутоиммунных осложнений.

Выявление повышенного содержания Th1-лимфоцитов относительно CD3⁺ Т-лимфоцитов (больше 27,8%) может использоваться как прогностический маркер развития аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД, а также открывает новые направления исследования патогенеза заболевания.

Пациенты со сниженным (менее 10³ копий на 10⁵ клеток) или нулевым количеством TREC и KREC имеют наихудший прогноз по заболеванию в виде летальности, развитию аутоиммунных заболеваний и тяжелых инфекционных осложнений.

Внедрение полученных результатов в практику

Знание клинико-иммунологических характеристик СДД используется для выявления у пациентов врожденного иммунодефицитного состояния и начала адекватного лечения до развития тяжелых инфекционных осложнений, а также для ранней диагностики аутоиммунных заболеваний в первом педиатрическом (иммунологии и аллергологии) отделении ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского и отделении иммунологии ФГБУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва. Семерым пациентам диагноз был установлен впервые при обращении в вышеуказанные отделения. Остальным детям, с подтвержденной del22q11.2, было проведено расширенное иммунологическое обследование; по результатам обследования назначена патогенетическая иммунокорректирующая терапия.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повышенная инфекционная заболеваемость отмечена у 23 (76,6%) человек из 30; среди заболеваний преобладали пневмонии (более 70%); тяжелые жизнеугрожающие инфекции встречались в 46,6% случаев. Помимо бактериальных инфекций, отмечены различные вирусные, в том числе генерализованные (ЦМВ) и грибковая инфекции. Лабораторные признаки иммунодефицитного состояния выявлены у 73,3% пациентов.

2. Аутоиммунные осложнения отмечались у 5 (16,7%) детей из 30. Среди аутоиммунных осложнений были зафиксированы хр.ИТП, АИГА и воспалительные заболевания кишечника — ЯК и болезнь Крона.
3. Повышение уровня Th1-лимфоцитов (выше 27,8%) отмечалось у пациентов с СДД и аутоиммунными осложнениями.
4. Наихудший прогноз по развитию тяжелых инфекционных, аутоиммунных осложнений и уровню летальности имели дети с нулевыми и низкими (менее 10^3 копий на 10^5 клеток) значениями TREC и KREC.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на Первом объединенном научно-практическом форуме детских врачей (РФ, Орел, 2008), VII Весеннем съезде иммунологов (ESID, Чехия, Прага, 2008), на VI Международной ежегодной научной конференции по неонатальной гематологии и иммунологии (США, Бостон, 2008), на XV съезде Европейского общества иммунодефицитов (ESID, Италия, Флоренция, 2012), на XVII Конгрессе педиатров России (Москва, 2014), на XVI съезде Европейского общества иммунодефицитов (ESID, Чехия, Прага, 2014), на XVII съезде Европейского общества иммунодефицитов (ESID, Испания, Барселона, 2016), использованы в лекциях для врачей.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 97 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных материалов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, указателя использованной литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 16 рисунками. Библиография представлена 97 источниками литературы, в том числе отечественных ссылок — 14, иностранных — 83.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на базе ФГБУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (генеральный директор центра – д.м.н., профессор, академик РАН А.Г. Румянцев).

Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории «Ферти-Лаб» (зав. лабораторией профессор, д.м.н. М.В. Немцова), медико-генетическом научном центре РАМН, лаборатории пренатальной диагностики (зав. лабораторией, профессор, д.б.н. Т.В. Золотухина), лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (зав. лабораторией к.м.н. Ю.В.Ольшанская).

Обследование пациентов по иммунологическому профилю проводилось в иммунологической лаборатории при ДГКБ №9 им. Г.Н.Сперанского (руководитель подразделения к.м.н. Н.В. Давыдова) и клиничко – диагностической лаборатории ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (руководитель лаборатории к.м.н. С.А. Плясунова).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

В исследование были включены 36 детей с СДД, из которых 30 детей составляли основную группу, а 6 детей были включены позже, с целью проведения дополнительного расширенного иммунологического обследования. Все дети наблюдались в отделениях иммунологии в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (научный консультант отделения, зав. отделением, д.м.н., профессор, А.Ю.Щербина), первом педиатрическом (иммунологии и аллергологии) ДГКБ №9 им. Г.Н.Сперанского (научный консультант отделения д.м.н., профессор А.П. Продеус, зав. отделением С.Б. Зимин), Перинатальном кардиологическом центре при ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова (научный консультант отделения д.м.н., профессор Н.П. Котлукова) и генетическом центре при ДГКБ №13 им. Н.Ф. Филатова (зав. генетическим центром В.Г. Солониченко).

В качестве контроля были созданы 2 группы детей: первая – из 19 здоровых детей, проходивших диспансерное обследование в поликлинике при ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского, вторая – из 5 пациентов с хр. ИТП (согласно критериям Н.А. Алексеева, 1998), наблюдавшихся в Измайловской детской городской клинической больнице (ИДГКБ).

Возраст детей на момент включения в исследование колебался от 2 недель до 15 лет. СДД определялся согласно критериям А.Ю. Щербины (2006). У всех пациентов диагноз был подтвержден молекулярно-генетическими методами, в том числе у 7 диагноз был заподозрен впервые и подтвержден иммунологами в ДГКБ № 9 им. Г.Н.Сперанского и ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва в ходе исследования. Только 5 детей после подтверждения del22q11.2 сразу были направлены к иммунологу для проведения комплексного обследования иммунного

статуса, уточнения степени тяжести иммунодефицита и прогноза заболевания. 83% детей были обследованы по иммунологическому профилю в связи с проведением настоящего исследования.

Медиана возраста выявления микроделеции del22q11.2 составила 4 месяца (интерквартильная широта от 1 до 24 месяцев). Значение медианы возраста постановки диагноза «ПИД: синдром del22q11.2 (синдром ДиДжорджи)» составило 17 месяцев (интерквартильная широта от 4 до 66 месяцев). То есть разница во времени между установлением генетического дефекта и верификацией диагноза составила 13 месяцев, хотя в исследовании встречались пациенты, которым правильный диагноз был установлен только через несколько лет после проведенного генетического исследования. Данные представлены на рис. 1.

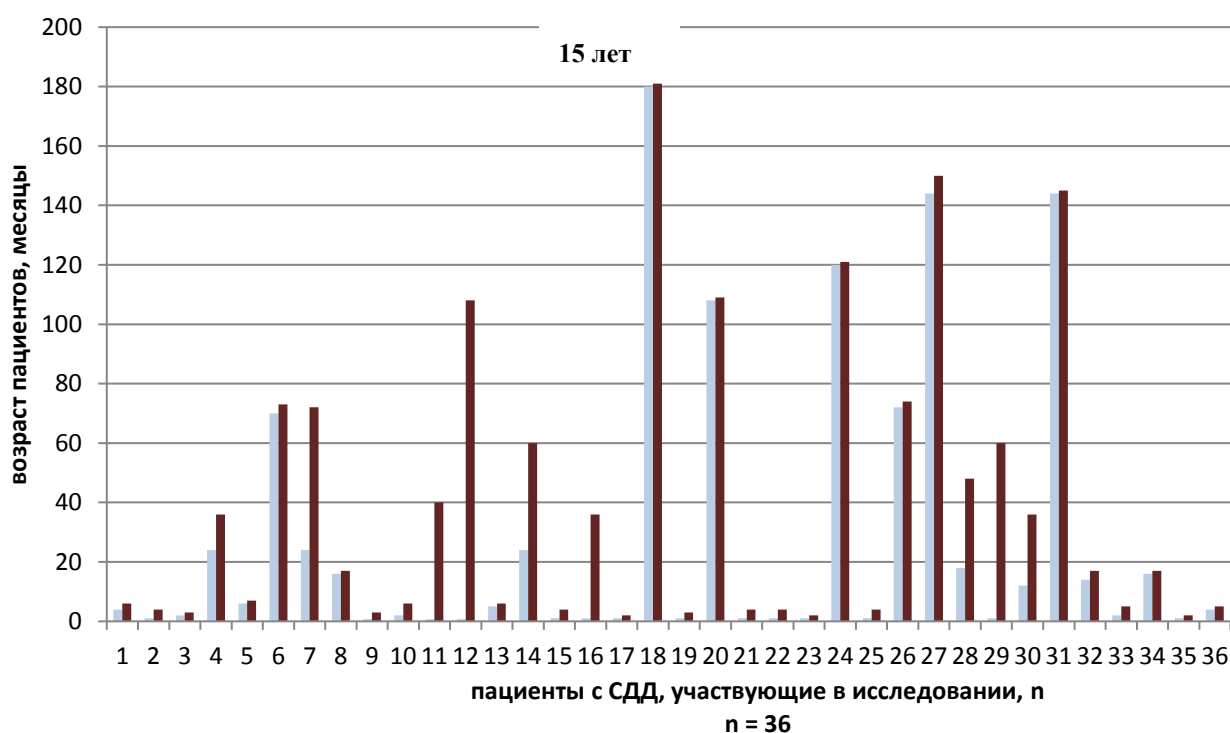


Рис. 1. Разница во времени между определением del22q11.2 и постановкой диагноза «ПИД: синдром ДиДжорджи». Светлый столбец – возраст определения del22q11.2. Темный столбец – возраст постановки диагноза «ПИД: синдром ДиДжорджи».

Среди детей, включенных в основную группу исследования, мальчиков было 20 (66,7%), девочек – 10 (33,3%). В контрольной группе гендерных различий не отмечалось: мальчиков было 18 (75%), девочек 6 (25%). Группы контроля и основная были сопоставимы по возрасту.

У всех детей, включенных в исследование, проводили анализ медицинской документации, включающей «Историю развития ребенка» (ф.112/у), «Медицинскую карту стационарного больного» (ф.003/у), выписки из стационаров, оценку общеклинических и иммунологических показателей.

Длительность наблюдения за пациентами основной группы варьировала от 2 недель (в связи со смертью пациента) до 8 лет. За время наблюдения умерло 5 (16,66%) пациентов из 30. Четыре человека умерло от инфекционных осложнений, 1 ребенок – от декомпенсации сердечного порока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое обследование и анамнез заболевания

При сборе анамнеза жизни обращали внимание на частоту заболеваемости, принадлежность пациента к группе часто болеющих детей, согласно критериям А.А. Баранова, В.Ю. Альбицкого (1986), спектр перенесенных тяжелых инфекционных заболеваний (пневмонии, сепсис, генерализованные формы ЦМВ, кандидоз и др.), случаи ранней детской смертности в семейном анамнезе.

Во всех случаях при клиническом обследовании использовали общий врачебный осмотр. При оценке хабитуса акцентировали внимание на количестве и вариантах стигм дисэмбриогенеза (В.А. Доскин, С.З. Макарова, 2006) и врожденных пороках развития (особенно дефектах ССС и небо-глоточного аппарата).

Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование проводили в лаборатории «Ферти-Лаб» методом полимеразной цепной реакции и электрофореза с помощью анализа микросателлитного полиморфизма по локусам D22S246, D22S1638, D22S941, D22S264, D22S1709, перекрывающим область делеции 22-й хромосомы; в лаборатории пренатальной диагностики Медико-генетического научного центра РАМН методом флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) с ДНК-зондом LSI TUPLE 1 (HIRA)/LSI ARSA (“Abbott”, США); в лаборатории цитогенетики ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева методом FISH - зондом HIRA (“Abbott”, США).

