

**Курбатова Ольга Владимировна**

**Состояние клеточного и гуморального иммунитета и  
функциональная активность лимфоцитов у детей с  
печеночными формами гликогеновой болезни**

14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2017**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,  
заслуженный деятель науки РФ **Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна**

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор **Петричук Светлана Валентиновна**

**Официальные оппоненты:**

**Балмасова Ирина Петровна** - доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний НИМСИ ФБГОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

**Ройтман Александр Польевич** - доктор медицинских наук, профессор кафедры лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства**

Защита диссертации состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук**

**Новикова Л.И.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Гликогеновая болезнь (ГБ) - обобщающее название группы редких наследственных заболеваний, обусловленных недостаточностью ферментов, участвующих в обмене гликогена. Энзимные дефекты приводят к нарушениям структуры гликогена и его избыточному накоплению в различных тканях и органах. В зависимости от недостатка того или иного фермента, а также от типа поражаемой ткани, в настоящее время выделяют до 15 типов заболевания [Баранов А.А. и соавт., 2015; Ozen H. et al., 2007]. К печеночным формам ГБ относятся: I тип, связанный с дефектом глюкозо-6-фосфатазы, III тип, обусловленный дефектом гликоген-деветвящего фермента и VI-IX типы, возникающие при дефекте фосфорилазной или фосфокиназной системы [Сурков А.Н. и соавт. 2012, 2014; Froissart R. et al., 2011].

Заболевание имеет прогрессирующее течение, в результате дистрофии и воспалительных изменений происходит разрушение гепатоцитов, сопровождающееся фиброзированием ткани печени вплоть до цирроза. При всех типах печеночной формы ГБ наблюдаются характерные клинические признаки болезни, такие как гипогликемия, лактат-ацидоз, гепато- и спленомегалия, гломерулосклероз, остеопороз, Кроно-подобный синдром [Melis D. et al., 2014, 2016; Lawrence N. et al., 2015].

Для ГБ характерны клинические признаки гуморально-эффекторного иммунодефицита: частые бактериальные инфекции верхних дыхательных путей и ЛОР-органов, кожи и подкожной жировой клетчатки, желудочно-кишечного тракта [Lin L. et al., 2015]. При ГБ I типа описано наличие дефекта нейтрофилов, обусловленного нарушением процессов хемотаксиса при нормальном производстве супероксид аниона [D'Eufemia P. et al., 2007; Наеев В. et al., 2011; Jun H. et al., 2014]. В экспериментальных и клинических исследованиях при ГБ Ia типа показано, что повышение концентрации хемокинов, в частности, IL-8 и инфильтрация ткани печени нейтрофилами способствуют образованию некротических очагов [Kim S. et al., 2008]. Актуальность проведенного исследования связана с безусловным участием иммунной системы в патогенезе заболевания и недостаточностью сведений о механизмах этого участия, что отражено в следующем разделе.

### Степень разработанности темы исследования

В последнее время получены данные о нарушениях врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов с различными болезнями накопления. Показано, что пациенты с болезнью Гоше, мукополисахаридозом VII типа и альфа-маннозидозом предрасположены к подавлению иммунитета, более восприимчивы к инфекциям, имеют более высокий риск развития аутоиммунных заболеваний и злокачественных новообразований [Castaneda J. et al., 2008; Zahran A et al., 2016].

Нарушения в иммунной системе при болезнях накопления зависят от ферментного дефекта и имеют разнонаправленный характер. Так, у детей с болезнью Гоше (накопление глюкоцереброзида) описано повышенное абсолютное количество В- и Т-лимфоцитов, активированных Т-хелперов (CD4+HLA-DR+) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+HLA-DR+) по сравнению с контролем [Zahran A. et al., 2016]. У пациентов с болезнью Ниманна-Пика типа С (накопление липидов) выявлены значительные нарушения регуляции врожденного иммунитета, при этом снижается количество НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в циркуляции, нарушаются процессы дегрануляции [Platt N. et al., 2016]. Исследование мышинной модели мукополисахаридоза I типа выявило снижение В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов по сравнению с контрольной группой животных [Archer L. et al., 2013].

Несмотря на явные признаки нарушений в иммунной системе у пациентов с ГБ, данные, описывающие состояние иммунного статуса у этих пациентов, ограничиваются

единичными публикациями клинических примеров [Davis M. et al., 2010; Bégin P. et al., 2013; Melis D. et al., 2014].

Содержание цитокинов и хемокинов отражает степень гистологической активности воспалительного процесса и стадии фиброза печени при хронических болезнях различной этиологии [Арсентьева Н.А. и соавт., 2015; Rau M. et al., 2016; Tian X. et al., 2016; Zepeda-Morales A. et al., 2016]. При болезнях накопления также показано, что накапливающееся вещество (гликоцереброзид) может активировать антиген-презентирующие клетки (макрофаги) и способствовать повышенной продукции цитокинов Th1-лимфоцитами (IFN $\gamma$ , IL12, TNF $\alpha$ ,) и Th17-лимфоцитами (IL17A/F), запуская каскад воспалительных реакций в органах накопления гликоцереброзида (селезенке, печени, костном мозге и др.) [Pandey M. et al., 2012]. Учитывая накопление гликогена в гепатоцитах и развитие процессов воспаления, возникает вопрос о роли циркулирующих цитокинов в процессах фиброзирования при печеночных формах ГБ.

В последнее время важная роль в процессах фиброза печени отводится печеночной митохондриальной дисфункции, которая диагностируется при различных заболеваниях печени, в частности, у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени [Rector R. et al., 2010; Schröder T, et al., 2016; Mehta R, et al., 2016]. Дисфункция митохондриальных ферментов приводит к развитию оксидативного стресса, что, в свою очередь, провоцирует выработку провоспалительных цитокинов [Kucejova V. et al., 2016].

Роль митохондриальной дисфункции доказана в формировании множества патологических процессов, связанных с нарушениями врожденного иммунного ответа, аутовоспалительными заболеваниями, хроническими дегенеративными и опухолевыми заболеваниями [Царегородцев А. и соавт., 2013; West A. et al., 2011; Cloonan S. et al., 2012; Nunnari J. et al., 2012; Pagliarini D. et al., 2013; Bhattacharjee N. et al., 2016]. Нарушения митохондриального аппарата выявляются также при многих генетических заболеваниях [Garcia-Cazorla A. et al., 2006; Alston C et al., 2016.]. Митохондриальные дисфункции описаны также у пациентов с болезнями накопления: выявлены дефектные митохондрии у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова [Zischka H. et al., 2015], показано наличие нарушений кальциевого гомеостаза и процессов образования АТФ при гликогенозе II типа (болезнь Помпе) [Lim J. et al., 2015].

Таким образом, сочетание метаболических нарушений, воспалительных и фибротических процессов в печени с наличием клинических признаков иммунодефицитных состояний у пациентов с ГБ, определяют актуальность системного изучения клеток иммунной системы, которое должно включать оценку количественного состава субпопуляций лимфоцитов и их функциональную активность - как метаболическую, так и цитокинсинтезирующую.

**Цель исследования** - выявить особенности иммунного статуса и функциональной активности лимфоцитов у детей с печеночными формами гликогеновой болезни.

**Задачи исследования:**

1. Выявить возрастные особенности клеточного и гуморального иммунитета у детей с гликогеновой болезнью.
2. Установить особенности клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от типа гликогеновой болезни у детей.
3. Оценить информативность цитокинового профиля и других лабораторных показателей для диагностики степени фиброза печени при разных типах гликогеновой болезни.
4. Определить особенности метаболизма и митохондриальной активности в популяциях лимфоцитов у детей с гликогеновой болезнью.
5. Установить взаимосвязь иммунологических параметров, метаболической активности лимфоцитов, биохимических показателей крови и стадии фиброза печени у пациентов с гликогеновой болезнью.

6. Разработать алгоритм определения типа гликогеновой болезни на основании лабораторных показателей.

### **Научная новизна**

Впервые проведено длительное динамическое наблюдение большого количества пациентов с редкой наследственной патологией углеводного обмена - гликогеновой болезнью - и выявлены нарушения возрастной динамики популяций лимфоцитов, прогрессирующие с возрастом. Показано перераспределение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, характеризующееся увеличением относительного уровня Т-хелперов за счет существенного увеличения Th17-лимфоцитов и активированных Т-хелперов. Выявлена дисфункция клеток врожденного иммунитета, заключающаяся в снижении относительного количества NK-клеток и в увеличении доли популяции В1-лимфоцитов с возрастом.

Впервые выявлены отклонения в иммунном статусе лимфоцитов, свойственные разным типам гликогеновой болезни, наибольшие отклонения отмечены при I типе, наименьшие - при VI-IX типах заболевания. Наиболее тяжело протекающий клинически Ib тип гликогеновой болезни характеризуется снижением уровня цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов при значимом увеличении количества Th17-лимфоцитов.

Впервые оценена концентрация цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- $\beta$ ) в зависимости от стадии фиброза печени у детей с гликогеновой болезнью и показано, что для каждой стадии фиброза печени характерен особый цитокиновый профиль.

Впервые выявлено снижение активности внутриклеточных дегидрогеназ лимфоцитов (ГФДГ, СДГ, ЛДГ, НАДН-Д) при повышенном количестве Pas-позитивных лимфоцитов, наиболее выраженное при I типе гликогеновой болезни.

Впервые у пациентов с гликогеновой болезнью определена активность СДГ в популяциях лимфоцитов и показано, что процессы окислительного фосфорилирования в цитотоксических Т-лимфоцитах и NK-клетках протекают в 2,5 раза интенсивнее, чем в В-лимфоцитах. Среди субпопуляций Т-хелперов наибольшая активность СДГ выявлена в Th2-лимфоцитах и активированных Т-хелперах, наименьшая - в регуляторных Т-клетках.

Впервые у пациентов с гликогеновой болезнью определены корреляции между стадией фиброза печени и иммунологическими, биохимическими и метаболическими показателями крови.

На основании информативных лабораторных показателей разработан алгоритм пошаговой диагностики типа гликогеновой болезни.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В работе получены новые данные о состоянии клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с гликогеновой болезнью. Прогресс заболевания характеризуется нарастанием нарушений в иммунном статусе, количество активированных Т-хелперов и Th17-лимфоцитов позволяет оценить степень выраженности воспалительных процессов.

Исследованы закономерности изменения цитокинового профиля и количественных характеристик популяций лимфоцитов в зависимости от стадии фиброза печени у пациентов с гликогеновой болезнью и определены пороговые значения концентрации TGF- $\beta$  в плазме крови для дифференциальной диагностики стадии фиброза и назначения адекватной тактики лечения.

