

Т.И. Долгих, Ю.И. Тирская, С.В. Барinov, Т.Н. Белкова

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ПЛОДА

Омская государственная медицинская академия (Омск)

В результате проведенных исследований установлена значимость иммунологических критериев для прогноза внутриутробной инфекции. Проведено сравнительное исследование показателей иммунной и цитокиновой системы у женщин группы риска развития внутриутробной инфекции (ВУИ). Показано, что реализация ВУИ сопровождается повышением содержания провоспалительных цитокинов в крови матери и активацией фагоцитарного звена. С учетом полученных результатов составлен алгоритм ведения женщин группы риска.

Ключевые слова: внутриутробная инфекция, цитокины, факторы риска

IMMUNOLOGIC MARKER OF INTRANATAL INFECTIONS

T.I. Dolgikh, Yu.I. Tirskaia, S.V. Barinov, T.N. Belkova

Omsk State Medical Academy, Omsk

The results of the research established determination of immunologic marker for prognosis of intranatal infection. The authors performed a comparative study of the immunity values of women in a risk group for prenatal infection. As it was shown when prenatal infection develops, there is an increase in the content of proinflammatory cytokines in the pregnant woman serum and activation of the ingestion rate. Account the results to devise an algorithm the pregnant woman care.

Key words: prenatal infection, cytokines, risk factor

В России подтвержденная частота перинатальной смертности в результате инфекционно-воспалительных процессов составляет около 10,1 %, уступая только внутриутробной асфиксии и врожденным аномалиям. Новорожденные с клиническими проявлениями инфекции требуют дорогостоящей терапии и последующей реабилитации, которая полностью не исключает хронизации процесса и даже полной инвалидизации ребенка.

В связи с большой распространенностью и возможными тяжелыми клиническими последствиями ВУИ особое значение приобретает разработка методов прогнозирования и диагностики внутриутробного инфицирования плода. Сложность проблемы прогноза и антенатальной диагностики ВУИ обусловлена как широким набором микроорганизмов, способных вызвать ВУИ, так и малой клинической выраженностью инфекционных процессов [1, 2].

Цель исследования: изучить иммунологические критерии внутриутробного инфицирования у беременных группы риска, плода и новорожденного.

Работа выполнялась в рамках темы Минздравсоцразвития России «Изучение инфекционной перинатальной патологии» (Приказ от 20.05.2009 г. № 257).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое, когортное, проспективное, продленное, контролируемое исследование пар мать-новорожденный группы риска ВУИ. Обследование матерей осуществлялось с 22 недель гестации.

Определение ДНК потенциальных возбудителей: Herpes simplex virus 1/2 (HSV-1 и 2),

Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus, (EBV), Human herpes virus-6 (HHV-6), Toxoplasma gondii (T. gondii) — проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наборах «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В».

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови изучали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» «Вектор-Бест» (Новосибирская обл.).

Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA-6», стандартных математических таблиц «Microsoft Excel» и авторской программы для ЭВМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обследование беременных группы риска по ВУИ осуществлялось с 22 недель гестации. Отбор беременных осуществлялся по данным анамнеза (септические осложнения аборт и родов, неразвивающаяся беременность, рождение детей с ВУИ, преждевременные роды, перинатальные потери); на основании данных об осложнениях данной беременности (вирусно-бактериальная инфекция, герпесвирусные инфекции в стадии активации и первичное инфицирование, проявление инфекционной патологии репродуктивного тракта, респираторно-вирусные заболевания); при наличии очагов экстрагенитальной инфекции; а так же на основании наличия ультразвуковых маркеров ВУИ (задержка развития плода, нарушение плодово-плацентарного кровотока, многоводие/маловодие, пиелоктазия у плода, утолщение плаценты, взвесь в околоплодных водах). Проводилось оценка клеточного звена иммунитета, исследовался уровень провоспалительных и противовоспалитель-

ных цитокинов, осуществлялась этиологическая расшифровка [7].

