

ДИСФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА

**Митропанова М.Н.¹, Чудилова Г.А.¹, Нестерова И.В.^{1,2},
Ковалева С.В.¹**

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва,
Россия

Резюме. Проблема реабилитации детей с врожденными расщелинами губы и неба (ВРГН) является сложнейшей задачей и не теряет своей актуальности. Дети с ВРГН часто страдают повторными острыми вирусными и бактериальными инфекциями респираторного тракта и ЛОР-органов, что приводит к вынужденной отсрочке проводимых хирургических, ортодонтических лечебных мероприятий, адекватной речевой терапии, осложнениям после проведенных этапных хирургических операций. Развитие воспалительных процессов у детей с ВРГН связано с анатомо-топографическими особенностями, облегчающими проникновение патогенной микрофлоры, нарушениями микробиоценоза слизистой ротовой полости и носа и, как следствие, с негативными изменениями в иммунной системе (ИС). Ключевыми клетками ИС в поддержании гомеостаза и обеспечения здоровья полости рта являются нейтрофильные гранулоциты (НГ). Дисфункции НГ при ВРГН препятствуют элиминации возбудителей и поддерживают их персистенцию. Это может возникать на фоне ранее имевшихся дефектов функционирования системы НГ и усугубляться значительным по патогенности и массивности воздействием различных инфекционных агентов. Полноценная диагностика дисфункций НГ необходима для дальнейшего осуществления их своевременной иммунокоррекции и предотвращения развития патологического хронического воспаления в ответ на длительно присутствующую на слизистой ротовой полости и носа патогенную микрофлору. С этой целью проведено изучение функциональной активности и фенотипических особенностей НГ при ВРГН у детей на разных этапах комплексной реабилитации. Проведено исследование образцов крови 56 детей с ВРГН: 1-3 лет (n = 20, группа 1), 4-6 лет (n = 20, группа 2) и 7-12 лет (n = 20, группа 3), находящихся на разных этапах комплексной реабилитации, и 30 условно здоровых детей (группы контроля) соответствующего возраста. Выявлено нарушение микробиоценоза слизистых ротовой и носовой полости, что может явиться причиной или следствием снижения антибактериального иммунитета, и прежде всего дисфункций НГ. Обнаружены общие для всех возрастных групп детей с ВРГН дисфункции НГ: появление НГ, экспрессирующих CD14-рецепторы, отсутствующие у детей всех трех контрольных групп, что свидетельствует о присутствии вирусной и бактериальной нагрузки; дефекты фагоцитоза, связанные со снижением количества активно фагоцитирующих НГ, нарушение функций захвата; напряженность NADPH-оксидаз с частичной или полной блокадой ответа на дополнительную антигенную нагрузку даже в период отсутствия острых клинических проявлений. Сравнительный анализ

Адрес для переписки:

Митропанова Марина Николаевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар, ул. Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 164-11-10.
E-mail: kaf-detstom@yandex.ru

Address for correspondence:

Mitropanova Marina N.
Kuban State Medical University
350063, Russian Federation, Krasnodar, Sedina str., 4.
Phone: 7 (918) 164-11-10.
E-mail: kaf-detstom@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Н. Митропанова, Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова, С.В. Ковалева «Дисфункции нейтрофильных гранулоцитов у детей с врожденными расщелинами губы и неба» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 885-894.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894
© Митропанова М.Н. и соавт., 2019

For citation:

M.N. Mitropanova, G.A. Chudilova, I.V. Nesterova, S.V. Kovaleva "Dysfunctions of neutrophilic granulocytes in children with congenital cleft lip and palate", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 885-894.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894

изучаемых показателей уровня экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD14 НГ в группах детей с ВГРН демонстрирует разную оснащенность, предопределяющую несостоятельность фагоцитарной и микробицидной функции НГ в разные возрастные периоды. Так, увеличение экспрессии данных мембранных маркеров, особенно CD64 и CD14, в старших возрастных группах сопровождается более значимой дефектностью фагоцитарной и киллинговой функции НГ, что сопряжено не только с возвратными вирусными респираторными инфекциями, но и с высокой частотой ассоциированных бактериальных инфекций дыхательной системы и ЛОР-органов. Выявленные дисфункции НГ у детей с ВГРН различных возрастных групп свидетельствуют об их неспособности к реализации адекватной противoinфекционной защиты, что может приводить к нетипично протекающим вирусно-бактериальным инфекциям и возникновению различных, в том числе гнойных, осложнений в послеоперационном периоде, что требует разработки таргетной иммунотерапии, включаемой в программу комплексной реабилитации детей с ВГРН и направленной на восстановление нарушенных функций НГ.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, врожденные расщелины губы и неба, дети