Иммунологическое обследование включало:

- исследование гуморального иммунитета
- исследование клеточного иммунитета
- определение митогенного ответа
- выявление процентного содержания Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-17 (IL17), – Th17-лимфоцитов, по отношению к CD3⁺ Т-лимфоцитам
- выявление процентного содержания Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон- γ (ИФН- γ), – Th1-лимфоцитов, по отношению к CD3⁺ Т-лимфоцитам
- установление количества TREC и KREC
- у 4 пациентов определяли содержание специфических антител

Определение концентрации иммуноглобулинов сыворотки

Концентрацию иммуноглобулинов IgA, IgG и IgM в сыворотке крови определяли методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе Architect С 8000 (“Abbott”, США) с использованием наборов согласно инструкции производителя.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови

Имунофенотипирование лимфоцитов из образцов цельной крови выполняли по стандартной методике проточной цитометрии с использованием флюорохром-конъюгированных моноклональных антител: CD45PE-Cy5/CD3FITC/CD19PE (“Dako”, США), CD8FITC/CD4PE/CD3PE-Cy5 (“Dako”, США), CD3FITC/CD(16+56)PE (“Beckman Coulter”, США), Малтитест CD45RAFITC/CD45ROPE/CD3PerCp/CD4APC (“Becton Dickenson”, США). Анализ проводили на цитофлуориметрах FACS Scan Analyzer (“Becton Dickenson”, США) и Cyan (“Beckman Coulter”, США) с использованием программ Cell Quest и Summit, соответственно.

Определение митогенного ответа

Для определения экспрессии раннего маркера активации лимфоцитов CD69 (митогенный ответ) лимфоциты цельной крови активировали фитогемагглютинином (“Sigma”, США) в субмаксимальной (5 мкг/мл) и максимальной (10 мкг/мл) концентрациях при температуре 37°C в течение 4 часов. После инкубации лимфоциты окрашивали антителами CD3FITC и CD69PE (“Beckman Coulter”, США) по стандартной методике, эритроциты лизировали с помощью FACS Lysing solution (“Becton Dickenson”, США). Образцы отмывали и фиксировали. Анализ производили методом проточной цитометрии на цитофлуориметрах FACS Scan Analyzer (“Becton Dickenson”, США) и Cyan (“Beckman Coulter”, США).

Определение процентного содержания Th17- и Th1-лимфоцитов

Для определения процентного содержания Th17- и Th1-лимфоцитов из цельной крови выделяли мононуклеарные клетки по стандартной методике с использованием фиколлаурографина Histopaque (“Sigma-Aldrich”, США). Для активации выработки цитокинов использовали форбол-12-миристан-13-ацетат (10 нг/мл) вместе с иономицином (1мкг/мл) в присутствии брэфелдина А (10мкг/мл) (“Sigma-Aldrich”, США). Мононуклеары инкубировали в полной питательной среде RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сывороткой (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 16 часов. Активированные образцы мононуклеаров отмывали отмывочным раствором с 5% фетальной сывороткой. Поверхностные антигены CD3 и CD4 окрашивали моноклональными антителами анти-CD3FITC (“Beckman Coulter”, США) и анти-CD4FITC

(“Beckman Coulter”, США). После окрашивания образцы отмывали центрифугированием, мембрану клеток фиксировали фиксатором, а затем клетки пермеабилizировали пермеабилizатором из набора Fix & Perm, (“Invitrogen”, США) с одновременным добавлением антител к IL-17PE (“e-Bioscience”, США) и к – ИФН γ PE (“Beckman Coulter”, США). Окрашенные клетки фиксировали раствором Cell Fix (“Becton Dickenson”, США) и анализировали методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Scan Analyzer (“Becton Dickenson”, США).

Определение количества TREC и KREC

Количественное определение копий TREC и KREC в образцах проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с помощью коммерческого набора (T&B Test, Россия). Методика включала в себя следующие этапы: экстракцию ДНК из цельной крови (набор Рибо преп, Амплисенс, Россия), амплификацию участков ДНК молекул TREC и KREC с одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией. В ходе ПЦР одновременно происходила амплификация участка гена человека IL17RA (эндогенный внутренний контроль). С учетом эндогенного контроля проводили пересчет количества копий TREC и KREC. Количество копий TREC и KREC рассчитывали на 10^5 ядер-содержащих лейкоцитов с учетом внутреннего контроля IL17RA по формуле: Количество TREC (KREC) = (кол-во копий TREC (KREC) на мл/кол-во копий IL17RA)*200000.

Определение концентрации специфических антител

Концентрацию специфических антител определяли в Центре молекулярной диагностики методом РПГА (реакцией прямой гемагглютинации).

Для оценки степени выраженности иммунодефицита и проведения корреляций нами была разработана балльная система (А.Ю. Щербина, О.В. Швец, 2015):

- 5 баллов — смерть пациента;
- 4 балла — наличие у пациента аутоиммунного заболевания и тяжелых инфекционных осложнений;
- 3 балла — пациенты с многократными инфекционными осложнениями;
- 2 балла — пациенты со средним и высоким уровнем резистентности к инфекциям;
- 1 балл — отсутствие инфекционной заболеваемости, присутствие только лабораторных признаков иммунодефицита;
- 0 баллов — отсутствие каких-либо лабораторных и клинических проявлений;

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica, версия 8.0. Возраст пациентов представлен в виде медианы и интерквартильной широты. Для обработки данных по количеству субпопуляций Т-лимфоцитов при нормально распределенном признаке использовали двухвыборочный тест Стьюдента для независимых выборок. Количество субпопуляций Т-лимфоцитов представлено в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Достоверными считались различия, вероятность случайного появления которых не превышала 0.05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническая характеристика пациентов

У подавляющего большинства исследуемых нами пациентов имелись те или иные, характерные для СДД, фенотипические особенности. Наиболее отличительным и часто встречающимся признаком (в нашем исследовании 73%) составляли изменения ушных раковин. Чаще всего они были низко расположены, имели неправильную форму, разнообразной вариабельности контур и мягкую, диспластичную структуру.

Только двое детей (№№ 15 и 21) из 30 не имели выраженных врожденных дефектов в ССС. Все остальные дети (93%) имели врожденный порок сердца или магистральных сосудов или другие изменения ССС, отличные от нормы.

Полная расщелина твердого и мягкого неба отмечалась только у одной пациентки (№15). Подслизистое расщепление неба зафиксировано у 5 детей. Таким образом, минимум 20% детей из обследуемой группы имели незаращение неба.

Гипокальциемия в различной степени выраженности отмечалась у 8 (26,67%) пациентов из 30. У троих (10%) детей концентрация кальция была значительно снижена, что привело к развитию гипокальциемических судорог (№№ 3,4,24). Концентрация паратиреоидного гормона была ниже нормы у детей, развивших судорожный синдром, а также у двух других пациентов.

Значимые поражения ЦНС зафиксированы у 20 пациентов из 30, что составило 66,7%. Более половины (66,7%) детей имели задержку психомоторного развития (ПМР) и задержку речевого развития (ЗРР), и испытывали трудности при обычном общении. Большинство из них обучалось в школе надомного обучения.

Суммируя вышеизложенные данные, самые частые отличительные признаки и пороки развития у пациентов с СДД представлены на рис. 2:



Рис. 2. Наиболее часто встречаемые отличительные черты детей с СДД, %.

Инфекционная заболеваемость

Самым частым инфекционным проявлением в наблюдаемой нами группе пациентов являлась пневмония, которая регистрировалась у 22 (73,3%) из 30 детей. Примерно у 1/3 пациентов отмечались повторные пневмонии. В 36,4% случаев на фоне пневмонии отмечалось развитие ателектазов. Возможно, часть пневмоний была связана не только с дефектами в иммунной системе, но и с сопутствующей патологией ССС. Двое детей имели хроническое двустороннее поражение легких с развитием пневмофиброза: у пациента № 28 на фоне хронической ЦМВ инфекции и у пациентки №19 на фоне хронической грибковой инфекции. Также среди инфекций наблюдались ангины, обструктивные бронхиты, гаймориты, рецидивирующий стоматит. У трети пациентов отмечались рецидивирующие ОРВИ, нередко с затяжным течением. Часть детей имели кишечные инфекции и нуждались в стационарном лечении. Особенности инфекционной заболеваемости пациентов с СДД представлены на рис. 3 и в табл. 1.

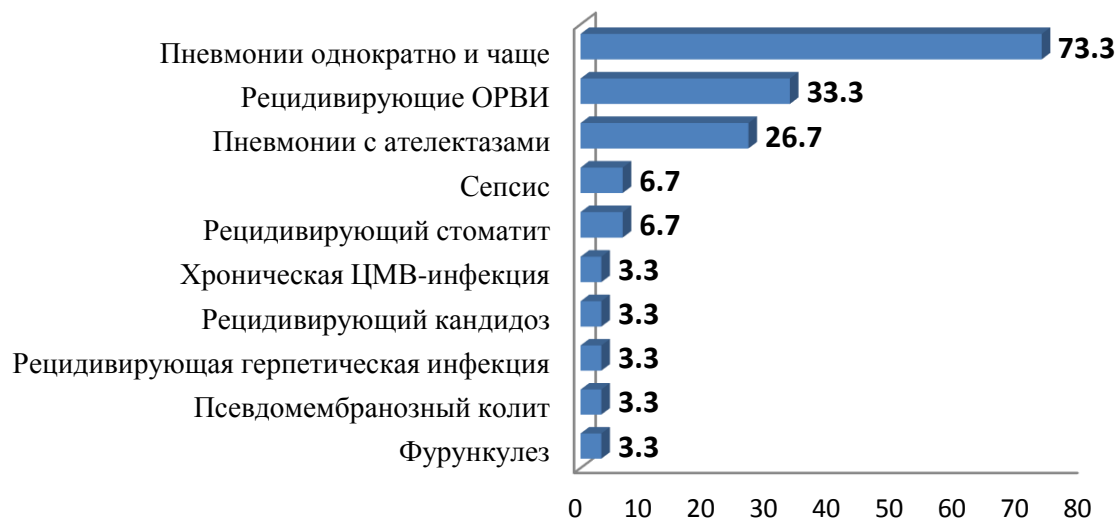


Рис. 3. Встречаемость различных инфекционных заболеваний у пациентов с СДД, %.

Таблица 1. Инфекционные и аутоиммунные проявления у пациентов с СДД, включенных в исследование.

