

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ РАЗЛИЧНОГО СРОКА ГЕСТАЦИИ С ВНУТРИУТРОБНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Долгих Т.И.¹, Шелев М.В.¹, Нестеренко Э.В.²,
Белкова Т.Н.²,

¹Центральная научно-исследовательская лаборатория Омской государственной медицинской академии, г. Омск

²Педиатрический стационар родильного дома № 1, г. Омска

Резюме. Целью исследования явилось изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, определяемого методом проточной цитометрии, у 40 новорожденных детей с различным сроком гестации и с верифицированной внутриутробной инфекцией (1-я группа) или с гипоксическим поражением мозга (2-я группа). Установлено, что у детей 1-й группы активированные моноциты CD14⁺HLA-DR⁺ присутствовали в 2,3 раза чаще, а В1-лимфоциты с фенотипом CD5⁺CD19⁺ («запрещенный» клон) – в 1,8 раза чаще, чем во 2-й группе. Среди недоношенных детей 1-й группы лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD16⁺/CD56⁺, CD3⁺CD95⁺ и CD5⁺CD19⁺ регистрировались чаще, чем у доношенных, в 5, 11, 1 и в 2 раза соответственно. Это свидетельствует о включении компенсаторных механизмов защиты со стороны иммунной системы в условиях повышенной антигенной нагрузки (более выраженных у недоношенных детей).

Ключевые слова: новорожденные, внутриутробные инфекции, проточная цитометрия, лимфоциты.

Dolgikh T.I., Shelyov M.V., Nesterenko E.V., Belkova T.N.

IMMUNOPHENOTYPING OF BLOOD LYMPHOCYTES IN NEWBORNS WITH PRENATAL INFECTIONS AT DIFFERENT GESTATION TERMS

Abstract. The study aimed to compare subset composition of peripheral blood lymphocytes in 40 newborns at different gestation periods, complicated by a verified prenatal infection (1st group), or with hypoxic brain damage (2nd group), using a flow cytometry technique. It was found that activated CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes were 2,3-fold more common in the infants from the 1st group, and representation of CD5⁺CD19⁺ B1 lymphocytes (a «forbidden» clone) was 1,8-fold higher than in 2nd group. Among pre-term babies from the 1st group, the lymphocytes with CD3⁺CD16⁺/CD56⁺, CD3⁺CD95⁺ and CD5⁺CD19⁺ phenotype were registered more often, than in full-term infants (resp., 5, 11, and 2 times higher). These data argue for involvement of compensatory defense immune mechanisms under the conditions of increased antigenic load, being more pronounced in pre-term infants. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 417-420)

Keywords: newborns, prenatal infections, flow cytometry, lymphocytes.

Введение

Перинатальные инфекции – одна из ведущих причин перинатальной и детской патологии и смертности. Частота клинически выраженных форм внутриутробных инфекций (ВУИ) составляет 0,5-1% при своевременных родах и увели-

чивается до 3,5-16% при преждевременных родах [1, 5]. Несмотря на значительные успехи современной медицины, ВУИ остается сложной для антенатальной диагностики. Это связано с полиэтиологичностью патологии, отсутствием четкой взаимосвязи между выраженностью клинических проявлений инфекции у матери и степенью поражения плода, многофакторным влиянием инфекционного агента на плод и т.п.

Наряду с острым течением инфекции у плода и новорожденного может наблюдаться длительная персистенция возбудителя с формированием латентного или медленно текущего хронического

Адрес для переписки:

Долгих Татьяна Ивановна,
644001, ул. 20 лет РККА, 15.

Тел.: (3812) 37-03-43.

Факс: (3812) 36-17-90.

E-mail: dolgih-ti@mail.ru

инфекционного процесса. Инфекционная патология часто скрывается за такими диагнозами, как внутриутробная гипоксия, асфиксия, внутричерепная травма.

По данным ряда исследований, инфекционные заболевания выявляют у 50-60% госпитализированных доношенных и у 70% недоношенных детей. По результатам вскрытий новорожденных, у 37,5% умерших детей инфекционная патология явилась основной причиной смерти, сопутствовала или осложняла течение основного заболевания. Многолетнее изучение внутриутробных инфекций выявило особое своеобразие этой патологии [6, 7].

У новорожденных и особенно недоношенных детей отмечается дефицит почти во всех звеньях иммунной системы. В совокупности они обуславливают значительно более высокую частоту опасных для жизни инфекционных заболеваний, чем у взрослых людей. Как показало лечение тяжелых дефицитных состояний после пренатальных инфекций у плода, ущербного иммунитета недостаточно, чтобы защитить организм от нежелательных реакций, реализуемых медиаторами воспаления иммунной системы [2, 3, 4, 8].