DYSFUNCTIONS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE

Mitropanova M.N.^a, Chudilova G.A.^a, Nesterova I.V.^{a, b}, Kovaleva S.V.^a

^a *Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation*

^b *Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The problem of rehabilitation of children with congenital cleft lip and palate (CCLP) is a difficult task and doesn't lose its relevance. Children with CCLP often suffer from repeated acute viral and bacterial infections of the respiratory tract and upper respiratory tract, which leads to a forced delay in surgical, orthodontic treatment, adequate speech therapy and complications after staged surgical operations. The development of inflammatory processes in children with CCLP is associated with anatomical and topographic features that facilitate the penetration of pathogenic microflora in oral and nose mucosa and, consequently, negative changes in the immune system (IS). The key cells of IS in maintaining homeostasis and ensuring oral health are neutrophil granulocytes (NG). NG dysfunctions in CCLP interfere with the elimination of pathogens and support their persistence. This can occur against the background of previously existing defects in the functioning of the NG system and is aggravated by the significant pathogenicity and massiveness of the impact of various infectious agents. Full diagnostics of NG dysfunctions is necessary for the further implementation of their timely immune correction and prevention of the development of pathological chronic inflammation in response to the pathogenic microflora long-term on the mucous membrane of the mouth and nose. For this purpose study was conducted of the functional activity and phenotypic characteristics of NG in children with CCLP at different stages of complex rehabilitation. Blood samples of 56 children with CCLP 1-3 years (n = 20, group 1), 4-6 years (n = 20, group 2), and 7-12 years (n = 20, group 3) at different stages of complex rehabilitation and 30 conditionally healthy children (control groups) of the corresponding age was studied. A violation of the microbiocenosis of the mucous membranes of the oral and nasal cavities was revealed, which may be a cause or a consequence of a decrease in antibacterial immunity, first of all NG dysfunctions. Common for all age groups children with CCLP NG dysfunction was found: the appearance of NG expressing CD14 receptors that are absent in children of all three control groups, which indicates the presence of viral and bacterial load; defects of phagocytosis associated with a decrease in the number of actively phagocytic NG, impaired NG capture functions; impaired NADPH oxidase release with partial or complete blockade of the response to additional antigenic load, even in the absence of acute clinical manifestations. Comparative analysis of the studied indicators of the expression level of the receptors CD64, CD16, CD32, CD14 NG in children with CCLP demonstrates different equipment, which determines the inconsistency of the phagocytic and microbicidal function of NG in different age periods. Thus, an increase in the expression of these membrane markers, especially CD64 and CD14, in older age groups is accompanied by more significant defects in phagocytic and killing functions of NG, which is associated not only with recurrent viral respiratory infections, but also with a high frequency of associated bacterial infections of the respiratory system and ENT –

organs. Revealed NG dysfunctions in children with CCLP of various age groups indicate their inability to implement adequate anti-infective protection, which can lead to atypically occurring viral – bacterial infections and the occurrence of various, including purulent complications in the postoperative period, which requires the development of targeted immunotherapy, included in the program of comprehensive rehabilitation in children with CCLP and aimed at restoring impaired NG functions.

Keywords: neutrophilic granulocytes, congenital cleft lip and palate, children

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются основными клетками иммунной системы, которые в большом количестве рекрутируются в ответ на контакт с патогенами и отвечают за обеспечение здоровья полости рта. Ключевым фактором поддержания гомеостаза является взаимодействие между микробиотой полости рта и НГ [8, 9, 17]. Важнейшей функцией НГ является мгновенное реагирование на бактериальные, вирусные и грибковые патогены. Рецепторы поверхностной цитоплазматической мембраны НГ являются чувствительными сенсорами, которые способствуют реализации важных функций НГ и опосредуют взаимосвязь гранулоцитов с экстрацеллюлярным окружением [4-6]. У детей с пороками развития челюстно-лицевой области формирование воспалительного процесса связано с анатомо-топографическими особенностями при врожденной расщелине губы и неба (ВГРН), облегчающими проникновение патогенной микрофлоры с последующими нарушениями микробиоценоза слизистой ротовой полости и слизистой носа, и, как следствие, с негативными изменениями состояния иммунной системы [2, 3]. Необходимость использования антибактериальных препаратов приводит к появлению микроорганизмов с выраженными патогенными свойствами, обладающих высокой резистентностью к антибиотикам, что дополнительно усугубляет изменения микробного пейзажа при ВГРН [1]. Дисфункции НГ при ВГРН препятствуют элиминации возбудителей и поддерживают их персистенцию. С одной стороны, нарушение элиминации возбудителей может возникать на фоне ранее имевшихся дефектов функционирования системы НГ, с другой – несостоятельность НГ усугубляется значительным по патогенности и массивности воздействием различных инфекционных агентов.