После рождения, на первые сутки, проводилось дообследование новорожденных, по результатам которого проводилось распределение на детей на группы и ретроспективная оценка результатов обследования матерей.

Внутриутробное инфицирование было установлено у 42 % детей (основная группа), из которых в 12 % на основании наличия клинических симптомов был выставлен диагноз ВУИ, а у остальных подтвержден факт внутриутробного инфицирования без клинических проявлений болезни. В зависимости от наличия (отсутствия) клинических проявлений детей распределили на две группы: основная группа — дети с ВУИ; группа сравнения — дети с инфицированием, без клинических проявлений ВУИ.

В контрольную группу были включены 18 здоровых беременных женщин с нормально протекающей беременностью и их новорожденные, обследование проводилось на тех же сроках, что и пациенток основной группы и группы сравнения.

В группе новорожденных с диагнозом ВУИ преждевременно родились 76,47 % детей (средний срок гестации составил $31 \pm 3,4$ недели). При этом в 76 % случаев причиной преждевременных родов явилось дородовое излитие околоплодных вод, в 11 % развилась спонтанная родовая деятельность, не поддающаяся медикаментозной коррекции, и в оставшихся случаях досрочно было проведено оперативное родоразрешение. Среди показаний к оперативному родоразрешению преобладала острая гипоксия плода (23 %). В анамнезе течения беременности у данной подгруппы пациенток отмечено проведение неоднократных курсов сохраняющей терапии. У каждого второго ребенка диагностировали тяжелую или средней степени тяжести асфиксию, при этом ее частота у доношенных была в 3 раза выше по сравнению с доношенными ($p = 0,000$).

В группе с гематогенным вариантом инфицирования у 23,53 % новорожденных отмечалась клиника поражения ЦНС в виде менингоэнцефалита и органического поражения головного мозга. При этиологической расшифровке из крови и/или ликвора была детектирована ДНК следующих патогенов: EBV — в 50 % случаев; HSV 1, 2 типа — в 6,25 %; HHV-6 — в 12,5; CMV — в 6,25 % случаев. Частота микст-инфекции при различных ассоциациях возбудителей составила 12,5 %. При герпес-вирусной инфекции отмечалось более раннее начало заболевания — на 5–7-й день жизни, острое течение с повышением температуры тела, гипертензионным синдромом, нарушением микроциркуляции, гепатолиенальным синдромом, без специфических высыпаний на коже и слизистых, в ряде случаев с поражением кишечника в виде некротизирующего энтероколита. При исследовании ликвора определялся сегментоядерный цитоз со сменой на лимфоцитарный на фоне специфической терапии. При стандартном бактериологическом исследовании

ликвора во всех случаях получен отрицательный результат [4].

При восходящем варианте инфицирования выявлялись следующие возбудители: уреаплазменная инфекция — в 57,14 %; *E. coli* — в 14,2 %; *E. faecalis* — в 7,14 %; *E. faecium* — в 28,5 %; *Klebsiella* — в 21,4 %; *Staph. pyogenus* — в 7,14 %; *Strep. mutans* — в 14,2 %; коагулазонегативные стафилококки — в 14,2 %. Частота микст-инфекции при различных ассоциациях возбудителей составила 28,57 %. В случаях восходящего инфицирования клинические проявления пневмонии зарегистрированы в 17,6 %, энтероколита в 11,8 %; поражения кожи и слизистых оболочек, такие как омфалит, конъюнктивит, везикулез различной степени выраженности встречались в 70,6 % случаев. У 29,4 % новорожденных имелось сочетание нескольких инфекционных очагов. Необходимо отметить, что при подтверждении восходящего пути инфицирования у всех матерей в той или иной степени выявлялись нарушения видового состава вагинальной микрофлоры на момент данной беременности и в анамнезе женщины отмечали неоднократные курсы лечения воспалительных заболеваний нижнего отдела репродуктивной системы [4].

