



## Состояние адаптивного иммунитета слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки при неонатальном сепсисе

Халит Саубанович Хаертынов<sup>1\*</sup>, Владимир Алексеевич Анохин<sup>1</sup>,  
Гузель Рустамовна Бурганова<sup>2</sup>, Георгий Олегович Певнев<sup>2</sup>,  
Михаил Олегович Мавликеев<sup>2</sup>, Андрей Павлович Киясов<sup>2</sup>,  
Альберт Анатольевич Ризванов<sup>2</sup>, Альберт Альфредович Гильманов<sup>3</sup>,  
Сергей Анатольевич Любин<sup>3</sup>, Екатерина Геннадьевна Михеева<sup>1</sup>,  
Павел Витальевич Пшеничный<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

<sup>3</sup>Городская детская больница №1, г. Казань, Россия

### Реферат

**Цель.** Оценка показателей адаптивного иммунитета слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей с неонатальным сепсисом.

**Методы.** Проведено исследование биоптатов слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, полученных при проведении дуоденоскопии новорождённых, имевших признаки эрозивно-язвенного поражения пищеварительного тракта. 5 из них были получены от детей с клинико-лабораторными признаками неонатального сепсиса, 2 — от детей группы сравнения. Проведено иммуногистохимическое окрашивание биоптатов с использованием системы визуализации Novolink Polymer Detection System с коммерческими антителами к CD4, CD8, CD20 и Vcl-2 и системы визуализации CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System с коммерческими антителами к каспазе-3 и каспазе-9 в соответствии с инструкциями производителя.

**Результаты.** Было установлено, что количество Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки в группе новорождённых с сепсисом в 4 из 5 случаев не отличалось от показателей контрольной группы. Количество лимфоцитов CD8<sup>+</sup> у детей с сепсисом в 3 из 5 случаев было даже большим, чем в группе контроля. Количество В-лимфоцитов CD20<sup>+</sup> у 4 детей с сепсисом было значительно меньше по сравнению с контролем. Установлена активация апоптоза в клетках слизистой оболочки у детей с сепсисом, что проявлялось большим количеством каспаза-3-позитивных клеток (в 4 из 5 случаев) по сравнению с показателями контрольной группы. Количество каспаза-9-позитивных клеток в исследуемых группах было практически одинаковым. Отмечено значительное уменьшение количества Vcl-2-позитивных клеток слизистой оболочки у всех 5 детей с сепсисом по сравнению с показателями контрольной группы.

**Вывод.** Проведённое исследование выявило умеренно выраженную иммуносупрессию в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки у детей с неонатальным сепсисом, проявившуюся низкими значениями В-лимфоцитов CD20<sup>+</sup> на фоне отсутствия значимого снижения количества Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>; установлена умеренно выраженная активация процессов апоптоза на фоне сниженного антиапоптотического потенциала, что создаёт условия возможной транслокации кишечной микробиоты в кровотоки.

**Ключевые слова:** неонатальный сепсис, эндоскопия, двенадцатиперстная кишка, лимфоциты кишечника, апоптоз.

**Для цитирования:** Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бурганова Г.Р. и др. Состояние адаптивного иммунитета слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки при неонатальном сепсисе. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (1): 31–39. DOI: 10.17816/KMJ2020-31.

## Adaptive immunity in the mucous membrane of the duodenum in neonatal sepsis

K.S. Khaertynov<sup>1</sup>, V.A. Anokhin<sup>1</sup>, G.R. Burganova<sup>2</sup>, G.O. Pevnev<sup>2</sup>, M.O. Mavlikeev<sup>2</sup>, A.P. Kiyasov<sup>2</sup>, A.A. Rizvanov<sup>2</sup>, A.A. Gil'manov<sup>3</sup>, S.A. Lyubin<sup>3</sup>, E.G. Mikheeva<sup>1</sup>, P.V. Pchenitchnyi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;

<sup>3</sup>Children's Municipal Hospital №1, Kazan, Russia

### Abstract

**Aim.** To assess of adaptive immunity of the duodenal mucosa in neonates with sepsis.

**Methods.** A study of duodenal biopsy specimens obtained during duodenoscopy from neonates who had signs of suspected ulcerative lesions of the digestive tract. Five of them were obtained from infants with clinical and laboratory signs of neonatal sepsis (NS), two — from infants without sepsis (comparison group). Immunohistochemical staining was performed using the Novolink Polymer Detection System imaging system with commercial antibodies to CD4, CD8, CD20 and Bcl-2, and the CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System imaging system with commercial antibodies to caspase-3 and caspase-9 in accordance with the manufacturer's instructions.

