

Б.А. Бахметьев¹, С.Я. Зверев², Н.С. Калашникова², Л.В. Ключникова²**АКТУАЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТКИ ВОЗРАСТНЫХ НОРМ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛЕТОК КРОВИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЗА СОСТОЯНИЕМ ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ**¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь)² Пермский краевой Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Пермь)

Учитывая рост числа ВИЧ-инфицированных женщин детородного возраста, настоящее исследование было направлено на сравнение CD-фенотипа детей, рожденных инфицированными матерями с возрастными нормами, полученными в ходе изучения функционального состояния иммунной системы здоровых детей разного пола и возраста в Пермском крае. Было обследовано 133 ребенка инфицированных матерей в возрасте от 1 месяца до 4 лет и 53 ребенка, которые в момент проведения исследования были клинически здоровы и не страдали хроническими заболеваниями. Среди лимфоцитов периферической крови детей идентифицировали число CD3+-Т-лимфоцитов, CD3+CD4+-Т-хелперов, CD3+CD8+-цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3-CD19+-В-лимфоцитов, CD3-CD16+/56+-NK-клеток. Было установлено достоверное повышение функциональной активности иммунной системы у детей группы риска. У ВИЧ-положительных детей в возрастных группах от 1 до 6 месяцев и от 1 года до 4 лет, по сравнению с их здоровыми сверстниками, выявлено повышение абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов. Напротив, в возрастной группе от 6 до 12 месяцев при аналогичном сравнении показано снижение процентного числа лимфоцитов и абсолютного числа NK-клеток. Разделение исследуемых детей по полу подтвердило необходимость учета данного фактора даже в столь раннем возрасте. Было показано, что как при перинатальном контакте, так и при развитии ВИЧ-инфекции реакции мужского и женского организмов отличаются. Данные, полученные при иммунофенотипировании крови здоровых детей г. Перми, были сравнены с аналогичными американских и китайских исследований. Выявленные отличия зависели, прежде всего, от возрастного диапазона обследованных детей и чаще затрагивали абсолютные значения клеток, экспрессирующих конкретные маркеры. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшей временной детализации при оценке состояния иммунной системы у детей в норме и позволяют разработать качественно новые критерии мониторинга иммунной системы при риске вертикального пути заражения ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ, дети, возраст, иммунофенотипирование**NECESSITY OF AGE-RELATED STANDARDS FOR IMMUNE PHENOTYPING OF BLOOD CELLS FOR MONITORING OF HEALTH IN CHILDREN BORN BY HIV-INFECTED WOMEN**B.A. Bakhmetyev¹, S.Ya. Zverev², N.S. Kalashnikova², L.V. Kluchnikova²¹ Institute of ecology and genetics of microorganisms Ural Branch of RAS, Perm² Perm Regional Centre of Prevention and Control of AIDS and infectious diseases, Perm

Considering the increase in number of HIV-infected women of childbearing age this study was aimed at a comparison of CD-phenotype of children born by infected mothers with age standards obtained during the analysis of the functional state of the immune system of healthy children differing by sex and age in the Perm region. 133 children from infected mothers at the age from 1 month to 4 years and 53 clinically healthy children were examined. Among the peripheral blood lymphocytes of children the numbers of CD3+-T-lymphocytes, CD3+CD4+-T-helpers, CD3+CD8+-cytotoxic T-lymphocytes, CD3-CD19+-B-lymphocytes, CD3-CD16+/56+-NK-cells were identified. The increase in the functional activity of the immune system of the risk group was reliably determined. In HIV-positive children of 1 to 6 months and 1 to 4 years the increase in the absolute number of leukocytes, lymphocytes, T-lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, B-lymphocytes was observed as compared with their healthy coevals. By contrast, under similar comparison within the age group of 6 to 12 months the decrease in percentage of lymphocytes and absolute number of NK-cells was determined. Gender-based division of children under study supported the necessity in taking into account this factor yet in this early age. It was shown that both in perinatal contact and under the progression of HIV infection the reaction of male and female bodies differed. Data obtained from the phenotyping of blood from healthy children in the city of Perm were compared with those provided from American and Chinese investigations. Resulting differences primarily depended on the age range of the children and were frequently related to the absolute cell number that expressed definite markers. Results evidence for the necessity in further temporal specification under the assessment of the state of the immune system in children, and allow developing new criteria for immune system monitoring under the risk of vertical route of HIV infection.