Известно, что функциональная активность НГ, в частности их фагоцитарная функция и микробицидная активность, находится в непосредственной зависимости от фенотипических особенностей – количества и плотности экспрессируемых рецепторов [7]. Так, показано, что CD64(Fc γ RI), CD16(Fc γ RIII), CD32(Fc γ RII) – триггерные молекулы, запускающие иммунный фагоцитоз и процессы киллинга. Экспрессия на мембране НГ CD32, CD16 важна в осуществле-

нии как фагоцитарной функции, так и антитело-зависимой цитотоксичности (АЗКЦ), что ассоциируется с CD11b/CD18-зависимым повышением адгезии, дегрануляцией и киллингом [18]. Раннее распознавание микробных продуктов иммунной системой является необходимым условием для эффективного воспалительного ответа, приводящего к привлечению НГ к месту инфекции и бактериальному клиренсу. Рецепторы распознавания PAMP, включая TLR4, а также рецептор CD14, играют существенную роль в этом процессе [15]. CD14 представляет собой липополисахарид-связывающий белок (LPS) и функционирует как рецептор эндотоксина. CD14 и рецепторы распознавания образов Toll-подобного рецептора (TLR) участвуют в ответе на LPS и другие микробные продукты, компоненты грамотрицательных и грамположительных бактерий, микобактерий, спирохет и дрожжей [12]. Роль CD14 и TLR4 ранее была обнаружена при распознавании респираторно-синцитиального вируса (RSV) [14], что позволяет предположить, что эти рецепторы могут иметь более широкое участие в иммунном ответе, чем считалось ранее. CD14 слабо экспрессируется на НГ, однако после активации НГ экспрессия молекулы CD14 на поверхностной плазматической мембране увеличивается за счет транслокации из цитоплазматических гранул [16]. При длительной стимуляции НГ LPS молекулы CD14 синтезируются *de novo* [19]. НГ реагируют на комплексы LPS/LBP через CD14, высвобождая TNF α [10]. Определение особенностей функционирования НГ при ВГРН у детей имеет важное значение в мониторинге таких пациентов на разных этапах комплексной реабилитации. Полноценная диагностика дисфункций НГ необходима для дальнейшего осуществления их своевременной иммунокоррекции с целью предотвращения развития патологического хронического воспаления в ответ на длительно присутствующую на слизистой ротовой полости и носа патогенную микрофлору. Вместе с тем функциональная активность и фенотипические особенности НГ при ВГРН у детей на разных этапах комплексной реабилитации остаются малоизученными.

Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа и функциональной активности НГ у детей с врожденными расщелинами губы

и неба на различных этапах комплексной реабилитации.

Материалы и методы

В исследование были включены 56 детей с ВРГН, находящихся на разных этапах комплексной реабилитации.

Группу 1 составили 20 детей от 1 года до 3 лет на этапе подготовки к хирургической операции по устранению дефекта мягкого неба (велоластики) или ранней щадящей операции по устранению дефектов твердого неба (уранопластики); в группу 2 вошло 20 детей от 4–6 лет перед хирургической операцией по устранению и коррекции дефектов твердого неба и закрытием остаточного дефекта неба (поздняя уранопластика), коррекции верхней губы и преддверия полости рта – ортодонтическая реабилитация; группу 3 составили 16 детей от 7 до 12 лет на этапе подготовки к ранней аутоостеопластике с коррекцией альвеолярного отростка верхней челюсти и хрящевого отдела носа, удалением временных и постоянных зубов по ортодонтическим показаниям, рассечением послеоперационных рубцов, устранением небно-глоточной недостаточности (компактостеотомия). Из ортодонтических мероприятий – применение лицевой маски, небных винтов для расширения верхней челюсти с одновременной протракцией, съемных и несъемных конструкций. Группы контроля составили условно здоровые дети соответствующих возрастных диапазонов (по 10 человек в каждой группе). Проводили микробиологические исследования полости рта, носоглотки и носовой полости у детей с ВРГН на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов стандартными методами.