**Results.** It was found that the number of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes of the duodenal mucosa in neonatal sepsis group in 4 of 5 infants did not differ from the control group. The number of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in neonates with sepsis in 3 of 5 cases was even higher than in the control group. The number of CD20<sup>+</sup> B-lymphocytes in 4 infants with sepsis was significantly less compared with the control. Activation of apoptosis in mucosal cells was detected, which was manifested by a large number of caspase-3-positive cells (in 4 of 5 cases) in comparison with the control group. The number of caspase-9-positive cells in the studied groups was almost equal. A substantial decrease in the number of Bcl-2-positive mucosal cells in all 5 infants with sepsis was noted as compared with the control indicators.

**Conclusion.** The study revealed moderate immunosuppression in the duodenal mucosa in neonates with sepsis, manifested by low values of CD20<sup>+</sup> B-lymphocytes in the absence of a significant decrease in the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. The detected moderate activation of apoptosis processes against the background of reduced antiapoptotic potential creates the conditions for a possible translocation of the intestinal microbiota into the bloodstream.

**Keywords:** neonatal sepsis, endoscopy, duodenal mucosa, intestinal lymphocytes, apoptosis.

**For citation:** Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Burganova G.R. et al. Adaptive immunity in the mucous membrane of the duodenum in neonatal sepsis. *Kazan medical journal.* 2020; 101 (1): 31–39. DOI: 10.17816/KMJ2020-31.

Сепсис — наиболее актуальная инфекционная патология детей периода новорожденности, что обусловлено значительной её распространённостью в этой возрастной группе и высокой летальностью [1]. Результаты исследований адаптивного иммунитета при сепсисе показали значимое снижение количества В- и Т-эффекторных клеток крови [2]. В большей мере это касается субпопуляции лимфоцитов CD4<sup>+</sup> [2]. Основной причиной такого снижения считают активацию апоптоза [3]. Результатом сепсис-индуцированного апоптоза лимфоцитов становятся иммуносупрессия и неэффективность противоинфекционного ответа, что ассоциируется с неблагоприятным исходом заболевания. У пациентов, погибших от сепсиса, подобного рода снижение зарегистрировано не только в крови, но и в селезёнке, и в лимфатических узлах [3–5].

Поскольку лимфатический аппарат кишечника служит самой мощной составляющей периферического отдела иммунной системы, мы попытались выяснить его возможное участие

в реакциях на инфекционную агрессию. В первую очередь нас интересовали изменения в слизистой оболочке кишки, фактически в зоне потенциальной реакции на микрофлору, заселяющую в этот период кишечник ребёнка. Приступая к исследованию, мы отдавали себе отчёт и в том, что фенотипически кишечник формирует (либо должен формировать) определённый комплекс или стереотип реагирования на разнообразные внешние воздействия, в том числе и на стресс. По нашему мнению, он может характеризовать или, по крайней мере, описывать общую реакцию организма при сепсисе. Именно это и стало побудительной основой настоящего исследования.

Цель исследования — оценка показателей адаптивного иммунитета слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей с неонатальным сепсисом (НС).

Дизайн исследования представлен как серия клинических случаев. Проведено исследование биоптатов двенадцатиперстной кишки, полученных во время эндоскопической фибро-

гастродуоденоскопии (ФГДС) у детей, имевших признаки эрозивно-язвенного поражения пищеварительного тракта: 5 из них были получены от детей с клинико-лабораторными признаками НС, 2 образца — от детей группы сравнения. Эндоскопические исследования детям как опытной, так и контрольной групп проводили строго по показаниям, которыми были рвота с прожилками крови, наличие крови в содержимом назогастрального зонда.

Исследование проведено в период 2016–2017 гг. на базе ГАУЗ «Городская детская больница №1» г. Казани. ФГДС и забор образцов проводили после получения добровольного информированного согласия на проведение этого исследования от одного из родителей ребёнка. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (протокол №2 от 21.02.2017).