Результаты проведенного исследования клеточного звена иммунитета беременных представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о повышении ($p = 0,001$) лимфоцитов с фенотипом CD3 + CD16 + /CD56 + (Т-NK), CD3 + /CD4 + и снижение CD3 + /CD8 + в группе пациенток родивших детей с ВУИ, по остальным показателям достоверных различий между группами выявлено не было. При этом отмечается более высокий уровень Т-NK клеток у женщин с гематогенным вариантом инфицирования (табл. 2).

Результаты исследования уровня цитокинов (TNF и интерлейкинов (IL): IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) представлены в табл. 1.

Уровень IL-1 β был в 15 раз выше в основной группе ($p = 1e^{-04}$) по сравнению с контрольной и в 11 раз выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Активность TNF α в группе сравнения была в 12 раз ниже по сравнению ($p = 1e^{-04}$) с пациентками в основной группе, родивших детей с ВУИ. При анализе уровня IL-10 отмечается ($p = 1e^{-04}$) снижение его количества у беременных основной группы по сравнению с группой контроля и группой сравнения. Особого внимания заслуживают результаты, полученные при исследовании уровня ИФН- γ (табл. 1). У женщин основной группы, родивших детей с ВУИ уровень ИФН- γ как спонтанного ($p = 0,002$) так и стимулированного ($p = 0,022$) был значительно ниже, чем в группе сравнения и контроля.

При оценке состояния цитокиновой системы у пациенток с различными вариантами реализации перехода возбудителей к плоду отмечено существенно повышение значения провоспалительных цитокинов в группе с гематогенным типом инфицирования в отличие от восходящего (табл. 2). Так уровень IL-1 β в группе с гематогенным инфицированием был в 2 раза ($p = 1e^{-04}$) выше по сравнению

Таблица 1

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов и уровень цитокинов периферической крови беременных (Me(Q₁;Q₂))

Показатели	Контрольная группа (n = 18)	Группа сравнения (n = 52)	Основная группа (n = 35)
CD3+	68,0 (60,5; 76,5)	68,2 (54,6; 74,4)	66,8 (59,8; 73,8)
CD3+/CD4+	30,6 (28,8; 34,7)	31,03 (25,5; 33,6)	34,01 (30,2; 40,1)*
CD3+/CD8+	31,6 (30,0; 37,0)	32,4 (27,6; 36,8)	28,4 (24,8; 31,5)*
CD19+/CD20+	12,5 (9,18; 15,3)	10,6 (9,22; 12,6)	11,2 (6,0; 15,5)
CD3+CD16+/ CD56+	8,85 (6,5; 11,7)	8,4 (6,5; 12,5)	12,2 (9,83; 17,2)*
CD5+/CD19+	1,05 (0,25; 1,4)	1,1 (0,1; 2,1)	1,1 (0,25; 2,35)
T-лимф. HLA-DR	6,8 (6,2; 12,5)	9,45 (5,2; 11,9)	6,45 (5,0; 10,2)
CD14+/HLA-DR+	81,6 (80,1; 85,4)	84,9 (76,8; 90,8)	81,5 (77,3; 89,9)
ИНФγ спонтан.	114 (75,7; 181)	71,85 (51,6; 125,4)	10,92 (3,08; 16,9)*
ИНФγ стимул.	1640 (1540; 1700)	1374,6(1030,2; 1660,1)	1130,4 (902; 1550)*
IL-1β	6,12 (2,3; 8,5)	8,38 (6,82; 12,35)	91,26 (74,1; 111,6)*
IL-6	3,2 (1,1; 8)	13,6 (7,17; 24,1)	12,4 (4,3; 32,2)
IL-8	18,4 (5,58; 35,1)	58,3 (26,4; 108)	50,3 (7; 122)
IL-10	26,2 (12,4; 38,6)	15,52 (12,5; 20,5)	4,19 (3,1; 4,95)*
TNFα	4,1 (1,35; 14,6)	6,8 (2,2; 8,85)	80,83 (61,6; 72,7)*

Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой и группой сравнения. Me – медиана, Q₁ – нижний квартиль, Q₂ – верхний квартиль.

