

УДК 616.12-007.1-053.1-053.2-07:616.438-0765

DOI: 10.17816/pmj36446-54

## **ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ, ВЫЗВАННОЙ ВРОЖДЕННЫМ ПОРОКОМ СЕРДЦА, НА ВНУТРИТИМИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ**

*Н.П. Логинова<sup>1\*</sup>, В.А. Четвертных<sup>1</sup>, Г.А. Хромцова<sup>1</sup>,  
Р.М. Шехмамetyev<sup>2</sup>, Л.А. Четвертных<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет

имени академика Е.А. Вагнера,

<sup>2</sup>Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии им. С.Г. Суханова, г. Пермь, Россия

## **INFLUENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE-CAUSED HYPOXIA ON INTRATHYMIC DEVELOPMENT OF T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN OF FIRST YEAR OF LIFE**

*N.P. Loginova<sup>1\*</sup>, V.A. Chetvertnykh<sup>1</sup>, G.A. Khromtsova<sup>1</sup>,  
R.M. Shekhametyev<sup>2</sup>, L.A. Chetvertnykh<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>E.A. Vagner Perm State Medical University,

<sup>2</sup>Federal Center of Cardiovascular Surgery named after S.G. Sukhanov, Perm, Russian Federation

---

**Цель.** Изучение влияния гипоксии, вызванной врожденным пороком сердца, на внутритимическое развитие Т-лимфоцитов и обеспечение организма Т-клеточным ресурсом детей с патологией сердца разной степени сложности.

**Материалы и методы.** В работе представлены результаты комплексного иммуноморфологического исследования тимуса при врожденных пороках сердца у детей ( $n = 129$ ) первого года жизни. С помощью гистохимических и иммунологических методов оценено влияние гипоксии, обусловленной врожденным пороком сердца, на функциональное состояние тимуса в обеспечение организма ребенка Т-лимфоцитами.

**Результаты.** Установлено, что степень сложности врожденного порока сердца коррелировала со степенью угнетения формирования пула Т-лимфоцитов. На протяжении первого года жизни в тимусе снижается пролиферативная активность тимоцитов (оцениваемая по экспрессии Ki-67), являющаяся причиной уменьшения количества CD3<sup>+</sup>-timoцитов. В условиях выраженной гипоксии (синий тип порока) тормозится процесс дифференцировки Т-лимфоцитов, что ведет к сохранению менее зрелых форм тимоцитов. В результате гипоксия приводит к угнетению пролиферации, дифференцировки тимоцитов, влияя на субпопуляционный состав клеток. Таким образом, в периферическую кровь не-

---

© Логинова Н.П., Четвертных В.А., Хромцова Г.А., Шехмамetyev Р.М., Четвертных Л.А., 2019

тел.: +7 (952) 338 50 28

e-mail: natalitsa@yandex.ru

[Логинова Н.П. (\*контактное лицо) – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Четвертных В.А. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии; Хромцова Г.А. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Шехмамetyev Р.М. – заведующий кардиохирургическим отделением № 4; Четвертных Л.А. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии].

достаточно поступают тимусные мигранты (количество ТРЭК), что свидетельствует о низкой функциональной активности тимуса по обеспечению организма Т-клеточным ресурсом.

**Выводы.** Без сомнения, это может явиться причиной иммунодефицитного состояния и снижения формирования адаптивного иммунитета у данной категории детей.

**Ключевые слова.** Тимус, гипоксия, дети, врожденный порок сердца, дифференцировка, Т-лимфоциты.

**Aim.** To study the influence of hypoxia, caused by congenital heart disease, on the intrathymic development of T-lymphocytes and provision of the organism with T-cellular resource in children with cardiac pathology of different degree of severity.

**Materials and methods.** The paper presents the results of complex immunomorphological study of the thymus in children of the first year of life ( $n = 129$ ) with congenital heart diseases. Histochemical and immunological methods were used to assess the influence of congenital heart disease-caused hypoxia on the functional status of thymus regarding provision of a child with T-lymphocytes.