Проводилась оценка количества НГ, экспрессирующих CD64-, CD16-, CD32-, CD14-рецепторы (Becton Dickinson FACScan, США), и конъюгатов моноклональных антител CD64-FITC, CD16-FITC, CD32-PE, CD14-FITC (Beckman Coulter International S.A., Франция). Исследование фагоцитарной функции НГ проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6], тестировали содержание активно фагоцитирующих НГ – относительное (% ФАН) и абсолютное количество (ФАН абс.); для характеристики объема захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) определяли фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности и переваривания определялся процент переваривания (% П), индекс переваривания (ИП). Активность микробицидных систем НГ, с оценкой их способности к реализации цитотоксического и цитолитического потенциала, тестировалась

с использованием нагрузочных тестов в системе *in vitro*. В зависимости от уровня активности NADPH-оксидазы в спонтанном и стимулированном NBT-тесте (индукция *S. aureus*, штамм 209) определялся средний цитохимический индекс – СЦИ, рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ) – % ФПК_{ст}/% ФПК_{сп}.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Достоверность различия определяли при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По результатам микробиологических и бактериологических исследований идентифицировано 10 культур грамположительных и грамотрицательных бактериальных микроорганизмов, а также *Candida albicans* и *Candida krusei*. Изучение микробного пейзажа у детей с ВРГН позволило выявить определенную закономерность – слизистые были заселены не монокультурами, а ассоциациями микроорганизмов, колонизирующими различные биотопы. Также выявлено, что с увеличением возраста во всех изученных биотопах наблюдаются значительные изменения как в качественном, так и в количественном составе микробов. Нарушение микробиоценоза слизи-

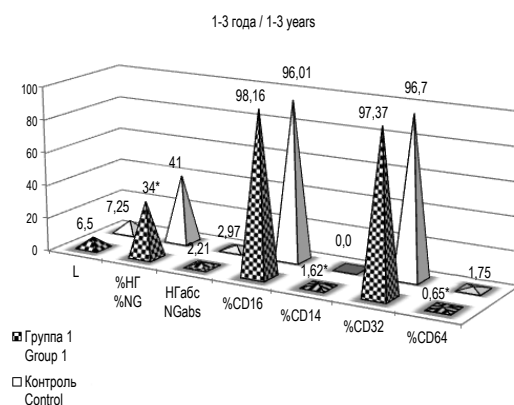


Рисунок 1. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Примечание. * – $p < 0,05$ (достоверность различий между исследуемой группой и соответствующим контролем).

Figure 1. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 1-3 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. *, $p < 0.05$ (the significance of differences between the study group and the corresponding control).

стных ротовой и носовой полости может явиться причиной или следствием снижения антибактериального иммунитета, и прежде всего дисфункций НГ.

Анализ показателей фагоцитарной и микробицидной активности, фенотипического профиля НГ у детей с ВГРН разных возрастных групп на различных этапах комплексной реабилитации продемонстрировал ряд особенностей.

Так, выявлено, что у детей группы 1, на фоне снижения относительного и абсолютного содержания НГ, отмечается незначительное увеличение количества НГ, экспрессирующих CD16- и CD32-рецепторы ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$), достоверное снижение в 2,5 раза уровня CD64⁺ НГ и появление НГ 0,97 (0,44-2,30) %, экспрессирующих на поверхности цитоплазматической мембраны CD14-антигены, в сравнении с показателями контрольной группы детей от 1-3 лет (рис. 1, табл. 1).

Анализ результатов исследования фагоцитарной функции у детей 1 группы, прежде всего, показал более низкий уровень активно фагоцитирующих НГ (% ФАН, ФАН абс.) относительно таковых у здоровых детей (рис. 2).

При этом и показатели поглотительной способности НГ (ФЧ, ФИ), и показатели, харак-