Таблица 2

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов и уровень цитокинов периферической крови беременных родивших детей с ВУИ

Показатели	Гематогенное (n = 16)	Восходящее (n = 14)	Смешанное (n = 5)
CD3+	69,6 (65,49÷73,64)	63,3 (57,49÷69,09)	67,0 (53,12÷80,89)
CD3+/CD4+	36,8 (31,82÷41,69)	31,0 (27,69÷34,22)	33,8 (23,75÷43,81)
CD3+/CD8+	27,5 (24,12÷30,79)	28,8 (24,01÷33,68)	30,5 (26,37÷34,63)
CD19+/CD20+	11,5 (8,7÷14,31)	9,7 (6,92÷12,48)	13,7 (7,41÷20,08)
CD5+/CD19+	1,48 (0,84÷2,11)	2,93 (1,25÷6,11)	0,92 (0,49÷2,33)
HLA-DR+	7,21 (4,69÷9,71)	9,3 (5,67÷12,94)	5,61 (2,99÷8,23)
ИРИ	2,23 (1,0÷3,25)	1,11 (0,85÷1,32)	1,11 (0,79÷1,43)
CD3+CD16+/CD56+	15,82* (8,21÷17,42)	11,18 (9,11÷13,23)	12,67 (9,03÷14,41)
ИНФγ спонтан.	7,04 (3,01÷9,51)	12,3 (7,25÷17,36)	19,7 (5,15÷26,23)
ИНФγ стимулир.	1060,0(820,5÷1307,23)	1300 (1030÷1590)	1050 (576,64÷1521,81)
IL-1β	122 (95,32÷149,48)	59,5* (44,06÷74,92)	80,6* (58,61÷102,51)
IL-6	29 (17,51÷40,58)	9,29* (3,73÷14,84)	19,6* (1,16÷40,28)
IL-8	97,4 (47,46÷147,26)	51,5* (28,09÷74,92)	53,5* (18,24÷125,16)
IL-10	3,99 (1,05÷6,48)	5,52 (3,25÷9,05)	1,14 (0,7÷4,2)
TNFα	84,0 (41,9÷144,48)	87,2 (46,9÷72,8)	52,9* (34,84÷71,04)
Лактоферрин	1230 (894,64÷1557,58)	1290 (891,2÷1698,5)	1690 (513÷3190)
CD14+/HLA-DR+	81,3 (75,46÷87,18)	85,9 (82,16÷89,65)	77,6 (65,34÷89,78)
Признак: ВУИ: гематогенное/восходящее ИЛ-1β $p = 1e-04$ ИЛ-6 $p = 0,005$ ИЛ-8 $p = 0,003$ CD3+CD16+56+ $p = 0,0019$		Признак: ВУИ: гематогенное/смешанное ИЛ-1β $p = 0,011$ ИЛ-6 $p = 0,001$ ИЛ-8 $p = 0,043$ ФНО $p = 0,004$	

уровнем данного показателя в группе с восходящим вариантом инфицирования. Та же закономерность присутствует при анализе уровней IL-6 и IL-8. В груп-

пе с гематогенным вариантом инфицирования показатели IL-6 в 3 раза выше ($p = 0,005$), чем при восходящем пути инфицирования. IL-8 при гематогенном

инфицировании почти в 2 раза выше ($p = 0,003$) чем при восходящем. В тоже время при смешанном типе инфицирования плода уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) был в среднем в 1,5 раза ниже, чем при гематогенном, но значимо ($p < 0,05$) превышал аналогичные показатели при восходящем пути инфицирования. Возможно, это связано с недостаточностью иммунного ответа при сочетанной инфекции. Уровни ИФН γ , лактоферина, IL-10, существенного различия не имели в зависимости от типа внутриутробного инфицирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало повышение CD3 + CD16 + / CD56 + (T-NK) в группе женщин с реализацией ВУИ, что свидетельствует об усиленной киллерной активности лимфоидных клеток. У женщин, родивших детей с ВУИ, показатели провоспалительных цитокинов (IL-1 β ; TNF α) были значимо выше, чем у женщин из группы сравнения, что свидетельствует об активации фагоцитоза. Превышение определенного порогового значения данных факторов во время беременности является одним из механизмов, запускающих развитие патологических реакций, приводящих к срыву адаптации способствующих развитию таких осложнений как преждевременное прерывание беременности, антенатальная гибель плода [1, 3, 8].