№ п/п	Возраст ребенка на момент последней консультации /госпитализации	Пол ребенка	Инфекционные осложнения	Аутоиммунные осложнения	Исход
1	2 мес	М	Пневмония + ателектаз (после коррекции ВПС)	Нет	Умер
2	3 года	М	ОРВИ 4–5 раз в год	Нет	Жив
3	2 года	Ж	Двусторонняя пневмония + ателектаз (до коррекции ВПС), ОРВИ 2 раза, бронхит	Нет	Жив
4	2 года	М	Клебсиеллезный сепсис (до коррекции ВПС)	Нет	Жив
5	10 лет	М	Пневмония (до коррекции ВПС), пневмония + ателектаз (после коррекции ВПС), перфоративный гнойный аппендицит, псевдомембранозный колит клостридиальной этиологии, частые ОРВИ	ЯК, хроническая ИТП	Жив
6	10 лет	Ж	Пневмония 2 раза, ангина, ОРВИ ежемесячно	Нет	Жив
7	6 лет	М	ОРВИ ежемесячно, фолликулярная ангина, тяжелая кишечная инфекция, пневмония	Нет	Жив
8	9 лет	М	Инфекционный мононуклеоз, ОРВИ ежемесячно с затяжным течением	Нет	Жив
9	10 лет	Ж	Пневмония (после коррекции ВПС), ОРВИ 5–6 раз в год	Нет	Жив
10	5 лет	М	Пневмония врожденная и в 2 года, рецидивирующий стоматит	Нет	Жив
11	14 лет	М	Частые ОРВИ, рецидивирующий орхит, пиелонефрит	Нет	Жив
12	10 лет	М	Пневмония + ателектаз (до коррекции ВПС), затем 3 пневмонии, лакунарная ангина 2 раза, ОРВИ ежемесячно, 2 раза с гнойными осложнениями, сальмонеллез	Нет	Жив
13	4 года	Ж	Пневмония (после коррекции ВПС)	Нет	Жив

14	5 лет	М	Пневмония (после коррекции ВПС), фурункулез, частые ОРВИ	Нет	Жив
15	18 лет	Ж	Двусторонняя пневмония 3 раза, рецидивирующая герпетическая инфекция, дизентерия, сепсис	Болезнь Крона, хроническая ИТП	Умерла
16	4 года	Ж	Врожденная пневмония, пневмония с ателектазами (после коррекции ВПС)	Нет	Жив
17	4 года	М	Пневмония 2 раза (до и после коррекции ВПС), частые ОРВИ	Нет	Жив
18	1 год 5мес	М	Бронхит при рождении, пневмония 2 раза + отек легких (до коррекции ВПС)	Нет	Умер
19	2 года 7мес	Ж	Пневмония с абсцедированием с переходом в хроническое двустороннее поражение легких с деструкцией, двусторонний пневмофиброз, далее пневмония 2 раза	Нет	Жив
20	16 лет	М	В детстве ОРВИ, рецидивирующие бронхиты, в настоящее время рецидивирующий кандидоз	Хроническая ИТП	Жив
21	10 лет	Ж	Двусторонний гайморит, фарингомикоз, рецидивирующий стоматит	Хроническая ИТП, АИГА	Жив
22	2 мес	М	Двусторонняя пневмония 2 раза + ателектаз (до коррекции ВПС)	Нет	Умер
23	3 года	М	Пневмония (после коррекции ВПС), ОРВИ 5–6 раз в год	Нет	Жив
24	12 лет	М	Двусторонняя врожденная пневмония	Хроническая ИТП	Жив
25	6 мес	Ж	ОРВИ	Нет	Жив
26	4 мес	М	ОРВИ ежемесячно, пневмония после коррекции ВПС	Нет	Жив
27	3 мес	М	Пневмония с ателектазом после коррекции ВПС, острый бронхит	Нет	Жив
28	8 мес	М	Хроническая персистирующая ЦМВ-инфекция: пневмонит, энцефалит, подострый хориоретинит. Пневмония с развитием ателектаза (ЦМВ-инфекция, синегнойная палочка), фиброз легких	Нет	Умер
29	2 мес	Ж	Пневмония после коррекции ВПС	Нет	Жив
30	3 мес	М	ОРВИ, острый гастроэнтерит (ротавирусная и аденовирусная инфекции)	Нет	Жив

Аутоиммунные осложнения

За время наблюдения у 5 (16,7%) из 30 пациентов с СДД отмечалось развитие аутоиммунных осложнений. Хр.ИТП имела место у всех пятерых детей. В дополнение к хр. ИТП также были зафиксированы АИГА (у пациентки № 21) и воспалительные заболевания кишечника. Среди последних отмечались язвенный колит (у пациента №5) и болезнь Крона (у пациентки №15).

Корреляция между клиническим фенотипом пациентов и степенью выраженности иммунодефицита

В нашей работе мы попытались выяснить, существует ли какое-либо определенное количество пороков или дефекты развития, определяющие дальнейшее течение СДД и прогноз заболевания, то есть мы попытались провести корреляцию между клиническим фенотипом пациента и степенью выраженности иммунодефицита. С целью выявления максимальной корреляции мы использовали данные всех 36 пациентов.

При оценке корреляции между тяжестью иммунодефицита и количеством пороков развития мы принимали во внимание наиболее характерные и часто встречаемые врожденные дефекты у пациентов с СДД (пороки развития ССС, расщелину неба, гипоплазию паращитовидных желез).

Логично предположить, что чем больше пороков развития у того или иного пациента с СДД, тем более выраженным будет иммунодефицит и хуже прогноз заболевания. Однако на практике мы получили несколько иную картину.

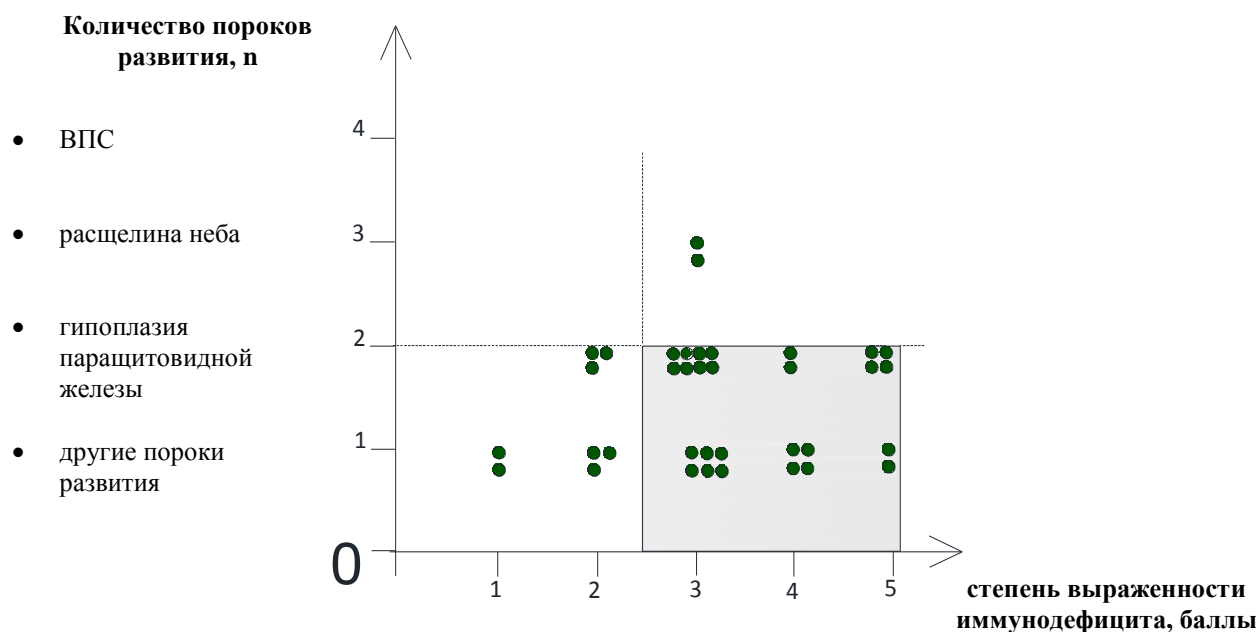


Рис. 4. Корреляция между количеством пороков развития и степенью выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД.

На рис. 4 видно, что бóльшая часть пациентов с максимальной степенью выраженности иммунодефицита и наихудшим прогнозом по заболеванию находится в зоне с минимальным (1) и средним (2-3) количеством врожденных пороков развития, что, в свою очередь, показывает

высокую необходимость тщательного иммунологического обследования пациентов при сочетании выраженного иммунодефицита и минимального количества пороков развития.

Также мы хотели выяснить, существует ли какая-либо корреляция между степенью выраженности иммунодефицита и различными отклонениями, характерными для пациентов с СДД. Для оценки мы выбрали те же составляющие.

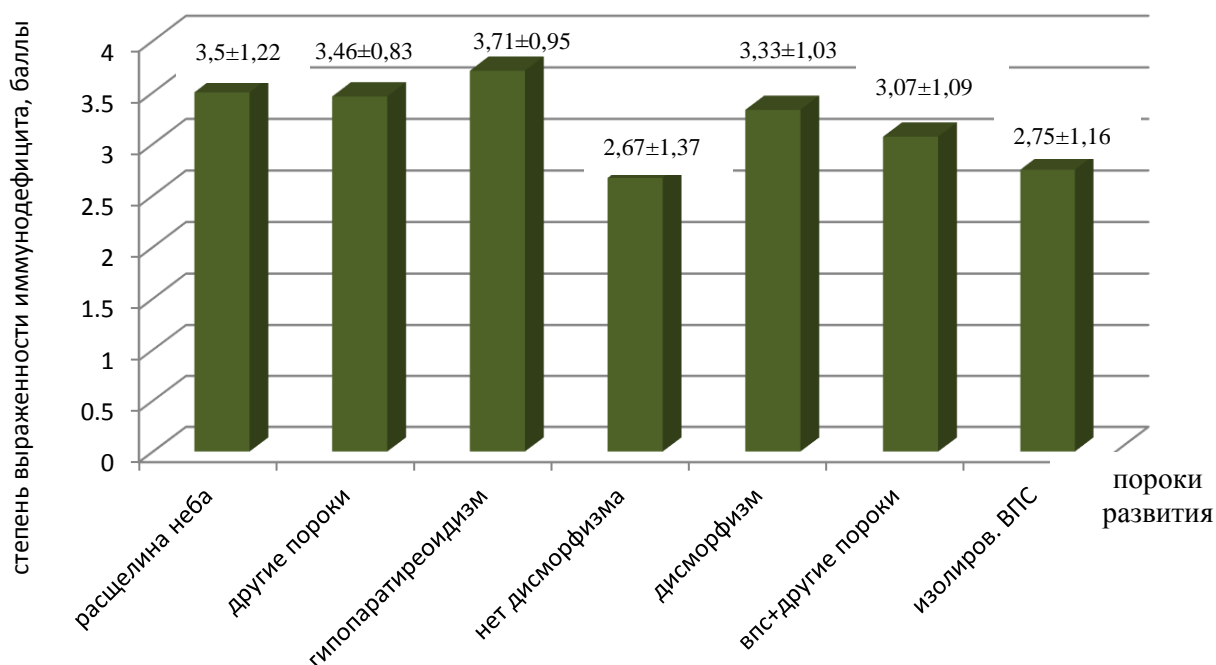


Рис. 5. Корреляция между пороками развития и степенью выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД.

На рис. 5 отчетливо видно, что пациенты с СДД и наличием изолированного врожденного порока сердца имеют практически одинаковую степень иммунодефицита с пациентами, имеющими ВПС и другие пороки (последние 2 столбца на рис. 5). Примерно тот же уровень тяжести иммунодефицита мы наблюдаем у пациентов с СДД и в сочетании с гипопаратиреозом, и с дисморфизмом, и с другими пороками, в том числе, и с расщелиной неба. В процессе исследования мы отметили некоторую тенденцию к наихудшему прогнозу заболевания у детей с расщелиной неба. Так, из 6 детей один ребенок умер, трое имели аутоиммунные осложнения.

Мы также хотели выяснить, существует ли корреляция между степенью выраженности иммунодефицита и различными пороками ССС, особенно группой конотрункальных пороков, характерных для данной патологии, и получили следующие данные (рис. 6).