Диагноз НС был установлен на основании клинико-лабораторных данных: развитие синдрома системного воспалительного ответа, повышение в крови концентрации С-реактивного белка более 1 мг/дл, наличие одного или нескольких очагов инфекции, признаки полиорганной недостаточности и выделение микроорганизма из венозной крови. Клинико-лабораторная характеристика пациентов, включённых в исследование, представлена в табл. 1.

4 (80%) детей родились доношенными, 1 — недоношенным на сроке 36 нед гестации. У 3 (60%) диагностирован ранний НС, у 2 (40%) — поздний НС. Очаги инфекции установлены у всех 5 детей. У 2 (40%) из них была диагностирована пневмония, ещё у 2 (40%) произошло развитие некротического энтероколита, у 1 (20%) — пневмонии и некротического энтероколита. В 2 случаях диагностирован септический шок. Признаки полиорганной недостаточности установлены у 4 из 5 детей.

Этиология НС была определена только у двоих (40%): у одного ребёнка из крови была выделена *Klebsiella pneumoniae*, продуцент β-лактамаз расширенного спектра действия, у второго — *Staphylococcus epidermidis*.

Воспалительные изменения в крови в виде лейкоцитоза зарегистрированы у 3 (60%) детей. Абсолютной лимфопении ( $<2 \times 10^9/\text{л}$ ) не было выявлено ни у одного из пациентов. У 3 (60%) отмечена тромбоцитопения, причём в 2 случаях число тромбоцитов было менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ .

Все дети получили антибактериальную, инфузионную терапию, респираторную поддержку в виде искусственной вентиляции лёгких

(ИВЛ), иммунотерапию (введение IgM-обогащённого иммуноглобулина). Во всех случаях НС завершился выздоровлением.

В контрольной группе оба ребёнка родились доношенными. В одном случае была диагностирована врождённая пневмония, в другом — геморрагическая болезнь новорождённого.

*Эндоскопическое исследование.* Эндоскопию верхних отделов пищеварительного тракта выполняли детским гастрофиброскопом (Pentax FG-16V, Япония) диаметром 5,3 мм, что достаточно для проведения эндоскопии у новорождённых с массой тела 500 г и более. Угол поля зрения составлял  $120^\circ$ , диапазон движения наконечника вверх и вниз —  $180^\circ$ , вправо и влево —  $160^\circ$ . Осмотр детей проводили в стабильном клиническом состоянии.

*Получение материала и заливка в парафин.* Забор биоптатов двенадцатиперстной кишки проводили во время эндоскопического исследования. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и в течение нескольких часов доставляли на кафедру морфологии и общей патологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета (ИФМиБ КФУ) для дальнейшего процессинга.

Заливку образцов в парафин проводили по стандартной методике на базе гистологической лаборатории Центра биомедицинской микроскопии при кафедре морфологии и общей патологии ИФМиБ КФУ. С каждого парафинового блока на ротационном микротоме HM 355S (Thermo Scientific, США) были получены срезы биопсийных материалов толщиной 4–5 мкм.

*Окраска гематоксилином и эозином.* Для визуализации структур тканей один срез от каждого образца был окрашен гематоксилином Майера и 1% водным раствором эозина (ЭргоПродакшн, Россия) по стандартному протоколу [6].

*Иммуногистохимические методы окрашивания.* Иммуногистохимическое окрашивание было проведено с использованием визуализационной системы Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, Великобритания) с коммерческими антителами к CD4 (клон EPR6855, Abcam, разв. 1:100), CD8 (клон sp239, Sigma-Aldrich, разв. 1:100), CD20 (клон L26, Abcam, разв. 1:50) и Bcl-2 (клон 124, Dako, разв. 1:20), а также визуализационной системы CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (Dako, США) с коммерческими антителами к каспазе-3 (Abcam, разв. 1:200) и каспазе-9 (клон E23, Abcam, разв. 1:250) в соответствии с инструкциями производителя.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика детей, которым была проведена фиброгастроудоденоскопия