Выявленное в работе снижение интенсивности процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах обосновывает развитие дисфункции иммунного ответа у пациентов с гликогеновой болезнью. Показана значимость определения активности СДГ для оценки тяжести состояния пациентов с гликогеновой болезнью.

В работе проанализированы специфические изменения биохимических показателей сыворотки крови при разных типах гликогеновой болезни и разработана многоступенчатая

шкала комплексной оценки степени выраженности биохимических изменений, необходимая для диагностики степени нарушений функций печени у детей с гликогеновой болезнью.

Выявлены информативные лабораторные показатели и определены их пороговые значения для создания алгоритма пошаговой диагностики типа гликогеновой болезни у детей.

### **Методология и методы исследования.**

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью с применением системного подхода к исследованию показателей клеточного и гуморального иммунитета. Объектом исследования были дети с разными типами гликогеновой болезни. В работе использованы современные аналитические методы, обеспечивающие достоверность полученных результатов. Работа соответствует правилам проведения научных исследований и одобрена локальным независимым этическим комитетом (протокол №Х1-2013 от 20 ноября 2013 г.).

Лабораторные исследования выполнены на базе централизованной клинко-диагностической лаборатории (заведующая лабораторией - д.м.н., профессор Е.Л. Семикина), лаборатории цитохимии (заведующая лабораторией - д.б.н., профессор С.В. Петричук) и лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (заведующий лабораторией - д.м.н., профессор Н.А. Маянский).

Клинический анализ крови, биохимические исследования, исследования кислотно-основного состояния, определения уровня иммуноглобулинов крови проводили в центральной клинко-диагностической лаборатории. Для получения биологических образцов крови были использованы системы для взятия венозной крови BD Vacutainer®, использовалась венозная кровь, взятая из локтевой вены в утренние часы натощак.

Клинический анализ крови проводили на анализаторе Sismex 800 SX (Япония). Определяли количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, тромбоцитов.

Биохимический анализ крови и определение количества иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) проводили на анализаторе UniCel DxС800 (Beckman Coulter, США). Определяли диагностически значимые биохимические показатели: аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспаргатаминотрансферазу (АСТ), глюкозу, лактат, глутаматдегидрогеназу (ГГТ), сывороточную лактатдегидрогеназу (ЛДГс), холестерин, триглицериды, креатинфосфокиназу (КФК). Определение кислотно-основного состояния (ВЕ) проводили на приборе ABL 800 FLEX (Дания).

### **Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови**

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, было выполнено на проточном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США), использовали моноклональные антитела производства Beckman Coulter и Becton Dickinson (США): CD4-FITC, CD3-FITC, HLA-DR-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD(16+56)-PE, CD294-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PC7, CD25 PE-Cy7, CD25- PC7, CD5-PC7.

Пробоподготовку образцов периферической крови для многоцветного анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией [Зурочка А.В. и соавт., 2013; Хайдуков С.В. и соавт., 2014]. С помощью поверхностных моноклональных антител оценивали следующие популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3+CD45+), Т-хелперы (CD3+CD4+CD45+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+CD45+), активированные Т-лимфоциты (CD3+CD45+HLA-DR+), Th17-лимфоциты (CD3+CD4+CD161+CD45+), регуляторные Т-клетки (CD3+CD4+CD127<sup>low</sup>+CD45+), активированные Т-хелперы (CD3+CD4+CD127<sup>high</sup>+CD45+), Th2-лимфоциты (CD3+CD4+CD294+CD45+), В-лимфоциты (CD19+CD3-CD45+), включая В1-популяцию (CD45+CD3-CD19+CD5+) и В2-

популяцию (CD45+CD3-CD19+CD5-) лимфоцитов, NK-клетки (CD3-CD16+CD56+CD45+), NKT-клетки (CD3+CD16+CD56+CD45+).

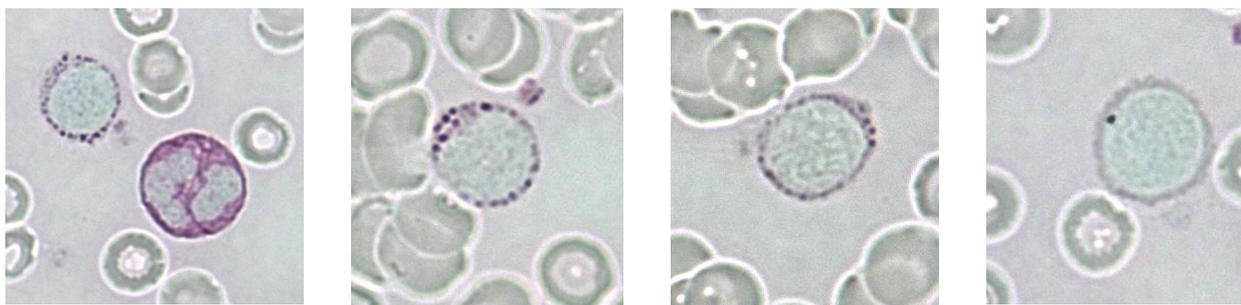
### **Метод мультиплексного определения цитокинов**

Определение концентрации циркулирующих цитокинов выполняли мультиплексным количественным методом с использованием проточной цитофлуориметрии (CYTOMICS FC500). Биологические образцы (плазму крови) получали методом центрифугирования цельной крови и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . В работе использовали наборы реагентов FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex (BMS810FF), Human IL-17A FlowCytomix Simplex (BMS82017FF), Human TGF-beta1 FlowCytomix Simplex (BMS8249FF). Протокол исследования соответствовал инструкции производителя (BenderMed Systems GmbH, Германия). Оценивали концентрации цитокинов IL-2, IL-8, IL-5, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  в плазме крови. В качестве референсных значений для концентраций цитокинов были использованы данные исследований, выполненных мультиплексным количественным методом [Маянский Н.А. и соавт., 2011; Toptygina A. et al., 2014].

### **Методы оценки метаболической активности лимфоцитов**

#### **Pas-реакция определения гликогена в лимфоцитах**

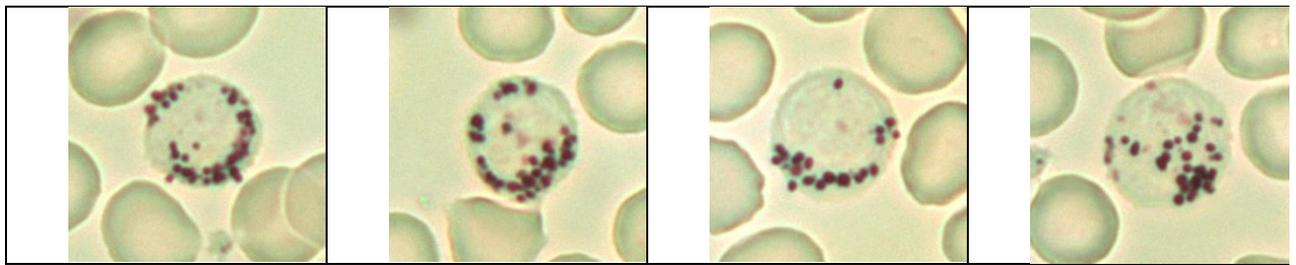
Определение содержания гликогена в лимфоцитах периферической крови проводили методом PAS-реакции [Козинец Г.И и соавт., 1997; Hagemans M.L. et al., 2010; Tabatabaei Shaffiei M. et al., 2014]. Гликоген откладывается в клетках в виде гомогенной окраски или в виде гранул (рис.1). Оценивали процент PAS-позитивных клеток на 100 лимфоцитов.



*Рис. 1. PAS-реакция в лейкоцитах (увеличение \*1000).*

### **Метод количественного определения активности дегидрогеназ**

Для оценки энергетических процессов в общей популяции лимфоцитов определяли активность митохондриальных дегидрогеназ: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), НАДН-дегидрогеназы (НАДН-Д), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ), а также активность цитоплазматической лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ферментов определяли методом количественного цитохимического анализа, включающего световую микроскопию и цитоморфоденситометрию [Петричук С.В. и соавт., 2005]. Метод основан на способности п-нитротетразолия фиолетового в процессе ферментативной реакции со специфическим каждому ферменту субстратом образовывать нерастворимые в воде гранулы формазана (рис. 2).

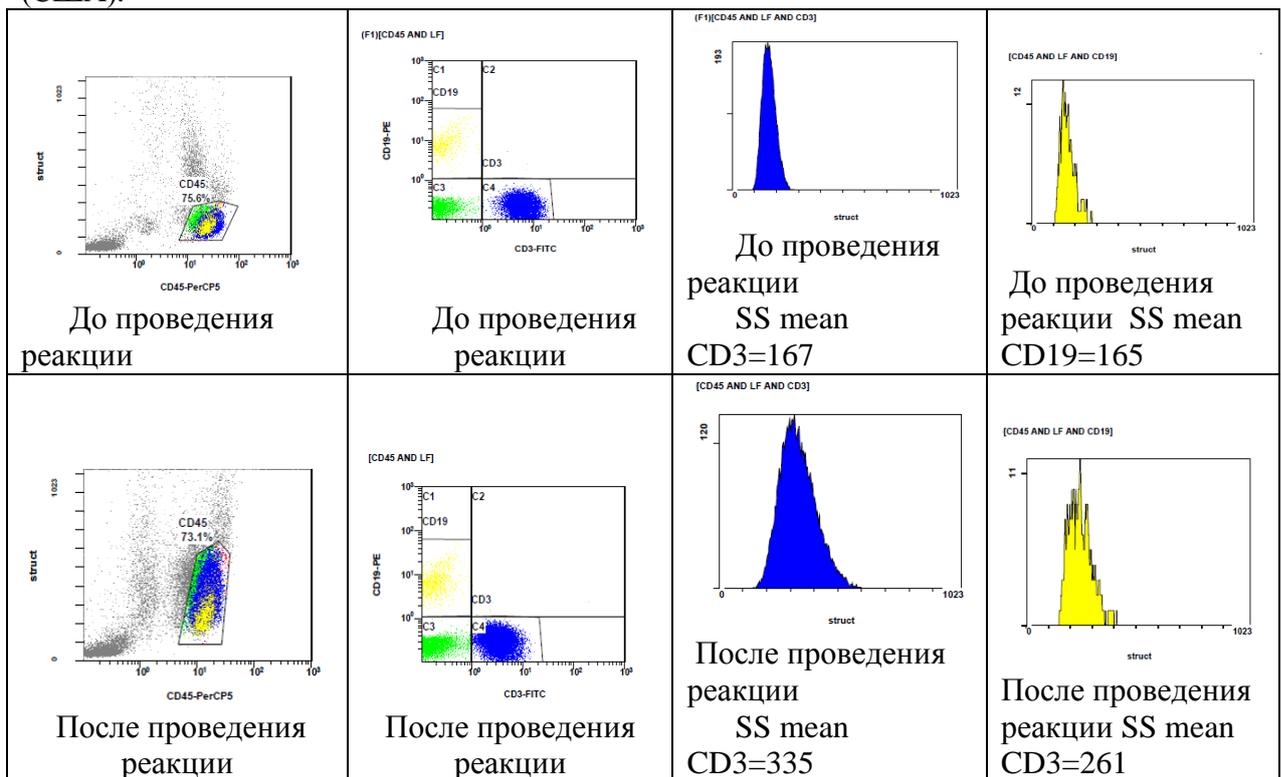


**Рис. 2. Выявление активности СДГ в лимфоцитах количественным цитохимическим методом (увеличение \*1000).**

Определение активности дегидрогеназ проводили с помощью аппаратно-программного комплекса визуализации морфологических препаратов «ВидеоТест» и программы «Морфология 5.2» (Россия).