Key words: HIV, children, age, immunophenotyping

Начиная с 2002 г., в динамике развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Пермском крае произошли существенные изменения. Снижение заболеваемости сопровождалось увеличением доли гетеросексуального пути передачи по сравнению с парентеральным при внутривенном

введении наркотиков, а также значительным вовлечением в эпидемический процесс женщин фертильного возраста. В связи с этим на территории края происходит рост количества детей, рожденных инфицированными ВИЧ матерями, кумулятивное число которых на 16 марта 2012 года

составило 2077. Согласно статистическим данным, 50 % таких детей поражаются вирусом [13]. Этиотропная профилактика вертикального пути передачи инфекции и отказ от грудного вскармливания снижают вероятность инфицирования ребенка до 2 % [12]. Иммунная система детей, рожденных инфицированными матерями, требует постоянного контроля, учитывая факт перинатального контакта с ВИЧ и, как следствие этого, возможности развития ответных реакций или инфекции.

Современные методы мониторинга состояния иммунной системы позволяют получать конкретные данные о количественном и функциональном состоянии отдельных популяций моноклеарных клеток. Проточная цитометрия наряду с вирусологическими исследованиями занимает особое место в мониторинге ВИЧ/СПИДа, позволяя понять патогенез этого заболевания [23]. Исследования в этой области указывают на различия, существующие в данных механизмах у взрослых и детей [9, 11, 12]. Изучение ВИЧ-инфекции у детей требует масштабных динамических исследований с учетом возрастных норм, широко варьирующих в разных странах и регионах [3, 7, 9, 20], что связано с генетическим полиморфизмом и локальной экологией, и требуют обязательной разработки региональных нормативов для детей [7, 20, 25].

Целью настоящего исследования было сравнение CD-фенотипа детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями Пермского края, с возрастными нормами, полученными в ходе изучения аналогичных показателей у их здоровых сверстников разного пола и возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе работы были обследованы 133 ребенка, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, в возрасте от 1 месяца до 4 лет и 53 ребенка, в этом же возрастном диапазоне, которые на момент проведения исследований были клинически здоровы и по данным анамнеза и амбулаторных карт не страдали хроническими заболеваниями. Все образцы крови для исследований были забраны с информированного согласия родителей детей.

В венозной крови детей определяли лейкоцитарный состав с учетом относительного (%) и абсолютного числа форменных элементов крови. Регистрация экспрессии CD-молекул на моноклеарных клетках проводилась на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) с использованием 2-цветных моноклональных антител стандартного диагностического набора Simultest IMK Lymphocyte Kit (Becton Dickinson, USA).

К гепаринизированной крови добавляли стандартный набор антител:

1. CD45 FITC/CD14 PE
2. Ig G1 FITC/IgG2 PE
3. CD3 FITC/CD19 PE
4. CD3 FITC/CD4 PE
5. CD3 FITC/CD8 PE
6. CD3 FITC/CD16+CD56 PE

FITC — флюоресцеина изотиоционат; PE-фикоэритрин

Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. После связывания меток образцы лизировали стандартным раствором FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, USA) в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре, затем дважды отмывали стандартным раствором Cell Wash (Becton Dickinson, USA). В соответствии со стандартным протоколом иммунофенотипирования [3, 25] среди лимфоцитов венозной крови идентифицировали относительное число клеток:

- CD3+ -Т-лимфоцитов
- CD3+CD4+ -Т-хелперов
- CD3+CD8+ -цитотоксических Т-лимфоцитов
- CD3-CD19+ -В-лимфоцитов
- CD3-CD16+ /CD56+ -NK-клеток.

Анализ проводился с использованием стандартного пакета программ SimulSET Software 2000 (Becton Dickinson, USA).

Абсолютное число данных клеток рассчитывали из абсолютного числа лейкоцитов крови и процентного соотношения в них гранулоцитов и лимфоцитов, полученных на QBC™ AUTOREAD™ Plus Centrifugal Hematology System (Becton Dickinson, USA).