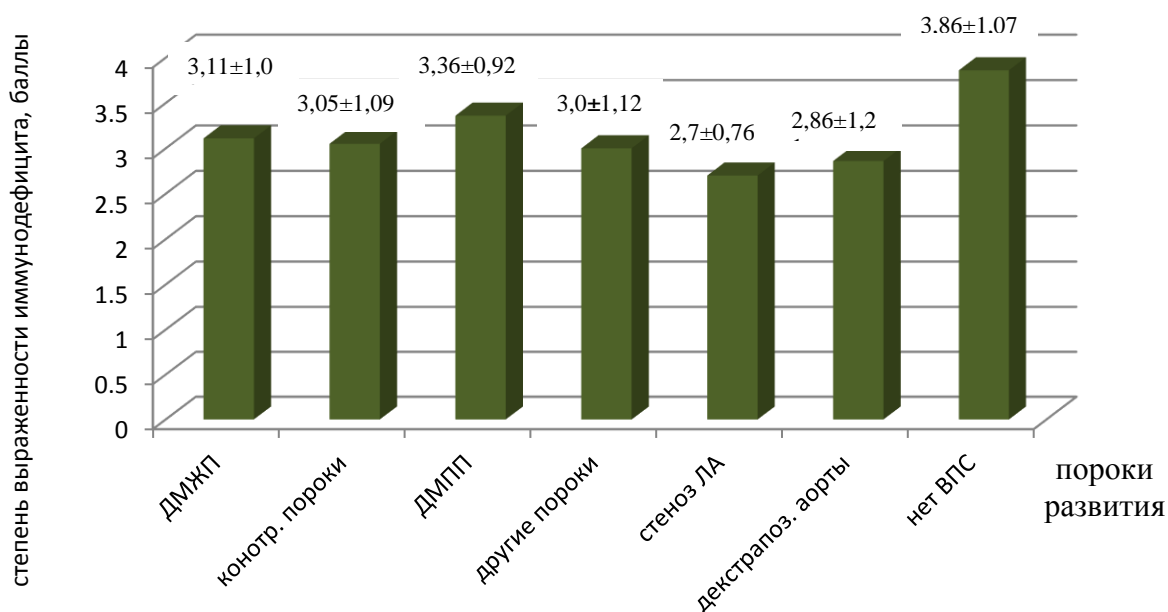


Рис. 6. Корреляция между пороками развития ССС и степенью выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД.

Из рис. 6 видно, что степень выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД и конотрункальными пороками сердца (второй столбец рис. 6) была сопоставима с таковой у пациентов с остальными врожденными пороками сердца. Мы отметили тенденцию к наихудшему варианту течения заболевания у пациентов с СДД и отсутствием порока ССС (последний столбец рис.6). Так, среди данной когорты пациентов – двое детей умерло, а у троих впоследствии диагностированы аутоиммунные заболевания. Это заставляет задуматься о необходимости тщательного обследования пациентов с СДД без врожденных пороков развития.

Изменения в иммунном статусе

Исследование гуморального иммунитета до начала заместительной терапии проведено всем 30 пациентам основной группы. Концентрация IgA была значительно снижена у 9 (30%) пациентов. У остальных детей концентрация IgA находилась в пределах нормы или выше нормальных значений (см. рис. 7, а). Концентрация IgM была ниже возрастной нормы у 14 (46,7%) детей. У 4 (13,3%) детей этот показатель находился на нижней границе нормы (рис.7, б). Концентрация IgG находилась в пределах нормальных значений у 27 (90%) детей (рис. 7, в).

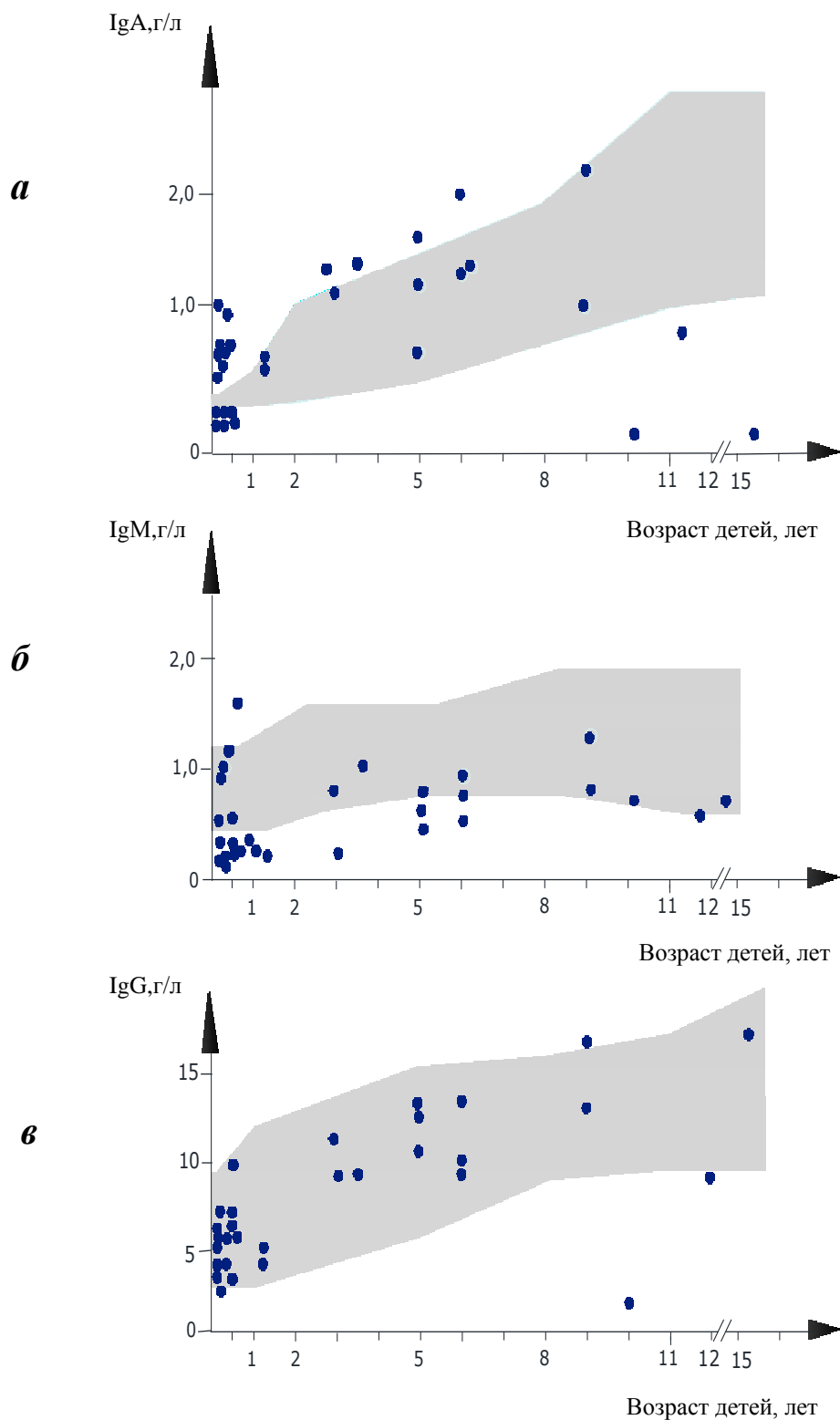


Рис. 7. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови: *а* – IgA, *б* – IgM, *в* – IgG у пациентов с СДД до начала проведения заместительной терапии. Здесь и на рис. 8-9: серая область обозначает возрастные нормы.

Изменения в клеточном звене

У 22 (73,3%) пациентов абсолютное количество Т-лимфоцитов было ниже нормы (рис. 8, *а*). При исследовании субпопуляций Т-лимфоцитов значительное снижение абсолютного количества CD4⁺Т-лимфоцитов выявлено у 22 (73,3%) пациентов (рис. 9, *а*), значительное снижение абсолютного количества CD8⁺лимфоцитов – у 23 (76,7%) пациентов (рис. 9, *б*). Несмотря на то, что СДД ранее считался Т-клеточным иммунодефицитом, у 6 (20%) пациентов абсолютное количество В-лимфоцитов было снижено. В то же время у 10 (33,3%) детей абсолютное количество В-лимфоцитов было значительно выше нормы или находилось на верхней границе нормы (рис. 8, *б*).

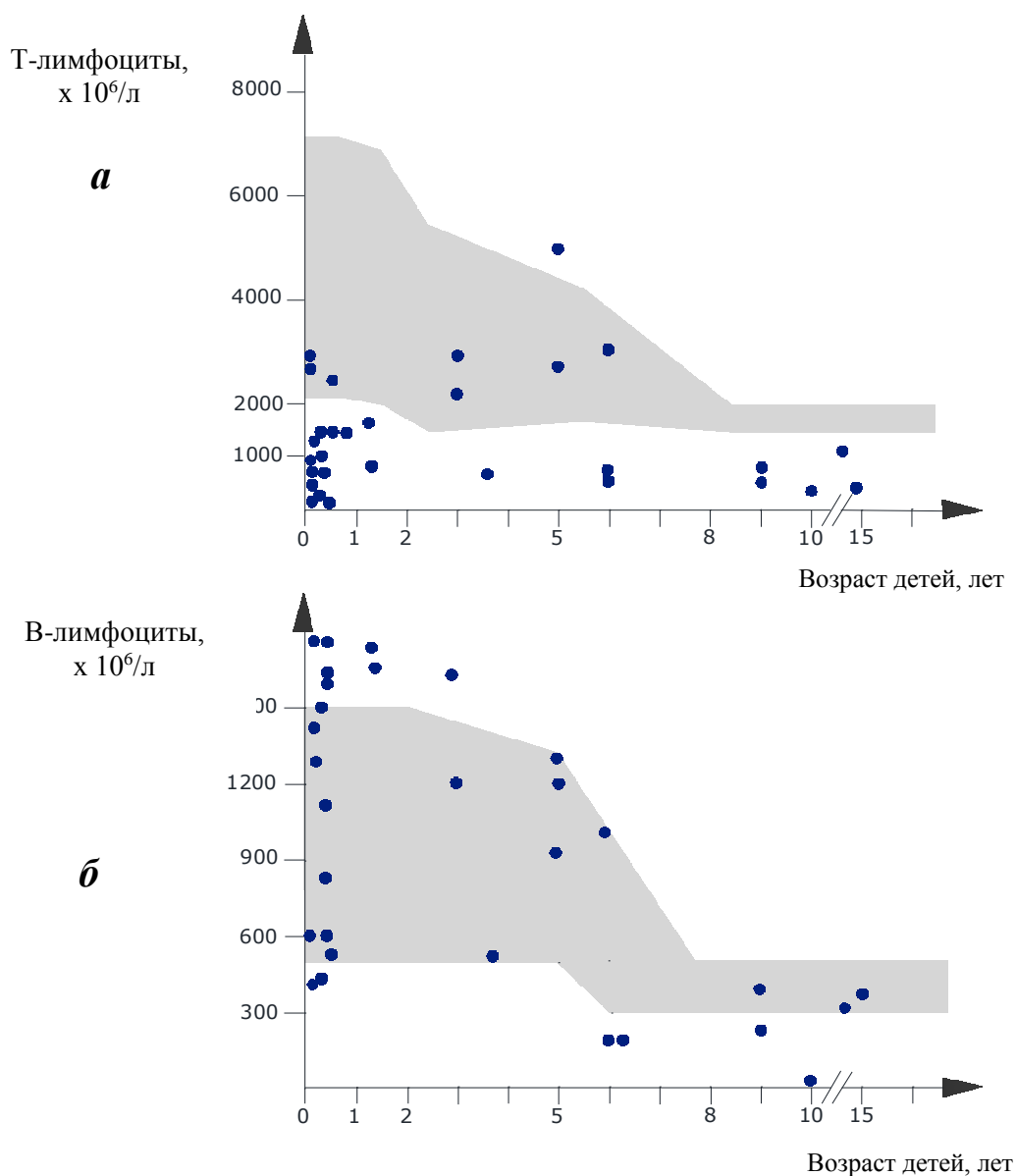


Рис. 8. Абсолютное количество Т-лимфоцитов (*а*) и В-лимфоцитов (*б*) в периферической крови пациентов с СДД.