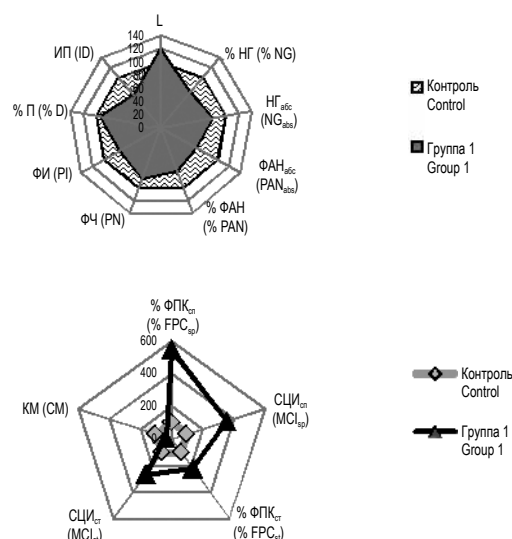


Рисунок 2. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Figure 2. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 1-3 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННОЙ РАСЩЕЛИНОЙ ГУБЫ И НЕБА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDICATORS OF THE RECEPTOR FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	1-3 года 1-3 years	Контроль 1-3 года Control 1-3 years	4-6 лет 4-6 years	Контроль 4-6 лет Control 4-6 years	7-12 лет 7-12 years	Контроль 7-12 лет Control 7-12 years
Общее количество лейкоцитов Total leukocyte count	6,5 (6,45-7,00)	7,25 (6,15-7,40)	5,63 (4,94-7,15)	5,68 (5,00-6,15)	6,35* (5,39-7,28)	4,57 (4,03-5,10)
% НГ % NG	34,00* (28,00-38,00)	41,00 (39,00-45,50)	44,00 (36,50-53,75)	41,29 (35,00-45,00)	52,00 (43,00-61,50)	57,83 (54,25-59,75)
% CD16	97,92 (97,88-98,4)	96,01 (96,00-99,20)	98,53* (98,28-99,27)	93,30 (91,30-95,20)	92,10* (91,08-92,98)	98,25 (96,84-99,36)
% CD14	0,97* (0,44-2,30)	0,01	0,88* (0,39-1,46)	0,01	1,07* (0,96-1,17)	0,01
% CD32	98,81 (97,17-98,30)	96,70 (93,87-99,80)	98,11 (97,53-98,71)	94,10 (92,30-96,00)	93,72 (92,70-94,25)	93,1 (91,06-96,60)
% CD64	0,58* (0,48-0,70)	1,75 (1,40-1,93)	0,62 (0,13-1,03)	0,61 (0,20-0,70)	3,36* (2,11-4,65)	0,50 (0,40-0,68)

Примечание.* – достоверность различий $p < 0,05$ по отношению к соответствующему возрастному контролю.

Note. *, significance of differences $p < 0.05$ with respect to the corresponding age control.

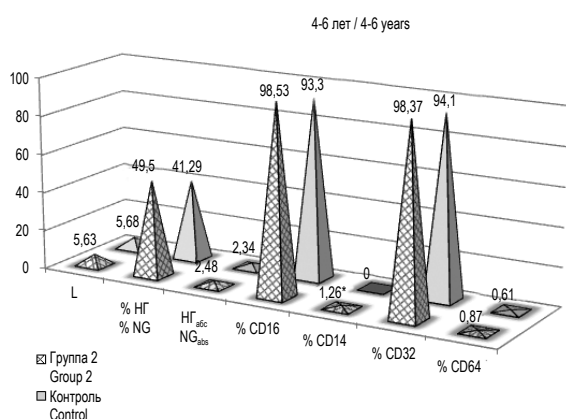


Рисунок 3. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 4-6 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. As for Figure 1.

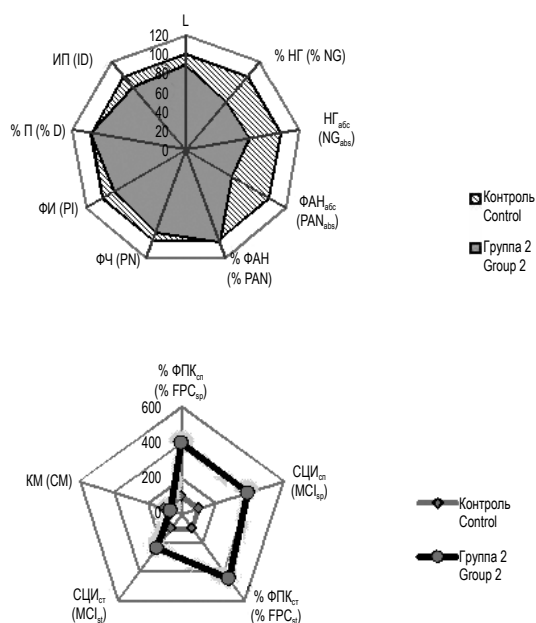


Рисунок 4. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Figure 4. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 4-6 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

теризующие переваривающую способность НГ, были на уровне контрольных значений (рис. 2). В то же время наблюдалась напряженность NADPH-оксидазной микробицидной активности НГ в спонтанном NBT-тесте (СЦИ_{сп} – 0,32 (0,25-0,40), % ФПК_{сп} – 11,00 (8,00-13,00) против СЦИ_{сп} – 0,09 (0,05-0,12), % ФПК_{сп} – 2,00 (1,00-3,00) в контроле). При дополнительной антигенной нагрузке отмечался срыв резервных возможностей НГ, что отразилось в снижении КМ – 0,88 (0,88-1,33) против 2,5 (1,50-3,50) у здоровых детей соответствующей возрастной группы (рис. 2).