Данные	Группа детей с неонатальным сепсисом (n=5)					Контрольная группа (n=2)	
	1	2	3	4	5	1	2
Диагноз	Поздний неонатальный сепсис, некротический энтероколит, синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания, полиорганная недостаточность	Ранний неонатальный сепсис, септический шок, пневмония, полиорганная недостаточность	Ранний неонатальный сепсис, септический шок, пневмония, некротический энтероколит, полиорганная недостаточность	Поздний неонатальный сепсис, некротический энтероколит, полиорганная недостаточность	Ранний неонатальный сепсис, пневмония	Внутриутробная пневмония	Геморрагическая болезнь новорождённого
Гемокультура	<i>K. pneumoniae</i> , БЛРС	—	—	<i>S. epidermidis</i>	—	—	—
Гестационный возраст, нед	36	39	40	39	37	39	39
Масса тела при рождении, г	2150	3630	3400	3470	3350	3780	3490
Пол	ж	ж	м	м	ж	м	м
Возраст при проведении эндоскопии, дни	12	7	9	19	3	4	10
C-реактивный белок, мг/дл	9,6	2,4	1	19,2	9,6	0,9	0
Лейкоциты в крови, $\times 10^9/л$	14,8	27,2	20,2	19	40,4	14,9	11,4
Лимфоциты в крови, %	28	13	15	24	6	23	46
Лимфоциты в крови, $\times 10^9/л$	4,144	3,536	3,030	4,560	2,424	3,427	5,244
Лактат в крови, ммоль/л	2,3	12,5	11	4,9	3,9	2,2	2,4

Примечание: БЛРС —  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра; ж — женский, м — мужской.

**Таблица 2.** Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов двенадцатиперстной кишки и показателей апоптоза/антиапоптоза клеток

Пациенты	CD4	CD8	CD20	Каспаза-3	Каспаза-9	Bcl-2
	S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub>			M		
Новорождённые с сепсисом						
1	0,012	0,008	0,003	19,4	9,2	40,4
2	0,011	0,004	0,004	8,2	8,5	44,9
3	0,012	0,004	0,003	10,8	10,2	23,1
4	0,018	0,008	0,008	11,5	3,9	78,4
5	0,003	0,008	0,003	11,5	6,3	35,0
Контрольная группа						
1	0,011	0,005	0,05	9,6	7,2	135,5
2	0,007	0,004	0,007	8,8	8,6	85,5

Примечание: S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub> — отношение позитивно окрашенной площади к общей площади поля зрения; M — среднее количество клеток на единицу площади.

Антитела к CD4 были использованы в качестве маркёров Т-лимфоцитов-хелперов, антитела к CD8 — маркёров цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток, антитела к CD20 — маркёров В-клеток. Положительным контролем иммуногистохимических реакций служили срезы тканей, содержащие исследуемые антигены [7].

Полученные гистологические препараты были изучены на микроскопе Axio Imager (Carl Zeiss, Германия), а также отсканированы на сканере гистологических препаратов Aperio CS2 (Leica Biosystems, Швейцария) при различных увеличениях.

*Подсчёт результатов.* Количественное определение CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup>-позитивных клеток проводили с помощью программы для анализа и обработки изображений ImageJ (National Institute of Health, США).

Результаты подсчёта CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> представлены в виде отношения позитивно окрашенной площади поля зрения к общей площади поля зрения при увеличении ×200. С каждого образца было подсчитано по пять случайных полей зрения.

Подсчёт Bcl-2-, каспаза-3- и каспаза-9-позитивных клеток проводили вручную после визуализации окрашенных клеток на полученных образцах при увеличении ×200. С каждого образца было подсчитано по пять случайных полей зрения. Результаты представлены в виде среднего числа клеток на единицу площади изученного образца органа.