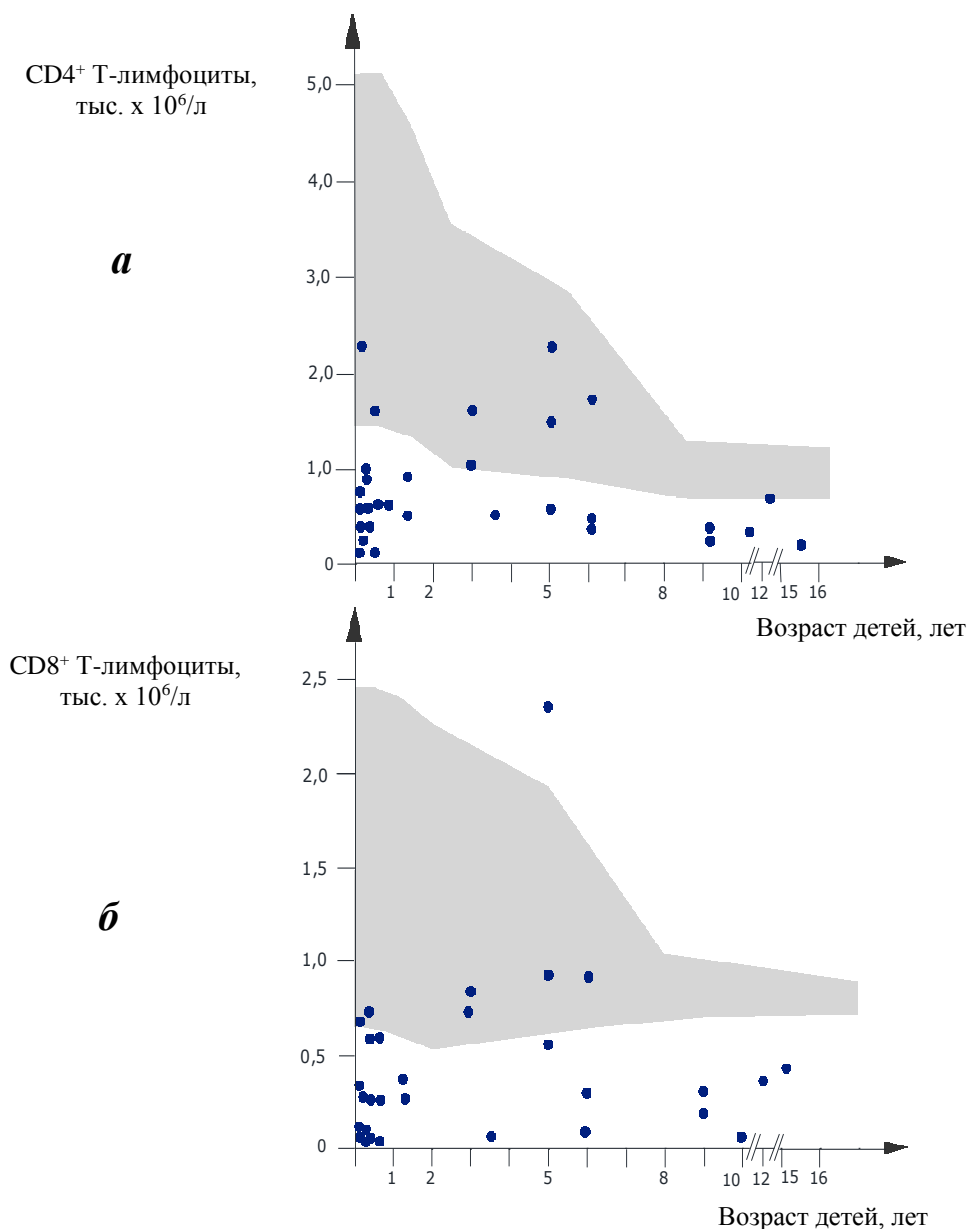


Рис. 9. Абсолютное количество субпопуляций CD4⁺ (а) и CD8⁺ (б) Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с СДД.

Изменения в митогенном ответе

Митогенный ответ Т-лимфоцитов исследовали у 21 (70%) пациента. Выявлено, что только у 2 (9,5%) пациентов митогенный ответ был в норме. Несмотря на то, что у некоторых (7 пациентов или 33,3%) из обследованных пациентов отмечалось нормальное количество Т-лимфоцитов, у подавляющего большинства (90,5%) детей с СДД митогенный ответ был значительно снижен (рис. 10).

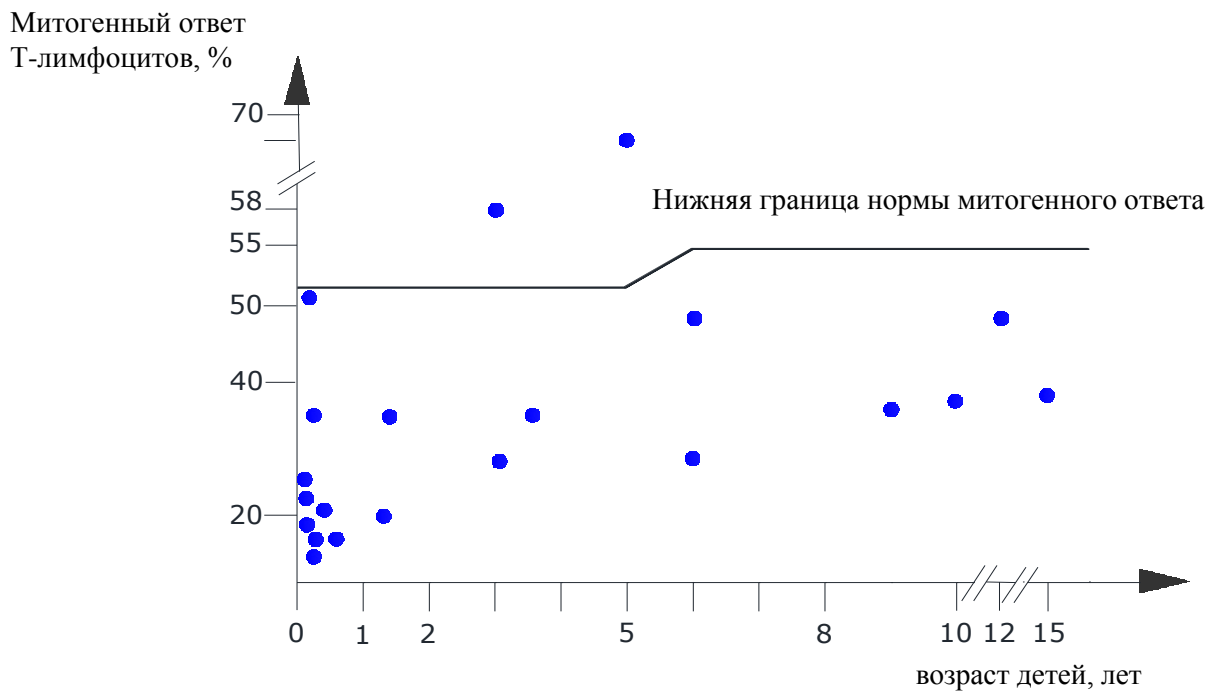


Рис. 10. Митогенный ответ Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с СДД относительно нижней границы нормы.

Изменение количества TREC и KREC у пациентов с СДД

Измерение количества TREC и KREC было проведено 21 пациенту с СДД. Тринадцать человек имели сниженные значения TREC, 6 из них – сниженное количество TREC и KREC менее 10^3 копий $\times 10^5$ клеток (рис. 11). Для оценки степени выраженности иммунодефицита и проведения корреляций мы использовали балльную систему, разработанную ранее:

- 5 баллов — смерть пациента;
- 4 балла — наличие у пациента аутоиммунного заболевания и тяжелых инфекционных осложнений;
- 3 балла — пациенты с многократными инфекционными осложнениями;
- 2 балла — пациенты со средним и высоким уровнем резистентности к инфекциям;
- 1 балл — отсутствие инфекционной заболеваемости, присутствие только лабораторных признаков иммунодефицита;
- 0 баллов — отсутствие каких-либо лабораторных и клинических проявлений.

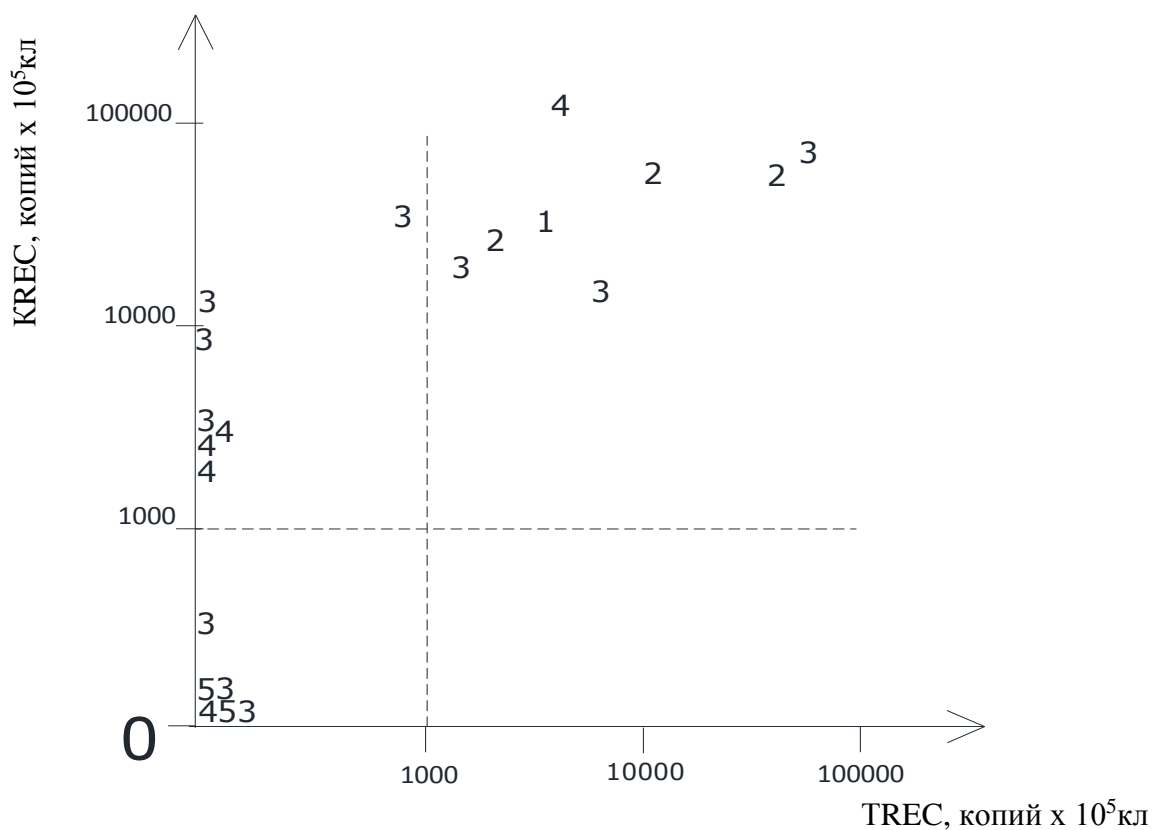


Рис. 11. Корреляция между степенью выраженности иммунодефицита и количеством KREC и TREC у пациентов с СДД.

