

## ОСОБЕННОСТИ СТАНОВЛЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМ ПОРОКОМ СЕРДЦА\*

В.А. Четвертных, *Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера*  
 Н.П. Логинова, *Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера*  
 Д.Ю. Шилов, *Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера*  
 А.П. Годовалов, *Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера*  
 О.В. Лебединская, *Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера*  
 Е.В. Сайдакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Проведен комплексный динамический анализ основных компонентов иммунной системы у детей с врожденными пороками сердца (ВПС) разной степени сложности с использованием современных иммунологических, иммунохимических, гистологических, гистохимических, цитохимических и электронно-микроскопических методов исследований. Установлено, что у детей с ВПС к моменту рождения имеется значительная функциональная незрелость первичного органа иммунитета – тимуса, особенно при сложных пороках сердца. Данный факт отражается на пролиферации и дифференцировке тимоцитов как *in vivo*, так и *in vitro*. Вследствие этого уже с рождения в крови больных детей снижен уровень наивных Т-лимфоцитов. После перенесенной тимэктомии в течение 3 лет растет апоптоз циркулирующих лимфоцитов (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), снижаются и фагоцитарные свойства клеток врожденного иммунитета. Полученные результаты отражают несостоятельность системы иммунитета у детей с врожденными пороками сердца.

**Ключевые слова:** *врожденный порок сердца, дети, тимус, иммунитет.*

Врожденные пороки сердца (ВПС) являются одной из самых распространенных аномалий у детей. Частота ВПС составляет до 30 % от всех пороков развития [1, 2, 6, 10]. По результатам официальных статистических данных, ежегодно в России регистрируется более 20 тыс. случаев врожденных пороков сердца разной степени сложности у детей, из них 75 % нуждаются в оперативной коррекции порока. Дети с ВПС подвержены раз-

личным заболеваниям вследствие имеющегося у них иммунного дисбаланса [3, 7, 11, 14]. Как правило, в послеоперационном периоде основная задача врача кардиолога и педиатра направлена на адаптацию сердечно-сосудистой системы ребенка. Оценка же иммунной системы этой категории больных в динамике не проводится.

Известно, что судьбу иммунной системы в детском возрасте определяет состоя-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 11-04-96023-р\_урал\_a).

ние первичного органа иммунитета – тимуса. Нарушение его структуры и функции при различных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы может являться причиной развития акцидентальной инволюции органа, определяя дефектное состояние иммунной системы в целом [4, 5, 8]. Нами были изучены особенности раннего постнатального состояния тканей тимуса у детей с врожденными пороками сердца. В послеоперационном периоде в динамике 3 лет определен иммунный статус данной категории детей.

*Цель работы* – изучить особенности морфофункционального состояния иммунной системы у детей с врожденными пороками сердца в до- и послеоперационном периодах их жизни.

*Материалы и методы.* Для осуществления поставленной задачи впервые был проведен комплексный динамический анализ основных компонентов иммунной системы с использованием современных иммунологических, иммунохимических, гистологических, гистохимических, цитохимических и ультрамикроскопических методов исследований.

Исследовано 70 образцов тимуса от детей в возрасте до 1 года. Тимэктомия проводилась в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. В зависимости от степени тяжести сердечного порока дети разделены на 2 группы: с сильными (синими) пороками (n=33) – тетрада Фалло, транспозиция магистральных сосудов, аномалия Эбштейна, и слабыми (белыми) пороками (n=38) – дефектами межжелудочковой и межпредсердной перегородок.

На до- и послеоперационном этапе у детей (n=75) обследована кровь. Сформировано 5 групп по 15 человек в каждой: 1-я – группа сравнения (здоровые дети); 2-я – кровь у детей с ВПС до тимэктомии (перед операцией); 3-я – кровь у детей через 1 год после тимэктомии; 4-я – кровь у детей через 2 года после тимэктомии; 5-я – кровь у детей через 3 года после тимэктомии.

Оценка морфофункционального состояния тимуса проводилась с помощью гистологических методов. Образцы материала фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,2). Срезы окрашивали гематоксилином-эозином; на выявление соединительнотканых элементов – по ван Гизону; на тучные клетки – по Шубичу; ретикулярные волокна – по Футу.

Иммуногистохимическими методами состояние лимфоидных и нелимфоидных компонентов тимуса оценивали, используя моноклональные антитела: CD3, CD4, CD8, CD68, CD31-PECAM-1, CD34, Ki-67, Vcl-2, коллаген IV, виментин, PanCytokeratin (Pan-CK AbsAE1/AE3), цитокератин 5/14, цитокератин 8/18 (производство «Дасо», США). Визуализацию результатов проводили с использованием системы детекции «Ultra Vision ONE Detection System HRP Polymer». Инкубировали с хромогеном DAV Plus Substrate System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в БиоМаунт-среду. Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (фирма «Labvision», США).

Для получения полутонких срезов кусочки тимуса размером 1–2 мм<sup>3</sup> фиксировали в 10 % растворе глутарового альдегида и 1 % растворе OsO<sub>4</sub>, дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в аралдитовые смолы. Готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим.

Съемку препаратов проводили на морфометрической установке «Olympus» с последующим анализом полученных изображений в программе IMAG PRO+ (free version).

Функциональные свойства тимоцитов изучали путем оценки пролиферативной активности клеток (*in vitro*). В качестве Т-клеточного митогена использовали конканавалин А (КонА) (Concanavalin A from Canavalin ensiformis, Sigma, США) в концентрациях 40, 20, 10, 5 и 2,5 мкг/мл.

Бластогенез Т-лимфоцитов оценивали по включению метки НЗ-тимидин.

