3. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., и т.д. Газовая сигнализация клетках млекопитающих // Успехи физиологических наук. 2015. Т. 46, № 4. С. 53–73.
4. Реутов. В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиологических наук. 2007. Т. 38, № 4. С. 39–58.
5. Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине. 2012. №2. С. 128–134.
6. Коган А. Х. Двойное потенцирование ишемической болезни сердца активными формами кислорода и антиоксиданты / Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2002. № 2. С. 3–6.
7. Лебедев В. В. Супероксидная теория патогенеза и терапии иммунных расстройств // Вестник РАМН. 2002. № 4. С. 34–40.8-10
8. Серебрякова В.Н., Трубачева И.А., Кавешников В.С. Нарушения липидного и углеводного обмена в организованной популяции женщин, занятых умственным трудом // Сибирский медицинский журнал. 2014. № 2, Т. 29. С. 79-84.
9. Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshel'skaya O.A. et al. System of matrix metalloproteinases and cytokine in type 2 diabetes and impaired carbohydrate tolerance associated with arterial hypertension. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2014. Т. 156. № 5. С. 635-638.
10. Sill J.C., Proper J.A., Johnson M.E., Uhl C.B., Katusic Z.S. Reactive oxygen species and human platelet GP IIb/IIIa receptor activation. // Free Radic Biol Med. 2009. №.18 (8). P. 613-619.
11. Трубачева О.А., Ситожевский А.В., Петров И.В., и т.д. Влияние активных форм кислорода на коллаген-зависимую агрегацию тромбоцитов у пациентов сахарным диабетом и артериальной гипертензией. Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 26. № 4-2. С. 111-118.
12. Трубачева О.А., Кремено С.В., Петрова И.В и т.д. Участие активных форм кислорода в регуляции Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов эритроцитов. Бюллетень сибирской медицины. 2009. Т. 8. № 2. С. 56-60.

**Устьянцева Л.С., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Рюмин В.Е., Шакирова К.П.
Становление микробиоценоза и локального иммунитета кишечника детей с
экстремально низкой массой тела, сформировавших бронхолегочную дисплазию**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и
младенчества» МЗ РФ
(Россия, Екатеринбург)*

doi: 10.18411/lj-11-2020-31

idsp: ljjournal-11-2020-31

Аннотация

Проведено исследование микробиоценоза и локального иммунитета кишечника у 75 глубоко недоношенных детей с экстремально низкой массой тела с бронхолегочной дисплазией в зависимости от срока гестации в динамике постнатального периода. Выявленные изменения доказывают участие условно-патогенной микрофлоры в формировании гуморального иммунитета и подтверждается наличием положительных корреляционных связей условно-патогенной микрофлоры с уровнем sIgA в копрофильтратах в возрасте 1 месяца жизни и содержанием IL-4 в 38-40 недель постконцептуального возраста.

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, иммунитет, микрофлора кишечника, экстремально низкая масса тела, цитокины

Abstract

The study of microbiocenosis and local immunity of the intestine in 75 extremely premature infants with extremely low birth weight with bronchopulmonary dysplasia in the dynamics of the postnatal period. The revealed changes prove the participation of opportunistic microflora in the formation of humoral immunity and is confirmed by the presence of positive correlations between opportunistic microflora and sIgA level in

coprofiltrates at the age of 1 month of life and IL-4 content at 38-40 weeks of post-conceptual age.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, immunity, intestinal microflora, extremely low birth weight, cytokines

Формирование микробиоты кишечника — многоэтапный процесс, который играет важную роль в созревании иммунной системы у новорожденных детей [1]. Для активации местного иммунитета, а также иммунной системы всего организма на фоне формирования адекватного иммунного ответа необходимо воздействие антигенов нормофлоры [2]. Нормофлора обладает выраженными иммуногенными свойствами и способствует развитию лимфоидной ткани кишечника и местного иммунитета [3]. В физиологических условиях существует регуляция и избирательность защитных механизмов, которые контролируют колонизацию кишечника и определяют либо иммунологическую толерантность, либо развитие иммунного ответа на патогены. Патологическое течение ante- и интранатального периодов, инфекция, гестационный возраст и масса тела при рождении, гипоксия и асфиксия, проведение инвазивных медицинских манипуляций и респираторной поддержки, отсроченное прикладывание к груди у детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) способствуют не только формированию бронхолегочной дисплазии (БЛД), но и нарушению колонизации желудочно-кишечного тракта, что в последующем усугубляет течение заболевания [4, 5, 6, 7]. Работ, посвященных изучению формирования кишечного микробиоценоза у детей с ЭНМТ, сформировавших БЛД, в литературе встречается мало, поэтому данная проблема является весьма актуальной.