Цель исследования. С целью оптимизации лабораторной диагностики и разработки диагностических критериев, изучить субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и цитокиновый профиль у новорожденных детей с внутриутробными инфекциями.

Материалы и методы

Лабораторные исследования проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Омской государственной медицинской академии. Обследовано 40 детей первого месяца жизни, поступивших в педиатрический стационар родильного дома № 1 г. Омска для оказания специализированной помощи. Основную группу (1-я группа) составили 17 детей с подтвержденным диагнозом внутриутробная инфекция, которые в зависимости от срока гестации были подразделены на две подгруппы 1А – недоношенные дети ($n = 11$) и 1Б – доношенные дети ($n = 6$). В группу сравнения (2-я группа) вошли 23 ребенка с гипоксическим поражением ЦНС и с отрицательным результатом обследования на ВУИ, из которых доношенными были 18 новорожденных, недоношенными 5 новорожденных ребенка.

Для верификации диагноза наряду с клиническим обследованием проведен комплекс лабораторных исследований. Материалом для исследования служили: венозная кровь, моча и ликвор (по показаниям). Определение ДНК потенциальных возбудителей: вируса простого герпеса 1 и 2 типов (*HSV-1,2*), вируса Эпштейна-Барр (*EBV*), цитомегаловируса (*CMV*), вируса герпеса человека 6-го типа (*HHV-6*), токсоплазм (*T. gondii*)

проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наборах «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В» и комплектах для амплификации «АмплиСенс» (производства ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» г. Москва, Россия).

Детекцию результатов осуществляли на мультканальном автоматическом люминесцентном анализаторе «АЛА-1/4» по конечной точке («Biosan», Латвия) или методом электрофореза при помощи УФ-трансиллюминатора в электрофоретической камере «SE-2».

Антигены возбудителей *HSV-1,2*, *CMV*, *T. gondii* выявляли в реакции иммунофлюоресценции на наборах компании «VIRCELL microbiologists» (Испания), с использованием люминесцентных микроскопов «Carl Zeiss» (Германия) и МИК-МЕД-2 (Россия). Специфические иммуноглобулины классов IgA, IgM, IgG и индекс avidности IgG-антител к *CMV* и *T. gondii* определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на наборах производства следующих компаний: ЗАО «Вектор-бест» (Новосибирская обл., Россия), «Euroimmun» (Германия), ООО НПО «Диагностические системы» (Н-Новгород, Россия). В соответствии с прилагаемыми инструкциями к тест-системам, при ручной постановке, результаты регистрировали на ридере «Multiscan EX» («Labsystems», Финляндия) или автоматическом ИФА-анализаторе «Elysis Quattro» («Human», Германия).

Общий анализ крови проводили по стандартной методике на гематологическом анализаторе «Excell 22» компании «Drew Scientific» (США). Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови осуществлялось на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC 500», с пробоподготовкой образцов на станции «TQ-Prep» компании «Beckman-Coulter» (США).

Мультиплексное определение цитокинов в крови пациентов проводилось на проточном лазерном иммуноанализаторе «BIO-PLEX 200» (США), с использованием коммерческих наборов «Human Cytokine 27-plex».

Поскольку полученные данные имели распределение отличное от нормального распределения Гаусса, то при математической обработке результатов использовались непараметрические статистические методы. Определялись медиана (Me), 25 и 75 квартили (Q_1 ; Q_2), коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R), а также критерий достоверности различий между количественными признаками Манна-Уитни (U). Для определения различий между долями, отражающими качественные признаки, применялся критерий хи-квадрат (χ^2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для получения рас-

четов использовались программы Statistica 6.0 и Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение.

Результаты этиологической расшифровки ВУИ показали, что частота моно-инфекции у новорожденных 1-й группы составила 64,7%, при этом первое ранговое занимал ННВ 6 типа (45,5%), который встречался в 1,7 раза чаще чем CMV ($p = 0,004$, $\chi^2 = 8,35$) и в 2,5 раза чаще чем EBV ($p = 0,00$, $\chi^2 = 17,0$). У одного ребенка была детектирована ДНК *Chl. pneumoniae*. При микст-инфекции у 6 детей встречались следующие ассоциации возбудителей: *CMV+Chl. trachomatis*, *CMV+T. gondii*, *CMV+HSV1*, *HSV1+EBV*, *HSV1+HSV2*, *Chl. trachomatis+M. hominis+U. urealyticum*.