### Метод иммуноцитохимического определения активности СДГ в популяциях лимфоцитов

Активность СДГ в популяциях лимфоцитов определяли иммуноцитохимическим методом на проточном цитометре СУТОМИКС FC500 [пат. №2302635 Петричук С.В. и соавт., 2007; Измайлова Т.Д. и соавт., 2014; Kurbatova O. et al., 2015]. Метод основан на увеличении коэффициента бокового светорассеяния (SS) после проведения цитохимической реакции на выявление активности фермента в пермеабилizированных и окрашенных моноклональными антителами клетках лимфоконцентрата (рис. 3). Активность СДГ определяли в основных и малых популяциях лимфоцитов. Математическую обработку цитометрических данных проводили с помощью программы СХР. v2.2, Beckman Coulter (США).



**Рис. 3. Этапы определения активности СДГ иммуноцитохимическим методом: выделение популяции лимфоцитов по параметрам флуоресценции, оценка гранулярности (SS) до и после проведения цитохимической реакции.**

## Статистические методы

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 6.0 (США). Данные в таблицах представлены в виде медианы [верхняя; нижняя квартиль]. Достоверность различий между группами оценивали непараметрическими критериями Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова. Различия при  $p < 0,05$  считались достоверными. Корреляционный анализ был выполнен методом множественной пошаговой регрессии с исключением. Анализ диагностической и прогностической значимости исследуемых параметров, а также оценку уровня пороговых значений показателей, осуществляли методом характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-анализ) с использованием программы «SPSS 16.0» (США).

В связи с возрастными особенностями иммунного статуса детей, результаты иммунограммы были пересчитаны в процентах отклонения от соответствующего возрастного референсного интервала, с расчетом ошибки для доли вариант. При разработке бальной шкалы для оценки биохимических нарушений учитывали степень отклонения показателей от референсных значений, перевод степени отклонения показателей в баллы выполняли согласно рекомендациям по оценке степени нарушений функций печени у детей [Волынец Г.В. и соавт., 2013].

## Личный вклад автора

Автором выполнен сбор и анализ клинических и лабораторных данных, проведены исследования иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови, выполнено определение уровня циркулирующих цитокинов, определение метаболической активности лимфоцитов в мазках периферической крови (содержание гликогена, определение активности дегидрогеназ: СДГ, НАДН-Д, ЛДГ, ГФДГ) и определение активности СДГ в популяциях лимфоцитов. Автором самостоятельно осуществлена статистическая обработка полученных данных, написаны статьи и тезисы по материалам диссертационной работы.

## Степень достоверности и апробация результатов

Апробация работы состоялась 21 марта 2017 года на заседании проблемной комиссии «Новые технологии в педиатрии» Федерального государственного автономного учреждения «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №2).

Основные положения диссертации доложены на научно-практических конференциях: Объединенный иммунологический форум (Нижний Новгород, 2013), 12 International Congress of inborn errors of metabolism - SSIEM (Barcelona, Spain, 2013), XVIII Всероссийская научно-практическая конференция «Консолидация науки и практики» (Москва, 2014), 47th European Human Genetics Conference -ESHG 2014 (Milano, Italy, 2014), 47 annual meeting European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition - ESPGHAN (Jerusalem, Israel, 2014), 8-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва, 2014), International meeting on mitochondrial pathology - EUROMIT (Tampere, Finland, 2014), 39 FEBS Congress (Paris, France, 2014), 13 SSIEM (Innsbruck, Austria, 2014), XIV Российский научный форум на Урале с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (Екатеринбург, 2014), XV Всероссийский Научный форум «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015), XII конференция иммунологов Урала 2015 - Пермский Научный Форум (Пермь, 2015), 40 FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015), 48 ESPGHAN (Netherlands, Amsterdam, 2015), 14 SSIEM (Lyon, France, 2015), 11 International Society for Adaptive Medicine - ISAM (Yonago, Japan, 2015), 6th World Congress on Targeting Mitochondria (Berlin, Germany, 2015), I-й Калининградский научный иммунологический форум (Калининград, 2016), II конгресс лабораторной медицины (Москва, 2016).

## **Публикации по теме диссертации**

По материалам исследования опубликовано 26 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК и 11 публикаций, индексируемых в базе данных Scopus.

## **Внедрение в практику**

Результаты работы внедрены в практику гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского и отделения восстановительного лечения детей с болезнями органов пищеварения ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава РФ и используются в качестве учебного материала на кафедре педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 239 страницах и состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Объем и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Заключение», «Выводы». Список литературы включает 76 отечественных и 166 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 125 рисунками и 22 таблицами.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. У детей с гликогеновой болезнью выявлены нарушения в иммунном статусе, прогрессирующие с возрастом, степень иммунных нарушений определяется типом заболевания и наиболее выражена при I типе гликогеновой болезни.

2. Метаболизм лимфоцитов у детей с гликогеновой болезнью характеризуется снижением показателей активности внутриклеточных дегидрогеназ и увеличением количества PAS-позитивных лимфоцитов, зависящим от типа заболевания.

3. Определение концентраций цитокинов, показателей иммунного статуса и активности дегидрогеназ лимфоцитов позволяет диагностировать стадию фибротических изменений в печени и степень выраженности воспалительного процесса у пациентов с гликогеновой болезнью.

4. Комплексная оценка показателей клинического, биохимического и цитохимического анализов крови является дополнительным методом скрининга типа гликогеновой болезни и позволяет сузить показания для проведения молекулярно-генетической экспертизы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объем исследования**

Обследованы дети с гликогеновой болезнью, находившиеся в период с 2008 г. по 2016 г. на лечении в гастроэнтерологическом отделении с гепатологической группой (заведующий отделением - д.м.н., профессор А.С. Потапов) и в отделении восстановительного лечения детей с болезнями органов пищеварительной системы (заведующая отделением - к.м.н. О.С. Гундобина) НИИ педиатрии им. Г.Н.Сперанского (директор – академик РАН Л.С. Намазова-Баранова) ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава России (директор - академик РАН А.А. Баранов).

В исследование включено 170 наблюдений за 73 пациентами с гликогеновой болезнью, обследованных в динамике заболевания. Из них с ГБ I типа – 70 наблюдений (23 ребенка), с ГБ III типа – 40 наблюдений (19 детей), и 60 наблюдений (31 ребенок) пациентов с ГБ VI и IX типов, объединенных в одну группу из-за схожести клинической картины

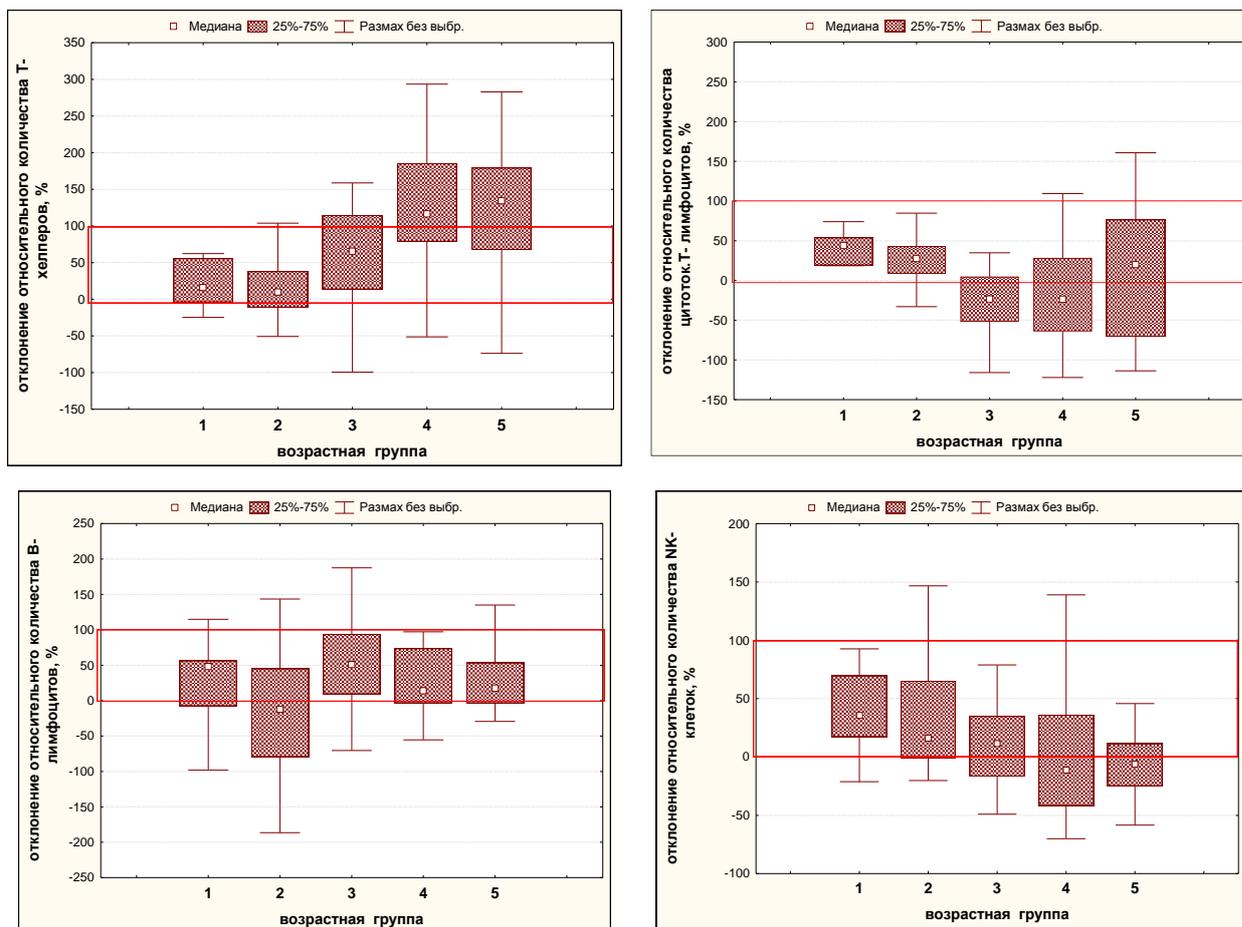
заболевания. Группу сравнения составили 79 условно здоровых детей. Возраст пациентов колебался от 1 года до 17 лет, медиана возраста составила 7,6 [4,1; 10,8] года. Дети с ГБ были разделены на 5 возрастных групп в соответствии с возрастными диапазонами, рекомендованными для оценки иммунологических показателей: 1-2 года (12 набл. - 1 группа), 3-5 лет (57 набл. - 2 группа), 6-8 лет (29 набл. - 3 группа), 9-11 лет (34 набл. - 4 группа), 12-16 лет (38 набл. - 5 группа). Группу сравнения составили практически здоровые дети, сопоставимые по возрасту: 1-2 года (6 набл.), 3-5 лет (21 набл.), 6-8 лет (11 набл.), 9-11 лет (17 набл.), 12-16 лет (26 набл.). Возрастные диапазоны выбраны согласно клиническим рекомендациям по изменению возрастных иммунологических показателей [Каколина В.Ф и соавт., 2006; Топтыгина А.П. и соавт., 2012; Семикина Е.Л. и соавт., 2013; Кудрявцев И.В. и соавт., 2016].