Цель исследования. Оценить изменение микрофлоры кишечника и содержание цитокинов в копрофильтратах у детей с ЭНМТ в возрасте 1 месяца жизни и по достижению постконцептуального возраста (ПКВ) 38–40 недель.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое и бактериологическое обследование 75 детей с ЭНМТ, родившихся на 22–31 неделе гестации, сформировавших БЛД. Глубоко недоношенные дети были подразделены на две основные группы: 1-я группа – 35 новорожденных с ЭНМТ, родившихся в гестационном сроке 22-27 недель, 2-я группа – 40 новорожденных с ЭНМТ, родившихся в гестационном сроке 28-31 неделя. 3-я группа – группа сравнения - 25 доношенных здоровых новорожденных детей, родившихся от условно здоровых женщин благоприятного репродуктивного возраста (20-34 лет) с физиологически протекавшими беременностью, родами и послеродовым периодом.

Исследование микрофлоры кишечника проводили в возрасте 1 месяца жизни, а также в ПКВ 38–40 недель. Микробиологическое исследование фекалий выполняли по методике количественного посева Ю.М. Фельдман и соавт. с идентификацией выделенных культур с помощью коммерческих биохимических тест-систем фирмы «LACHEMA» (Чехия).

Иммунологическое обследование включало в себя оценку продукции про- и противовоспалительных цитокинов на локальном уровне (копрофильтраты). Исследование копрофильтратов проводилось в 1 месяц жизни и в ПКВ 38–40 недель. Содержание цитокинов (INF- γ , IL-8, IL-4, IL-6) определяли методом иммуноферментного анализа «Multiskan MCC/340» фирмы Labsystems (Финляндия) с помощью коммерческих тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителей наборов. Уровень sIgA в копрофильтратах оценивали при использовании тест-систем «Immundiagnostik» (Германия). Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0, IBM SPSS Statistics 22, Microsoft Office Excel 2007 для Windows. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, P25 и P75). Уровень значимости (p) с учетом поправки Бонферрони

принимали равным или менее 0,017, при $0,017 < p < 0,05$ констатировали тенденцию к изменению параметров. Корреляционный анализ проводили с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Корреляционную связь с коэффициентом корреляции $|r| = 1-0,75$ расценивали как сильную, $|r| = 0,75-0,25$ – как умеренную и $|r| < 0,25$ – как слабую.

Результаты и обсуждения. В период ранней микробной колонизации кишечника у ребенка начинается формирование адаптивного звена иммунитета, существенная роль в этом процессе отведена бифидо- и лактобактериям, запускающим продукцию цитокинов активированными фагоцитарными клетками [8].

Изменение качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника влияет на баланс Th1/Th2 клеток хелперов, определяя иммунологическую толерантность относительно нормальной микробиоты или иммунный ответ на патогены [9].

При бактериологическом исследовании микробиоты толстой кишки у недоношенных детей с ЭНМТ, сформировавших впоследствии БЛД, в возрасте 1 месяца жизни выявлен выраженный дефицит облигатной микрофлоры. В 1-й группе детей частота обнаружения энтеробактерий (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas spp.*) составила 34,2%. Суммарная доля грамположительных бактерий (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*) – 28,5% (табл.1). Во 2-й группе частота выявления грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов была практически одинаковой и составляла 35% и 32,5% соответственно.

Таблица 1.