**Results.** It was established that the degree of severity of congenital heart disease correlated with the degree of suppression of T-lymphocyte pool formation. During the first year of life, proliferative activity of thymocytes (assessed by Ki-67 expression) in the thymus falls, being the reason of decrease in the number of CD3<sup>+</sup> thymocytes. In conditions of marked hypoxia (blue type of defect) the process of T-lymphocyte differentiation is inhibited that causes preservation of less mature forms of thymocytes. As a result, hypoxia is the reason of proliferation suppression and thymocyte differentiation, influencing subpopulation composition of the cells. Thus, insufficient quantity of thymic migrants enters the peripheral blood that confirms low functional activity of thymus regarding provision of the organism with T-cellular resource.

**Conclusions.** No doubt, it can be the cause of immunodeficient state and reduced formation of adaptive immunity in this category of children.

**Key words.** Thymus, hypoxia, children, congenital heart disease, differentiation, T-lymphocytes.

## ВВЕДЕНИЕ

Врожденные пороки сердца (ВПС) входят в группу самых частых аномалий развития у детей и составляют 25 % всех врожденных аномалий развития [1, 2]. При естественном течении ВПС к концу первого года жизни умирает более 70 % детей [3]. В литературе последних лет представлены сведения, что дети с ВПС подвержены различным заболеваниям из-за имеющегося у них иммунного дисбаланса [4–6]. В периферической крови таких детей снижен уровень CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов [10], изменен субпопуляционный состав Т-лимфоцитов, меняется баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [4]. По данным М.Ф. Зиньковского [2], в подобных случаях нарушение иммунных процессов проявляется угнетением всех звеньев иммунитета, что может быть не только причиной острых, рецидивирующих форм инфекций, но и этиологическим факто-

ром в развитии тяжелых послеоперационных осложнений. Установлено, что степень иммуносупрессии в послеоперационном периоде сильнее выражена у детей с врожденными пороками, вызывающими цианоз слизистых и кожных покровов (синий тип), сочетающихся с выраженным нарушением гемодинамики и кислородным дефицитом, тогда как у детей с ВПС, не вызывающими цианоза (белый тип), эти изменения менее выражены [11]. Важным утяжеляющим фактором для организма является то, что оперативное лечение ВПС часто сопровождается удалением тимуса, связанным с доступом к сердцу, и является неотъемлемой частью общепринятой мировой практики.

В настоящее время основная часть исследований посвящена оценке послеоперационного состояния иммунной системы детей с ВПС после проведенной у них тимэктомии [6–8, 12]. Однако вопрос о состоянии тимуса как первичного органа иммуногенеза и обес-

печение им развивающегося организма Т-лимфоцитами в условиях циркуляторной гипоксии на сегодня остается нерешенным.

*Цель исследования* – изучение влияния гипоксии, вызванной врожденным пороком сердца, на внутритимическое развитие Т-лимфоцитов и обеспечение Т-клеточным ресурсом детей с патологией сердца разной степени сложности.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы биоптаты тимуса 126 детей в возрасте от одного до 11 месяцев. Тимэктомия проводилась при сердечно-сосудистых операциях у детей до года с целью коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования были проведены согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и соответствуют протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г.; обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних. Согласно клиническому признаку (наличие или отсутствие цианоза слизистых и кожных покровов) выделены две группы ВПС: 1-я ( $n = 62$ ) – белые типы (без цианоза); 2-я группа ( $n = 64$ ) – синие типы (с цианозом). Группу сравнения составили тимусы случайно погибших клинически здоровых детей ( $n = 11$ ) в возрасте до года.

Исследовали также периферическую кровь ( $n = 31$ ). У детей с ВПС ( $n = 21$ ) кровь забирали из локтевой вены перед тимэктомией в объеме 2,5 мл. Группу сравнения составили здоровые дети ( $n = 10$ ) в возрасте до 1,2 г.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах, которые

наносили на адгезивные стекла, обработанные полилизинном (Thermo, Великобритания). Иммуногистохимические реакции проводили аппаратным способом с использованием иммуногистохимических автостейнеров Autostainer-360 (Thermo, Великобритания). Для визуализации результатов применяли системы детекции Ultra Vision ONE Detection System HRP Polymer. Препараты инкубировали с хромогеном DAB Plus Substrate System и докрашивали гематоксилином Майера с заключением в био-маунт-среду. Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (Labvision, США).