Для определения изменения пролиферативного ответа лимфоцитов в культуры вносили insulin-like growth factor-I (Sigma, США) в концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  М, somatotropin (Sigma, США) в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  М. Все исследования сопровождалось постановкой контролей: 1) пробы без гормональных препаратов и митогенов; 2) пробы только с внесением митогенов.

Для оценки поликлональной тимусзависимой продукции цитокинов культивирование тимоцитов с КонА 5 мкг/мл осуществляли в аналогичных условиях в течение 72 ч. Исследование концентрации цитокинов в супернатантах культур проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем согласно инструкции производителя («Интерферон гамма», Вектор-Бест, Новосибирск; «Интерлейкин 4», Вектор-Бест, Новосибирск; «Интерлейкин 10», Вектор-Бест, Новосибирск; «Интерлейкин 17», Вектор-Бест, Новосибирск).

Исследование ДНК проводили в цельной крови в объеме 1 мл с использованием набора реагентов «KR-012» фирмы «OMNIX» (Россия) согласно инструкции производителя. Общую концентрацию ДНК и степень ее контаминации белком определяли спектрофотометрически на длинах волн 260 и 280 нм (UVmini 1240 «Shimadzu», Япония). Расчет осуществляли на основе соответствующих коэффициентов экстинкции общепринятым методом [13].

С целью стандартизации метода получен калибровочный образец ДНК (концентрация 275 мкг/мл, соотношение показателей светопоглощения на длинах волн 260 и 280 нм – 1,91). Калибратор являлся смесью ДНК, полученной от 7 добровольных доноров разного пола в возрасте от 2 до 4 лет.

Для расчета количества TREC применяли математический метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [12]. В качестве референса [9] использована ге-

номная последовательность  $\beta$ -актина (набор 401846 –  $\beta$ -actin control reagents, «Applied Biosystems», США). Амплификация целевого и референсного генов проводилась отдельно.

Реакцию осуществляли на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) по программе: 95 °C – 180 с (1 цикл); 61 °C – 20 с, 70 °C – 10 с, 95 °C – 15 с (50 циклов). Уровень флуоресценции измеряли при температуре 70 °C в каждом цикле амплификации.

Использовали прямой праймер TCR2: 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT; обратный праймер TCR2: 3'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG; флуоресцентный зонд TCR2: FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGT GCCCACT-BHQ1.

Выделение мононуклеаров из периферической крови производили путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла («Диа-М»). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали средой RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева.

Спонтанный апоптоз лимфоцитов исследовали, используя набор «Annexin V-FITC/7-AAD» (IM3614, «Beckman Coulter Company», США), согласно инструкции производителя. Субпопуляционное разделение апоптотических клеток выполняли с помощью коммерческих антител к поверхностным антигенам CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, конъюгированных с фикоэритрином («Beckman Coulter Company», США). Протоочно-цитофлюориметрический анализ проводили на приборе FACSCalibur («Becton Dickinson», США) с использованием коммерческого пакета программ сбора и анализа данных CellQuestPro. Наличие спонтанного апоптоза лимфоцитов определяли путем вычитания из общего количества CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) клеток в гейте лимфоцитов числа 7-AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) клеток и количества Annexin V– CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) клеток. Исследование фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов проводили с использованием *S. aureus* штамма Cowan I. Обезвреженный формалином стафилококк

(«Пермское НПО «Биомед») трехкратно отмывали 0,15М NaCl, центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин и окрашивали флюоресцеина изотиоцианатом (FITC; Sigma, США) по общепринятой методике. Концентрацию стафилококка определяли фотометрически при 600 нм относительно стандартов мутности. Поглощительную активность лейкоцитов изучали в цельной крови. Оценку поглощения FITC-меченого стафилококка проводили по общепринятой методике на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). По полученным результатам рассчитывали следующие показатели: 1) фагоцитарный индекс (ФИ) – процент клеток, поглотивших стафилококки; 2) фагоцитарное число (ФЧ) – отношение средней интенсивности флюоресценции одного поглотившего стафилококки фагоцита к средней интенсивности флюоресценции FITC-меченой бактериальной клетки; 3) интегральный показатель поглощения (ИПП) – число бактерий, поглощенных 100 нейтрофилами (ИПП=ФЧ×ФИ).

Полученные данные подвергали статистической обработке в программе Statistica 7.0.

*Результаты.* В норме тимус, как первичный орган иммуногенеза, создает оп-

тимальные условия для качественного созревания Т-лимфоцитов. У детей с ВПС установлено, что морфологические изменения в органе зависели от степени тяжести сердечного порока. При сложных пороках в органе имелись значительные расстройства кровообращения, сопровождающиеся расширением и переполнением сосудов кровью, с мелкоочаговыми кровоизлияниями в ткани, а также одиночно или расположенные группами тучные клетки. В этих местах был резко выражен отек стромы и соединительнотканых структур. В междольковой соединительной ткани избыточно развивалась жировая ткань, представленная крупными и мелкими скоплениями vimentin-позитивных адипоцитов. На полутонких срезах имелись признаки дистрофических изменений клеток стромы с нарушением их связи с лимфоцитами («зоны отчуждения»), что приводит к гнезднему опустошению коры долек (рис. 1).

На этом фоне активизировались клетки фибробластического дифферона с положительной экспрессией к CD34<sup>+</sup> и виментину, характерных для прогениторных клеток мезенхимального происхождения и нередко сопровождающихся в таких участках активным неоваскулогенезом (рис. 2).