Частота выявления условно-патогенной микрофлоры в кале у детей с ЭНМТ возрасте 1 месяца жизни

Микрофлора	КОЕ/г	1 группа (n=35)		2 группа (n=40)		
		Абс.	%	Абс.	%	
Микрофлора не выявлена		10	28,5	12	30	p ₁₋₂ =0,003
Микрофлора обнаружена		25	71,5	28	70	p ₁₋₂ =0,005
Enterobacter cloacae	< 10 ⁵	2	5,7	0	0	
	>10 ⁵	1	2,9	1	2,5	
Enterobacter aerogenes	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	0	0	2	5	
Klebsiella pneumoniae	< 10 ⁵	1	2,9	1	2,5	
	>10 ⁵	2	5,7	3	7,5	
Klebsiella oxytoca	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	0	0	2	5	
Escherichia coli	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	2	5,7	3	7,5	
Stenotr. Maltophilia	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	1	2,9	1	2,5	
Pseudomonas spp.	< 10 ⁵	2	5,7	0	0	
	>10 ⁵	1	2,9	1	2,5	
S. epidermidis	< 10 ⁵	6	17,1	4	10	
	>10 ⁵	1	2,9	0	0	
S. haemolyticus	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	0	0	3	7,5	
Enterococcus faecium	< 10 ⁵	2	5,7	4	10	
	>10 ⁵	2	5,7	2	5	
Грибы рода Candida	< 10 ⁵	1	2,9	0	0	
	>10 ⁵	0	0	0	0	
Микст-флора	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	1	2,9	1	2,5	

Примечание: p – значимость различий между группами детей (критерий χ^2 с поправкой Йетса): 1 – дети 22 – 27 недель гестации, 2 – дети 28 – 31 недели гестации.

Микст-флора была выявлена в обеих группах детей практически с одинаковой частотой 2,9% (*Candida kruzei* 10^5 и *Staphylococcus epidermidis* 10^5 КОЕ/г) и 2,5% (*Klebsiella oxytoca* 10^6 и *Citrobacter freundii* 10^6 КОЕ/г) случаев соответственно.

Следует отметить, что микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующие бактерии (*Stenotr. Maltophilia* и *Pseudomonas spp.*), потенциально опасные в плане формирования антибиотико-резистентности, определялись практически у каждого четвертого ребенка обеих групп (25,7% и 27,5% соответственно)

К ПКВ 38-40 недель кишечная микрофлора обнаруживалась у всех детей из 1-й группы. Суммарная доля грамположительных микроорганизмов снизилась до 17,2% случаев, а частота выявления энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий увеличилась до 62% (табл.2).

Таблица 2

Частота выявления условно-патогенной микрофлоры в кале у детей с ЭНМТ в постконцептуальном возрасте 38-40 недель

Микрофлора	КОЕ/г	1 группа (n=29)		2 группа (n=29)		p
		Абс.	%	Абс.	%	
Микрофлора не выявлена		0	0	7	24,1	p ₁₋₂ =0,003
Микрофлора обнаружена		29	100	22	75,8	p ₁₋₂ =0,005
Enterobacter cloacae	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	1	3,4	0	0	
Klebsiella pneumoniae	< 10 ⁵	0	0	1	3,4	
	>10 ⁵	6	20,7	3	10,3	
Klebsiella oxytoca	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	2	6,9	1	3,4	
Escherichia coli	< 10 ⁵	0	0	0	0	
	>10 ⁵	3	10,3	2	6,9	
Pseudomonas spp.	< 10 ⁵	0	0	1	3,4	
	>10 ⁵	0	0	0	0	
S. epidermidis	< 10 ⁵	4	13,8	1	3,4	
	>10 ⁵	0	0	0	0	
Enterococcus faecium	< 10 ⁵	2	10,3	4	13,8	
	>10 ⁵	3	10,3	1	3,4	
Микст-флора	< 10 ⁵	2	6,9	2	6,9	
	>10 ⁵	4	10,3	4	13,8	

Примечание: p – значимость различий между группами детей (критерий χ^2 с поправкой Йетса): 1 – дети 22 – 27 недель гестации, 2 – дети 28 – 31 недели гестации.

Во 2-й группе детей кишечник был колонизирован в 75,8% случаев. При этом удельный вес грамотрицательных микроорганизмов сохранился на прежнем уровне (34,4%) по сравнению с месячным возрастом. Частота обнаружения коагулазонегативных стафилококков и энтерококков уменьшилась в 1,6 раза и составила 20,7% случаев в обеих группах. Количество выявления случаев микробных ассоциаций в ПКВ 38-40 недель в 1-й и 2-й группах увеличилось 7,1 и 8,2 раза (20,6% случаев).