Диагноз ВИЧ-инфекции детям, рожденным инфицированными матерями, окончательно устанавливали по достижению ими возраста 18 месяцев серологическими методами: результаты иммуноферментного анализа (ИФА) подтверждали выявлением антител к индивидуальным структурным белкам вируса методом иммуноблота.

Для статистического анализа полученных данных использовали стандартные пакеты прикладных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) и Statistica (StatSoft Inc., USA). Достоверность различий между двумя группами проводили по непарному t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов крови детей проводился с учетом их пола и возраста. Общая характеристика возрастного и полового состава обследованных детей представлена в таблице 1.

В ходе исследования было установлено, что у детей младшей возрастной группы в возрасте от 1 до 6 месяцев, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, отмечается более высокая концентрация лейкоцитов крови по сравнению с детьми здоровых матерей. Однако это различие максимально и значимо только у ВИЧ-инфицированных детей (табл. 2). Кроме того, наблюдается достоверное увеличение абсолютных значений CD3⁺-Т-лимфоцитов и CD3⁻CD19⁺-В-лимфоцитов при ВИЧ-инфицировании ребенка (табл. 2). У детей, инфицированных ВИЧ, увеличение абсолютного и относительного количества CD3⁻CD19⁺-В-лимфоцитов сопровождается одновременным

Таблица 1

Распределение обследованных групп детей по возрасту и полу

Возраст	Дети здоровых матерей (группа контроля)			Дети ВИЧ-инфицированных матерей					
				ВИЧ-негативные			ВИЧ-позитивные		
	всего	мальчики	девочки	всего	мальчики	девочки	всего	мальчики	девочки
От 1 до 6 месяцев	9	5	4	78	38	40	4	3	1
От 6 месяцев до 1 года	10	6	4	28	6	22	4	2	2
От 1 года до 4 лет	34	14	20	12	6	6	7	5	2
Всего	53	25	28	118	50	68	15	10	5

Таблица 2

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 1 до 6 месяцев

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n			
лейкоциты	абс.	5011 ± 667	9	7805 ± 476	77	9587 ± 1072	4		*	
лимфоциты	%	65,2 ± 3,95	9	64,4 ± 1,34	77	72,5 ± 4,56	4			
	абс.	3264 ± 488	9	4871 ± 242	77	7059 ± 1155	4	*	*	*
CD3 ⁺	%	70,5 ± 2,09	9	6,0 ± 1,11	74	64,8 ± 2,39	4			
	абс.	1472 ± 154	9	1236 ± 125	74	1680 ± 336	4		*	*
CD19 ⁺	%	17,4 ± 1,94	9	24,8 ± 0,97	74	28,5 ± 1,50	4	*	*	
	абс.	605 ± 128	9	1219 ± 83	74	1968 ± 235	4	*	*	*
CD4 ⁺	%	40,6 ± 1,93	9	45,6 ± 1,12	77	41,5 ± 2,60	4			
	абс.	1312 ± 193	9	2182 ± 111	77	3016 ± 684	4	*	*	
CD8 ⁺	%	26,3 ± 1,48	9	21,8 ± 1,03	77	22,8 ± 1,70	4			
	абс.	874 ± 176	9	1044 ± 84	77	1587 ± 274	4		*	
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	12,6 ± 1,90	9	10,8 ± 0,78	74	8,0 ± 1,78	4			
	абс.	404 ± 77	9	553 ± 60	74	548 ± 129	4			
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		1,59 ± 0,15	9	2,41 ± 0,12	77	1,85 ± 0,16	4	*		

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

ростом абсолютного числа CD3⁺-Т-лимфоцитов, включая численность CD4⁺-Т-хелперов и CD8⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов, без изменения соотношения CD4⁺/CD8⁺. Напротив, у ВИЧ-негативных детей инфицированных матерей наблюдается увеличение этого соотношения, поскольку более высокое число CD4⁺-клеток не ассоциировано с изменением числа CD8⁺-лимфоцитов.

При исследовании крови детей от 6 месяцев до 1 года (табл. 3) существенных различий в исследованных параметрах между контактными ВИЧ-негативными и детьми здоровых матерей установлено не было. В то же время у ВИЧ-инфицированных детей, по сравнению с детьми контрольной группы, зарегистрировано достоверное снижение процентного числа лимфоцитов в целом и абсолютного числа CD3⁺-CD16⁺/56⁺-NK-клеток.