Диагноз «гликогеновая болезнь» устанавливался на основании анамнестических, клинических, лабораторных данных и подтверждался молекулярно-генетическими методами в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии (заведующий лабораторией - к.б.н. К.В. Севостьянов).

Оценку стадии фиброза печени проводили методом транзIENTной эластографии печени на аппарате FibroScan F502 (EchoSense, Франция). Для диагностики степени фиброза печени использовали шкалу METAVIR: стадия F1 – плотность в интервале 5,9-7,2 кПа; стадия F2 – 7,3-9,5 кПа; стадия F3 – 9,6-12,5 кПа, стадия F4 (цирроз печени) - плотность 12,6 кПа и более [Сурков А.Н., 2013; Дворяковский И.В. и соавт., 2016; Сурков А.Н. и соавт., 2016]. Кроме того, все пациенты были комплексно обследованы по стандартному лабораторному протоколу, включая клинический, биохимический анализы крови, иммунофенотипирование лимфоцитов, определение содержания цитокинов в плазме крови и оценку метаболической активности лимфоцитов.

### **Содержание работы**

В результате проведенного исследования количества лимфоцитов периферической крови было получено, что хотя количество лимфоцитов у пациентов с ГБ уменьшалось с возрастом, но во всех возрастных группах было достоверно выше, чем в группе сравнения ( $p < 0,001$ ). Выявлено увеличение с возрастом относительного количества Т-клеток за счет увеличения количества Т-хелперов на фоне снижения цитотоксических Т-лимфоцитов, что приводило к увеличению соотношения CD4/CD8. У пациентов с ГБ относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов с возрастом достоверно снижается и, в среднем по группе, соответствует возрастным референсным значениям (рис. 4).



**Рис.4** Отклонение относительного количества Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток от показателей возрастной нормы. Диапазон нормативных значений (0-100%) выделен красной линией.

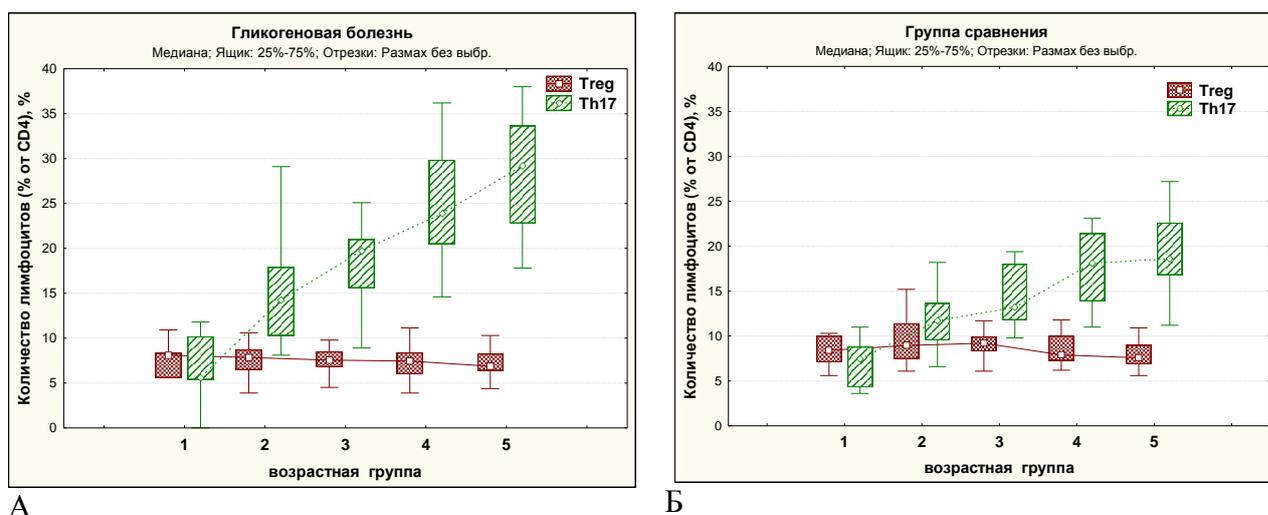
Анализ концентрации иммуноглобулинов у пациентов с ГБ показал достоверное увеличение количества IgG, IgA и IgM с возрастом, что соответствует возрастной динамике референсных значений, и является подтверждением сохранности функциональной активности В-клеточного звена иммунитета. Анализ соотношения В1- и В2-популяций показал достоверное увеличение количества В1-клеток (% от CD19) с возрастом. Выявленное повышенное количество В1-клеток у пациентов с ГБ также может свидетельствовать о риске развития аутоиммунной патологии у детей старше 12 лет, что и подтверждается описанными клиническими наблюдениями [Melis D. et al., 2008; Lawrence N. et al., 2014].

Анализ содержания НК-клеток показал, что их абсолютное количество снижается с возрастом и у пациентов с ГБ, и в группе сравнения, повторяя динамику снижения общего количества лимфоцитов. С возрастом увеличивается количество пациентов с ГБ, у которых содержание НК-клеток ниже референсных значений (рис. 4). Таким образом, анализ В1-популяции лимфоцитов и НК-клеток указывает на снижение функций врожденного иммунитета, прогрессирующее с возрастом, что соответствует описанным клиническим наблюдениям возникновения аденом печени у пациентов с ГБ [Сурков А.Н., 2014; Calderaro J., 2013; Lawrence N. et al., 2014; Li X., 2016].

У пациентов с ГБ количество НКТ-клеток достоверно увеличивается с возрастом, значительно превышая рост данной популяции в группе сравнения. В настоящее время показано, что увеличение количества НКТ-клеток способствует развитию воспалительных процессов в печени за счет продукции INF- $\gamma$  [Hou X., 2016; Wang J., 2016]. Кроме того, мы наблюдали значимый рост количества активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+) с

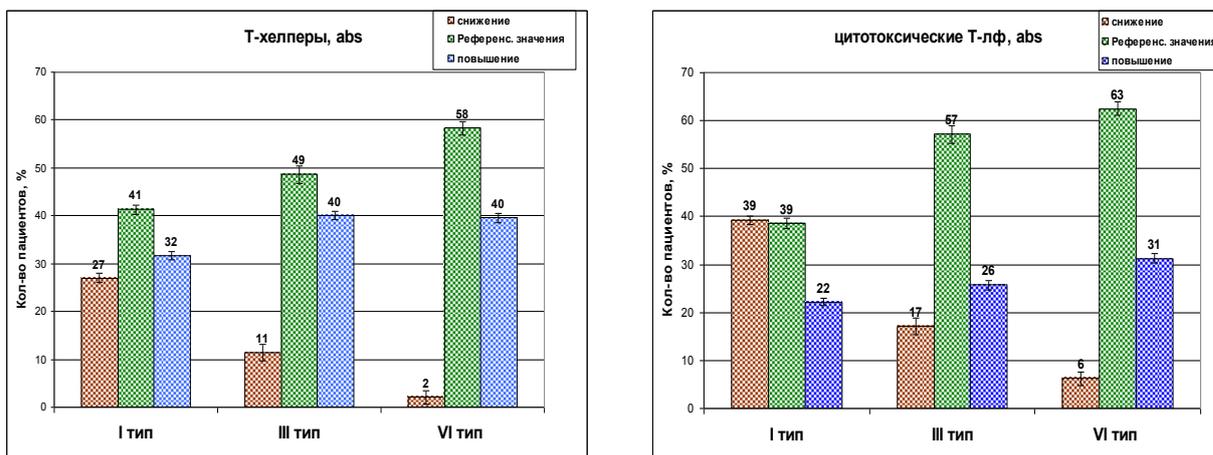
возрастом, что может являться отражением процессов воспаления в ткани печени у пациентов с ГБ [Panasiuk A, 2003].

В настоящее время показана важная роль регуляторных Т-клеток (Treg) и Th17-лимфоцитов в развитии иммунопатологических состояний, в том числе и при хронических заболеваниях печени [Гариб Ф.Ю., и соавт., 2016; Capone M., et al., 2016; Chackelevicius S.M., et al., 2016; Endo Y., et al., 2016; Rau M., et al., 2016]. У пациентов с ГБ количество Th17-лимфоцитов достоверно увеличивалось с возрастом, а содержание Treg практически не изменялось (рис. 5). У детей старше 2-х лет соотношение Th17/Treg существенно выше, чем в группе сравнения. Анализ активированных Т-хелперов (CD4+CD127high+CD25+CD45+) показал значимое увеличение их количества с возрастом, что также указывает на прогрессирование воспалительных процессов в печени у обследованных пациентов [Ramachandran P. et al., 2015].