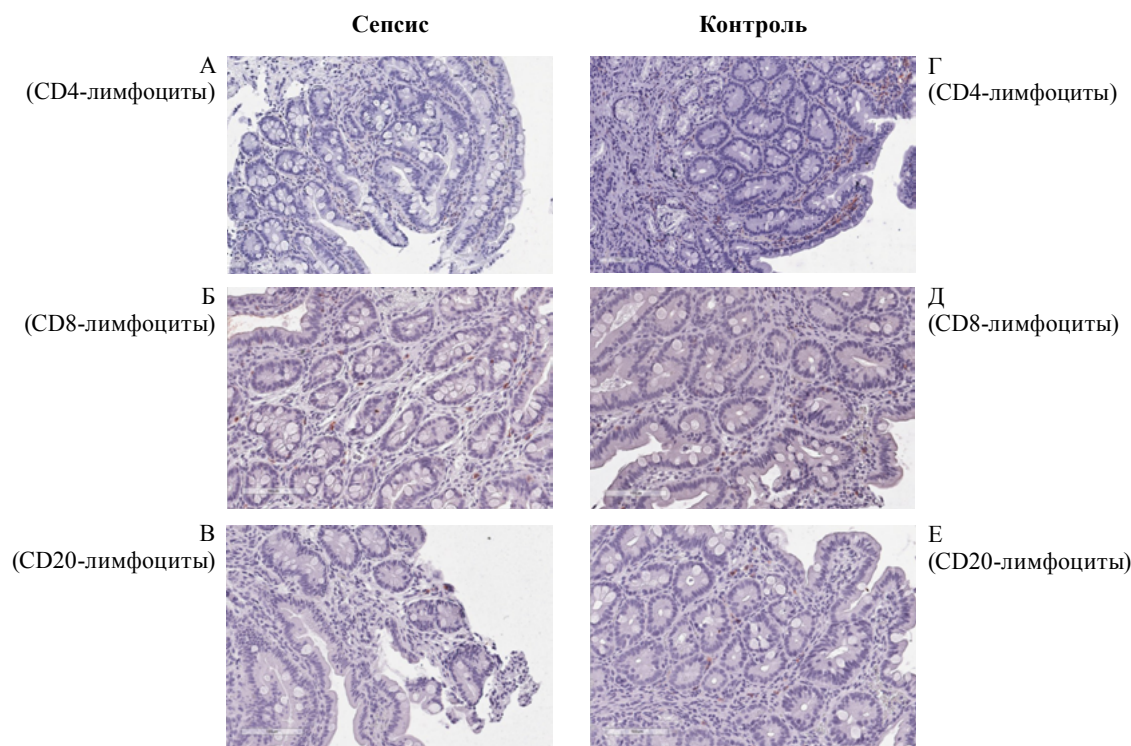
Учитывая малую выборку пациентов, дизайн исследования представлял описание серии случаев.

*Результаты эндоскопического исследования.* У 3 из 5 детей основной группы слизистая

оболочка пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки была интактной, у 1 ребёнка отмечена гиперемия слизистой оболочки нижней трети пищевода, ещё у 1 — гиперемия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. В контрольной группе у 1 ребёнка выявлена гиперемия слизистой оболочки нижней трети пищевода, у другого — гиперемия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки.

*Результаты морфологического исследования.* Морфология стенки двенадцатиперстной кишки у пациентов основной группы (с сепсисом) в целом была неспецифичной, однообразной и характеризовалась умеренно выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, отёком и мезенхимозом стромы, гиперплазией бокаловидных клеток. У детей контрольной группы зарегистрирована аналогичная картина, у 1 ребёнка с пневмонией выявлена очаговая выраженная В-лимфоцитарная инфильтрация с формированием фолликулов.

*Результаты иммуногистохимического исследования.* Установлено, что количество лимфоцитов CD4<sup>+</sup> слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей с НС в 4 из 5 случаев не отличалось от показателей контрольной группы (табл. 2, рис. 1). Только у 1 ребёнка с сепсисом количество клеток CD4<sup>+</sup> было заметно меньше, чем у детей контрольной группы. Число лимфоцитов CD8<sup>+</sup> у детей с НС в 2 из 5 случаев не отличалось от значений группы контроля, а в 3 случаях даже было большим. Количество CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов у 4 из 5 детей с НС было заметно меньше по сравнению с показателями контрольной группы. В 1 случае число клеток CD20<sup>+</sup> было таким же, как в контроле.



**Рис. 1.** Иммуногистохимическое окрашивание CD4-, CD8- и CD20-лимфоцитов (коричневая окраска) двенадцатиперстной кишки у ребёнка с сепсисом (А, Б, В) и без сепсиса (Г, Д, Е). Увеличение  $\times 200$