С увеличением возраста различия между здоровыми и инфицированными детьми вновь стано-

вятся более явными (табл. 4) и по своей структуре схожи с различиями, установленными для младшей возрастной группы до 6 месяцев. Косвенными признаками ВИЧ-инфицирования детей в возрасте от 1 года до 4 лет являются более высокое абсолютное число CD3⁺-Т-лимфоцитов и повышение относительного и абсолютного количества CD3⁺CD8⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов. По отношению к детям здоровых матерей в группе ВИЧ-позитивных также отмечается повышенное число лейкоцитов и лимфоцитов, и, как следствие, увеличиваются абсолютные значения CD3⁺CD4⁺-Т-хелперов и CD19⁺-В-лимфоцитов (табл. 4).

Учитывая возможность наличия половых различий в исследованных показателях, нами был проведен их сравнительный анализ отдельно для мальчиков и девочек (табл. 5). Было установлено, что ВИЧ-положительные девочки имеют больше отличий в абсолютных значениях исследованных

Таблица 3

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 6 месяцев до 1 года

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>			
лейкоциты	абс.	7520 ± 1227	10	8961 ± 605	28	8025 ± 2540	4			
лимфоциты	%	72,8 ± 3,23	10	63,1 ± 3,20	28	49,9 ± 7,37	4		*	
	абс.	5518 ± 929	10	5756 ± 507	28	4030 ± 1271	4			
CD3 ⁺	%	63,7 ± 1,73	10	64,7 ± 1,57	28	65,0 ± 1,87	4			
	абс.	3601 ± 672	10	3685 ± 317	28	2680 ± 893	4			
CD19 ⁺	%	24,0 ± 1,65	10	26,0 ± 1,19	28	25,0 ± 4,22	4			
	абс.	1346 ± 247	10	1523 ± 150	28	1024 ± 376	4			
CD4 ⁺	%	38,3 ± 1,57	10	41,5 ± 1,75	28	33,8 ± 8,22	4			
	абс.	2150 ± 388	10	2318 ± 195	28	1637 ± 771	4			
CD8 ⁺	%	23,1 ± 2,29	10	21,9 ± 1,31	28	30,3 ± 8,08	4			
	абс.	1356 ± 346	10	1239 ± 165	28	994 ± 196	4			
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	12,0 ± 1,58	10	9,4 ± 0,76	28	9,0 ± 3,08	4			
	абс.	552 ± 49	10	556 ± 84	28	307 ± 89	4		*	
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		1,85 ± 0,25	10	2,04 ± 0,12	28	1,60 ± 0,27	4			

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

Таблица 4

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 1 года до 4 лет

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>			
лейкоциты	абс.	6324 ± 333	33	7108 ± 1025	12	8629 ± 810	7		*	
лимфоциты	%	45,5 ± 2,51	33	52,1 ± 3,61	12	56,0 ± 5,34	7			
	абс.	2743 ± 185	33	3574 ± 415	12	4968 ± 824	7	*	*	
CD3 ⁺	%	67,5 ± 1,72	33	65,3 ± 2,71	12	70,7 ± 2,93	7			
	абс.	1855 ± 146	33	2299 ± 272	12	3488 ± 533	7		*	*
CD19 ⁺	%	19,5 ± 1,04	33	26,1 ± 1,45	12	20,6 ± 2,49	7	*		
	абс.	516 ± 42	33	912 ± 112	12	1050 ± 259	7	*	*	
CD4 ⁺	%	37,4 ± 1,44	33	41,6 ± 2,40	12	40,4 ± 3,31	7			
	абс.	1029 ± 84	33	1451 ± 166	12	1966 ± 314	7	*	*	
CD8 ⁺	%	26,1 ± 1,76	33	21,3 ± 1,78	12	28,6 ± 2,92	7			*
	абс.	711 ± 80	33	773 ± 146	12	1424 ± 272	7		*	*
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	11,9 ± 1,24	33	9,5 ± 1,24	12	7,7 ± 0,68	7			
	абс.	314 ± 37	33	351 ± 70	12	381 ± 77	7			
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		3,19 ± 1,28	33	2,07 ± 0,18	12	1,57 ± 0,27	7			