Примечание: 1, 2, 3, 4, 5 – баллы в оценке степени выраженности иммунодефицита.

Из анализа данных на рис. 11 очевидно, что наихудший прогноз в виде летальности (5 баллов по нашей шкале) имеют пациенты со сниженным количеством TREC и KREC (менее 10^3 копий на 10^5 клеток). Подавляющее число пациентов с аутоиммунными осложнениями (4 балла по нашей шкале) находятся в области рисунка с минимальным количеством TREC. Пациенты с тяжелыми инфекционными осложнениями, но без аутоиммунной патологии (3 балла по нашей шкале) находятся в нескольких областях рисунка 11, однако в зоне с низкими значениями TREC этих пациентов больше (7 против 3). Пациенты с оценкой 2 балла и 1 балл, имеющие самое благоприятное течение и прогноз по заболеванию, находятся в пределах удовлетворительных значений TREC и KREC (рис.11).

Также мы попытались установить, существует ли корреляция между количеством TREC, T-лимфоцитов и степенью выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД. На рис. 12 видно, что пациенты с наихудшим прогнозом заболевания (4 и 5 баллов по нашей шкале) находятся в области рисунка со сниженным количеством TREC менее 10^3 копий $\times 10^5$ клеток и T-лимфоцитов менее 1000 кл/мкл.

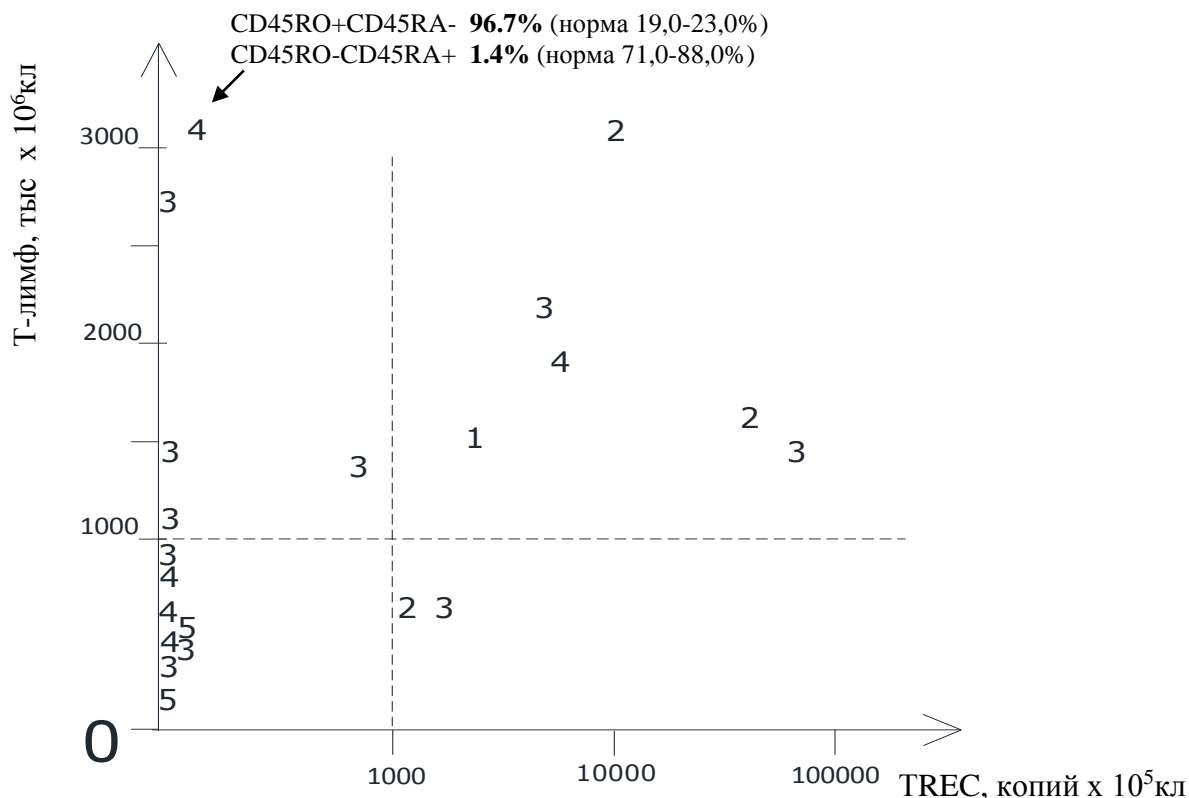


Рис. 12. Корреляция между степенью выраженности иммунодефицита, количеством TREC и Т-лимфоцитов у пациентов с СДД.

Примечание: 1, 2, 3, 4, 5 – баллы в оценке степени выраженности иммунодефицита

Обращает на себя внимание 1 пациент (4 балла по нашей шкале) с достаточно высоким количеством Т-лимфоцитов. При проведении расширенного фенотипирования у этого пациента обнаружилось, что основную часть его Т-лимфоцитов составляют Т-лимфоциты памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻) — 96,7%, в то время как количество наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD45RA⁺) значительно снижено и составляет 1,4% (рис. 12). С учетом этих выявленных данных, мы измерили количество Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-лимфоцитов и у других пациентов с СДД. Выяснилось, что у всех пациентов с СДД, кому было сделано расширенное фенотипирование, количество Т-лимфоцитов памяти было повышено, а количество наивных Т-лимфоцитов снижено. При этом более выраженные отклонения от удовлетворительных значений Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-лимфоцитов отмечались именно у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и инфекционными осложнениями (4 и 3 балла по нашей шкале), в то время как отклонения от нормы этих субпопуляций у пациентов с оценкой 1 и 2 балла по нашей шкале были незначительными.

Изменения в субпопуляциях Th1 и Th17 - лимфоцитов

Для более детальной оценки роли провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов в развитии аутоиммунной патологии мы выделили 2 группы пациентов среди основной и 2 среди контрольной выборки детей.

1-ая группа — пациенты с del22q11.2 без аутоиммунных осложнений

(12 человек);

2-ая группа — пациенты с del22q11.2 с аутоиммунными осложнениями

(5 человек);

3-я группа — контрольная группа пациентов с хр.ИТП

(5 человек);

4-ая группа — контрольная группа здоровых детей

(19 человек).

Первую группу представляли пациенты с СДД без аутоиммунных осложнений. Вторую группу составляли дети с СДД и аутоиммунными заболеваниями. У всех 5 пациентов этой когорты была зарегистрирована хр.ИТП, у 1 пациента в анамнезе отмечалась АИГА, у 2 детей одновременно с аутоиммунными цитопениями развились воспалительные заболевания кишечника — болезнь Крона и ЯК (рис. 13). В 3-ю группу были включены 5 пациентов без явных иммунодефицитных состояний, но с аутоиммунными проявлениями (хр. ИТП), и последнюю, четвертую группу, составила группа контроля из 19 здоровых детей (рис.13).

Проц. содержание
Th17- лимфоцитов
относительно
CD3⁺ Т-лимф, %

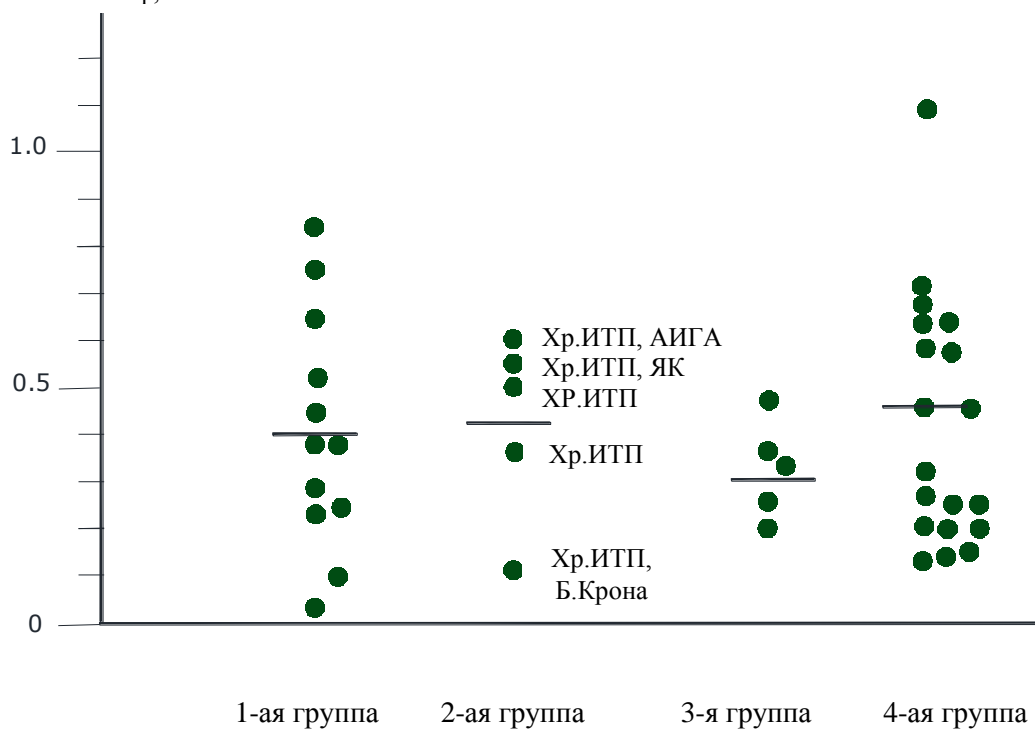


Рис. 13. Процентное содержание Th17-лимфоцитов по отношению к CD3⁺ Т-лимфоцитам периферической крови в различных группах пациентов.

Как видно из данных рис.13, количество Th17-лимфоцитов у детей с СДД не зависело от аутоиммунных осложнений и составило $0,40 \pm 0,24\%$ в 1-й группе и $0,42 \pm 0,2\%$ во 2-й группе ($p_{1-2} = 0,84$). Количество Th17-лимфоцитов у детей с СДД в обеих группах статистически значимо не отличалось от аналогичного показателя у здоровых детей — $0,44 \pm 0,26\%$ ($p_{1-4} = 0,68$; $p_{2-4} = 0,9$). Также мы не обнаружили статистически значимых различий в количестве Th17-лимфоцитов у детей с аутоиммунными проявлениями без del22q11.2 ($0,31 \pm 0,11\%$) и у здоровых детей ($0,44 \pm 0,26\%$; $p_{3-4} = 0,3$). Таким образом, мы пришли к заключению, что количество Th17-лимфоцитов не меняется в зависимости от наличия del22q11.2 и аутоиммунных осложнений.

При исследовании Th1-лимфоцитов мы обнаружили, что количество лимфоцитов этой субпопуляции у пациентов с СДД без аутоиммунных осложнений ($11,09 \pm 8,0\%$) статистически не отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе здоровых детей ($11,69 \pm 5,9\%$; $p_{1-4} = 0,8$) (рис. 14).