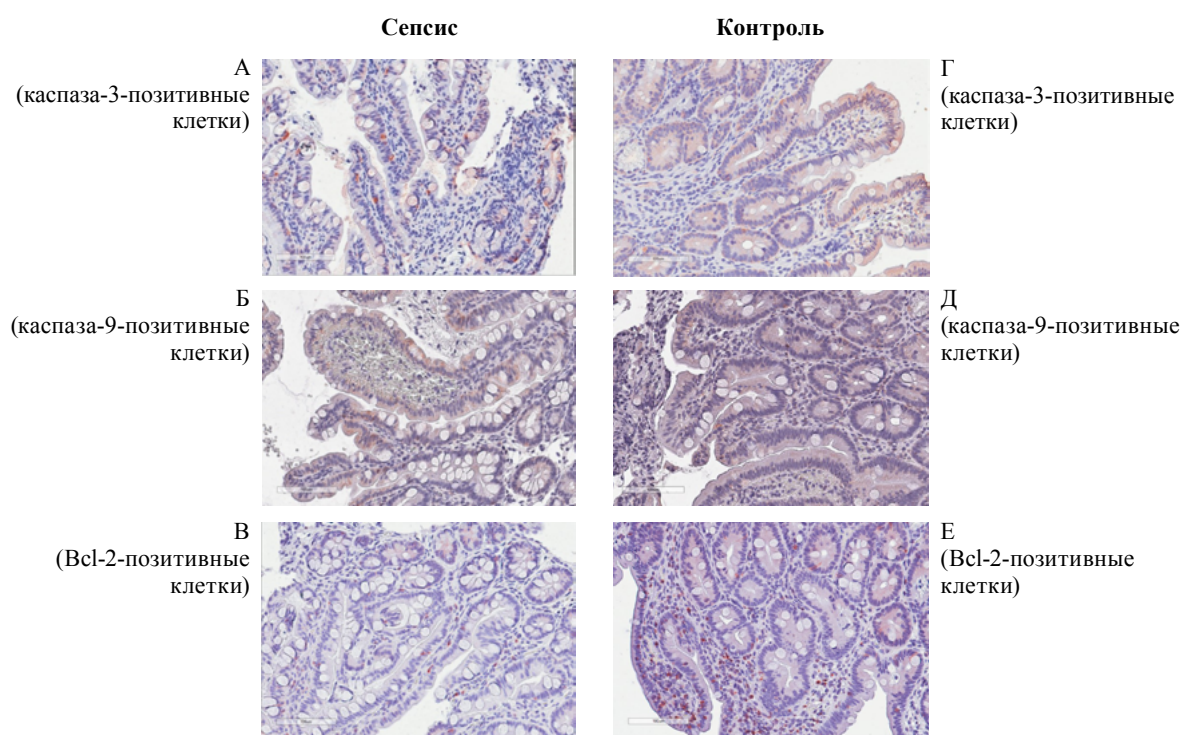
Обнаружена активация процессов апоптоза в клетках слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, что проявилось большим количеством каспаза-3-позитивных клеток у 4 из 5 новорождённых с сепсисом в сравнении с показателями контрольной группы (рис. 2, см. табл. 2). Число каспаза-9-позитивных клеток в группе детей с НС было большим относительно значений контрольной группы только в 2 из 5 случаев. Обращало на себя внимание существенное снижение числа Vcl-2-позитивных клеток слизистой оболочки у всех 5 детей с НС по сравнению с показателями контроля (см. табл. 2, см. рис. 2). Их средние значения в группе детей с НС были в 2,5 раза меньше, чем в контроле.

Согласно современным представлениям о патофизиологии сепсиса, после сравнительно короткого периода активации клеток врождённого иммунитета и развития синдрома системного воспалительного ответа наступает иммуносупрессия, становящаяся, как показывает современная практика, одной из основных причин неблагоприятного исхода при сепсисе. При этом иммуносупрессии подвержены клетки как врождённого, так и адаптивного иммунитета.

Группой исследователей, возглавляемой К. Wolk (2003), было показано, что первичная

стимуляция моноцитов эндотоксином способствует активации этих клеток с выраженным провоспалительным ответом, однако при повторном введении эндотоксина формируется толерантность к нему со снижением экспрессии HLA-DR моноцитов [8]. Данный феномен рассматривают в качестве одного из предикторов неблагоприятного исхода при сепсисе. В исследованиях G. Monneret (2002) было установлено, что 40% снижение экспрессии HLA-DR на поверхности моноцитов в течение 5 дней от начала септического шока ассоциируется со смертельным исходом [9].