Число детей имеющих микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующие бактерии в 1-й группе возросло на 12,2% (до 37,9%), а во 2-й группе не изменилось и составляло 27,5%.

При анализе состояния локального иммунитета детей с ЭНМТ в зависимости от гестационного возраста обнаружено, что содержание IFN- γ в копрофильтратах у глубоко недоношенных детей в возрасте 1 месяца жизни достоверно превышало показатели группы сравнения (табл.3).

У всех детей основных групп отмечалось сниженное содержание IL-6, статистически значимое на протяжении периода наблюдения. Наименьшая концентрация этого цитокина наблюдалась у детей 1-й группы в 1 месяц жизни. Сниженный уровень IL-8 регистрировался у всех детей с ЭНМТ к концу неонатального периода с сохраняющимся уменьшением концентрации по достижению ПКВ 38-40 недель у детей 2-й группы.

Таблица 3.

Уровень цитокинов в динамике постнатального периода в копрофильтратах у детей с ЭНМТ, МЕ (P25-P75)

Показатели, пг/мл	Возраст	1-я группа (n=42)	2-я группа (n=43)	3-я группа (n=25)	P
IFN- γ	1 мес.	6,32(5,48-7,06)	5,37(4,95-5,84)	5,68(0-5,89)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$ $p_{1-2}=0,09$
	ПКВ 38-40	6,22(5,23-7,27)	5,79(5,16-8,0)	5,68(0-5,89)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$
IL-6	1 мес.	2,94(2,89-3,23)	3,12(3,02-3,23)	6,12(5,54-6,47)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$ $p_{1-2}=0,012$
	ПКВ 38-40	3,06(2,89-3,13)	3,12(2,89-3,29)	6,12(5,54-6,47)	$p_{1-3}=0,06$ $p_{2-3}=0,03$
IL-8	1 мес.	2,31(2,3-2,48)	2,22(2,18-2,55)	5,81(2,82-5,9)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$
	ПКВ 38-40	2,44(2,2-3,85)	2,56(2,24-2,82)	5,81(2,82-5,9)	$p_{2-3}=0,001$
IL-4	1 мес.	23,95 (16,69-34,08)	12,47(2,31-60,18)	4,33 (3,24-4,48)	$p_{1-3, 2-3}=0,010$
	ПКВ 38-40	32,33 (20,88-61,48)	35,39(27,27-50,81)	4,33 (3,24-4,48)	$p_{1-3, 2-3}=0,001$

Примечание: p – значимость различий между группами детей (критерий Манна-Уитни): 1 – дети 22 – 27 недель гестации, 2 – дети 28 – 31 недели гестации.

В динамике периода наблюдения у всех недоношенных детей отмечалось достоверно высокое содержание IL-4, что может свидетельствовать о значении условно-патогенных микроорганизмов, их видового разнообразия в активации гуморального звена иммунитета, осуществлении местных защитных механизмов (активация хемотаксиса, ограничение очага воспаления, повышение цитотоксической способности макрофагов).

Степень защиты от бактериальных и вирусных инфекций желудочно-кишечного тракта зависит от содержания sIgA, основная функция которого заключается в нейтрализации токсинов и вирусов, а повышенная продукция указывает на развитие инфекционного процесса. В результате проведенных исследований установлено, что содержание уровня sIgA в копрофильтратах у детей с ЭНМТ в различные сроки исследования превышало нормативные значения (0,5-2,0 г/л) (табл. 4).

Таблица 4.

Содержание sIgA в копрофильтратах у детей с ЭНМТ в динамике постнатального периода, г/л

Срок исследования	1-я группа (n=42)	2-я группа (n=43)	3-я группа (n=25)	Уровень значимости
1 месяц	10,44 (8,89-10,97)	9,7(9,58-10,71)	1,08(1,03-3,36)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$
ПКВ 38-40 недель	10,03 (5,97-11,12)	8,77(6,5-10,02)	1,08(1,03-3,36)	$p_{1-3, 2-3}=0,0001$

Примечание: p – значимость различий между группами детей (критерий Манна-Уитни): 1 – дети, 22 – 27 недель гестации, 2 – дети 28 – 31 недели гестации.