Выявленные изменения у детей этой группы характеризуют, с одной стороны, дефектность и напряженность врожденного иммунитета на фоне состояния физиологического воспаления слизистой десен при прорезывании временных зубов, характерного для этого возраста, с другой стороны и, как следствие, формирование неадекватного иммунного ответа, связанного с постоянной вирусной нагрузкой (персистенция респираторных и герпес-вирусов, острые герпетические стоматиты), бактериальной нагрузки, представленной наиболее часто регистрируемыми ассоциациями стрептококков (*Str. viridans*, *Str. pneumoniae*), *Ent. durans*, *Ent. faecium*, *S. epidermidis*, *Haemophilus influenza*, при обилии мягкого зубного налета, грибковые стоматиты, вызванные *Candida albicans*, несмотря на отсутствие острых клинических проявлений заболеваний.

Показано, что у детей исследуемой группы 2 (4-6 лет) общее количество лейкоцитов и НГ имело тенденцию к снижению, но достоверно не отличалось от значений контрольной группы условно здоровых детей, сопоставимой по возрасту ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$). При анализе показателей, характеризующих фенотип НГ, отмечено достоверное увеличение относительного количества НГ, экспрессирующих CD32- и CD14-рецепторы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$), при неизменном уровне CD64⁺НГ, CD16⁺НГ по отношению к показателям контроля ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$) (рис. 3, табл. 1).

При этом количество активно работающих НГ (% ФАН, ФАН абс.), способность захвата бактериального антигена (ФЧ и ФИ) и переваривающая активность НГ были в пределах контрольных значений ($p > 0,05$) (рис. 5). Однако выявлена активация спонтанных NADPH-оксидаз с низким ответом на дополнительную антигенную нагрузку (КМ – 1,13 (1,00-1,25) против 1,67 (1,55-2,00) в контроле) (рис. 4).

Анализ показателей, определяющих состояние НГ у детей с ВРГН данной возрастной группы, выявил неадекватно низкий ответ на вирусные инфекции и блокаду – на бактериальные. Для этой группы детей характерны хронические

герпетические стоматиты, разной степени тяжести с афтозными высыпаниями на слизистой оболочке полости рта, катаральным воспалением десен. Появляется сменный прикус (смена временных зубов на постоянные) слизистая десен в состоянии физиологического воспаления, которая является входными воротами для вирусной и бактериальной инфекции. Ухудшается гигиеническое состояние полости рта, активно появляется кариес и осложненный кариес зубов, наличие в полости рта несанируемых зубов увеличивает штаммы микроорганизмов *S. mutans*, *S. aureus*, значительно усиливается колонизация *Str. viridans*, *Str. pneumoniae*, *Ent. Durans*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*. Дети этого возраста с ВГРН болеют детскими инфекциями, которые проявляются воспалением в полости рта (корь, ветряная оспа, скарлатина и т.д.) – эрозиями, афтами, язвами, страдают рецидивирующими бактериальными стоматитами, катаральными и гнойными воспалениями миндалин, ринитами.

Анализ показателей группы 3 детей 7-12 лет позволил выявить следующие закономерности: на фоне тенденции снижения общего количества лейкоцитов выявлено достоверное снижение относительного и абсолютного количества НГ (рис. 5).

При этом отмечено повышение в 6,7 раза уровня CD64⁺НГ до 3,36 (2,11-4,65) % против 0,50 (0,40-0,68) % в контроле, появление CD14⁺НГ в 1,07 (0,96-1,17) % на фоне снижения уровня CD16⁺НГ до 92,10 (91,08-92,00) % против 98,25 (96,84-99,36) % в контроле (рис. 5).

При оценке фагоцитарной активности у детей 3 группы, на фоне снижения абсолютного количества НГ до 2,11 (1,67-3,17) против 4,3 (4,27-4,64) в контроле, выявлено снижение и доли среди них активно фагоцитирующих НГ до 44,0 (42,50-45,50) % против 54,67 (51,00-57,00) %, что особенно показательно при оценке абсолютных показателей ФАН (0,87 (0,44-1,30) × 10⁹/л против 2,35 (2,17-4,64) × 10⁹/л) (рис. 6).