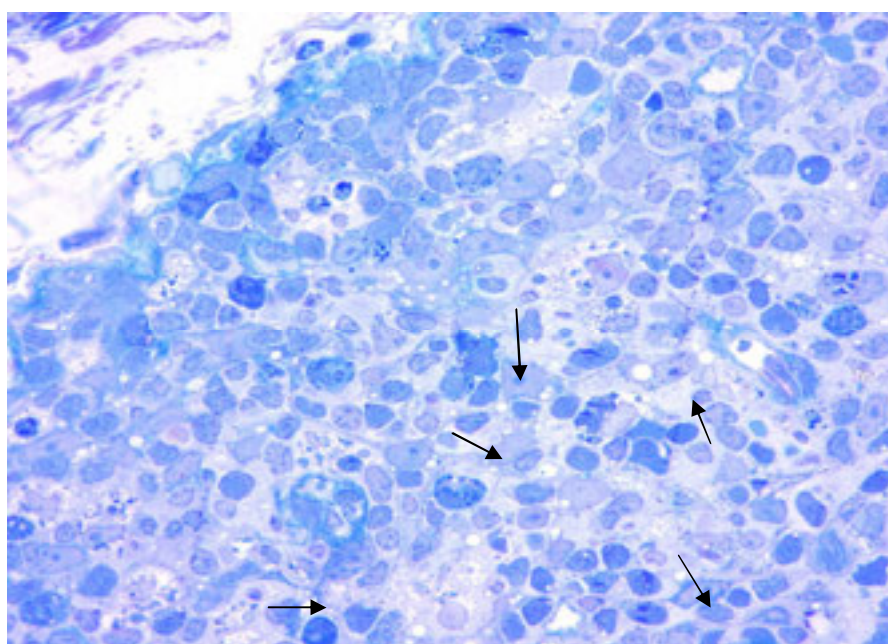


Рис. 1. Дистрофические изменения тимусных эпителиальных клеток в коре дольки. Полутонкий срез, окр. толуидиновым синим. ×900

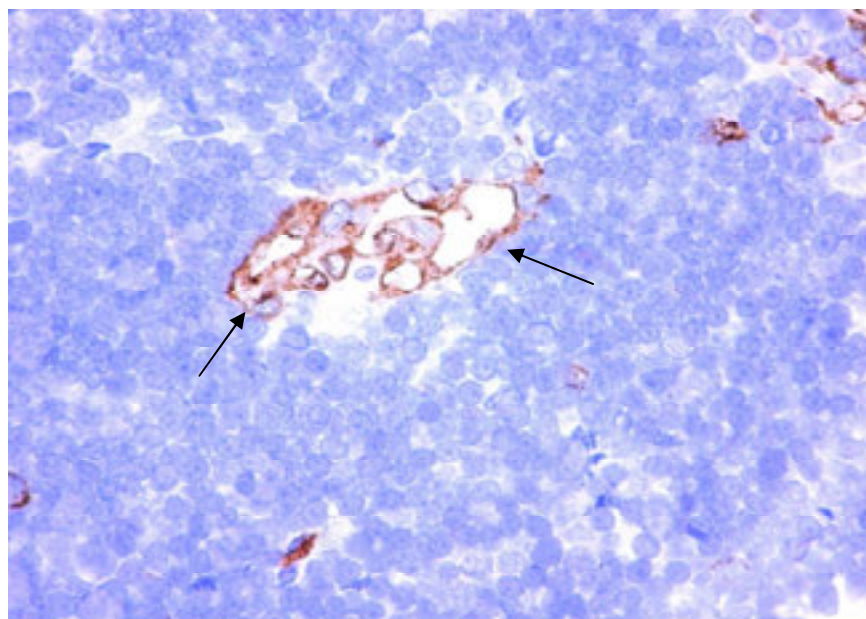


Рис. 2. Экспрессия CD34<sup>+</sup> в клетках фибробластического дифферона. Неоваскулогенез. ×600

У детей со слабыми пороками в тимусе наблюдали аналогичные морфологические изменения, но выраженные в меньшей степени.

Структурные изменения тимуса проходили при параллельной устойчивости лимфоцитов к апоптозу, что влияло на их пролиферативные свойства. Подтверждением этому служила активность генов bcl-2 в клетках коркового вещества долек тимуса. У детей с сильными ВПС экспрессия bcl-2 в цитоплазме клеток увеличивалась по направлению от субкапсулярной к кортикомедуллярной зоне. В субкапсулярной зоне у них доля bcl-2-положительных лимфоцитов составляла 32,2±6,1 %, у детей со слабыми пороками – 41±3,8 %. В кортикальной части дольки в участках нахождения дубль-положительных лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) экспрессия bcl-2 определялась в диффузно расположенных лимфоцитах и у детей с сильными пороками она была в 2 раза выше (18,6±2,9 %), чем у детей со слабыми пороками (9,8±3,0 %). От мозгового вещества в сторону коры (чего никогда не имеется в норме) формировались крупные скопления bcl-2 положительных лимфоцитов. При окрашивании срезов по Футу в кортикомедуллярной зоне наблюдали

нарушение структуры гематотимического барьера (рис. 3), что и способствовало миграции лимфоцитов из мозговой части дольки в корковое вещество.