При проведении корреляционного анализа было обнаружено, что наличие условно-патогенной микрофлоры в кишечнике у детей положительно коррелирует с

уровнем sIgA в копрофильтратах в возрасте 1 месяца жизни ($r=0,32$, $p=0,04$), а также с содержанием IL-4 в 38-40 недель ПКВ.

Заключение. Таким образом, у всех глубоко недоношенных детей с ЭНМТ, сформировавших БЛД, кишечная микрофлора была представлена факультативными анаэробами. В динамике периода обследования наблюдалось уменьшение количества кокковой микрофлоры и повышение доли условно-патогенных энтеробактерий, выделение которых из фекалий к ПКВ 38-40 недель составило 100% и 75,9% в обеих группах. Колонизация кишечника энтеробактериями и неферментирующими грамотрицательными бактериями у детей 1-й группы в 1,6 раза превышала показатели детей 2-й группы (62 % против 38%). При этом у 24,1% детей 2-й группы кишечник не был колонизирован. Доля кишечной микст-флоры у детей 1-й и 2-й группы увеличилась до 20,7%.

Колонизация кишечника условно-патогенной микрофлорой у всех недоношенных детей с БЛД в динамике постнатального периода сопровождалась повышением концентрации IFN- γ и IL-4, и уменьшением содержания IL-6 и IL-8 на фоне увеличения продукции sIgA в копрофильтратах, что свидетельствует об участии условно-патогенной микрофлоры в формировании гуморального иммунитета и подтверждается наличием положительных корреляционных связей условно-патогенной микрофлоры с уровнем sIgA в копрофильтратах в возрасте 1 месяца жизни и содержанием IL-4 в 38-40 недель ПКВ.

Благодарности: статья подготовлена при финансовой поддержке Минобрнауки, грант Президента Российской Федерации № МК-1140.2020.7.

1. Чаплин А.В., Ребриков Д.В., Болдырева М.Н. Микробиом человека// Вестник РГМУ, 2017. №2. С.5-13.
2. Шамова К.П., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Устьянцева Л.С. Характер микробной колонизации и цитокиновый профиль у детей с экстремально низкой массой тела в динамике постнатального периода// Международный научный журнал «Интернаука», 2017. Т.1, № 3 (25). С.61-64.
3. Хавкин А.И. Микрофлора и развитие иммунной системы// Вопросы современной педиатрии, 2012. 11 (5). С. 86–89.
4. Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра. Что нового?// Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (1). С.38-45.
5. Набока Ю.Л., Рымашевский А.Н., Свирава Э.Г., Брагина Л.Е. Формирование микрофлоры пищеварительного тракта новорожденных в динамике// Журнал микробиол. 2012. №3. С.65-70.,
6. Печкуров Д.В., Турти Т.В., Беляева И.А., Тяжева А.А. Микробиота кишечника у детей: от профилактики нарушений становления к предупреждению неинфекционных заболеваний// Педиатрическая фармакология. 2016. №13 (4). С.377-383.
7. Toscano M., De Grandi R., Grossi E. et. al. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns, immune system: a mini review// Front. Microbiol. 8:2100. DOI: 10.3389/fmicb. 2017.02100.
8. Чистякова Г.Н., Чарипова Б.Т., Тарасова М.Н. Особенности состояния иммунной системы и характер микробной колонизации детей с экстремально низкой массой тела при рождении // Педиатрия. 2013. № 2. С. 42-48.
9. Бениова С.Н., Столина М.Л., Руденко Н.В. Заболевания желудочно-кишечного тракта у доношенных и недоношенных новорожденных// Современные проблемы науки и образования. 2012. № 3. С.45-49.

Утепова Г.Б., Нигматова Л.М., Нуримова Д.М.
Состояние противокраснушного иммунитета у детей

*Ташкентский государственный стоматологический институт
 (Узбекистан, Ташкент)*

doi: 10.18411/lj-11-2020-32

idsp: ljjournal-11-2020-32

Аннотация

Известные эпидемиологические особенности краснухи определяют контингенты риска, подверженность заражению которых имеет серьезные последствия. При высокой