Процессы захвата (ФИ, ФЧ) также имели тенденцию к снижению ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$), а показатели переваривания (% П, ИП) не отличались от контрольных значений. При этом выявлено повышение спонтанной активности NADPH-оксидаз как по % ФПК – 4,00 (3,00-5,00) против 1,00 (1,00-1,75) ($p < 0,05$), так и по СЦИ – 0,15 (0,13-0,18) против 0,05 (0,04; 0,11) ($p < 0,05$) в контроле. При дополнительной антигенной нагрузке в NBT_{ст}-тесте сохранялся резервный микробицидный потенциал НГ – КМ 1,34 (1,26-1,42) (рис. 6). Данные изменения можно оценить как неадекватную реакцию НГ. Синтез *de novo* CD14, усиление экспрессии CD64 при сниже-

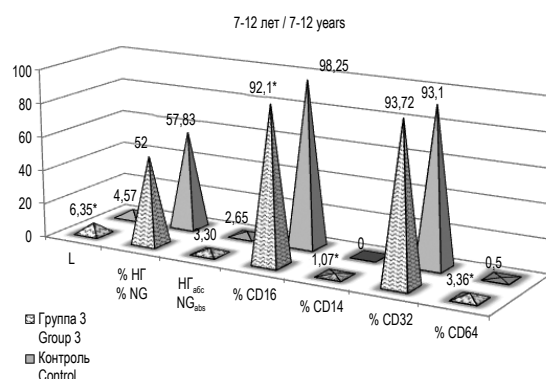


Рисунок 5. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 7-12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 7-12 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. As for Figure 1.

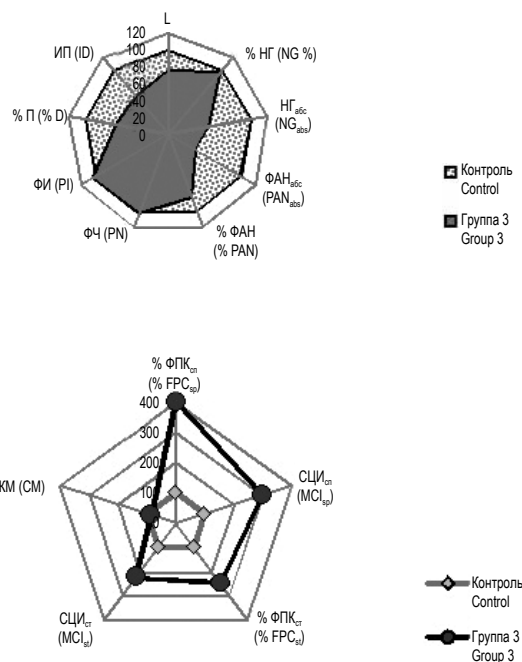


Рисунок 6. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 7-12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Figure 6. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 7-12 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

нии экспрессии CD16 демонстрируют фенотип НГ, характерный для наличия инфекции [19]. В 3 группе детей также выявлен неэффективный ответ НГ на постоянную микробную нагрузку, преимущественно бактериальную, так как выявленный количественный дефицит НГ, в том числе активно фагоцитирующих НГ, недостаточен для элиминации патогена. У детей группы 3 увеличивается частота встречаемости микроорганизмов и их видовое разнообразие, кроме обнаруженных в других группах ассоциаций стрептококков, стафилококков появляются в большом количестве *S. krusei* и *S. albicans*, *Ent. durans*, *Kl. pneumonia*. В этот возрастной период у детей отмечается склонность к пролиферативным и гипертрофическим воспалительным процессам в области десневого сосочка и маргинальной десны (отечно-воспалительные и фиброзные формы гипертрофического гингивита), а также аллергические риниты, аллергические стоматиты.

Таким образом, сравнительный анализ уровня экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD14 НГ в изучаемых группах детей с ВГРН и детей разных возрастных контрольных групп демонстрирует разную оснащенность, предопределяющую несостоятельность фагоцитарной и микробицидной функции НГ во все изучаемые возрастные периоды. Несмотря на появление корцепторных молекул CD14 на НГ, свидетельствующих об активации паттернраспознающих рецепторов TLR2 и TLR4 в целях обеспечения процессов адекватной элиминации микроорганизмов, по всей вероятности, высокая микробная нагрузка и ее увеличение в различных группах

с ВГРН вызывает блокаду взаимодействия CD16-CR3 под действием Mac-1-подобного белка GAS [11], продуцируемого микроорганизмами, в частности стрептококками, что приводит к нарушению передачи сигналов и ингибированию антимикробного ответа НГ.