Второй фрагмент работы включал определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови новорожденных детей. При сравнительном анализе количества лимфоцитов периферической крови у детей 1-й и 2-й групп достоверных различий не выявлено. Обращал на себя внимание факт выявления в 1-й группе активированных моноцитов с фенотипом CD14⁺/HLA-DR⁺, который встречался в 2,3 раза чаще, и В1-лимфоцитов с фенотипом CD5⁺/CD19⁺ («запрещенный» клон В-лимфоцитов), которые регистрировались в 1,8 раза чаще, чем во 2-й. Это может свидетельствовать о формировании аутоиммунного процесса в период внутриутробного развития.

Для выявления различий в состоянии иммунной системы у детей с различным сроком гестации, новорожденные 1-й группы были разделены на две подгруппы: 1А – доношенные дети ($n = 11$) и 1Б – недоношенные дети ($n = 6$). Результаты фенотипирования лимфоцитов представлены в таблице 1.

В результате анализа установлено, что уровень CD3⁺CD16⁺/CD56⁺, CD3⁺/CD95⁺ и CD5⁺/CD19⁺ в крови недоношенных детей был достоверно выше, чем у доношенных в 5; в 11,1 и в 2 раза соответственно ($p = 0,02$; $p = 0,02$; $p = 0,03$). Полагаем, что повышенный уровень Т-НК клеток в крови недоношенных детей, при наличии внутриутробной инфекции, свидетельствует об усиленной киллерной активности лимфоидных клеток. В то же время, большее количество лимфоцитов в крови недоношенных детей находилось в состоянии готовности к апоптозу, что может свидетельствовать об истощении резервов иммунной системы в и без того незрелом организме. Более того, результаты исследований показали, что имели место лабораторные признаки аутоиммунного процесса при внутриутробной патологии (табл. 1).

Для оценки системы цитокиновой регуляции параллельно с иммунофенотипированием определяли провоспалительные цитокины IL-1 β ,

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ ГРУПП 1А И 1Б (Me(Q₁;Q₂)), %

	Доношенные в 1-й группе (n = 11)	Недоношенные в 1-й группе (n = 6)
CD3 ⁺ /CD19 ⁺	71,3 (65,4; 82,8)	55 (34,4; 73,2)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	55,9 (40,1; 63,8)	41,8 (25,1; 50,2)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	14,6 (12,2; 18,9)	11,5 (9,8; 16,8)
CD3 ⁺ /CD19 ⁺	7,7 (4,4; 15,6)	7,6 (5,7; 10,9)
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	0,2 (0,2; 0,4)	1,0 (0,5; 6,2)*
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	7,6 (5,7; 11,6)	10,8 (9,8; 21,1)
CD3 ⁺ /CD25 ⁺	3,4 (2,6; 5,4)	2,2 (1,2; 2,9)
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	0,5 (0,3; 0,9)	0,5 (0,3; 1,0)
IRI	3,2 (3,0; 3,6)	3,0 (2,6; 3,6)
CD3 ⁺ /CD95 ⁺	1,9 (0,6; 2,1)	21,1 (4,7; 28,3)*
CD3 ⁺ /CD50 ⁺	72,2 (58,9; 79,6)	59,7 (35,4; 75,5)
CD14 ⁺ /HLA-DR ⁺	52,2 (22,6; 80,7)	26,9 (12,1; 99,8)
CD5 ⁺ /CD19 ⁺	3,0 (0,8; 3,3)	6,1 (4,1; 6,8)*

Примечание. Me – медиана; Q₁ – нижний квартиль; Q₂ – верхний квартиль; * – наличие статистически значимых различий между группами 1 и 2 ($p < 0,05$); критерий Манна–Уитни (U).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ 1-Й И 2-Й ГРУПП (ME(Q₁;Q₂)), ПКГ/МЛ

	Группа 1 (n = 17)	Группа 2 (n = 23)
IL-1 β	1,1 (1,0; 2,1)	0,3 (0,1; 0,6)
IL-6	4,5 (3,6; 5,6)	2,5 (1,7; 2,5)
TNF α	11,1 (8,8; 15,0)	8,3 (7,0; 8,9)
IL-10	1,2 (0,3; 2,6)	0,0 (0,0; 0,3)
в том числе		
	Доношенные в 1-ой группе (n = 11)	Доношенные во 2-ой группе (n = 18)
IL-1 β	2,1 (1,0; 3,0)	0,3 (0,1; 0,6)
IL-6	5,6 (5,1; 6,3)	2,5(1,7; 2,5)
TNF α	17,5 (11,4; 20,1)	8,3 (6,9; 8,9)
IL-10	1,2 (0,7; 1,9)	0 (0; 0,3)*

Примечание: Me – медиана; Q₁ – нижний квартиль; Q₂ – верхний квартиль; * – наличие статистически значимых различий между группами 1 и 2 ($p < 0,05$); критерий Манна–Уитни (U).