Для верификации в тимусе стромального компонента использовали PanCK, включающий в себя широкий спектр цитокератинов, специфически реагирующих с нейтральными и кислыми кератинами эпителиальных клеток. В результате положительная экспрессия PanCK позволила идентифицировать весь эпителиальный компонент в тимусе. В корковом и мозговом веществе долек PanCK в эпителиальных клетках выявлялся с разной интенсивностью. Ярко накапливался в клетках, прилежащих к базальной мембране дольки тимуса. Клетки имели крупное светлое ядро, занимающее большую часть цитоплазмы. Отростки этих клеток формировали контакты друг с другом на всем протяжении базальной мембраны, формируя ровный непрерывный пласт, продолжающийся в междольковые прослойки. Экспрессия PanCK в субкапсулярной и в основной части коры дольки отличалась и зависела от степени выраженности сердечного порока. В субкапсулярной зоне при слабо выраженных сердечных пороках PanCK накапливался рав-

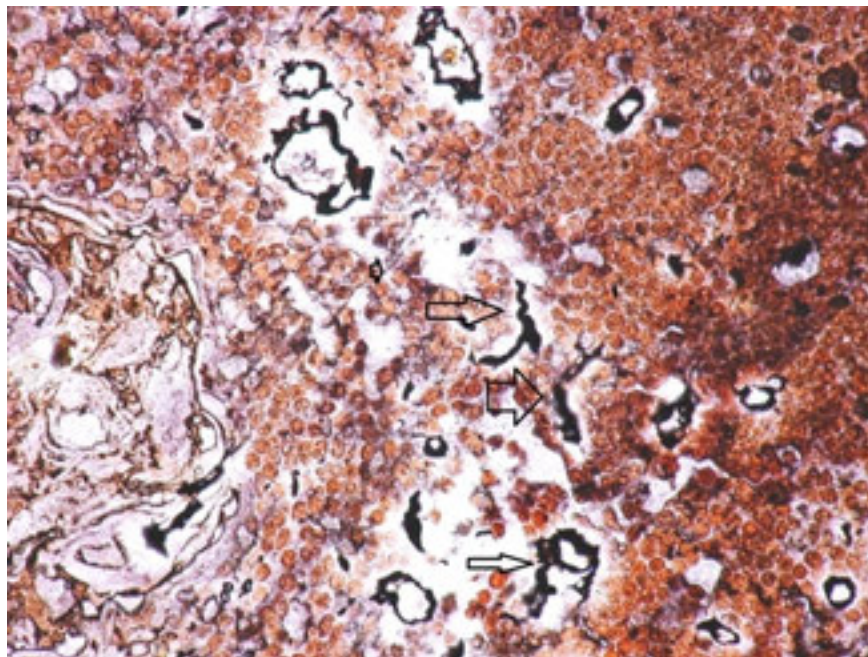


Рис. 3. Фрагменты сети ретикулярных волокон в кортикомедулярной зоне. Окр. по Футу.  $\times 400$

номерно. В большинстве долек эпителиальные клетки, соединяясь отростками, формировали подобие сети (кластеры), контактируя с лимфоцитами на этапе их развития (рис. 4).

В пределах коркового вещества доля кластеров составила  $44,66 \pm 2,29\%$ . Кластеры состояли из  $325,34 \pm 35,39$  объектов,

представленных тимусными эпителиальными клетками (ТЭК), экспрессирующими PanCK. В кортикальной зоне ТЭК не везде формировали кластеры. В части долек сеть местами была нарушена, клетки теряли контакт друг с другом, что приводило к формированию изолированных скоплений ТЭК ( $52,33 \pm 4,08\%$ ). В полу-

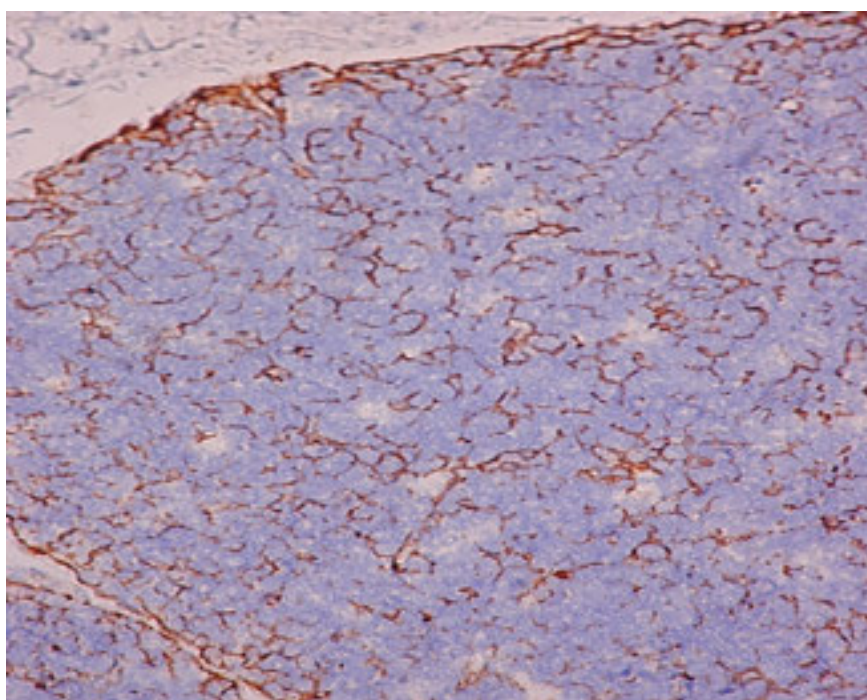


Рис. 4. Экспрессия PanCK в группе со слабыми пороками

тонких срезах эпителиальные клетки имели умеренные признаки дистрофических изменений, приводящие к потерям межклеточной связи и, как следствие, формированию зон клеточной дезорганизации. В глубокой коре, вблизи к кортикомедулярной границе, экспрессия PanCK вновь интенсивно регистрировалась в отростчатых клетках, формирующих несколько слоев эпителиального ретикулума.

При сложных сердечных пороках положительная экспрессия PanCK верифицировалась преимущественно на уровне базальной мембраны и субкапсулярной части коры дольки тимуса. В основной части коры дольки экспрессия PanCK была резко снижена, выявлялась эпизодически, фрагментарно или вообще отсутствовала (рис. 5).

Количество кластеров достоверно снижалось по отношению к группе детей со слабыми пороками, составило  $22,00 \pm 2,25$  % ( $p=0,001$ ). Кластеры были представлены меньшим количеством объектов –  $195,81 \pm 18,35$  ( $p=0,005$ ), но доля одиночно расположенных эпителиальных клеток была больше ( $64,33 \pm 3,79$  %,  $p=0,02$ ), чем в группе со слабым развитием пороков.

Состояние стромы влияло на процессы пролиферации и дифференцировки тимоцитов. В связи с этим проведена оцен-

ка их пролиферативной активности *in vivo* и *in vitro*.

При изучении пролиферативной способности клеток *in vivo* положительная экспрессия Ki-67 в срезах выявлялась в диффузно расположенных лимфоцитах в пределах всей дольки тимуса.

При сравнении двух групп детей доля тимоцитов, экспрессирующих Ki-67, статистически в обеих группах не отличалась и была равна  $51,0 \pm 2,2$  % в 1-й группе и  $52,2 \pm 3,1$  % – во второй. Однако доля клеток находящихся на стадии S-периода, во 2-й группе была выше, чем в 1-й, на  $63,3 \pm 5,8$  %. На наш взгляд, это связано с задержкой этапов дифференцировки лимфоцитов из-за выраженного процесса деструкции эпителиальных клеток стромы. Действительно, на полутонких срезах выявлялись значительные признаки дистрофических изменений клеток стромы, что приводило к нарушениям их связи между собой и с лимфоцитами и гнезднему опустошению коркового вещества долек. В этих участках накапливались активные макрофаги с многочисленными вакуолями светлого или пенистого характера и фагоцитированным материалом. На уровне субкапсулярной части тимоциты теряют контакты прежде всего с эпителиаль-

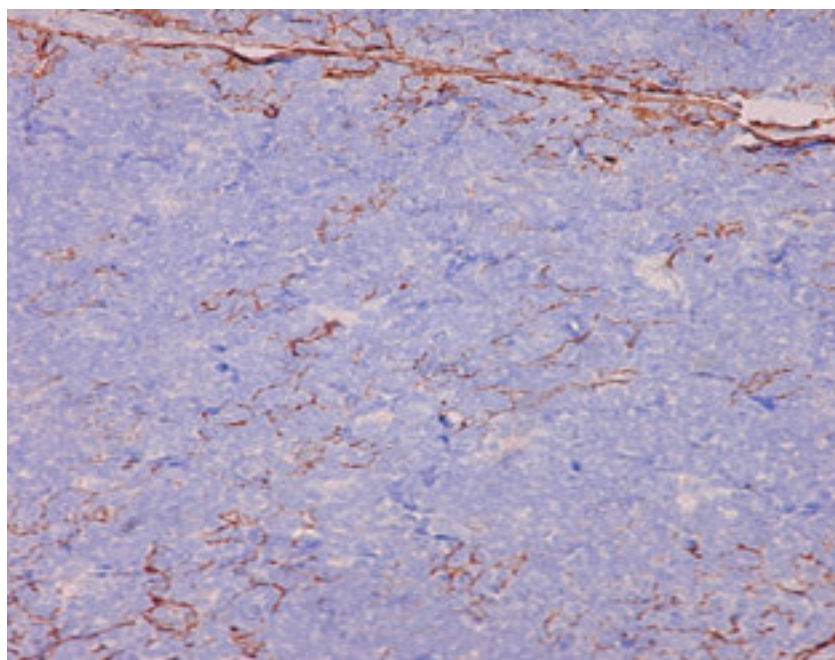


Рис. 5. Экспрессия PanCK в группе с сильными пороками

ными клетками, секретирующими IL-7.

Следовательно, деструкция и гибель ТЭК существенно влияют на пролиферацию лимфоцитов.

Влияние гормонов на пролиферацию тимоцитов *in vitro* выявило, что независимо от степени выраженности врожденного порока происходит снижение пролиферативных свойств тимоцитов (рис. 6, 7). Так, установлено, что под влиянием insulin-like growth factor-I (IGF) в концентрации  $10^{-9}$  М в культурах с Кон А 40 и 20 мкг/мл пролиферация тимоцитов достоверно ( $p=0,05$ ) снижалась по отношению к контрольной культуре. Действие somatotropine (STG) в концентрации  $10^{-8}$  М в культурах с Кон А 40 мкг/мл также вызывало снижение пролиферации тимоцитов в сравнении с контрольной культурой ( $p=0,05$ ).

Оценка поликлональной тимусзависимой продукции цитокинов в супернатантах культур тимоцитов выявила, что в культурах с IGF<sup>-7</sup>, IGF<sup>-9</sup>, STG<sup>-8</sup>, STG<sup>-9</sup>, STG<sup>-10</sup> М идет стимуляция продукции  $\gamma$ -интерферона в группе белых пороков по парному *t*-критерию Стьюдента к контрольной культуре.

В группе синих пороков статистических изменений не выявлено.

В культурах с IGF<sup>-7</sup>, IGF<sup>-8</sup>, STG<sup>-8</sup>, STG<sup>-9</sup>, STG<sup>-10</sup> М идет стимуляция продукции интерлейкина-4 в группе белых пороков. При синих пороках статистических изменений внутри группы не выявлено.

Установлено, что во всех группах концентрация интерлейкина-10 не изменяется.

В культурах с IGF<sup>-7</sup>, IGF<sup>-8</sup>, STG<sup>-8</sup>, STG<sup>-9</sup>, STG<sup>-10</sup> М идет стимуляция продукции интерлейкина-17 в группе белых пороков по парному *t*-критерию Стьюдента к контрольной культуре. В группе синих пороков во всех концентрациях гормонов уровень продукции интерлейкина-17 также растет по отношению к контрольной культуре.

В результате наблюдается конкуренция между процессами пролиферации и дифференцировки, т.е. при снижении пролиферации тимоцитов следует процесс дифференцировки в эффекторные тимоциты. Как видно из данных, наблюдается процесс стимуляции дифференцировки в сторону Th2- и Th17-клеток, не опосредо-

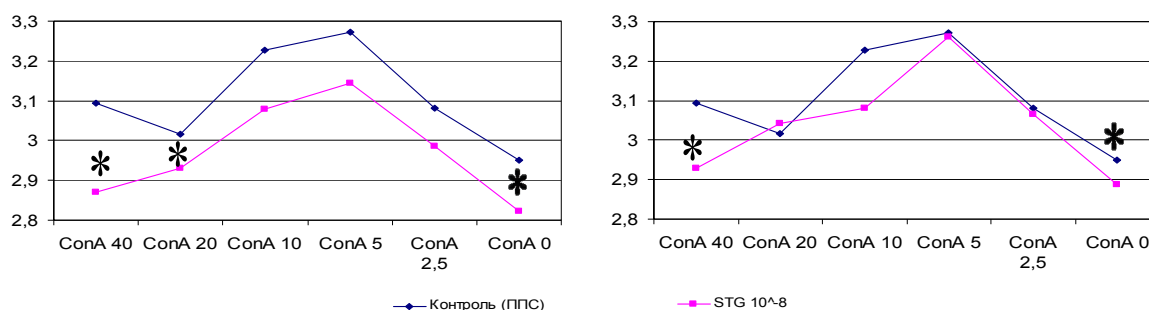


Рис. 6. Влияние инсулиноподобного фактора роста I (IGF) и соматотропного гормона (STG) на пролиферативный ответ тимоцитов в культурах с Кон А в группе синих пороков

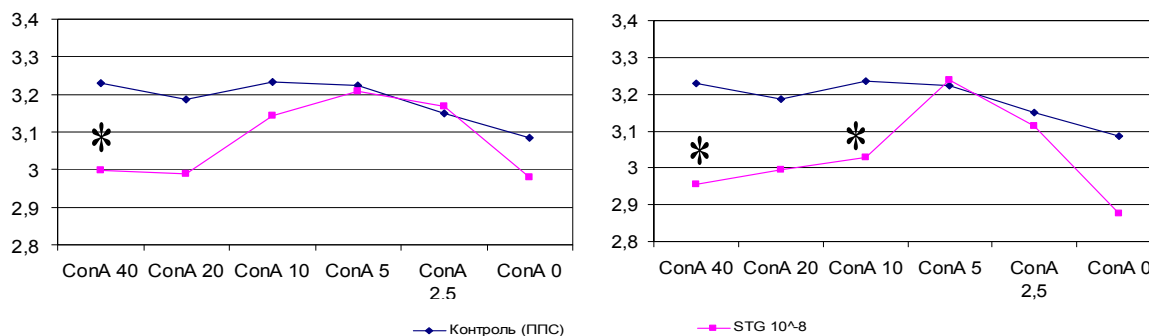


Рис. 7. Влияние инсулиноподобного фактора роста I (IGF) и соматотропного гормона (STG) на пролиферативный ответ тимоцитов в культурах с Кон А в группе белых пороков



ванную через продукцию IL-10. Дифференцировка в Th1 и Th2 звено наблюдается только в группе белых пороков. Очевидно, что снижение пролиферации и дифференцировки в группе синих пороков в значительной степени связано с гипоксией митохондриального происхождения.

Морфологические изменения в тимусе отразились и на функциональном состоянии лимфоцитов периферической крови. С помощью метода количественной полимеразной цепной реакции изучили содержание Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC), являющихся маркерами Т-клеток, эмигрировавших из тимуса в кровь. Уровень TREC в крови подтверждал низкую тимическую активность у детей с ВПС. С момента рождения доля первичных тимусных мигрантов определялась у них на 42 % ниже, чем у здоровых. После операции у детей в течение последующих 3 лет наблюдали дальнейшее снижение содержания TREC (на 16 %). В результате к 3-му году у детей после тимэктомии уровень тимусных мигрантов был ниже на 58 %, чем у здоровых. Степень сложности сердечного порока как до, так и после тимэктомии определяла содержание TREC в крови. При сложных сердечных пороках уровень TREC до операции был на 34 % ниже, чем при неосложненных пороках сердца. Через 3 года после операции эта разница увели-

чилась до 60 % (рис. 8).

При оценке функционального состояния CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов установлено, что после операции в динамике 3 лет наблюдали тенденцию к росту апоптоза этих клеток (рис. 9). Уже через год, по сравнению с группой здоровых детей, уровень апоптоза CD4 вырос на 30 %, а CD8 на 60 %; к 3-му году после операции показатель продолжал увеличиваться, оставаясь на том же высоком уровне: 12,6±1,8 % – для CD8<sup>+</sup> и 6,4±0,7 % – для CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (у здоровых детей CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов – 3,9±1,1 %; CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов – 3,1±0,7 %).

При сравнении характера апоптоза у детей с различными пороками сердца установлено, что независимо от сложности развития порока сердца в период от 1 до 3 лет после удаления тимуса уровень апоптоза лимфоцитов всегда оставался высоким, нарастая с каждым годом. При этом он был в 1,5 раза выше у детей со сложным пороком сердца.

Параллельно в крови исследовали функциональные свойства клеток врожденного иммунитета. Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов показала, что на протяжении 3 лет происходило снижение интегрального показателя фагоцитоза на 25 % (137,0±12,8) по сравнению с показателями здоровых детей (186,01±13,30).

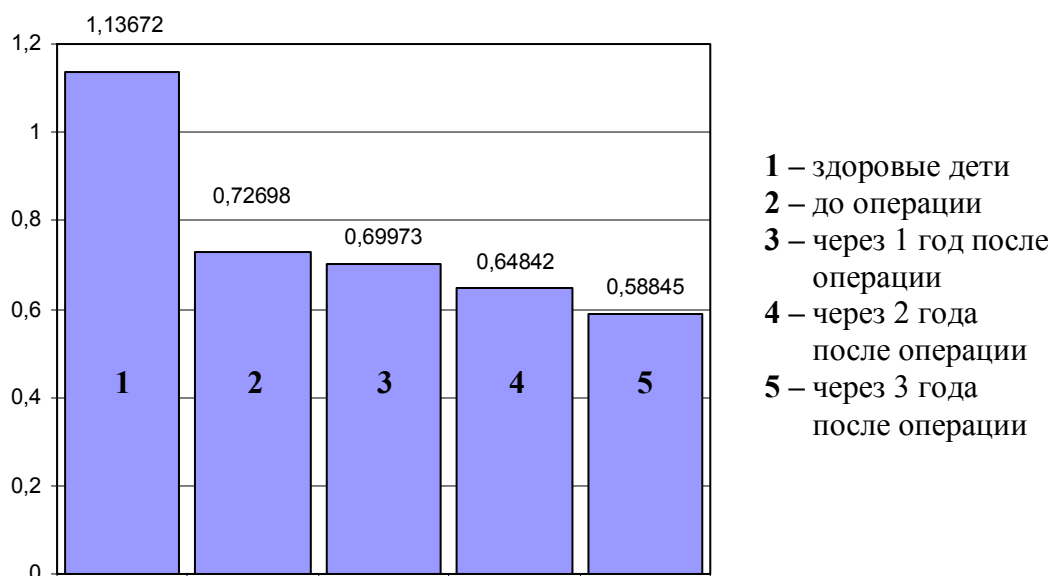


Рис. 8. Уровень TREC в лимфоцитах периферической крови

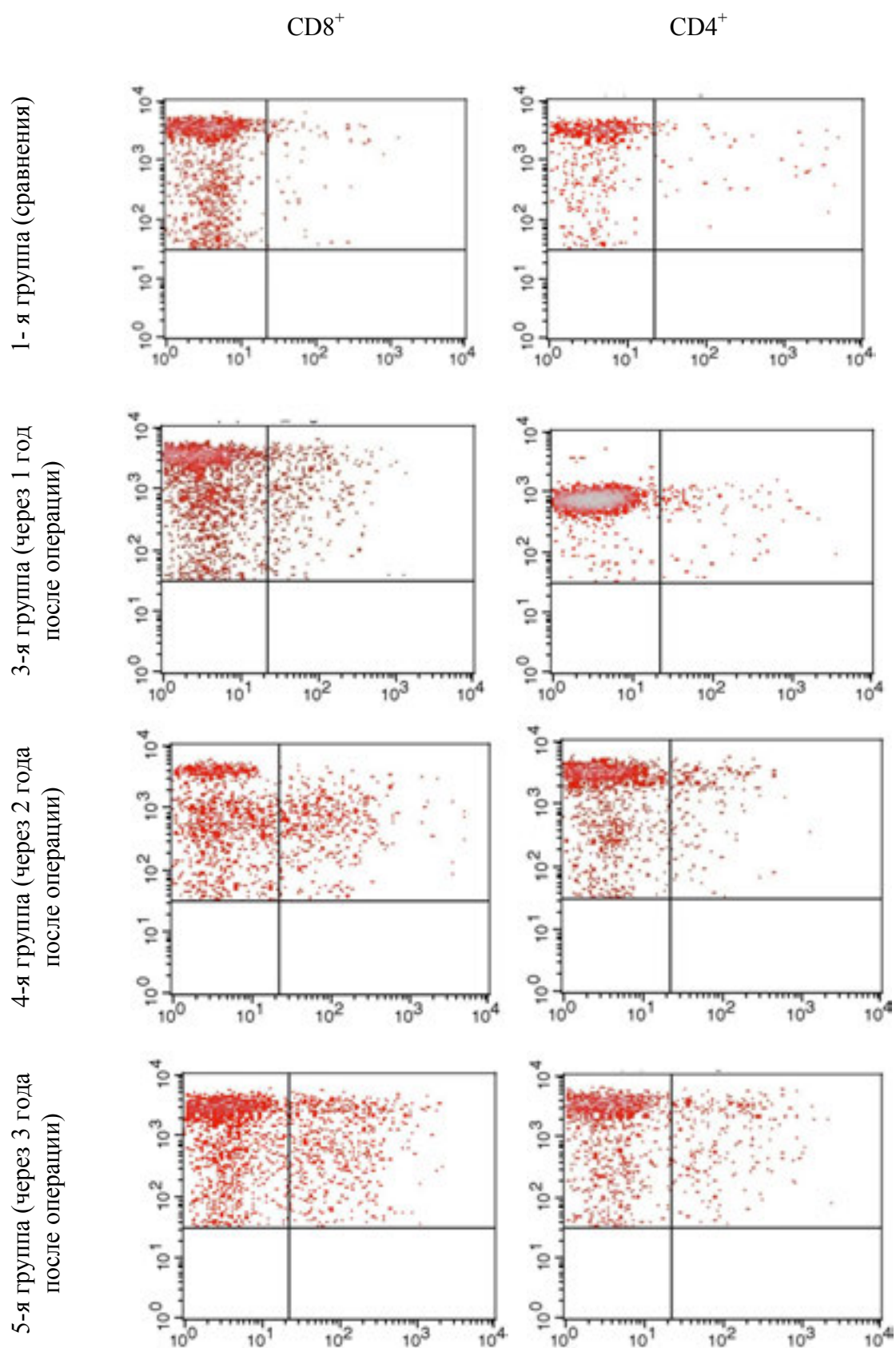


Рис. 9. Апоптоз лимфоцитов в крови (на каждой гистограмме верхний правый квадрат)

Степень сложности порока сердца также коррелировала с фагоцитарными свойствами нейтрофилов. При сложных врожденных пороках фагоцитарная активность нейтрофилов на протяжении 3 лет неуклонно снижалась и была достоверно меньше, чем у детей с неосложненным пороком, и значительно ниже, чем у здоровых детей. У детей с менее выраженным сердечным пороком интегральный показатель фагоцитоза к 3-му году после операции медленно приближался к показателям группы сравнения.