Как уже было отмечено, ключевая роль в элиминации возбудителя и формировании последующей невосприимчивости принадлежит факторам адаптивного иммунитета. У пациентов, умерших от сепсиса, в селезёнке, лимфатических узлах, вилочковой железе традиционно регистрируют снижение количества Т-клеток (субпопуляций лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) и В-лимфоцитов [3–5]. Существенное уменьшение клеточного пула в Т- и В-зависимых зонах с опустошением реактивных центров рассматривают как один из характерных морфологических признаков сепсиса [10].



**Рис. 2.** Иммуногистохимическое окрашивание каспаза-3-, каспаза-9- и Vcl-2-позитивных клеток (коричневая окраска) у ребёнка с сепсисом (А, Б, В) и без сепсиса (Г, Д, Е). Увеличение  $\times 200$

Основная причина формирующейся сепсис-индуцированной иммуносупрессии — повышенная активность процессов апоптоза клеток иммунной системы. Активация этого явления была продемонстрирована у пациентов разного возраста — взрослых, детей младшего возраста, новорождённых [3–5]. Ключевую роль в завершающей стадии этого процесса, как показали исследования, играет каспаза-3 [11]. Снижение количества эффективно функционирующих лимфоцитов в слизистой оболочке кишечника способствует транслокации бактерий и их токсинов в системный кровоток с развитием синдрома системного воспалительного ответа и повышением вероятности присоединения вторичных инфекций [12]. Результат сепсис-индуцированного апоптоза — снижение эффективности противоинфекционного иммунного ответа.

Мы предположили, что и в нашем исследовании будет выявлена сходная картина — снижение количества  $CD4^+$ -,  $CD8^+$ - и  $CD20^+$ -клеток, только теперь уже в тканях слизистой оболочки кишечника. В том числе учитывали и возможную активацию процесса апоптоза. Полученные результаты частично подтвердили исходную гипотезу. По-видимому, развивается умерен-

но выраженная иммуносупрессия в слизистой оболочке кишечника, что видно по низкому количеству В-лимфоцитов  $CD20^+$ . В то же время, численные показатели  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -клеток у большинства детей с НС практически не отличались от показателей контрольной группы. Мы не исключаем, что отсутствие ожидаемого снижения числа этих лимфоцитов в слизистой оболочке было связано с отсутствием выраженной иммуносупрессии у включённых в исследование пациентов.

Напомним, что ни один из детей не погиб. Ни в одном случае не было абсолютной лимфопении. Даже при септическом шоке, наиболее тяжёлой форме сепсиса (мы наблюдали его у 2 детей), протекавшем с гемодинамическими нарушениями и уровнем лактата крови более 10 ммоль/л, общее количество лимфоцитов в венозной крови и  $CD4^+$ -клеток в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки не отличалось от выбранного нами контроля. Шок же удалось достаточно быстро купировать. Кроме того, нужно учесть, что иммуносупрессия характерна для поздних сроков заболевания. В исследовании, проведённом R.S. Hotchkiss (2001) и уже ставшем классическим, выраженность снижения количества  $CD4^+$ - и  $CD20^+$ -клеток

в органах иммунной системы прямо коррелировала со сроками заболевания: иммуносупрессия была наиболее выраженной после 7-го дня болезни [13]. В нашем исследовании только у 1 (20%) ребёнка продолжительность НС в день проведения эндоскопического исследования превышала 7 дней.

Как уже было отмечено выше, основная причина лимфопении при сепсисе — активация апоптоза. Более того, апоптозу при сепсисе также подвержены эпителиальные клетки различных органов. Этот процесс чаще проявляется в кишечнике, лёгких, печени и способен привести к органной дисфункции [14]. В нашем исследовании это было заметно по увеличению числа каспаза-3-позитивных клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Только у 1 из детей количество такого рода клеток не отличалось от показателей контроля.

Активация апоптоза клеток пищеварительного тракта может стать причиной нарушений целостности кишечной стенки, снижения её барьерной функции и транслокации бактерий в кровотоки. Нередко пищеварительный тракт становится входными воротами инфекции при позднем НС. R.S. Hotchkiss и соавт. показали, что в образцах тканей, полученных от умерших пациентов, доля подвергшихся апоптозу клеток была наибольшей в толстой кишке — 47,1% [15].