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕЙ 1-Й ГРУППЫ, КОЭФФИЦИЕНТ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА R

	Сутки жизни	CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	CD3 ⁺ /CD25 ⁺	CD3 ⁺ /CD95 ⁺	рост	IL-2
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	R = -0,67					
CD3 ⁺ /CD95 ⁺		R = 0,79				
CD5 ⁺ /CD19 ⁺		R = 0,81			R = -0,78	
Гестационный возраст		R = -0,81		R = -0,79		
CD14 ⁺ /HLA-DR ⁺			R = 0,68			R = 0,90
m тела				R = -0,88		
Рост				R = -0,89		
IL-10					R = 0,9	
CD3 ⁺ /CD19 ⁻					R = 0,68	

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена ($p < 0,05$).

IL-6, TNF α и противовоспалительный цитокин IL-10 (табл. 2).

По результатам сравнительного анализа уровня цитокинов в крови детей 1-й и 2-й групп достоверных отличий выявлено не было. Однако, при анализе результатов обследования детей в зависимости от степени доношенности выявлены достоверные различия между доношенными детьми из 1-й группы (ВУИ) и доношенными детьми из 2-й группы (гипоксия ЦНС). Более высокий уровень IL-10 у детей с инфекцией свидетельствует об ограничении системной воспалительной реакции и сдерживании эффектов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α в условиях формирования иммунного ответа на антиген возбудителей инфекции. Следует отметить, что несмотря на наличие текущего инфекционного процесса, уровень провоспалительных цитокинов в крови доношенных детей 1-й группы не являлся запредельно высоким и не падал критически, что возможно, свидетельствует о включении компенсаторных механизмов иммунной системы в условиях повышенной антигенной нагрузки.

Взаимосвязи, установленные в ходе корреляционного анализа демонстрирует таблица 3. Установлена сильная отрицательная корреляционная связь между гестационным возрастом новорожденных с ВУИ и уровнем Т-киллеров (CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺, R = -0,81), и лимфоцитов в состоянии готовности к апоптозу (CD3⁺/CD95⁺, R = -0,79). Связь подтверждается зависимостью роста и массы тела с молекулами CD3⁺/CD95⁺. Не исключено, что срок беременности может быть одним из факторов, влияющим на зрелость системы клеточного иммунитета, что позволяет расценивать его как параметр оценки тяжести состояния детей с внутриутробной инфекцией.

Таким образом, в результате исследований выявлен различный уровень содержания лимфоцитов с фенотипом CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺, CD3⁺/CD95⁺ и CD5⁺/CD19⁺ между доношенными и недоношенными новорожденными детьми с внутриутробной патологией. Более высокое содержание IL-10 в крови доношенных детей с реализуемой внутриутробной инфекцией, чем

у новорожденных с гипоксическим поражением ЦНС, может свидетельствовать об ограничении системного воспалительного ответа и повреждения тканей и органов организма. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейшего изучения вопросов иммунного ответа при внутриутробной патологии.

Список литературы

1. Громада Н.Е. Цитокиновый профиль и количественное значение ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови у новорожденных с гипоксическим перинатальным поражением центральной нервной системы // Цитокины и воспаление. – 2008. – № 13. – С. 14-18.
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 11. – С. 10-17.
3. Кравченко Л.В. Состояние иммунной системы у детей первых месяцев жизни с герпесвирусной инфекцией // Педиатрия. – 2008. – № 1. – С. 52-58.
4. Перинатальные инфекции: практич. пособие / Под ред. А. Я. Сенчука, З. М. Дубоссарской. – М.: МИА, 2005. – 318 с.
5. Подзолкова Н.М., Скворцова М.Ю., Мельникова Н.И., Острейков И.Ф. Внутриутробная инфекция: современное состояние проблемы // Акушерство и гинекология. – 2009. – № 13. – С. 27-32.
6. Фризе К. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных – М.: Медицина, 2003. – 424 с.
7. Skrablin S. Maternal plasma IL-6, IL-1 β and C-reactive protein as indicators of tocolysis failure and neonatal outcome after preterm delivery // J. Matern. Fetal Neonatal Med. – 2007. – Vol. 20, N 14. – P. 335-341.
8. Taylor-Robinson D. The role of mycoplasmas in pregnancy outcome // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2007. – Vol. 21, N 3. – P. 425-438.

поступила в редакцию 16.12.09

отправлена на доработку 11.01.10

принята к печати 13.01.10