Обнаружены общие для всех возрастных групп детей с ВГРН дисфункции НГ:

– появление НГ, экспрессирующих CD14-рецепторы, отсутствующие у детей всех трех контрольных групп условно здоровых детей и свидетельствует о высокой вирусной и бактериальной нагрузке на слизистых даже в период отсутствия острых клинических проявлений;

– дефекты фагоцитоза, выраженные в той или иной степени, в первую очередь связанные со снижением количества активно фагоцитирующих НГ, нарушением функций захвата;

– напряженность NADPH-оксидаз с частичной или полной блокадой ответа на дополнительную антигенную нагрузку.

Выявленные особенности нарушений функционирования НГ у детей различных возрастных групп с ВГРН свидетельствуют об их неспособности к реализации адекватной противoinфекционной защиты, что может приводить к нетипично протекающим вирусно-бактериальным инфекциям и возникновению различных, в том числе гнойных, осложнений в послеоперационном периоде. Очевидна необходимость разработки таргетной иммунотерапии, направленной на восстановление нарушенных функций НГ и включаемой в программу комплексной реабилитации детей с ВГРН.

Список литературы / References

1. Леонтьев В.К., Воронин В.Ф., Шестаков В.Т. Микрофлора полости рта. М., 2000. 21 с. [Leontyev V.K., Voronin V.F., Shestakov V.T. Microflora of the oral cavity]. Moscow, 2000. 21 p.
2. Митропанова М.Н., Гайворонская Т.В., Любомирская Е.О. Цитокины крови у детей с врожденными расщелинами губы и неба // Кубанский научный медицинский вестник, 2016. № 4 (159). С. 79-82. [Mitropanova M.N., Gaivoronskaya T.V., Lyubomirskaya E.O. Blood cytokines in children with congenital cleft lip and palate. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Journal*, 2016, no. 4 (159), pp. 79-82. (In Russ.)]
3. Мусаходжаева Д.А., Инояттов А.Ш., Якубов Ш.Н. Некоторые показатели иммунной системы детей с врожденной расщелиной губы и неба // Проблемы биологии и медицины, 2011. № 4 (67). С. 33. [Musakhodzhaeva D.A., Inoyatov A.Sh., Yakubov Sh.N. Some indicators of the immune system of children with congenital cleft lip and palate. *Problemy biologii i meditsiny = Problems of Biology and Medicine*, 2011, no. 4 (67), p. 33. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 1) // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Yevlevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 2) // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Yevlevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas.

Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)
doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.

6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии (методические рекомендации). Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. Krasnodar, 2017. 52 p.

7. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, Vol. 28, no. 2, pp. 260-274.

8. Fine N., Hassanpour S., Borenstein A., Sima C., Oveisi M., Scholey J., Cherney D., Glogauer M. Distinct Oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. *J. Dent. Res.*, 2016, Vol. 95, no. 8, pp. 931-938.

9. Gao L., Xu, T., Huang G., Jiang S., Gu Y., Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell*, 2018, Vol. 9, no. 5, pp. 488-500.

10. Haziot A.I., Tsuberi B.Z., Goyert S.M.. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 12, pp. 5556-5565.

11. Hajishengallis G., Lambris J.D. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 187-200.

12. Imler J.L., Hoffmann J.A. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, Vol. 3, pp. 16-22.

13. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007, no. 297, pp. 353-363.

14. Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A., Walsh E.E., Freeman M.W., Golenbock D.T., Anderson L.J., Finberg R.W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.*, 2000, Vol. 1, no. 5, pp. 398-401.

15. McAvoy E.F., McDonald B., Parsons S.A., Wong C.H., Landmann R., Kubers P. The Role of CD14 in neutrophil recruitment within the liver microcirculation during endotoxemia. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 4, pp. 2592-2601.

16. Rodeberg D.A., Morris R.E., Babcock G.F. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. *Infect. Immun.*, 1997, Vol. 65, pp. 4747-4753.

17. Uriarte S.M., Edmisson J.S., Jimenez-Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 282-298.

18. van Spruiel A.B., Leusen J.H., van Egmond M., Dijkman H.B., Assmann K.J., Mayadas T.N., van de Winkel J.G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 8, pp. 2478-2486.

19. Wagner C., Deppisch R., Deneffle B., Hug F., Andrassy K., Hänsch M. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*, 2003, Vol. 19, pp. 5-12.

Авторы:

Митропанова М.Н. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Mitropanova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Dentofacial Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия

Ковалева С.В. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology FPT MW of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 11.03.2019
Отправлена на доработку 15.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 11.03.2019
Revision received 15.03.2019
Accepted 22.03.2019