**Рис. 5. Относительное количество Th17-лимфоцитов (% от CD4+лимфоцитов) и регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) (% от CD4+лимфоцитов) у пациентов с гликогеновой болезнью (A) и в группе сравнения (B).**

Анализ содержания основных и малых популяций лимфоцитов выявил достоверные отличия у пациентов с разными типами ГБ. Меньше всего пациентов с нормальными показателями иммунограммы отмечено при I типе ГБ, тогда как пациенты VI-IX типов, напротив, достоверно реже имелись отклонения в иммунном статусе (рис. 6). Пациенты с I типом характеризовались большим разбросом отклонений иммунологических показателей относительно референсных значений, что связано с неоднородностью этого типа заболевания и с разделением его на подтипы Ia (дефект глюкозо-6-фосфатазы) и Ib (дефект транспортного белка T1). Соотношение Th17/Treg было достоверно выше у пациентов I типа, чем у пациентов III и VI-IX типов ГБ, у пациентов III типа достоверно выше, чем у пациентов VI-IX типов ГБ.

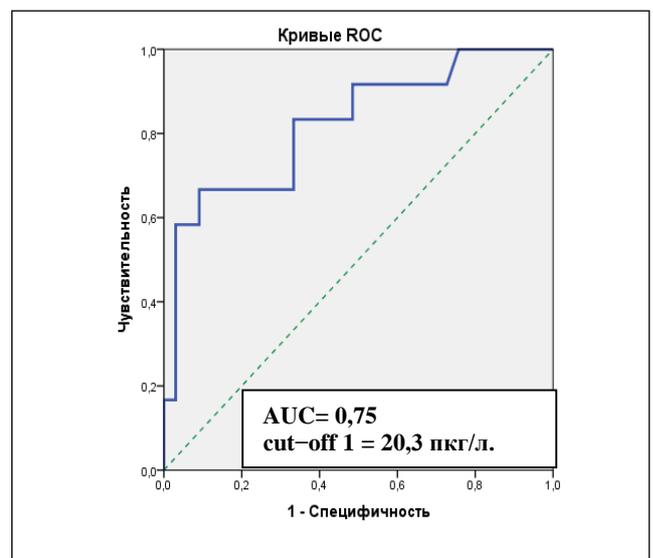
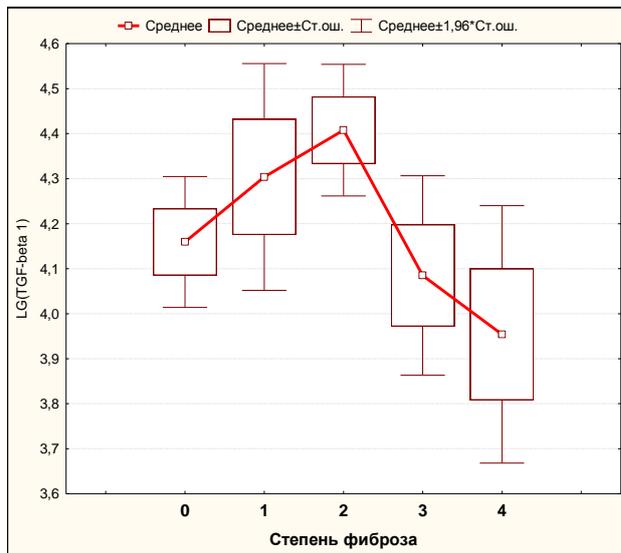


**Рис. 6. Распределение пациентов по отклонению абсолютного количества Т-хелперов (А) и цитотоксических Т-лимфоцитов (Б) от возрастных нормативных значений в зависимости от типа ГБ.**

Выявленные особенности иммунного статуса у пациентов с разными типами ГБ соотносятся с данными литературы о наиболее тяжело протекающем I типе заболевания [Баранов А.А., 2015; Burda P. et al., 2015].

Основным клиническим проявлением заболевания является увеличение печени с присоединением процессов фиброзирование. Наиболее часто выраженные фибротические изменения наблюдались при III типе ГБ (стадия фиброза F4 у 35%, F3-16%, F2-14%, F1-24% пациентов с этим типом) и I типе (F4 у 2%, F3-17%, F2-32%, F1-23% пациентов с этим типом), тогда как при VI-IX типе ГБ фибротические изменения отсутствовали (F0-82%) или были минимальны (F1-18%). Цитокиновый дисбаланс играет важную роль в иницировании и развитии процессов фиброза в печени [Балмасова И.П. и соавт., 2013; Симбирцев А.С. и соавт. 2015; Paquissi F.C., et al., 2016; Rau, M. et al., 2016; Zepeda-Morales, A.S., et al., 2016].

Анализ содержания циркулирующих цитокинов в плазме крови у пациентов с ГБ выявил повышенное содержание цитокинов более чем у половины пациентов. Уровень IL-2 был повышен у 86% пациентов с ГБ, IL-8 - у 82%, IL-5 - у 81%, IL-1 $\beta$  - у 67%, IL-4 - у 70%, IL-6 - у 58%, IL-12p70 - у 56%, IL-10 - у 55%, IFN- $\gamma$  - у 54%, IL-17A - у 48%, TNF- $\alpha$  - у 45%, TNF- $\beta$  - у 22% пациентов. Было получено, что концентрации цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-1- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8 изменяются линейно при прогрессировании фиброза печени. Концентрации IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 зависят от стадии фиброза нелинейно, причем пик максимальной концентрации разных цитокинов приходится на разные стадии заболевания. Концентрация TGF- $\beta$ 1 была снижена у 70% пациентов, увеличивалась до референсных значений к стадии F2, с последующим снижением к стадии F4 (рис.7А). Максимальное снижение концентрации TGF- $\beta$ 1 отмечалось у пациентов III типа ГБ.



А.

Б.

**Рис. 7. А. Концентрация TGF-β1 в зависимости от стадии фиброза печени у пациентов I и III типа ГБ. Б. ROC-кривая разделения стадий фиброза печени F2 и F3 по концентрации TGF-β1 у пациентов с I и III типом ГБ.**

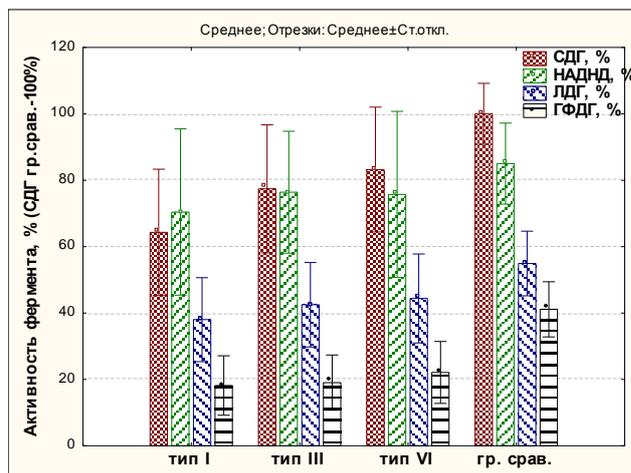
Важно отметить, что имеются принципиальные различия в лечении стадии фиброза печени F2 и F3 у пациентов с ГБ [Баранов А.А., 2015]. Для разделения этих стадий по концентрации TGF-β1 был применен ROC-анализ, который показал хорошее качество разделительной модели (AUC=0,75;  $p < 0,05$ ). Определение пороговых значений показало, что при снижении TGF-β1 менее 20,3 пкг/л можно предполагать переход в стадию фиброза F3 (ДЧ=75%, ДС=72%; рис. 7Б).

Таким образом, в нашем исследовании показана значимая роль TGF-β1 как главного профиброгенного цитокина, что согласуется с данными литературы [Курабекова Р.М. и соавт., 2015; Wynn T.A., et al., 2014]. Повышение содержания TGF-β1 при повреждении ткани печени оказывает стимулирующий эффект на продукцию коллагена фибробластами и гепатоцитами [Wynn T.A. et al., 2014] и в сочетании с другими методами обследования может более точно оценить стадию фиброза печени у каждого конкретного пациента [Шептулина А.Ф. и соавт., 2015].

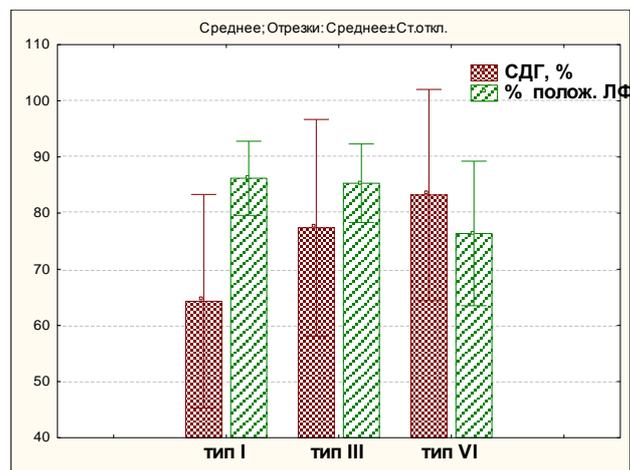
Метаболизм является основополагающим для ряда клеточных функций, в том числе регулирует дифференцировку и эффекторные функции иммунокомпетентных клеток [MacIver N.J. et al., 2013; Pearce E.L. et al., 2013; Ron-Harel N. et al., 2015; Mah A.Y. et al., 2016]. Учитывая наличие генетического дефекта, ведущего к нарушениям углеводного обмена у пациентов с ГБ, возникает вопрос о влиянии данного дефекта на энергетические процессы в лимфоцитах.

Выявлено, что у пациентов с ГБ лимфоциты имели положительную окраску на гликоген в 51% - 98% клеток (норма 2 - 30% клеток). Проведенный ROC-анализ позволил оценить уровень cut-off для пациентов, не болеющих гликогеновой болезнью, который составил 34% PAS-позитивных лимфоцитов (AUC=0,780). Выявлено достоверное увеличение процента PAS-позитивных клеток при I и III типах по сравнению с VI-IX типами ( $P_{I-VI}=0,001$ ;  $P_{III-VI}=0,004$ ).

У пациентов с ГБ показатели активности внутриклеточных ферментов в общей популяции лимфоцитов были снижены относительно группы сравнения, причем степень снижения определялась типом заболевания (рис. 8А).