Для определения качественного и количественного состава тимоцитов использовали моноклональные антитела (Dako, США) к: 1) CD3 – для идентификации зрелых Т-лимфоцитов; 2) Ki-67 – для клеток, делящихся митозом и находящихся в разных фазах клеточного цикла (G1-, S- и G2). Численную плотность ( $N_i$ ) позитивно окрашенных CD3-timoцитов рассчитывали по формуле:

$$N_i = (P_i/P_t)100 (\%),$$

где  $P_i$  – количество точек тестовой системы, попавших на позитивно окрашенные CD3-лимфоциты,  $P_t$  – общее число точек закрытой тестовой системы (81). При оценке экспрессии Ki-67 рассчитывали индекс пролиферации ( $IKi$ ) по формуле:

$$IKi = (n^+/N)100 (\%),$$

где  $n$  – число меченых ядер,  $N$  – общее число ядер в поле зрения микроскопа. Подсчеты проводили в 10 полях зрения каждого среза.

Фенотипическое созревание тимоцитов оценивалось путем выделения клеток из фрагментов тимусов пипетированием. Полученная клеточная суспензия на 85 % и более состояла из CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-timoцитов, что верифицировалось методом проточной цито-

метрии. Выделенные тимоциты трижды отмывали в забуференном физиологическом растворе с pH = 7,4 и затем инкубировали в плоскодонном 96-луночном планшете ( $1 \cdot 10^6$  кл в пробе) в полной питательной среде в течение 72 ч при 37 °C в условиях 5%-ного CO<sub>2</sub>. Фенотипическое созревание тимоцитов оценивали по изменению коэкспрессии молекул CD4/CD8 и переходу незрелых CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-timoцитов в более зрелые CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клетки. Для этого в гейте тимоцитов подсчитывали число CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-клеток методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител (PE Anti-Human CD4, OKT4; PC5 Anti-Human CD8, eBioscience, США). Детекция результатов производилась методом иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие изотипические контроли. Лимфоцитарный гейт выставляли на основе комбинации прямого и бокового светорассеивания и размера клеток. При учете результатов подсчитывали более 100 000 клеток.

Определение T-рецепторных эксцизионных колец (ТРЭК). Выделение ДНК проводили из 1 мл цельной крови с использованием набора реагентов «KR-012» (OMNIX, Россия) согласно инструкции производителя. Общую концентрацию ДНК и степень ее контаминации белком определяли спектрофотометрически (UVmini 1240, Shimadzu, Япония) общепринятым методом [13]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени осуществляли с использованием коммерческой реакционной смеси («Синтол», Россия), пары праймеров 5'-CACATCCCTTT-CAACCATGCT и 3'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG

(10 пкмоль/мкл каждого) и флуоресцентного зонда TCR2: FAM-ACACCTCTGGTTTTGT-AAAGGTGCCCACT-BHQ1. В качестве референсной последовательности был использован β-актин (коммерческий набор β-actin control reagents, Applied Biosystems, США). Реакцию осуществляли на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) по программе: 95°C – 180 с (1-й цикл); 61°C – 20 с, 70°C – 10 с, 95°C – 15 с (50 циклов). Амплификация целевого и референсного генов проводилась отдельно. Для расчета количества ТРЭК применяли математический метод 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> [14].

Результаты выражали в виде средней арифметической и ее среднего отклонения ( $M \pm m$ ). Достоверность между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента для непарных и парных данных или непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферация тимоцитов – неотъемлемый процесс, связанный с внутритимическим созреванием Т-лимфоцитов. С помощью ядерного биомаркера Ki-67 изучена интенсивность пролиферации тимоцитов. Маркер Ki-67 реагирует с клетками, находящимися в G<sub>1</sub>, S, M, G<sub>2</sub>-стадиях клеточного цикла. Если клетка не пролиферирует, такого взаимодействия не происходит. При изучении пролиферативной активности тимоцитов приняты во внимание зональные особенности коркового вещества. Первый этап пролиферации тимоцитов проходит в кортикомедуллярной зоне, там, куда первоначально мигрируют предшественники Т-лимфоцитов из красного костного мозга. В дальнейшем тимоциты последовательно поступают в субкапсулярную и кортикальную зону.

В группе контроля положительная экспрессия Ki-67 интенсивно выявляется в тимocyтах в пределах всей дольки в виде окрашенного в коричневый цвет ядерного субстрата (рис. 1, а).