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

параметров, по сравнению со здоровыми сверстниками, чем мальчики. Инфицированные девочки характеризуются повышенным числом лимфоци-

тов, CD3⁺-клеток, CD19⁺-В-лимфоцитов, CD4⁺-Т-хелперов, CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов, в то время как у мальчиков достоверно увеличиваются

общее число лейкоцитов, лимфоцитов и абсолютные значения $CD19^+$ -В-лимфоцитов, $CD4^+$ -клеток (табл. 5). В группах детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, половые различия еще более выражены. У девочек увеличиваются общее количество лейкоцитов, процент и абсолютное число лимфоцитов, и среди них — количество как В-клеток, так и $CD3^+$ -Т-клеток, абсолютные значения $CD4^+$ и $CD8^+$ -лимфоцитов, NK-клеток, процент Т-хелперов, соотношение $CD4^+/CD8^+$. Напротив, у мальчиков, на фоне общего повышения числа лимфоцитов, процент среди них $CD3^+$ -клеток, $CD8^+$ -цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток

снижен. У девочек с ВИЧ-инфекцией по сравнению с контактными ВИЧ-негативными детьми увеличен процент $CD8^+$ -лимфоцитов, а при аналогичном сравнении у мальчиков достоверно отличаются абсолютные значения данного показателя. Кроме того, у инфицированных девочек, по сравнению с ВИЧ-негативными детьми инфицированных матерей, снижено соотношение $CD4^+/CD8^+$ -клеток. Анализ исследуемых показателей внутри групп показал, что различия между мальчиками и девочками практически отсутствуют в группе здоровых детей, за исключением соотношения $CD4^+/CD8^+$, которое больше у мальчиков, чем у девочек. В

Таблица 5

CD-фенотип лимфоцитов крови мальчиков и девочек

Показатель		Пол	Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
					ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
			1		2		3				
			<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	1–2	1–3	2–3
Лейкоциты	абс	Д	6225 ± 428	28	8179 ± 449	68	7960 ± 1162	5	*		
		М	6440 ± 552	25	7785 ± 600	50	9105 ± 1013	10		#	
Лимфоциты	%	Д	51,64 ± 3,53	28	63,64 ± 1,70	68	59,88 ± 8,40	5	*		
		М	5616 ± 3,36	25	61,76 ± 1,89	50	58,17 ± 4,48	10			
	абс	Д	3094 ± 294	28	5199 ± 314	68	5050 ± 1379	5	*	*	
		М	3647 ± 454	25	4617 ± 253	50	5388 ± 708	10	#		
CD3 ⁺	%	Д	65,74 ± 1,89	28	65,70 ± 1,04	67	69,20 ± 1,98	5			
		М	6892 ± 1,48	25	63,92 ± 1,45	48	66,80 ± 2,36	10		#	
	абс	Д	2033 ± 205	28	3380 ± 190	67	3529 ± 990	5	*	*	
		М	2513 ± 321	25	2866 ± 173	48	3592 ± 475	10			
CD19 ⁺	%	Д	20,52 ± 1,17	28	23,85 ± 0,82	67	24,6 ± 3,96	5	*		
		М	19,48 ± 1,22	25	27,08 ± 1,21	48	23,5 ± 1,97	10	#		
	абс	Д	653 ± 96	28	1254 ± 89	67	1242 ± 911	5	*	*	
		М	731 ± 111	25	1273 ± 107	48	1310 ± 138	10	#	#	
CD4 ⁺	%	Д	37,19 ± 1,44	28	44,51 ± 1,16	67	37,0 ± 6,0	5	*		
		М	39,08 ± 1,43	25	43,82 ± 1,41	48	39,9 ± 2,88	10	#		
	абс	Д	1176 ± 43	28	2241 ± 129	67	2109 ± 770	5	*	*	
		М	1420 ± 174	25	2002 ± 120	48	2182 ± 321	10	#	#	
CD8 ⁺	%	Д	25,70 ± 1,63	28	22,77 ± 1,05	67	32,4 ± 5,45	5			*
		М	25,36 ± 1,87	25	20,36 ± 1,09	48	25,0 ± 2,4	10		#	
	абс	Д	784 ± 89	28	1166 ± 111	67	1441 ± 269	5		*	
		М	949 ± 169	25	924 ± 64	48	1308 ± 204	10			#
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	Д	12,56 ± 1,4	28	11,55 ± 0,86	67	6,4 ± 1,12	5			
		М	11,48 ± 1,09	25	8,63 ± 0,50	48	9 ± 1,19	10	#		
	абс	Д	364 ± 43	28	628 ± 71	67	295 ± 60	5	*		
		М	387 ± 45	25	401 ± 35	48	460 ± 75	10			
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺		Д	1,6 ± 0,12	28	1,33 ± 0,29	67	1,33 ± 0,29	5	*		*
		М	3,79 ± 1,6	25	1,81 ± 0,28	48	1,81 ± 0,28	10			