Фагоцитарная активность моноцитов крови, наоборот, к 2 годам выростала в 1,5 раза, а к 3-му году выравнивалась с показателями здоровой крови, но с небольшим угнетением фагоцитоза в группе со сложными пороками.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что у детей с ВПС к моменту рождения имеется значительная функциональная незрелость первичного органа иммунитета – тимуса. На наш взгляд, ключевым моментом служит нарушение структуры и функции стромы

органа, т.е. тимусного эпителия на этапе развития плода. Развивается инволюция, которая носит необратимый характер, сопровождается замещением стромы тимуса клетками фибробластического дифферона, не способными, в силу своих гистогенетических свойств, создавать условия для развития Т-лимфоцитов, что обуславливает склеротические изменения органа. В крови больных детей уже с рождения снижен уровень наивных Т-лимфоцитов.

После перенесенной тимэктомии в течение 3 лет растет апоптоз циркулирующих лимфоцитов, снижаются и фагоцитарные свойства клеток врожденного иммунитета. В послеоперационном периоде врачам педиатрической службы с целью предупреждения частого развития острых, рецидивирующих и осложненных форм инфекции необходимо учитывать иммунный статус детей с ВПС, особенно со сложными формами пороков, так как функциональное состояние клеток крови таких детей отражает несостоятельность системы иммунитета.

#### Библиографический список

1. Белозеров Ю.М. Детская кардиология. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 9–221.
2. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2001. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2002. – С. 34.
3. Виноградов К.В. Врожденные пороки сердца у детей: распространенность и современное состояние проблемы. <http://pediatric.mif-ua.com>. Здоровье ребенка. 2007; 6 (9).
4. Дударев И.В. Иммунологическая и гемодинамическая характеристика детей с врожденными пороками сердца синего и бледного типа // Иммунология. – 2002. – Т. 23. – № 3. – С. 167–170.
5. Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. – М.: СОТИС, 1996. – 270 с.
6. Мутафьян О.А. Врожденные пороки сердца у детей. – М.: BINON publishers, 2002. – С. 11–21.
7. Охотникова И.М., Агейкин В.А., Лозовская Л.С. Значение внутрибольничной вирусной инфекции в органной патологии детей грудного возраста // Медицинский научный и учебно-методический журнал. – 2001. – № 5. – С. 81–87.
8. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
9. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control gene / J. Vandesompele, K. De Peter, F. Pattyn [et al.] // Genome Biology. – 2002. – Vol. 3. – № 7. – Research 0034.
10. Boughman J.A., Berg K.A., Asternborski J.A. Familial risk of congenital heart disease assessed in a population based epidemiology study. // Am. J. Med. Genet. – 1987. – № 26. – P. 839–849.
11. How does neonatal thymectomy effect on the immune system / T. Turan, A. Turan, C. Arslan [et al.] // Acta cardiol. – 2004. – № 5. – P. 511–513.
12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method // Methods. – 2001. – Vol. 25. – P. 402–408.
13. Manchester K.L. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations // Biotechniques. – 1996. – Vol. 20. – № 6. – P. 968–970.

14. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection / B.F. Haynes, M.L. Markert, G.D. Sempowski [et al.] // Annu. Rev. Immunol. – 2000. – № 18. – P. 529–560.

**FEATURES OF THE FORMATION OF THE IMMUNE SYSTEM AMONG CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE**

V.A. Chetvertnykh, N.P. Loginova, D.Y. Shilov, A.P. Godovalov,  
O.V. Lebedinskaya, E.V. Saydakova

The paper presents a comprehensive dynamic analysis of major components of the immune system among children with congenital heart disease (CHD) of varying degrees of difficulty with the use of modern immunological, immunochemical, histological, histochemical, cytochemical and electron microscopic research methods. It was found that children with CHD at birth have a significant functional immaturity of the primary organ of immunity – the thymus, especially the ones with complex heart defects. This fact is reflected on thymocyte proliferation and differentiation both in vivo and in vitro. In this regard, since birth blood of sick children contains a reduced level of naive T lymphocytes. After undergoing thymectomy for 3 years apoptosis of circulating lymphocytes (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) is growing, and the phagocytic properties of the innate immune cells are decreasing. The obtained results reflect the failure of the immune system among children with congenital heart defects.

*Keywords: congenital heart disease, children, thymus, immune system.*

**Сведения об авторах**

*Четвертных Виктор Алексеевич*, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии, Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера (ПГМА), 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: rector@psma.ru

*Логинова Наталья Павловна*, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, ПГМА; e-mail: natalitsa@yandex.ru

*Шилов Дмитрий Юрьевич*, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры иммунологии, ПГМА; e-mail: shilov-dj@mail.ru

*Годовалов Анатолий Петрович*, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры иммунологии, ПГМА; e-mail: agodovalov@gmail.com

*Лебединская Ольга Витальевна*, доктор медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, ПГМА; e-mail: lebedinska@mail.ru

*Сайдакова Евгения Владимировна*, аспирант, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: radimira@list.ru

*Материал поступил в редакцию 04.07.2013 г.*