Проц. содержание
Th1- лимф. относительно
CD3⁺ Т-лимф, %

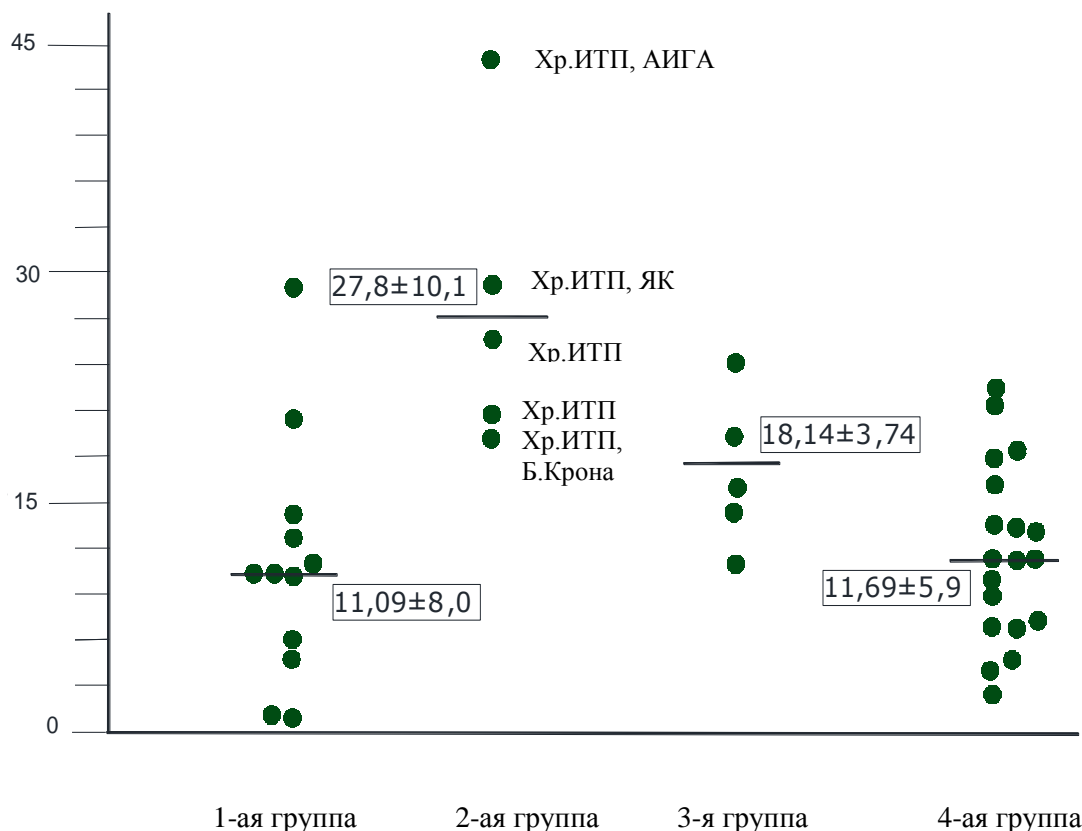


Рис. 14. Процентное содержание Th1-лимфоцитов по отношению к CD3⁺ Т-лимфоцитам периферической крови в различных группах пациентов.

Однако, при сравнении количества Th1-лимфоцитов в 1-й и 2-й группах пациентов, стало очевидно, что количество Th1-лимфоцитов статистически больше во 2-й группе (у пациентов с

СДД и аутоиммунными осложнениями), чем в 1-ой группе (у детей с СДД без аутоиммунных осложнений) ($11,09 \pm 8,0\%$ против $27,8 \pm 0,1$; $p_{1-2} = 0,002$), и чем у здоровых детей в 4-й группе ($27,8 \pm 0,1$ против $11,69 \pm 5,9$; $p_{2-4} = 0,00012$) (данные представлены на рис. 14).

Также на рис. 14 видно, что у пациентов 3-й группы (детей с хр. ИТП без иммунодефицита), было выявлено статистически более высокое количество Th1-лимфоцитов ($18,14 \pm 3,74\%$) по сравнению с пациентами 4-ой группы, то есть, со здоровыми детьми ($11,69 \pm 5,9\%$; $p_{3-4} = 0,03$).

Вышеперечисленное указывает на целесообразность своевременного всестороннего обследования и изучение иммунного статуса у пациентов с СДД, с целью раннего выявления дефектов в различных звеньях иммунной системы и уменьшения риска развития рецидивирующих тяжелых инфекций и аутоиммунных осложнений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается рост числа детей с подтвержденной del22q11.2, но без установленного развернутого клинического диагноза. Учитывая, что дети с врожденными иммунодефицитными состояниями имеют склонность к аутоиммунным и онкологическим заболеваниям, а также повышенный риск развития инфекционных процессов, чрезвычайно важной представляется ранняя оценка их иммунного статуса.

В немногочисленных работах, посвященных рассматриваемой проблеме, проанализированы лишь фенотипические особенности и отдельные показатели иммунной системы у детей с СДД. Однако полная клиничко-иммунологическая характеристика детей с СДД изучена в меньшей степени. В связи с этим, комплексная оценка иммунного статуса у пациентов с СДД представляется крайне важной для определения риска формирования тяжелых инфекционных осложнений и аутоиммунных заболеваний.

Учитывая вышеизложенное, были определены задачи исследования, основными из которых являлись: определение корреляции между клиническим фенотипом пациента с СДД и степенью выраженности иммунодефицита; описание иммунологических нарушений у детей с СДД; изучение количества субпопуляций Th1- и Th17-лимфоцитов и выявление корреляций с наличием del22q11.2 и риском развития аутоиммунных заболеваний у детей с СДД; оценка количества TREC и KREC и определение корреляций с течением заболевания; определение прогностических маркеров течения заболевания и развития аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД.

Для реализации поставленных задач обследовано 30 детей, составляющих основную группу. Шесть детей были включены позже, с целью проведения дополнительного

расширенного иммунологического обследования. Всем пациентам было выполнено молекулярно-генетическое исследование, диагноз СДД был подтвержден.

Для оценки степени выраженности иммунодефицита и проведения корреляций нами была разработана балльная система (А.Ю. Щербина, О.В.Швец, 2015):

- 5 баллов — смерть пациента;
- 4 балла — наличие у пациента аутоиммунного заболевания и тяжелых инфекционных осложнений;
- 3 балла — пациенты с многократными инфекционными осложнениями
- 2 балла — пациенты со средним и высоким уровнем резистентности к Инфекциям;
- 1 балл — отсутствие инфекционной заболеваемости, присутствие только лабораторных признаков иммунодефицита;
- 0 баллов — отсутствие каких-либо лабораторных и клинических проявлений;

Для более детальной оценки роли провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов в развитии аутоиммунной патологии, мы выделили 2 группы пациентов среди основной и 2 среди контрольной выборки детей:

- 1-я группа — пациенты с del22q11.2 без аутоиммунных осложнений;
- 2-я группа — пациенты с del22q11.2 и аутоиммунными осложнениями;
- 3-я группа — контрольная группа, с хр.ИТП (5 человек);
- 4-я группа — контрольная группа здоровых детей (19 человек);

Первоначально в нашей работе мы попытались выяснить, существует ли какое-либо количество пороков или дефекты развития органов и систем, определяющие дальнейшее течение СДД и прогноз заболевания: а именно, провести корреляцию между аномалиями развития и степенью иммунодефицита.

Для оценки корреляции между тяжестью иммунодефицита и количеством пороков развития мы принимали во внимание наиболее характерные и часто встречаемые врожденные дефекты у пациентов с СДД (пороки ССС, расщелину нёба и гипоплазию паращитовидных желез).

Логично предположить, что чем больше пороков развития у того или иного пациента с СДД, тем более выраженным будет иммунодефицит и хуже прогноз заболевания. Однако, на практике мы обнаружили, что бóльшая часть пациентов с максимальной степенью выраженности иммунодефицита и наихудшим прогнозом течения заболевания имеет минимальное (1) и среднее (2-3) количество врожденных пороков развития, что указывает на высокую необходимость тщательного иммунологического обследования пациентов при сочетании выраженного иммунодефицита и минимального количества дефектов развития.

Также мы хотели уточнить, есть ли корреляция между степенью выраженности иммунодефицита и различными дефектами развития. В ходе исследования мы обнаружили, что степень иммунодефицита не зависела от порока развития у пациентов с СДД. Примерно одинаковый уровень выраженности иммунодефицита мы наблюдали у наших пациентов и с ВПС, и с гипопаратиреозом, и с дисморфизмом, и с расщелиной неба. В процессе исследования мы отметили тенденцию к наихудшему прогнозу заболевания у детей с расщелиной неба. Так, из 6 детей один ребенок умер, трое пациентов имели аутоиммунные осложнения.

Мы также хотели выяснить, существует ли корреляция между течением заболевания и вариабельностью пороков ССС, особенно группой конотрункальных пороков. В ходе проведения исследования стало очевидно, что степень выраженности иммунодефицита у пациентов с СДД и конотрункальными пороками сердца была сопоставима с таковой у пациентов с остальными врожденными пороками сердца. Мы отметили тенденцию к максимальным проявлениям иммунодефицита у детей с отсутствием какого-либо порока со стороны ССС. Так, среди данной когорты пациентов – двое детей умерло, а у троих впоследствии диагностированы аутоиммунные заболевания. Это заставляет задуматься о необходимости тщательного обследования пациентов с СДД без врожденных пороков развития.

Анализируя инфекционную заболеваемость детей с СДД, мы выявили, что самым частым инфекционным проявлением являлась пневмония, которая регистрировалась в 73,3% случаев. Примерно у $\frac{1}{3}$ пациентов наблюдались рецидивирующие пневмонии. В 36,4% случаев на фоне пневмонии отмечалось развитие ателектазов. Двое детей имели хроническое двустороннее поражение легких с развитием пневмофиброза.

Изучая аутоиммунные осложнения у детей с СДД, мы обнаружили, что последние возникли у 5 (16,7%) пациентов из 30. Хр. ИТП отмечалась у всех пятерых детей. В дополнение к хр.ИТП имели место АИГА, ЯК и болезнь Крона. В исследовании, проведенном В. Tison et al (2011), также как и в нашей работе, было отмечено, что аутоиммунные цитопении у пациентов с СДД встречаются чаще, нежели другие аутоиммунные осложнения. Частота аутоиммунных проявлений в том исследовании составила 8,5%.

Исследуя гуморальный иммунитет, мы обнаружили, что концентрация IgA значительно снижена у 30% пациентов. Концентрация IgM ниже возрастной нормы отмечалась практически в половине случаев — у 14 (46,7%) детей. Концентрация IgG находилась в пределах удовлетворительных значений у 27 (90%) детей. Наши данные незначительно отличаются от выводов в исследовании, проведенном К.Patel (2012), обнаружившем, что 6% пациентов с СДД старше 3 лет имели гипогаммаглобулинемию.

Анализ клеточного иммунитета показал, что у 73,3% пациентов абсолютное количество Т-лимфоцитов было ниже нормы. При этом снижение количества CD4⁺Т-лимфоцитов и CD8⁺ Т-

лимфоцитов было выявлено в 73,3 и 76,7%, соответственно. В 20% случаев отмечалось снижение количества В-лимфоцитов. В то же время у 10 (33%) детей абсолютное количество В-лимфоцитов было значительно выше нормы или находилось на верхней границе нормы.