Мы не исключаем, что это связано с наибольшей концентрацией кишечной микрофлоры именно в толстой кишке. У пациентов, включённых в наше исследование, в 3 (60%) случаях был диагностирован некротический энтероколит. Апоптоз клеток пищеварительного тракта — один из ключевых механизмов развития некротического энтероколита [15]. В нашем исследовании во всех случаях отмечено увеличение числа каспаза-3-позитивных клеток по сравнению с контролем. Однако отсутствие заметного снижения количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в слизистой оболочке кишечника, по-видимому, способствовало благоприятному исходу заболевания у всех 5 детей.

Основным компонентом клетки, препятствующим апоптозу, служит митохондриальный белок Bcl-2 [11]. В нашем исследовании был выявлен сравнительно низкий уровень Bcl-2-позитивных клеток в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки у всех 5 детей с НС, что свидетельствует о подавлении активности антиапоптотических механизмов.

## ВЫВОДЫ

1. Проведённое исследование выявило умеренно выраженную иммуносупрессию в сли-

зистой оболочке двенадцатиперстной кишки у детей с неонатальным сепсисом, проявившуюся низкими значениями В-лимфоцитов CD20<sup>+</sup> на фоне отсутствия значимого снижения количества Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>.

2. Установлена умеренно выраженная активация процессов апоптоза на фоне сниженного антиапоптотического потенциала, что создаёт условия возможной транслокации кишечной микрофлоры в кровотоки.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Verma P., Berwal P.K., Nagaraj N. et al. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum, recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *Int. J. Contemp. Pediatr.* 2015; 2: 176–180. DOI: 10.18203/2349-3291.ijcp20150523.
2. Hotchkiss R.S., Osmon S.B., Chang K.C. et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol.* 2005; 174: 5110–5118. DOI: 10.4049/jimmunol.174.8.5110.
3. Boomer J.S., To K., Chang K.C. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011; 306 (23): 2594–605. DOI: 10.1001/jama.2011.1829.
4. Felmet K.A., Hall M.W., Clark R.S. et al. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol.* 2005; 174: 3765–3772. DOI: 10.4049/jimmunol.174.6.3765.
5. Toti P., De Felice C., Occhini R. et al. Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 122: 765–771. DOI: 10.1309/RV6E-9BMC-9954-A2WU.
6. Меркулов Г.А. *Курс патологогистологической техники.* 4-е изд. Л.: Медгиз, ленинградское отделение. 1961; 343 с. [Merkulov G.A. *Kurs patologogistologicheskoy tekhniki.* (Course of pathohistological techniques.) L.: Medgiz. 1961; 343 p. (In Russ.)]
7. Петров С.В., Райхлин Н.Т. *Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.* Казань. 2004; 452 с. [Petrov S.V., Rajhlin N.T. *Rukovodstvo po immunogistokhimicheskoy diagnostike opukholey cheloveka.* (Guidelines for immunohistochemical diagnosis of human tumors.) Kazan. 2004; 452 p. (In Russ.)]
8. Wolk K., Kunz S., Crompton N.E. et al. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (20): 18 030–18 036. DOI: 10.1074/jbc.M207714200.
9. Monneret G., Elmenkouri N., Bohe J. et al. Analytical requirements for measuring monocytic HLA-DR by flow cytometry. *Clin. Chem.* 2002; 48: 1589–1592. PMID: 12194941.
10. Цинзерлинг А.В. *Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза.* СПб.: СOTIS. 1993; 363 с. [Tcinzerling A.V. *Sovremennye infektsii. Patologicheskaya anatomiya i voprosy patogenez.* (Modern infections. Pathological anatomy and pathogenesis issues.) SPb.: SOTIS. 1993; 363 p. (In Russ.)]



11. Hotchkiss R.S., Coopersmith C.M., Karl I.E. Prevention of lymphocyte apoptosis — A potential treatment of sepsis? *Clin. Inf. Dis.* 2005; 41: 465–469. DOI: 10.1086/431998.
12. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Immunology.* 2013; 13: 862–874. DOI: 10.1038/nri3552.
13. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E. et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 2001; 166: 6952–6963. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6952.
14. Da Silva F.P., Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis.* 2009; 14: 509–521. DOI: 10.1007/s10495-009-0320-3.
15. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Karl I.E. Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand. J. Infect. Dis.* 2003; 35: 585–592. DOI: 10.1080/00365540310015692.