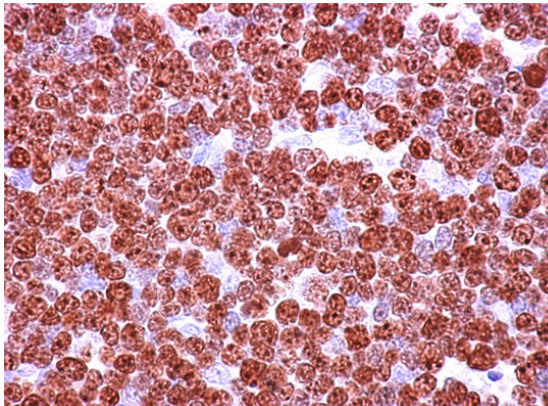
В группе с синим типом ВПС маркер пролиферации Ki-67 регистрировался во всех зонах коркового вещества, достоверно отличаясь от показателя контроля на протяжении всех сроков исследования. В кортикомедуллярной зоне пролиферация тимocyтов к первому месяцу, в сравнении с контрольной группой, снижается на 11 % ( $p < 0,001$ ). В последующем индекс пролиферации (IKi-67) в 6 и в 11 месяцев становится ниже контрольных данных в 2,6 раза – на 28 % ( $p < 0,001$ ).

В субкапсулярной зоне уже в первый месяц IKi-67 выявляется на 18 % меньше, чем в контроле ( $p < 0,001$ ). В течение всего года экспрессия маркера Ki-67 в клетках продол-

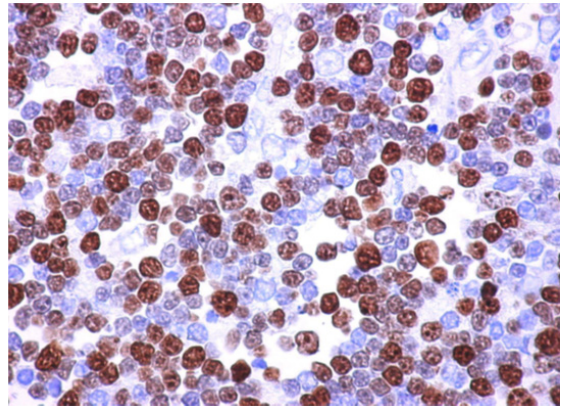
жает снижаться; через 6 месяцев интенсивность пролиферации ниже на 25 %, а к 11-му месяцу – до 33,5 %, т.е. более чем в три раза по отношению к данным контрольной группы ( $p < 0,001$ ).

В участках глубокой коры IKi-67 на протяжении всех сроков наблюдений также существенно снижается и к 11-му месяцу становится меньше на 38 % по сравнению с данными группы контроля ( $p < 0,001$ ). В этот возрастной период в пределах всего коркового вещества позитивно окрашенные тимocyты располагаются диффузно, находясь в окружении клеток, не участвующих в пролиферации (рис. 1, б).

В группе с белым типом ВПС в первый месяц в кортикомедуллярной зоне IKi-67 не имеет достоверных отличий от контрольных данных. С 6-го месяца интенсивность пролиферации снижается, а к 11-му месяцу уступает в среднем на 17 % группе контроля ( $p < 0,001$ ).



а



б

Рис. 1. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в тимocyтах коркового вещества дольки тимуса: а – группа контроля; б – синий порок ВПС. Ув.  $\times 1000$

Из кортикомедуллярной зоны тимocyты поступают в субкапсулярную, где начинается следующий этап их пролиферации. В этой части коркового вещества в течение года (1 – 6 – 11 месяцев) идет медленное снижение накопления маркера

Ki-67. Если в первый месяц IKi-67 регистрируется на 7 % ниже данных контроля ( $p < 0,001$ ), то к 11-му месяцу пролиферация снижается уже в 1,5 раза, и на 24 % регистрируется ниже по отношению к первому месяцу (табл. 1).

Таблица 1

**Индекс пролиферации (Кi-67) тимоцитов в зонах дольки тимуса (%)**

Зона дольки тимуса	Контроль	Тип ВПС	Срок наблюдения, мес.		
			1	6	11
Субкапсулярная	97,84 ± 5,47	С	77,16 ± 8,06*	69,84 ± 5,90*	62,40 ± 10,04*
		Б	87,52 ± 3,46*	74,40 ± 3,51*	66,48 ± 13,04*
Глубокая кора	78,68 ± 5,43	С	69,64 ± 2,98*	60,54 ± 6,85*	48,71 ± 3,47*
		Б	72,61 ± 13,33	68,43 ± 2,74*	65,61 ± 2,16*
Кортикомедулярная	86,56 ± 3,91	С	74,68 ± 4,07*	60,88 ± 9,33*	61,28 ± 12,63*
		Б	80,64 ± 10,27	71,92 ± 3,46*	67,20 ± 9,83*

*Примечание:* \* – значимые различия ( $p < 0,05$ ) между группами по отношению к контролю ( $M \pm m$ ). С – синий тип ВПС; Б – белый тип ВПС.

Из субкапсулярной зоны тимоциты перемещаются в сторону мозгового вещества, проходя через основную часть коры. Находясь в пределах глубокой коры, клетки постоянно пролиферируют. К 11-му месяцу экспрессия Ki-67, выявляемая в ядрах, обнаруживается в диффузно расположенных тимоцитах. В этой зоне в течение года регистрируется уменьшение числа клеток, вступивших в пролиферацию. Так, к 11 месяцам разница с контролем увеличивается в два раза – до 17 % ( $p < 0,001$ ).

В корковом веществе на этапах антигеннезависимой дифференцировки тимоциты вступают в контакт с ретикулоэпителиоцитами, пролиферируют и приобретают основные рецепторы (TCR-CD3<sup>+</sup>). В каждой зоне этому способствуют специфические

стимулирующие факторы, выделяемые клетками микроокружения.

Интенсивность тимопоэза *in vivo* оценивалась на основе экспрессии маркера CD3. При сердечных пороках численная плотность зрелых тимоцитов, несущих рецепторный комплекс CD3 в корковом веществе, зависит от типа ВПС и на протяжении всех сроков исследования определялась ниже, чем в контроле.

В группе с белым типом ВПС число CD3-позитивных тимоцитов в первый месяц (в поле зрения среза) регистрировалось на 25 % ниже контрольных данных (табл. 2). В последующем, к 6-му месяцу, число CD3<sup>+</sup> тимоцитов снижается еще на 13 % и остается на этом уровне до 11-го месяца жизни ( $p < 0,001$ ).

Таблица 2

**Количество тимоцитов в поле зрения тимуса**

Зона коры дольки	Контроль	Тип ВПС	Срок наблюдения, мес.		
			1	6	11
Субкапсулярная	331,62 ± 11,87	С	293,80 ± 25,49	247,75 ± 12,82	233,75 ± 32,29
		Б	334,42 ± 25,72	303,76 ± 5,33	291,50 ± 15,03
Глубокая кора	472,31 ± 10,68	С	427,30 ± 14,03*	386,18 ± 26,99	373,98 ± 14,89
		Б	444,05 ± 5,41	420,79 ± 5,91	411,13 ± 25,33*

*Примечание:* \* – значимые различия ( $p < 0,05$ ) между группами по отношению к контролю ( $M \pm m$ ). С – синий тип ВПС; Б – белый тип ВПС.

Синий тип ВПС ведет к более существенному снижению тимопоэза. Экспрессия CD3 в корковом веществе уже в первый месяц становится меньше на 35 % ( $p < 0,001$ ). В последующем снижение продолжается, и к 11-му месяцу интенсивность тимопоэза определяется уже на 47 % меньше, чем в группе контроля (см. табл. 2). В пределах коркового вещества CD3<sup>+</sup>-timoциты располагаются диффузно.

Результаты исследования показывают, что интенсивность пролиферации тимоцитов определяет их последующую дифференцировку. На наш взгляд, это связано с состоянием ретикулоэпителиоцитов коркового вещества, о чем говорилось нами ранее [9]. Ретикулоэпителиоциты, как известно, выполняют функцию тканевого каркаса и являются источниками сигналов для развивающихся тимоцитов. Установленные ранее морфологические, ультраскопические и иммуногистохимические изменения ретикулоэпителиоцитов при действии гипоксии лишают тимоциты возможности для их полно-

ценного функционального микроокружения. Степень выраженности гипоксии в значительной мере влияет на интенсивность как пролиферации, так и образования CD3<sup>+</sup>-рецепторов. При синем типе ВПС указанные процессы в корковом веществе угнетены сильнее, чем при белом типе порока. Все это в конечном счете влияет на качество развития тимоцитов и, как результат, на формирование Т-клеточного ресурса организма.

Качество фенотипического созревания тимоцитов оценивали по изменению коэкспрессии молекул CD4/CD8 и переходу незрелых CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>-timoцитов в более зрелые CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> /CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>-клетки.

Установлено, что у детей с синим типом ВПС достоверно выше содержание незрелых дубльпозитивных тимоцитов (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) при сравнении с детьми с белым типом ВПС (табл. 3). Таким образом, можно полагать, что более выраженная гипоксия препятствует фенотипическому созреванию тимоцитов, что также может являться причиной дисфункциональных нарушений.

Таблица 3

**Фенотипические изменения в культуре тимоцитов в группах с белым и синим типом ВПС**

Исследуемая группа	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> -timoциты, %	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -timoциты, %	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> -timoциты, %	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> -timoциты, %
Белый тип ВПС	84,94 ± 2,34	9,21 ± 3,61	4,26 ± 1,07	1,58 ± 0,52
Синий тип ВПС	89,19 ± 2,39*	7,79 ± 0,21	2,18 ± 0,46	0,87 ± 0,25

*Примечание:* \* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по непарному *t*-критерию Стьюдента по отношению к белому типу ВПС.

Одним из основных показателей функциональной активности тимуса является его способность продуцировать Т-лимфоциты, критерием этого будет присутствие в периферической крови недавних тимусных мигрантов, содержащих Т-рецепторные эксци-

зионные кольца (ТРЭК). ТРЭК содержатся в CD3<sup>+</sup>-timoцитах и рассматриваются как маркеры Т-клеток, недавно мигрировавших из тимуса на периферию (недавние тимусные эмигранты). ТРЭК – это структуры стабильные, они не делятся и дочерним клеткам

не передаются. В ходе пролиферации происходит постепенная их элиминация. В связи с этим уровень ТРЭК рассматривают как показатель функциональной активности тимуса, т.е. его способности продуцировать Т-лимфоциты [15]. Выявление ТРЭК с помощью ПЦР в реальном времени сейчас является наиболее надежным методом количественной оценки содержания недавних тимусных эмигрантов.

Результаты исследования показали, что количество ТРЭК в периферической крови здоровых детей составляет 1,07038 [0,96680; 1,46902]. В общей группе больных детей с ВПС, независимо от степени сложности врожденных пороков сердца, в крови опре-

деляется достоверно низкое количество ТРЭК в сравнении с группой здоровых детей, что отражает общее снижение тимической активности – 0,71097 [0,38524; 0,85681] (рис. 2). Сравнительная оценка содержания ТРЭК при разных пороках, обусловленных степенью выраженности гипоксии, показала, что наиболее низкий уровень количества ТРЭК у детей определяется при синих типах ВПС – 0,57055 [0,32646; 0,88270] ( $p < 0,001$ ). В группе детей с белыми типами ВПС, не вызывающими цианоза, их количество составляет 0,69495 [0,58255; 0,77916] ( $p < 0,05$ ). При этом возрастная динамика данных показателей в группах не имеет достоверных отличий.

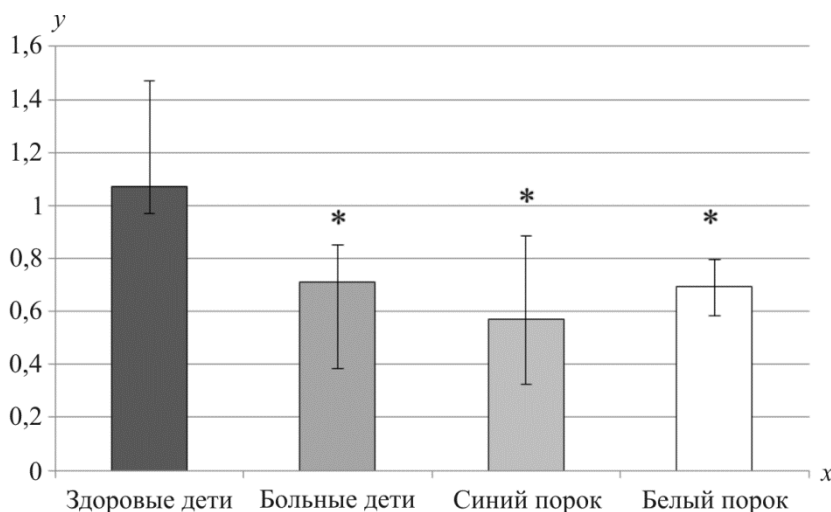


Рис. 2. Содержание ТРЭК в лимфоцитах периферической крови детей: \* – достоверные различия с группой здоровых детей; ось  $x$  – группы детей, ось  $y$  – количество ТРЭК (показатель  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )

## Выводы

Таким образом, результаты исследования показали, что в тимусе у детей первого года жизни в условиях хронической гипоксии, обусловленной ВПС, наблюдается снижение основной функции тимуса, направленной на обеспечение организма ребенка Т-лимфоцитами. Установлено, что степень сложности

ВПС коррелировала со степенью угнетения формирования пула Т-лимфоцитов. На протяжении длительного времени (эмбриональный и постнатальный период) гипоксия приводит к все более сильному угнетению пролиферации, дифференцировки тимоцитов, влияя на субпопуляционный состав клеток. В результате в периферическую кровь недостаточно поступают тимусные мигранты, что свидетельствует



о низкой функциональной активности тимуса по обеспечению организма Т-клеточным ресурсом. Без сомнения, это является причиной иммунодефицитного состояния и снижения формирования адаптивного иммунитета у данной категории детей, что необходимо учитывать педиатрам при планировании лечебных и профилактических мероприятий с целью коррекции развития вторичных иммунодефицитов.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белозеров Ю.М. Детская кардиология. М.: МЕДпресс-информ 2004; 9–221.
2. Зиньковский М.Ф. Врожденные пороки сердца. Киев: Книга плюс 2009; 1169.
3. Кондратьев В.А. Врожденные пороки сердца до и после операции. Таврический медицинко-биологический вестник 2005; 2: 76–82.
4. Кнышов Г.В. Кардиохирургия в Украине: прошлое, настоящее, будущее. Сердце и сосуды 2003; 1: 8–14.
5. Виноградов К.В. Врожденные пороки сердца у детей: распространенность и современное состояние проблемы. Здоровье ребенка 2007; 6: 9, available at: <http://pediatric.mif-ua.com>.
6. Фроленко А.Л. Клинико-иммунологическая характеристика детей после тимэктомии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург 2011; 26.
7. Дударев И.В. Иммунологическая и гемодинамическая характеристика детей с врожденными пороками сердца синего и бледно-го типа. Иммунология 2002; 3: 167–170.
8. Донецкова А.Д., Шарова Н.И., Никонова М.Ф., Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Ярилин А.А. Вклад тимуса в восстановление популяции Т-клеток после действия различных повреждающих агентов. Иммунология 2013; 6: 309–313.
9. Логинова Н.П., Четвертных В.А., Семченко В.В., Чемурзиева Н.В., Хромцова Г.А. Иммуноцитохимические особенности становления дифференцировки эпителиальных клеток тимуса у детей первого года жизни при эмбриональных нарушениях развития сердца. Фундаментальные исследования 2013; 12: 49–53.
10. Turan T., Turan A., Arslan C., Kinoglu B., Sarioqlu T. How does neonatal thymectomy effect on the immune system. Acta cardiol 2004; 5: 511–513.
11. Halton N.J., Jamieson B., Plunkett M., Kitchen C.M.R., Pham T., Krogstad P. Function and impaired maintenance of peripheral T cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. Pediatric research 2005; 1: 2–48.
12. Van Gent R., Schadenberg A.W.L., Otto S.A., Nievelstein R.A.J., Sieswerda G.T. Long-term restoration of the human T-cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration? Blood 2011; 3: 627–634.
13. Manchester K.L. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. Biotechniques 1996; 20 (6): 968–970.
14. 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; 25: 402–408.
15. Kong F.-K., Chen C.L., Cooper M. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T-cell emigrants in the circulation. Immunity 1998; 8: 97–104.

Материал поступил в редакцию 07.06.2019