А



Б

**Рис. 8. А. Активность внутриклеточных ферментов лимфоцитов у пациентов с ГБ и в группе сравнения. Б. Активность СДГ и количество лимфоцитов, содержащих гликоген, в зависимости от типа ГБ.**

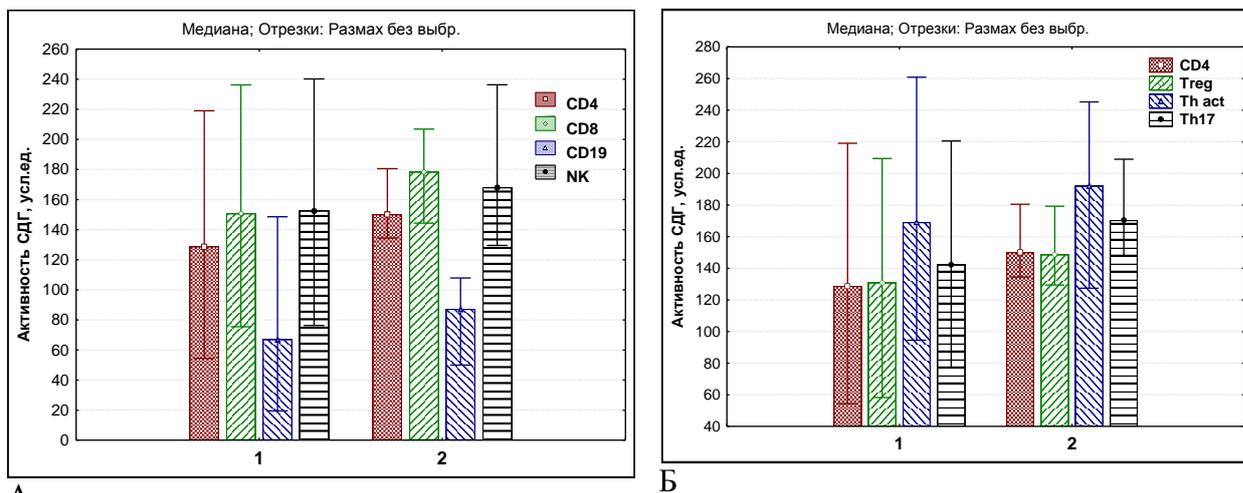
Наибольшее снижение активности ферментов выявлено при I типе ГБ: активность СДГ, в среднем, снижена на 34%, НАДН-Д - на 18%, ЛДГ - на 35%, ГФДГ - на 53% относительно группы сравнения. Наименьшие отклонения в ферментном профиле отмечены при VI-XI типах заболевания. Выявлено также, что чем больше гликогена накапливается в лимфоцитах, тем ниже активность СДГ (рис. 8Б).

Таким образом, у детей с ГБ выявлено снижение процессов энергетического обмена лимфоцитов, которое описано при других наследственных заболеваниях обмена веществ и при хронических заболеваниях печени различной этиологии [Савченко А.А. и соавт., 2011; Bushueva T. et al., 2013; Lim J. et al., 2015; Zischka H. et al., 2015; Schröder T. et al., 2016].

Анализ активности СДГ (основного фермента энергетического обмена) в основных и малых популяциях лимфоцитов показал, что популяции лимфоцитов достоверно отличаются по активности как в группе сравнения, так и в группе пациентов с ГБ. Наибольшей активностью СДГ обладают популяции цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток, затем Т-хелперы, наименьшая активность СДГ (50% от уровня в цитотоксических Т-лимфоцитах) отмечалась в популяции В-клеток (рис. 9А).

Выявленная высокая активность СДГ в цитотоксических Т-лимфоцитах согласуется с имеющимися данными о том, что цитотоксические Т-лимфоциты памяти имеют большее количество митохондрий и более высокий уровень образования АТФ, что необходимо для обеспечения быстрого иммунного ответа, по сравнению с наивными Т-клетками [van der Windt G.J., 2013]. Низкая активность СДГ в В-лимфоцитах связана, вероятно, с другим типом метаболизма в этих клетках, при котором существенная роль в производстве энергии отводится процессам гликолиза [Caro-Maldonado A., 2014; Murray P.J., 2015; Kunisawa J., 2016].

Выявлено, что в группе пациентов с ГБ активность СДГ в основных популяциях лимфоцитов была достоверно ниже, чем в группе сравнения (рис. 9А).



**Рис. 9. Показатели активности СДГ в основных популяциях лимфоцитов (А) и в популяциях Т-хелперов (Б) у пациентов с ГБ и в группе сравнения. (1 – ГБ, 2- группа сравнения).**

При этом степень снижения активности СДГ в разных популяциях имела разную выраженность и составляла: для НК-клеток - 9%, для цитотоксических Т-лимфоцитов - 16%, для Т-хелперов - 14%, для В-лимфоцитов - 23% относительно активности СДГ в соответствующих популяциях группы сравнения. У пациентов с ГБ было выявлено снижение активности СДГ во всех изученных субпопуляциях Т-хелперов. Максимальное снижение активности СДГ отмечено в популяции Th17-лимфоцитов (на 20% относительно группы сравнения), в Treg и активированных Т-хелперах активность СДГ была снижена на 14%, наименьшее снижение отмечено в Th2 – лимфоцитах (7%) (рис. 9 Б). Снижение активности СДГ в популяциях Т-хелперов может быть следствием длительной антигенной стимуляции и являться признаком истощения функциональной активности клеток у пациентов с ГБ [MacIver N.J., 2013].

Анализ активности СДГ в малых популяциях в зависимости от типа заболевания показал, что у пациентов III типа активность СДГ в Th17-лимфоцитах и в активированных Т-хелперах была достоверно выше, чем при I и VI-IX типах ГБ. Данный факт может объясняться тем, что именно при III типе ГБ наиболее часто встречаются выраженные фибротические изменения печени, в формировании которых непосредственно участвуют Th17-лимфоциты [Hammerich L., 2011].

Таким образом, нарушения углеводного обмена у пациентов с ГБ в разной степени отражаются на процессах гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах, что обусловлено особенностями метаболизма каждой субпопуляции лимфоцитов.

Маркерами тяжести состояния пациентов с ГБ традиционно служат изменения биохимических параметров. В связи с тем, что каждому типу ГБ соответствовали специфические изменения, для сравнения степени их выраженности была разработана балльная шкала (от 4 до 0), учитывающая степень отклонения 11 биохимических показателей от референсных значений (табл. 1.).

На основе балльной шкалы степень выраженности биохимических нарушений преобразована в процент отклонения от нормы (100%). Получено, что минимальные биохимические изменения (до 10% от нормы) отмечались у 22% обследованных пациентов с ГБ, умеренные изменения (от 10 до 20%) у 30% пациентов, изменения средней степени выраженности (20-30% отклонения от нормы) у 22%, 17% пациентов имели выраженные изменения (30-40%) и 9 % пациентов имели изменения в биохимических показателях более 40% от нормы.

При анализе данного показателя в зависимости от типа ГБ, было получено, что I и III типы ГБ имели достоверно более выраженные изменения в биохимических показателях, чем пациенты с VI-IX типом ( $P_{I-VI}=0,018$ ;  $P_{III-VI}=0,002$ ). Наши данные согласуются с

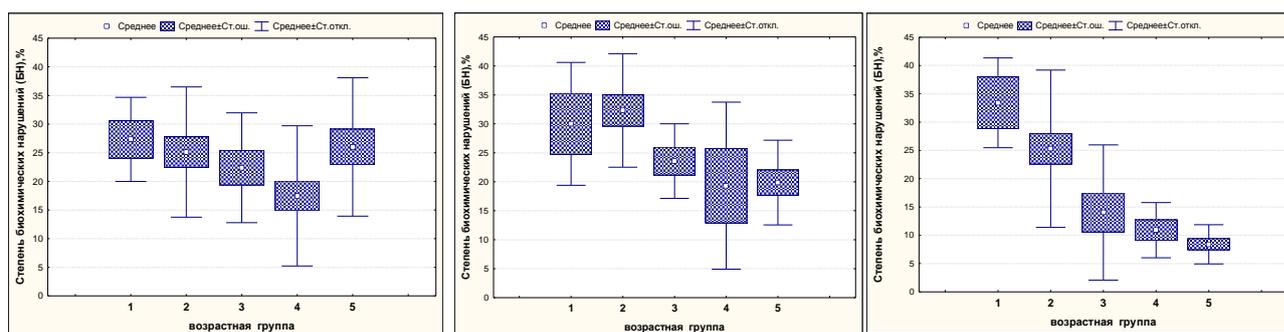
исследованиями Dai Y.J., (2009), но отличаются от ранних публикаций, описывающих более легкое по сравнению с I типом течение III типа ГБ [Coleman R.A., 1992].

Таблица 1.

Бальная шкала оценки изменений биохимических показателей у пациентов с ГБ

Баллы	4	3	2	1	0
Показатель					
АЛТ, Ед/л	[0;40]	[41;120]	[121;200]	[201;280]	>200
АСТ, Ед/л	[0;42]	[43;126]	[127;210]	[211;294]	>294
Коэф. де Ритиса	[1,73;1,83 ]	[1,3;1,72] [1,84;2,27]	[0,88;1,3] [2,28;2,73]	[0,09;0,87] [2,74;3,57]	<0,09 >3,57
Глюкоза, ммоль/л	[3,5;5,5]	[3,0;3,4] [5,6;6,0]	[2,5;2,9] [6,1;6,5]	[2,0;2,4] [6,6;7,0]	<2,0 >7,0
Лактат, ммоль/л	[0;2,2]	[2,3;4,4]	[4,5;6,6]	[6,7;8,8]	>8,8
ГГТ, Ед/л	[0;35]	[36;70]	[71;105]	[106;140]	>140
ЛДГ сыв, Ед/л	[0;225]	[226;450]	[451;675]	[676;800]	>800
Холестерин, ммоль/л	[0;5,2]	[5,3;10,4]	[10,4;15,6]	[15,7;20,9]	>20,9
ТГ, ммоль/л	[0;1,6]	[1,7;4,8]	[4,9;8,0]	[8,1;11,2]	>11,2
ВЕ, ммоль/л	[-2,0;2,0]	[-6,0;-2,1] [2,1;6,0]	[-10,0;-6,1] [6,1;10,0]	[-14,0;-10,1] [10,1;14,0]	<-14,0 >14,0
КФК, Ед/л	[0;150]	[151;450]	[451;750]	[751;1200]	>1200

Анализ возрастной динамики биохимических нарушений у пациентов с разными типами ГБ показал, что у пациентов I типа этот показатель не зависит от возраста (рис. 10). При III типе степень биохимических нарушений уменьшается с возрастом, но в среднем остается на уровне умеренных биохимических нарушений (20% и выше). При VI-IX типом с возрастом выраженность биохимических нарушений уменьшается и достигает уровня минимальных изменений (в среднем, до 10%) к подростковому возрасту, что согласуется с уменьшением клинической симптоматики у пациентов данного типа [Сурков А.Н., 2014, Баранов А.А., 2015].