Снижение уровня IL-10 у беременных основной группы приводила к нивелированию его ингибирующей роли в воспалительной реакции и свидетельствовала о нарушении процессов адаптации иммунорегуляторных механизмов при развитии инфекции.

Снижение уровня ИФН- γ у женщин с реализацией ВУИ у их новорожденных свидетельствовала о несостоятельности противовирусного ответа у беременных при высокой антигенной нагрузке и, как следствие, об увеличении риска проникновения возбудителей от матери к плоду.

Проведенное исследование показало, что реализация ВУИ сопровождается нарушением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов, достоверным повышением содержания TNF α , IL-1 β , и снижением IL-10 и ИФН γ в сыворотке крови беременных с внутриутробным инфицированием плода (в отличие от группы сравнения). Риск развития внутриутробной патологии у новорожденного был высоким при повышении уровня TNF α более 24,35 pg/ml, а IL-1 β — более 19,25 pg/ml.

Сведения об авторах

Долгих Татьяна Ивановна — заведующая Центральной научно-исследовательской лаборатории ОмГМА, доктор медицинских наук, профессор

Тирская Юлия Игоревна — ассистент кафедры акушерства и гинекологии № 2 ОмГМА, кандидат медицинских наук (644001, г. Омск, ул. Б. Хмельницкого, 126-36; тел.: 8913-145-28-17; e-mail: yulia.tirskaya@yandex.ru)

Баринин Сергей Владимирович — заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №2 ОмГМА, доктор медицинских наук, профессор

Белкова Татьяна Николаевна — доцент кафедры педиатрии ПДО ОмГМА, кандидат медицинских наук

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что реализация ВУИ сопровождается достоверным повышением уровня провоспалительных цитокинов параллельно со снижением противовоспалительных цитокинов, что может быть использовано в качестве критериев прогноза развития инфекционного процесса у плода и новорожденного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бубнова Н.И., Тютюнник В.А., Михайлова О.И. Репродуктивные потери при декомпенсированной плацентарной недостаточности, вызванной инфекцией // Акушерство и гинекология. — 2010. — № 4. — С. 55–58.
2. Буданов П.В., Стрижаков А.Н. Этиология, патогенез, диагностика и лечение внутриутробной инфекции // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2010. — Т. 9, № 3. — С. 61–71.
3. Буданов П.В., Стрижаков А.Н., Малиновская В.В., Казарова Ю.В. Дискоординация системного воспаления при внутриутробной инфекции // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2009. — Т. 8, № 2. — С. 61–68.
4. Долгих Т.И., Шелев М.В., Нестеренко Э.В., Белкова Т.Н. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови новорожденных детей различного срока гестации с внутриутробной инфекцией // Мед. иммунология. — 2010. — Т. 12, № 4–5. — С. 417–420.
5. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Кан Н.Е., Верясов В.Н. и др. Содержание цитокинов в амниотической жидкости, пуповинной крови и сыворотке крови женщин с внутриутробной инфекцией // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 5. — С. 14–17.
6. Пастман Н.М., Черных Е.Р., Хонина Н.А., Дударева А.В. и др. Иммунный статус женщин группы высокого риска по преждевременному прерыванию беременности // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 28–32.
7. Тирская Ю.И., Белкова Т.Н., Рудакова Е.Б., Долгих Т.И. и др. Врачебная тактика при внутриутробных инфекциях // Акушерство и гинекология. — 2011. — № 8. — С. 42–47.
8. Чистякова Г.Н., Газилова И.А., Ремизова И.И., Черданцева Г.А. и др. Оценка цитокинового профиля при физиологической и патологически протекающей беременности // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 1. — С. 3–8.