Примечание: $M \pm m$ – средняя арифметическая и ее стандартная ошибка. абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента для девочек, # – для мальчиков; различия между мальчиками и девочками внутри групп отмечены фоном, n – число детей в группе.

группе же детей, рожденных инфицированными матерями, достоверно отличаются процент $CD19^+$ -В-лимфоцитов, процентные и абсолютные значения NK-клеток. ВИЧ-инфицированные мальчики отличаются от ВИЧ-инфицированных девочек только по абсолютному числу NK-клеток (табл. 5).

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов считается одним из ключевых элементов мониторинга состояния здоровья инфицированных ВИЧ детей и взрослых [3, 20]. При этом считается, что снижение $CD4^+$ -лимфоцитов периферической крови является основным маркером развития синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [25]. В случае вертикального пути передачи вируса у детей выявлено более быстрое падение численности этих клеток, чем у взрослых [10, 12, 13]. Однако в процессе постнатального онтогенеза иммунной системы у здоровых детей также наблюдаются возраст-ассоциированные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, затрагивающие и $CD4^+$ -клетки [7, 20], что существенно осложняет корректную диагностику развития ВИЧ-инфекции. Множество исследований в различных странах проводилось и проводится для определения нормальных колебаний субпопуляций лимфоцитов в зависимости от возраста [5, 6, 19, 22], пола [1, 9, 16, 17, 18, 21] и расовой принадлежности [2, 4, 8, 9, 14, 15, 23, 24]. Большинство авторов цитированных работ сходятся во мнении, что в условиях единой методологии фенотипирования возраст обследованных может быть ключевым фактором, ведущим к дополнительным вариациям результатов. Учитывая вышеизложенное, а также особенности возрастного и полового распределения обследованных детей (табл. 1), статистический анализ различий между CD-фенотипом лимфоцитов крови здоровых детей и их сверстников, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, проводили в трех возрастных диапазонах.

Маловероятно, что выявленное в настоящей работе увеличение числа лейкоцитов в группе ВИЧ-позитивных детей от 1 до 6 месяцев связано с активацией лимфопоэза после перинатального контакта с вирусом, так как значимое увеличение числа лимфоцитов не сопровождается достоверными отличиями по их процентному содержанию и не зависит от наличия или отсутствия инфекции у ребенка. Тем не менее, абсолютное число лимфоцитов оказывается одним из трех параметров, которые реально различаются между ВИЧ-позитивными и ВИЧ-негативными детьми, рожденными инфицированными матерями. Обращает на себя внимание тот факт, что количество фиксируемых различий в CD-фенотипе по отношению к группе здоровых детей меньше среди ВИЧ-негативных, чем среди ВИЧ-позитивных детей, по 4 и 5 показателям, соответственно. Особенно следует отметить факт увеличения соотношения $CD4^+/CD8^+$ у ВИЧ-негативных детей, и отсутствие такового у инфицированных, что предполагает различие реакций со стороны иммунной системы на перинатальный контакт с ВИЧ и непосредственную реакцию на развитие инфекции.