Измерение количества TREC и KREC было проведено 21 пациенту с СДД. Тринадцать человек (61,9%) имели сниженные значения TREC, 6 из которых — значительно сниженное количество TREC и KREC (менее 10^3 копий $\times 10^5$ клеток). С учетом проведенных нами исследований, обнаружено, что наихудший прогноз в виде летальности имели пациенты со сниженным количеством TREC и KREC менее 10^3 копий на 10^5 клеток. Подавляющее число пациентов с аутоиммунными осложнениями имели минимальное количество TREC. Пациенты с тяжелыми инфекционными осложнениями, но без аутоиммунной патологии (3 балла по нашей шкале) имели различное количество TREC, но все же у большинства из них отмечались низкие и минимальные значения TREC. Пациенты с оценкой 2 балла и 1 балл по нашей шкале, с самым благоприятным течением и прогнозом по заболеванию, имели удовлетворительное количество TREC и KREC. Подобные результаты в своем исследовании получила E. Fronkova et al (2014), выявив 4 пациентов с СДД с минимальными значениями TREC, имеющими в анамнезе рецидивирующие инфекции, заболевания аллергической природы и аутоиммунную патологию.

Мы попытались установить, существует ли корреляция между количеством TREC, содержанием Т-лимфоцитов и степенью тяжести иммунодефицита у пациентов с СДД, и обнаружили, что пациенты с наихудшим прогнозом заболевания (4 и 5 баллов по нашей шкале) имели количество TREC менее 10^3 копий $\times 10^5$ клеток и Т-лимфоцитов менее 1000 кл/мкл. Обратил на себя внимание 1 пациент (4 балла по нашей шкале) с достаточно выраженным количеством Т-лимфоцитов. При проведении расширенного фенотипирования у этого ребенка обнаружено, что основную часть его Т-лимфоцитов составляли Т-лимфоциты памяти ($CD3^+CD4^+CD45RO^+CD45RA^-$) — 96,7%, в то время как количество наивных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^+CD45RO^-CD45RA^+$) было значительно снижено и составляло 1,4%. С учетом выявленных нами изменений, мы измерили количество Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-лимфоцитов и у других пациентов с СДД. Выяснилось, что у всех обследованных количество Т-лимфоцитов памяти было повышено, а количество наивных Т-лимфоцитов снижено относительно референсных значений лаборатории. При этом более выраженные отклонения от удовлетворительных значений Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-лимфоцитов отмечались именно у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и инфекционными осложнениями, в то время как отклонения от нормы этих субпопуляций у пациентов без осложнений — были незначительными.

Мы также проанализировали количество Th17- и Th1-лимфоцитов у 17 детей с подтвержденной del22q11.2, с целью выявить корреляции между процентным содержанием

клеток вышеупомянутых субпопуляций и аутоиммунной патологией. Установлено, что количество Th17-лимфоцитов у детей с СДД не зависело от наличия аутоиммунных осложнений. Также не обнаружено статистически значимых различий в количестве Th17-лимфоцитов у детей с аутоиммунными проявлениями без микроделеции del22q11.2 ($0,31 \pm 0,11\%$) и у здоровых детей ($0,44 \pm 0,26\%$; $p_{3-4} = 0,3$). Таким образом, можно заключить, что количество Th17-лимфоцитов не меняется у пациентов с del22q11.2, а также при возникновении аутоиммунных осложнений по сравнению со здоровыми детьми.

При исследовании количества ИФН- γ продуцирующих Т-лимфоцитов мы обнаружили, что количество Th1-лимфоцитов у пациентов с СДД без аутоиммунных осложнений ($11,09 \pm 8,0\%$) не отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе здоровых детей ($11,69 \pm 5,9\%$; $p_{1-4} = 0,8$). Однако, при измерении количества ИФН- γ продуцирующих Т-лимфоцитов у пациентов с СДД и аутоиммунными осложнениями, оно было статистически больше, чем в группе пациентов с СДД без аутоиммунных осложнений и в группе здоровых пациентов — $27,8 \pm 10,16\%$ ($p < 0,05$), $11,09 \pm 8,0\%$ ($p < 0,05$) и $11,69 \pm 5,9\%$ ($p < 0,05$), соответственно. В группе пациентов с хр. ИТП без иммунодефицита также были выявлены более высокие значения Th1-лимфоцитов ($18,14 \pm 3,74\%$) по сравнению со здоровыми детьми ($11,69 \pm 5,9\%$; $p_{3-4} = 0,03$). Суммируя вышеизложенное и учитывая результаты проведенного нами исследования, мы предполагаем, что Th1-лимфоциты имеют непосредственное отношение к аутоиммунным проявлениям у пациентов с del 22q11.2. Подтверждением этого вывода является тот факт, что у пациентов с хр.ИТП без иммунодефицита также было выявлено более высокое количество Th1-лимфоцитов по сравнению со здоровыми детьми, хотя различия были менее выраженными по сравнению с количеством Th1-лимфоцитов у пациентов с СДД с аутоиммунными осложнениями и здоровыми детьми.

Исследования субпопуляций Т-лимфоцитов (в том числе и Th17- и Th1-лимфоцитов) у пациентов с СДД ранее проводились и зарубежом. В работе R.Zemble (2010), также, как и в нашем исследовании, не было выявлено достоверных различий в количестве Th17-лимфоцитов у пациентов с СДД по сравнению с группой контроля. Однако, было обнаружено преобладание Th1-лимфоцитов у пациентов с СДД младше трех лет по сравнению с группой контроля, что по мнению автора может приводить к повышенной инфекционной заболеваемости.

Таким образом, вышеперечисленное указывает на целесообразность своевременного всестороннего обследования пациентов с СДД, с обязательным исследованием анализов иммунологического профиля, с целью раннего выявления дефектов иммунной системы и уменьшения риска развития рецидивирующих тяжелых инфекций и аутоиммунных осложнений.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследования не было выявлено корреляции между количеством врожденных пороков развития, конкретным видом порока и тяжестью иммунодефицита у пациентов с СДД.

2. Повышенная инфекционная заболеваемость отмечена 76,6% детей с СДД. Среди заболеваний преобладали пневмонии (более 70%). Тяжелые жизнеугрожающие инфекции встречались в 46,6% случаев. Этиологическая структура была представлена бактериальными, вирусными, в том числе генерализованными (ЦМВ), и грибковыми заболеваниями. Аутоиммунные осложнения отмечались в 16,7% случаев. Среди аутоиммунных заболеваний зафиксированы хр.ИТП, АИГА, ЯК, болезнь Крона.

3. У 46,66% детей отмечались дефекты Т-клеточного звена иммунитета, у 10% — изолированно дефекты гуморального звена. У трети пациентов (33,3%) отмечался комбинированный дефект.

4. Количество IL17-продуцирующих лимфоцитов у детей не зависело от наличия микроделеции del22q11.2 и развития аутоиммунных осложнений. Повышение количества Th1-лимфоцитов (ИФН- γ продуцирующих лимфоцитов) относительно CD3⁺ Т-лимфоцитов выше порогового значения 27,8% коррелировало с развитием аутоиммунных осложнений.

5. У 56,6% пациентов были выявлены нулевые или низкие значения TREC (менее 10³ копий на 10⁵ клеток), у части этих пациентов (43,3%) также выявлено снижение количества KREC (менее 10³ копий на 10⁵ клеток), что характеризует СДД как комбинированное иммунодефицитное состояние. Наихудший прогноз по развитию аутоиммунных заболеваний и показателю летальности имели пациенты с нулевыми и низкими значениями TREC и KREC.

6. Процентное содержание Th1-лимфоцитов (ИФН- γ продуцирующих лимфоцитов) относительно CD3⁺лимфоцитов выше 27,8% может служить ранним прогностическим маркером развития аутоиммунного заболевания у пациентов с СДД. Пациенты со сниженным менее 10³ копий на 10⁵ клеток или нулевым количеством TREC и KREC имеют наихудший прогноз по течению заболевания в виде летальности, развитию тяжелых инфекционных осложнений и аутоиммунной патологии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Синдром ДиДжорджи у пациента следует предполагать с раннего возраста при наличии у него сниженной резистентности к бактериальным и вирусным инфекциям в сочетании с высоким уровнем стигматизации и одним или несколькими пороками развития (пороками развития ССС системы, расщелиной нёба, гипоплазией паращитовидных желез).
2. Расширенное иммунологическое обследование следует проводить всем пациентам с СДД с целью выявления дефектов в различных звеньях иммунной системы для определения степени тяжести иммунодефицита и прогноза заболевания.
3. Выявление нулевого или низкого (менее 10^3 копий на 10^5 клеток) количества TREC и KREC у пациентов с СДД позволяет говорить о наихудшем прогнозе заболевания в виде летальности, высоком риске развития тяжелых инфекционных осложнений и аутоиммунных заболеваний.
4. Обнаружение повышенного содержания Th1-лимфоцитов (ИФН- γ продуцирующих лимфоцитов) относительно CD3⁺лимфоцитов выше 27,8% рекомендуется использовать как прогностический маркер развития аутоиммунных осложнений у пациентов с СДД.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. O.Shvets. Revealling Children with DiGeorge Syndrome. ESID Junior Spring Meeting, Prague: 2008; 7
2. О.В.Швец, А.П. Продеус, Н.П. Котлукова, А.Ю.Щербина. Выявление и катамнез детей с синдромом ДиДжорджи. Вестник Российского Государственного Медицинского Университета 2008; 4 (63): 53.
3. О.В.Швец, А.П. Продеус, А.Ю. Щербина. Синдром делеции del22q11.2 (синдром ДиДжорджи): клинические и иммунологические аспекты патологии. Российский иммунологический журнал 2011; 5(14):101-111
4. K.Patel, J. Akhter, L. Kobrynski, B. Gathman, O.Davis, K.Sullivan on behalf of the International DiGeorge Syndrome Consortium (Olesya Shvets et al). Immunoglobulin Deficiencies: The B-lymphocyte Side of DiGeorge Syndrome. The Journal of Pediatrics. 2012; 161 (5): 950-952
5. O.V.Shvets, N.V.Davydova, S.B.Zimin, A.P.Prodeus, A. Shcherbina. Proinflammatory Cytokine Expression in T-cells of children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. Journal of Clinical immunology 2012; 32 (Suppl 1):S1-S379, 191 (15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Florence, Italy, 2012);

6. О.В.Швец, Н.В.Давыдова, С.Б.Зимин, Н.П.Котлукова, К.А.Бочарова, А.П. Продеус, А.Ю.Щербина. Клинические и лабораторные проявления дефектов иммунной системы у пациентов с синдромом del22q11.2 (синдромом ДиДжорджи). Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2013; 12(4): 23-30
7. N.V.Davydova, O.V.Shvez, A.S.Smirnova, M.A.Gordukova, O.V.Barabanova, S.B.Zimin, N.V.Zinovieva, I.A.Korsunskiy, A.P.Prodeus. Autoimmune complications in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Barcelona, Spain, 2016;

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВПС – врожденный порок сердца

ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки

ДМПП – дефект межпредсердной перегородки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФН- γ – интерферон γ

ЛА – легочная артерия

СДД – синдром ДиДжорджи

ТФ – тетрада Фалло

Хр.ИТП – хроническая иммунотромбоцитопеническая пурпура

ЦМВ – цитомегаловирусная инфекция

ЯК – язвенный колит

IgA – иммуноглобулин А

IgM – иммуноглобулин М

IgG – иммуноглобулин G

IL-17 – интерлейкин 17

KREC- kappa- deleting recombination excision circle рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента

TREC – T cell receptor (TCR) excision circles – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора

Th1- лимфоциты – Т-лимфоциты, продуцирующие ИФН- γ

Th17- лимфоциты – Т-лимфоциты, продуцирующие интерлейкин-17