Тип I (R = -0,10)

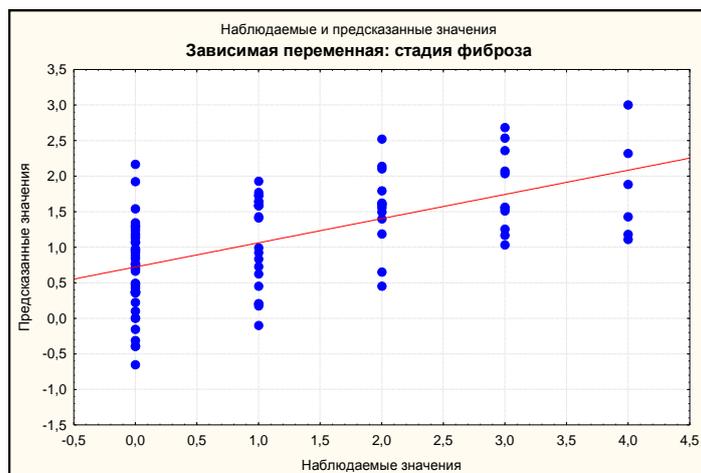
Тип III (R = -0,48)

Тип VI-IX (R = -0,57)

Рис. 10. Возрастная динамика биохимических нарушений (%) в зависимости от типа ГБ.

Множественный корреляционный анализ выявил зависимость степени биохимических нарушений от иммунологических параметров: большее количество Th17-лимфоцитов и более низкая активность СДГ в общей популяции Т-лимфоцитов соответствовали большей степени биохимических нарушений ( $R_{mn}=0,69$ ). Показано также, что стадия фиброза печени у пациентов с ГБ была тем выше, чем больше было количество PAS-позитивных лимфоцитов, существеннее биохимические нарушения и чем меньше была активность СДГ в лимфоцитах ( $R_{mn}=0,68$ ).

Установлена корреляция между степенью фиброза печени и количеством активированных Т-хелперов, возрастом и активностью СДГ в общей популяции лимфоцитов: чем больше было активированных клеток и ниже активность СДГ, тем выше была стадия фиброза (рис.11).



Уравнение множественной регрессии: Зависимая переменная: стадия фиброза печени		
Переменная	Коэф. регр	P
Св.член	0,98	0,20
Таст (% CD4)	0,06	0,02
возраст	0,11	0,00
Активность СДГ	-0,09	0,03

Рис. 11. Зависимость между степенью фиброза и иммунологическими и цитохимическими показателями ( $R_{\text{мн.}}=0,6$ )

Применение множественного регрессионного анализа позволило выявить наиболее информативное сочетание признаков для разделения пациентов с разными типами ГБ. С помощью ROC-анализа были рассчитаны пороговые значения для каждого лабораторного показателя. На основании установленных различий в метаболической активности лимфоцитов, в клиническом и биохимическом анализе крови построен пошаговый алгоритм определения I, III и VI типов ГБ (рис.12).

шаг	I тип	III тип	VI – IX тип
Шаг 1	Ras-лф > 84% НФ < $1,3 \cdot 10^9$ /л КФК < 125 Ед/л	КФК > 125 Ед/л ЛДГс > 267 Ед/л Ras-лф > 84%	ЛДГс > 230 Ед/л Ras-лф < 84%
% совпадений	38%, 100% - Ib тип	44%	47%
Шаг 2	Лактат > 2,98 моль/л ЛДГс < 267 Ед/л СДГ < 769 / Ras-лф > 84%	ТГ < 2,82 ЛДГс > 267 Ед/л Лактат < 2,98 моль/л Ras-лф > 84%/СДГ > 769 у.е.	НФ > $2,92 \cdot 10^9$ /л Ras-лф < 84%
% совпадений	89%	72%	67%
Шаг 3	ТГ > 2,82 ммоль/л ЛДГс < 267 Ед/л Ras-лф > 84%	СДГ > 769 у.е. Лактат < 2,98 моль/л НФ < $2,92 \cdot 10^9$ /л	СДГ > 725 у.е. Лактат < 3 моль/л НФ > $2,92 \cdot 10^9$ /л ЛДГс < 274 Ед/л
% совпадений	<b>100%</b>	<b>88%</b>	<b>86%</b>

Рис. 12. Алгоритм пошаговой диагностики типа гликогеновой болезни на основе определения метаболической активности лимфоцитов, показателей клинического и биохимического анализов крови.

Применение разработанного алгоритма на изученной выборке выявило совпадение с результатами молекулярно-генетического исследования при VI-IX типах в 86% случаев, при III типе в 88% и при I типе в 100% случаев.

## Выводы

1. Абсолютное количество лимфоцитов у детей с гликогеновой болезнью достоверно повышено относительно группы сравнения во всех возрастных группах. Возрастная динамика показателей клеточного иммунитета характеризуется повышением относительного количества Т-хелперов и снижением цитотоксических Т-лимфоцитов, в составе Т-хелперов увеличивается доля активированных клеток, отмечается существенное нарастание соотношения Th17/Treg за счет популяции Th17-лимфоцитов.
2. Абсолютное и относительное количество В-лимфоцитов у пациентов с гликогеновой болезнью соответствует возрастным нормам, при этом в группе пациентов старше 12 лет отмечается повышение доли В1-популяции до 40% ( $p < 0,05$ ). Отмечено повышение иммуноглобулинов класса G (IgG) у 25% пациентов, IgA - у 32%, IgM - у 10% пациентов, у остальных пациентов уровень иммуноглобулинов соответствует возрастным референсным значениям.
3. Каждому типу гликогеновой болезни соответствуют определенные изменения иммунного статуса, наиболее выраженные для I типа и наименее - для VI-IX типов. Для Ia типа характерно повышение абсолютного количества В-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов при снижении НК-клеток, для Ib типа – снижение количества В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов, для III и VI-IX типов - повышение количества Т-хелперов. Повышенный уровень иммуноглобулинов классов G и A чаще отмечался у пациентов I типа гликогеновой болезни.
4. У пациентов с гликогеновой болезнью выявлен повышенный уровень циркулирующих цитокинов (IL-2, IL-8, IL-5, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), зависящий от стадии фиброза печени и типа гликогеновой болезни. При отсутствии фиброза печени концентрация TGF- $\beta$ 1 была снижена при всех типах гликогеновой болезни и динамически нарастала к стадии F2 с последующим снижением к стадии F4. Снижение уровня TGF- $\beta$ 1 менее 20,3 пкг/л свидетельствует о переходе стадии фиброза F2 в стадию F3 (ДЧ=75%, ДС= 72%,  $p < 0,05$ ).
5. Метаболизм лимфоцитов у пациентов с гликогеновой болезнью характеризуется сниженной активностью дегидрогеназ лимфоцитов при повышенном количестве Pas-позитивных лимфоцитов и определяется типом гликогеновой болезни. Наибольшее снижение активности ферментов (СДГ на 34%, НАДН-Д на 18%, ГФДГ на 53%, ЛДГ на 35%) и максимальное количество Pas-позитивных лимфоцитов (87%) выявлено при I типе гликогеновой болезни.
6. Популяции лимфоцитов отличаются по активности СДГ как в группе сравнения, так и у пациентов с гликогеновой болезнью: наибольшая активность выявляется в цитотоксических Т-лимфоцитах и НК-клетках, наименьшая в В-лимфоцитах. У пациентов с гликогеновой болезнью вне зависимости от типа заболевания выявлено снижение активности СДГ в Т-хелперах на 14%, в цитотоксических Т-лимфоцитах на 16%, в В-лимфоцитах на 23% и в НК-клетках на 9% относительно группы сравнения. Активность СДГ в популяциях Th17-лимфоцитов и в активированных Т-хелперах достоверно ниже при I и VI-IX типах, чем при III типе заболевания.
7. При гликогеновой болезни нарастание степени биохимических нарушений сопровождается увеличением количества Th17-лимфоцитов и снижением активности СДГ в общей популяции лимфоцитов. Выраженные биохимические нарушения, сниженная активность СДГ в лимфоцитах, увеличение количества Pas-позитивных лимфоцитов отражают прогрессирование фибротических изменений печени.
8. Алгоритм дифференциальной диагностики типа печеночных форм гликогеновой болезни, основанный на показателях клинического и биохимического анализа крови и определения метаболической активности лимфоцитов, позволяет с вероятностью 86% определять VI-IX типы заболевания, с вероятностью 88% - III тип и с вероятностью 100% - I тип гликогеновой болезни.

## Практические рекомендации

1. При наличии клинических симптомов заболевания показано определение количества Ras-позитивных лимфоцитов в мазке периферической крови для подтверждения диагноза «гликогеновая болезнь».
2. С целью мониторинга степени активности воспалительного процесса в печени у пациентов с гликогеновой болезнью рекомендуется проводить иммунофенотипирование лимфоцитов с определением уровня Th17-лимфоцитов и активированных Т-хелперов не реже 1 раза в год или чаще – по показаниям.
3. При наличии у пациента фибротических изменений печени необходимо регулярное определение концентрации TGF- $\beta$ 1 и при выявлении уровня цитокина ниже 20,3 пкг/л рекомендовано проведение комплексного лабораторного и инструментального обследования с целью своевременной коррекции тактики лечения
4. В качестве дополнительных критериев оценки степени тяжести пациентов с гликогеновой болезнью и эффективности проводимой терапии рекомендуется использовать показатели активности внутриклеточных ферментов лимфоцитов наряду с анализом степени изменений биохимических показателей сыворотки крови.
5. Для верификации различных типов гликогеновой болезни у детей рекомендуется использование предложенного алгоритма, который позволит ускорить и повысить качество диагностики данной нозологии.

## Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Для поиска возможных иммунологических и метаболических предикторов формирования клинических осложнений необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами с гликогеновой болезнью в возрасте старше 18 лет.
2. Для изучения патогенетических механизмов формирования иммунных нарушений у пациентов с гликогеновой болезнью перспективно исследование ферментов белкового и жирового обмена в разных популяциях лимфоцитов.
3. Для улучшения верификации стадии фиброза печени у детей необходим поиск новых сывороточных маркеров фиброзирования.
4. Изучение возможности фармакологической коррекции выявленных иммунологических и метаболических нарушений у пациентов с гликогеновой болезнью.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Kurbatova, O. Lymphocytes intercellular enzymes activity in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, A. Surkov, S. Polyakova, L. Miroshkina, G. Semenova, I. Samokhina, T. Izmaylova, E. Kapustina, Z. Dukhova, R. Zakirov, E. Freidlin, S. Petrichuk // J. of Inherited Metabolic Disease.- 2013. - №36S.2. - P. 226
2. Мирошкина, Л.В., Проточная энзимология – новые технологии цитохимических исследований в педиатрии / Л.В. Мирошкина, Т.Д. Измайлова, Р.Ш. Закиров, О.В. Курбатова, Е.Ю. Капустина, С.В. Петричук // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013. - №9. - С.53
3. Kurbatova, O., Functional activity of lymphocytes mitochondria in children with genetically diagnosed glycogen storage disease of type I / O. Kurbatova, A. Surkov, S. Polyakova, L. Miroshkina, T. Izmaylova, I. Samokhina, E. Kapustina, K. Savostyanov, A. Pushkov, S. Petrichuk // European Journal of Human Genetics. – 2014. -№22S.1. - P.418.
4. Kurbatova, O., Lymphocytes intercellular dehydrogenases activity in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, A. Surkov, S. Polyakova, L. Miroshkina, Izmaylova T., G. Semenova I. Samokhina, E. Kapustina, Z. Dukhova, R. Zakirov, E. Freidlin, S. Petrichuk // JPGN.- 2014. - 2014.- P.130.
5. Курбатова, О.В., Особенности метаболизма лимфоцитов детей с генетически подтвержденным I типом гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, С.И. Полякова, А.Н.

Сурков, Г.Ф. Семенова, Л.В. Мирошкина, Т.Д. Измайлова, И.В. Самохина, Е.Ю. Капустина, З.Н. Духова, Р.Ш. Закиров, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Е.В. Фрейдлин, С.В. Петричук // Молекулярная диагностика.- 2014.- Т2.- С.190-191.

6. Kurbatova, O., Features of mitochondrial dysfunction in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, V. Sukhorukov, A. Surkov, S. Polyakova, L. Miroshkina, T. Izmaylova, G. Semenova, I. Samokhina, E. Kapustina, Z. Dukhova, R. Zakirov, E. Freidlin, S. Petrichuk // Abstract book EUROMIT International meeting on mitochondrial pathology. - 2014. - P.230.

7. Kurbatova, O., Diagnostic value of activity mitochondrial enzymes activity in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, A. Surkov, L. Miroshkina, S. Polyakova, T. Izmaylova, G. Semenova, I. Samokhina, E. Kapustina, R. Zakirov, S. Petrichuk // FEBS Journal. - 2014. - Vol.281, Sup.1.- P. 347.

8. Kurbatova, O., Cellular immunity characteristics and succinate dehydrogenase activity in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, L. Miroshkina, A. Surkov, S. Polyakova, T. Izmaylova, G. Semenova, I. Samokhina, E. Kapustina, Z. Dukhova, R. Zakirov, E. Freidlin, S. Petrichuk // J. of Inherited Metabolic Disease. – 2014. - Vol. 37(S.1)- P. 103.

9. Курбатова, О.В. Митохондриальная активность лимфоцитов у детей с подтвержденными молекулярно-генетическими исследованиями формами гликогеновой болезни I типа / О.В. Курбатова, Т.Д. Измайлова, А.Н. Сурков, С.И. Полякова, С.В. Петричук, Л.В. Мирошкина, Г.Ф. Семёнова, И.В. Самохина, Е.Ю. Капустина, З.Н. Духова // Вопросы современной педиатрии. -2014. -Т. 13. № S1. - С. 177.

10. Курбатова, О.В. Особенности Т-клеточного звена иммунитета у детей с гликогеновой болезнью / О.В. Курбатова, Л.В. Мирошкина, А.Н. Сурков, С.И. Полякова, Т.Д. Измайлова, Г.Ф. Семенова, И.В. Самохина, Е.Ю. Капустина, З.Н. Духова, А.С. Потапов, С.В. Петричук // Российский иммунологический журнал. – 2014. - №3-4. - С.331-334.

11. Измайлова, Т.Д. Проточная цитоэнзимометрия - новые технологии цитохимических исследований в клинической иммунологии / Измайлова Т.Д., Курбатова О.В., Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Писарева И.В., Капустина Е.Ю., Семенова Г.Ф., Духова З.Н. // Сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием. Ташкент. - 2014.- С.273-275

12. Курбатова, О.В., Митохондриальная дисфункция у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, Т.Д. Измайлова, А.Н. Сурков, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Полякова, Л.В. Мирошкина, Г.Ф. Семёнова, И.В. Самохина, Е.Ю.Капустина, З.Н. Духова, А.С. Потапов, С.В. Петричук // Вестник РАМН.- 2014. - № 7–8. - С.78-84.

13. Курбатова, О.В., Особенности функционирования НК-клеток у пациентов с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, С.И. Полякова, Л.В. Мирошкина, И.В. Самохина, Г.Ф. Семенова, З.Н. Духова, С.В. Петричук // Вопросы современной педиатрии. - 2015.- Т. 14. № S1. - С. 118.

14. Kurbatova, O. Activity of succinate dehydrogenase in T-lymphocytes subsets in children with genetically diagnosed glycogen storage disease type I / O. Kurbatova, R. Zakirov, L. Miroshkina, A. Surkov, S. Polyakova, I. Samokhina, G. Semenova, V. Sukhorukov, S. Petrichuk // FEBS Journal. – 2015. – Vol. 282 S.1.- P.122.

15. Курбатова, О.В., Гуморальный иммунитет у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, Р.Ш. Закиров, С.И. Полякова, Л.В. Мирошкина, И.В. Самохина, Т.Д. Измайлова, Г.Ф. Семенова, А.В. Никитин, Е.В. Фрейдлин, О.С. Мельничук, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук // Российский иммунологический журнал.- 2015. –Т.9 (18). - С.273-275.

16. Kurbatova, O., T-cell immunity in children with hepatic form of glycogen storage disease / O. Kurbatova, L. Miroshkina, A. Surkov, S. Polyakova, G. Semenova, I. Samokhina, Z. Dukhova, E. Freidlin, S. Petrichuk // JPGN. - 2015. – Vol. 60(S.1). - P.305.

17. Курбатова, О.В., Особенности иммунного статуса и активность сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов у детей с гликогеновой болезнью печеночных форм / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, Р.Ш. Закиров, С.И. Полякова, И.В. Самохина, Г.Ф. Семенова, Л.В. Мирошкина, Т.Д. Измайлова, С.В. Петричук // Медицинская иммунология. - 2015.- Том 17 № 3.- С.237.

18. Kurbatova, O.V. Features of functioning of humoral immunity in children with hepatic form of glycogen storage disease (GSD) / O.V. Kurbatova, T.V. Bushueva, A.N. Surkov, R.S. Zakirov, S.I. Polyakova, L.V. Miroshkina, I.V. Samokhina, T.D. Izmailova, G.F. Semenova, A.V. Nikitin, E.V. Freidlin, O.S. Melnichuk, E.L. Semikina, S.V. Petrichuk // J. of Inherited Metabolic Disease. - 2015.-Vol.38 (S.1). - P.173.

19. Kurbatova, O. Activity of succinate dehydrogenase in lymphocytes subsets in children with genetically diagnosed glycogen storage disease type I / O. Kurbatova, V. Sukhorukov, L. Miroshkina, A. Surkov, S. Polyakova, I. Samokhina, T. Izmaylova, G. Semenova, R. Zakirov, S. Petrichuk // ISAM.- 2015. - P.85

20. Kurbatova, O., The method of estimation of succinate dehydrogenase activity by using a flow cytometer / O. Kurbatova, R. Zakirov, T. Izmailova, T. Radygina, T. Erlich, I. Samokhina, L. Miroshkina, E. Freidlin, S. Petrichuk // Journal of World Mitochondria Society.- 2015.- Vol.1(1). - P.186.

21. Kurbatova, O., Energy metabolism in children with hepatic form glycogen storage disease / O. Kurbatova, A. Surkov, S. Polyakova, T. Izmailova, G. Semenova, I. Samokhina, R. Zakirov, E. Freidlin, S. Petrichuk // JWMS. - 2015. - Vol.1(1). - P.137

22. Курбатова, О.В., Возрастная динамика популяций В-клеток у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, Р.Ш. Закиров, Л.В. Мирошкина, А.В. Никитин, Е.В. Фрейдлин, О.С. Мельничук, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук // Лаборатория.-2016. - №1. -С.28-29

23. Курбатова, О.В., Особенности функционирования В-клеточного звена иммунитета у детей с гликогеновой болезнью печеночных форм / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, Л.В. Мирошкина, А.В. Никитин, С.В. Петричук // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2015. - № 3-4. - С. М10.

24. Курбатова, О.В., Цитокиновый профиль у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, Р.Ш. Закиров, А.Н. Сурков, А.В. Никитин, И.В. Самохина, Е.В. Фрейдлин, А.С. Потапов, С.В. Петричук // Российский иммунологический журнал.- 2016. - том 10 (19), № 2 (1). - С.131-133.

25. Курбатова, О.В. Уровень сывороточных цитокинов при различных стадиях фиброза печени у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, Р.Ш. Закиров, А.Н. Сурков, А.В. Никитин, И.В. Самохина, Е.В. Фрейдлин, А.С. Потапов, С.В. Петричук // Клиническая лабораторная диагностика.- 2016.- № 61(9).- С.537.

26. Курбатова, О.В., Возрастная динамика показателей иммунного статуса и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов у детей с печеночными формами гликогеновой болезни / О.В. Курбатова, А.Н. Сурков, И.В. Самохина, Р.Ш. Закиров, А.С. Потапов, С.В. Петричук // Медицинский алфавит. - 2017.- №6 том №1. - С.42-50.

### Список сокращений

АЛТ - аланинаминотрансфераза	СДГ - сукцинатдегидрогеназа
АСТ - аспартатаминотрансфераза	ТГ - триглицериды
БН - биохимические нарушения	ЩФ - щелочная фосфатаза
ГБ - гликогеновая болезнь	ВЕ- дефицит оснований
ГГТ - гамма-глутамилтрансфераза	IFN - интерферон
ГФДГ- глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	Ig - иммуноглобулин
ДС - диагностическая специфичность	IL - интерлейкин
ДЧ - диагностическая чувствительность	НК - натуральные киллеры
КФК - креатинфосфокиназа	Рас-лф - лимфоциты, содержащие гликоген
ЛДГ - лактатдегидрогеназа внутриклеточная	Тact - активированные Т-хелперы
ЛДГс - лактатдегидрогеназа сывороточная	TGF-β - трансформирующий фактор роста -β
НАДН-Д - никотинамидаденин дегидрогеназа	TNF - фактор некроза опухоли
НФ - количество нейтрофилов	Treg - регуляторные Т-лимфоциты