Менее показательной оказалась группа детей в возрасте от 6 месяцев до 1 года, здесь не было выявлено значимых различий между контактными и ВИЧ-позитивными детьми. Однако, по сравнению с детьми здоровых матерей, ВИЧ-инфицированные дети отличаются пониженным процентом лимфоцитов крови и абсолютным количеством $CD3^+CD16^+/CD56^+$ -NK-клеток. В следующей возрастной группе (с 1 года до 4 лет) различия между инфицированными и здоровыми детьми по своей структуре схожи с таковыми для младшей возрастной группы. ВИЧ-позитивные и ВИЧ-негативные дети, рожденные инфицированными матерями, отличаются определенной активацией процессов лейко- и лимфопоэза, что сопровождается изменением абсолютных значений параметров, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов.

Разделение исследуемых детей по полу подтвердило необходимость учета данного фактора даже в столь раннем возрасте. Как при контакте с вирусом, так и при развитии ВИЧ-инфекции реакции мужского и женского организмов отличаются. Иммунная система мальчиков ВИЧ-инфицированных матерей реагирует более активно по сравнению с девочками — на фоне общего снижения $CD3^+$ -лимфоцитов растет численность Т-хелперов и снижается процент цитотоксических Т-клеток. При развитии инфекции изменения в организме девочек затрагивают в основном только абсолютные значения показателей, в то время как для мальчиков отмечается перераспределение и в процентном соотношении клеток — рост лимфоцитов и, среди них, $CD4^+$ -Т-хелперов.

Полученные нами в ходе настоящего исследования данные возрастных региональных нормативов иммунофенотипирования были сопоставлены с недавно опубликованными материалами Shearer et al. [20] и Kam et al. [7]. Были выявлены определенные различия, зависящие, прежде всего, от возрастного диапазона обследованных детей и затрагивающие абсолютные значения клеток, экспрессирующих определенные CD-маркеры. Для реализации возможности корректного сопоставления данных было проведено перераспределение обследованных нами детей в более узкие возрастные группы, аналогичные используемым в работе Shearer et al. (2003). Среди здоровых детей младших возрастных групп — от рождения до 3 месяцев, с 3 до 6 месяцев и с 6 месяцев до 1 года — на фоне снижения содержания лейкоцитов в периферической крови, выявлено уменьшение абсолютных значений $CD3^+$ -Т-лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперов и $CD3^+CD19^+$ -В-лимфоцитов. В то же время численность $CD3^+CD16^+CD56^+$ -NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов, как в абсолютных, так и в относительных единицах у детей г. Перми была более высокой, чем у их американских сверстников. С увеличением возраста детей большинство перечисленных различий по абсолютным значениям нивелировались. Однако относительное количе-

ство NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов оставались более высокими у жителей Пермского края. По сравнению с китайскими детьми [7], пермские дети характеризуются более низким уровнем CD3⁺CD16⁺CD56⁺-NK-клеток в возрасте до 1 года и старше 2 лет, а также сниженным абсолютным числом CD3⁺CD8⁺-цитотоксических клеток в группе детей старше 1 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжения начатых исследований и углублении знаний о функционировании иммунной системы ребенка как здорового, так и имевшего риск передачи ВИЧ-инфекции от матери. Исследования подтверждают важность не только возрастного, но и полового деления детей в ходе оценки их иммунного статуса. В результате проведенной работы получены региональные возрастные нормативы, позволяющие проводить сравнительный анализ CD-фенотипа лимфоцитов крови в соответствии с мировыми стандартами. Проведенный сравнительный анализ клеточного состава крови детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, позволяет разработать качественно новые критерии мониторинга иммунной системы при риске вертикальной передачи ВИЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartlett J.A., Schleifer S.J., Demetrikopoulos M.K., Delaney B.R. et al. Immune function in healthy adolescents // Clin. Diagn. Immunol. — 1998. — Vol. 5. — P. 105–113.
2. Chin S.F., Cheong S.K., Lim Y.C., Ton S.H. The distribution of immunoregulatory cells in the peripheral blood of normal Malaysian adults // J. Patol. — 1993. — Vol. 15. — P. 49–52.
3. Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry influence of age, sex, and race and comparison with other published studies // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004. — Vol. 11, N 1. — P. 168–173.
4. Choong M.L., Ton S.H., Cheong S.K. Influence of race, age and sex on the lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy Malaysian adults // Ann. Clin. Biochem. — 1995. — Vol. 32. — P. 532–539.
5. Denny T., Yorgev R., Gelman R., Skuza C. et al. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life // JAMA — 1992. — Vol. 267. — P. 1481–1488.
6. Erkeller-Yuksel F.M., Deneys V., Yuksel B., Hanne I. et al. Age-related change in human blood lymphocyte subpopulation // J. Pediatr. — 1992. — Vol. 120. — P. 216–222.
7. Kam K.M. Maturation changes in peripheral lymphocyte subsets pertinent to monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese pediatric patients // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2001. — Vol. 8, N 5. — P. 926–931.
8. Kam K.M., Leung W.L., Kwork M.Y., Hung M.Y. et al. Lymphocyte subpopulation reference ranges for

monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese adult // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1996. — Vol. 3. — P. 326–330.

9. Lee B.W., Yap H.K., Chew F.T., Quah T.C. et al. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects from birth to adult // Cytometry. — 1996. — Vol. 26. — P. 8–15.

10. Likansakul S. The reference range of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in healthy non-infected infants born to HIV-1 seropositive mothers; a preliminary study at Siriraj Hospital // Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. — 1998. — Vol. 29, N 3. — P. 453–463.

11. Melvin A.J., Mohan K.M. Response to immunization with measles, tetanus, and haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy // Pediatrics. — 2003. — Vol. 111, N 6. — P. 641–644.

12. Peckham C., Gibb D. Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333, N 5. — P. 298–302.

13. Peckham C., Newell M.L. Preventing vertical transmission of HIV infection // N. Engl. J. Med. — 2000. — Vol. 343, N 14. — P. 1036–1037.

14. Prince H.E., Hirju K., Waldbeser L.S., Plaeger-Marchal S. et al. Influence of racial background on the distribution of T cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy donors // Diagn. Immunol. — 1985. — Vol. 3. — P. 33–37.

15. Quozi A.A., Salamah A.A., Rasheed R.A., Musalam A.A. et al. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Saudi men // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2002. — Vol. 9. — P. 279–281.

16. Reichert T., DeBruyere M., Deney V., Totterman T. et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasian // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1991. — Vol. 60. — P. 190–208.

17. Rudy B.J. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2002. — Vol. 9, N 5. — P. 959–965.

18. Santagostino A., Gargassio G., Pistorio A., Bolis V. et al. An Italian national multicenter study for definition of a reference range for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults // Haematologia. — 1999. — Vol. 84. — P. 499–504.

19. Shahabuddin S. Quantitative differences in CD8-lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cells, and HLA-DR — activated T cells of racially different male populations // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1995. — Vol. 76. — P. 168–170.

20. Shearer W.T. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The pediatric AIDS clinical trials group P1009 study // J. Allergy Clin. Immunol. — 2003. — Vol. 112, N 5. — P. 973–980.

21. Tollerud D.J., Clark J.W., Brown L.M., Neuland C.Y. et al. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy non-smokers // J. Clin. Immunol. — 1989. — Vol. 9. — P. 214–222.

22. Tollerud D.J., Ildstad S.T., Brown L.M., Clark J.W. et al. T-cell subsets in healthy teenagers: transition to the adult phenotype // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1990. — Vol. 56. — P. 88–96.
23. Webster H.K., Pattanapanyasat K., Phanupak P., Wasi C. et al. Lymphocyte immunophenotype reference range in healthy Thai Adults: implications for management of HIV/AIDS in Thailand // South-east Asian J. Trop. Med. Public Health. — 1996. — Vol. 27. — P. 418–429.
24. Wiener D.S., Shah S., Malone J., Lowell N. et al. Multiparametric analysis of peripheral blood in normal pediatric population by flow cytometry // J. Clin. Lab. Anal. — 1990. — Vol. 4. — P. 175–179.

Сведения об авторах

Бахметьев Борис Аркадьевич – заведующий лабораторией экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН, кандидат медицинских наук, доцент (614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13; тел. 8-9127896451; e-mail: bachmetyev@iegm.ru)

Зверев Сергей Яковлевич – заведующий диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, доктор медицинских наук

Калашникова Надежда Сергеевна – врач клинко-диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, кандидат биологических наук

Ключникова Лариса Вадимовна – заведующий клинко-диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями