© К.Р. Жиенбаев, Л.С. Дзоз, К.Г. Тохтаулинова, Н.В. Кравцова,
З.О. Базылбекова

*РГП на ПХВ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» МЗ и СР РК,
г. Алматы, Республика Казахстан*

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Анотация. Представлены данные количества отдельных субпопуляций и функциональных свойств лимфоцитов плодовой части пуповинной крови у беременных с плацентарной недостаточностью и листериозом. Выявлены значительные изменения иммунных параметров на локальном уровне (увеличение количества Т-, В-, хелперно-индукторных, супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, нарастании натуральных киллерных клеток, CD16+, CD56+ фенотипов, увеличение количества активированных Т-, В-, NK – клеток с HLA-DR+антигеном, снижение количества Т-лимфоцитов с активационными маркерами CD25+, CD95+, изменение функциональных свойств лимфоцитов.

Ключевые слова: листериоз, плацентарная недостаточность, пуповинная кровь, субпопуляционный профиль лимфоцитов.

© K.R. Zhienbaev, L.S. Dzoz, K.G. Tokhtakulinova, N.V. Kravtsova,
Z.O. Bazylbekova

*Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine
Almaty, Kazakhstan*

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF PLACENTAL INSUFFICIENCY IN LISTERIC INFECTION

Abstract. The work presents the data on the number of subpopulations and functional properties of lymphocytes of fetal umbilical blood in pregnant women with placental insufficiency and listeriosis. The study reveals significant changes of immune parameters at the local level (increase of the number of T-, B-, helper-inductor, suppressor-cellulotoxic T-lymphocytes, increase of the number of natural killer cells, CD16+, CD56+ phenotypes, activated T-, B-, NK – cells with HLA-DR+antigen, decrease of the number of T-lymphocytes with activating markers CD25+, CD95+, change of functional properties of lymphocytes. **Keywords:** listeriosis, placental insufficiency, umbilical blood, lymphocyte subpopulation profile.

Введение. С 1971 решением ВОЗ листериозную инфекцию внесли в список TORCH – комплекса. TORCH – это комплекс внутриутробных вирусных, бактериальных инфекций, вызывающих стойкие структурные изменения в организме. Известно, что беременные женщины в плане инфицированности листериозом являются наиболее уязвимым контингентом. Снижение напряженности иммунитета при беременности обуславливает повышенную восприимчивость к листериозной инфекции. Частота выявления положительной культуры листерий достигает 7,9% среди

беременных женщин и 21,9% у новорожденных. Носительство же среди беременных женщин достигает 40%. Данное обстоятельство связано с высоким тропизмом листерий к тканям матки и плаценты [1, 2, 3, 7].

Экспериментально доказано, что после внедрения в организм листерии проникают в плаценту и наполняют там все плацентарные сосуды и межворсинчатые пространства. Со временем в этих тканях образуются очаги воспаления, содержащие листерии. При исследовании плаценты беременных женщин в межворсинчатом пространстве определяются отложения фибрина с лейкоцитарной инфильтрацией, в строме ворсин – мелкие очажки некроза и лейкоцитарно-гистиоцитарные инфильтраты. В очагах некроза и воспаления определяются в большом количестве листерии, а в базальной пластинке – воспалительная диффузная инфильтрация и листериомы. В стенке сосудов пуповины наблюдается флегмонозное пропитывание и листериомы [4, 6]. Это может приводить к нарушению маточно-плацентарного кровотока различной степени тяжести в системе мать-плацента-плод. Данный факт послужил поводом для изучения иммунологического аспекта плацентарной недостаточности у женщин с листериозной инфекцией.

Цель исследования – изучение субпопуляционного состава, а также функций лимфоцитов плодовой части пуповинной крови у беременных с плацентарной недостаточностью (ПН) и листериозом.

Материал и методы обследования. Материалом исследования являлась пуповинная кровь (плодовая часть). Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов проводили по общелейкоцитарному гейту CD45+ методом прямой мембранной иммуофлюоресценции на проточном цитометре BD FACS Calibur с применением панели моноклональных антител к поверхностным антигенам лимфоцитов (CD3+CD19-, CD4+CD8-, CD8+CD4-, CD16+ CD3+, CD56+CD3+, CD19+ CD3-, CD3+HLA-DR+, CD3- HLA-DR+, CD25+CD3+, CD95+CD3+). Определяли ИРИ (иммунорегуляторный индекс) по соотношению CD4+/CD8+, а также индекс апоптоза – CD95+/CD25+. Функциональные

свойства клеток оценивали по локализации активационных маркеров CD25+, CD95+ на клетках методом двойного фенотипирования. Использовали коммерческие наборы реагентов, меченные FITS (CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD95, HLA-DR), а также меченные PE (CD25, CD95) BD Biosciences (США).

Достоверность различий определялась по коэффициенту Стьюдента ($p < 0,05$). Основным методом диагностики листериоза являлось определение противолистерийных антител в сыворотке крови твердофазным иммуноферментным методом с применением коммерческих ИФА тест-систем «Листерии О-IgG», (IMDI, Россия), а также выявление антител к антигену листерий, выделенному из специфических антигенсвязывающих лимфоцитов – АСЛ-ИФА. В реакции АСЛ-ИФА определяли общие иммуноглобулины, включающие иммуноглобулины классов М и G.

Результаты исследования. Исследования на наличие листериозной инфекции проводили беременным женщинам, находившимся на стационарном лечении в отделении патологии беременности. При обследовании 450 пациенток с патологическим течением беременности антитела к листериям были выявлены у 70 беременных женщин, т.е. в 15,5% случаев. Клиническая картина листериозной инфекции практически у всех беременных женщин протекала бессимптомно. В 5 (7,1%) случаях беременные женщины жаловались на субфебрильную температуру по типу аденовирусной инфекции с катаральными явлениями. Из 8 рожениц у 4 отмечалось многоводие, у 10 женщин наблюдалась выраженная задержка развития плода. Среди беременных с положительными результатами на листериоз у 30 (42,8 %) случаев ставился диагноз ПН и выраженная антенатальная гипоксия плода.

Исследования проведены у 30 беременных с плацентарной недостаточностью (ПН) с выявленными антителами к листериозу при сроке беременности 34-38 недель (III триместр), родоразрешенных путем операции кесарево сечение. Контрольную группу составили 30 беременных,

родоразрешенных путем операции кесарево сечение, не имеющих акушерских осложнений (высокая миопия, хореоретинопатия, перелом костей таза, состояние после остеосинтеза, врожденный вывих тазобедренного сустава) и соответственно с отсутствием антител к листериям.

Диагноз плацентарной недостаточности устанавливался на основании клинических данных, по данным фетометрии (сонографии), доплерометрии маточно-плодово-плацентарного кровотока, кардиотокографического исследования плода [5, 8, 9].

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов при плацентарной недостаточности и листериозной инфекции представлены в таблице 1.

Таблица 1

Субпопуляционный профиль лимфоцитов пуповинной крови при плацентарной недостаточности и листериозе

Наименование субпопуляций (%)	Пуповинная кровь (плодовая часть)	
	Контроль	ПН
Т-лимфоциты (CD3+CD19-)	48,889 ± 0,06	52,41 ± 1,01*
Т-хелперы (CD4+CD8-)	30,42 ± 0,07	35,99 ± 0,50*
Т-цитотоксические (CD8+CD4-)	18,2 ± 0,02	23,71 ± 0,11*
NK клетки (CD16+CD3+)	8,83 ± 0,03	15,0 ± 0,21*
Т-киллеры (CD56+CD3+)	3,71 ± 0,04	7,31 ± 0,26*
В-лимфоциты (CD19+CD3-)	9,33 ± 0,08	16,03 ± 0,41*
Т-активированные (CD3+HLA-DR+)	5,71 ± 0,03	8,55 ± 0,30*
В-активированные и NK (CD3-HLA-DR+)	10,67 ± 0,04	15,08 ± 0,60*
Маркер ранней активации (CD25+CD3+)	0,75 ± 0,01	0,52 ± 0,03*
Маркер апоптоза (CD95+CD3+)	1,17 ± 0,09	0,89 ± 0,04*
Индекс апоптоза (CD95+/CD25+)	1,56 ± 0,07	1,71 ± 0,29
ИРИ (CD4+/CD8+)	1,67 ± 0,001	1,51 ± 0,02*

Примечание: * - $p < 0,05$

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов при ПН в плодовой части пуповинной крови позволил установить достоверное увеличение числа

CD3+CD19-, CD4+CD8-, CD8+CD4-, CD16+CD3+, CD56+CD3-, CD19+CD3-, увеличение количества активированных CD3+HLA-DR+, CD3-HLA-DR+, а также снижение количества CD25+CD3+ и CD95+CD3+ клеток ($p<0,05$). Кроме того, отмечалось достоверное снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Индекс апоптоза (CD95+/CD25+) в сравнении с контролем не выявил достоверных различий. То есть при ПН у беременных с листериозной инфекцией имели место отклонения в перераспределении и миграции лимфоидных клеток в плодовой части пуповинной крови, отличающиеся от аналогичных показателей контрольной группы. Тестировано увеличение количества Т-, В-клеток антителопродуцентов, иммунорегуляторных хелперно-индукторных и супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, резкое увеличение натуральных киллерных клеток обоих фенотипов, а также усиление активации к чужеродным антигенам среди Т-, В-, NK-клеток по HLA-DR+ маркеру II класса гистосовместимости. При этом количество клеток, несущих маркеры ранней активации (CD25+) и апоптоза (CD95+) было снижено, что указывает на нарушение процессов пролиферации и элиминации клеток у плода при беременности, осложненной листериозом и ПН.

Таблица 2

Локализация активационных маркеров CD25+, CD95+ на лимфоцитах пуповинной крови при плацентарной недостаточности и листериозе

Наименование субпопуляций (%)	Пуповинная кровь (плодовая часть)	
	Контроль	ПН
CD3+ CD19-/CD25+	$6,43 \pm 0,15$	$12,31 \pm 0,56^*$
CD4+ CD8-/CD25+	$6,00 \pm 0,20$	$7,95 \pm 0,24^*$
CD8+ CD4-/CD25+	$7,22 \pm 0,002$	$15,0 \pm 0,10^*$
CD16+ CD3+/CD25+	$0,70 \pm 0,04$	$9,68 \pm 0,36^*$
CD56+ CD3+/CD25+	$0,65 \pm 0,05$	$7,91 \pm 0,35^*$
CD3+ CD19-/CD95+	$3,50 \pm 0,07$	$7,46 \pm 0,22^*$
CD4+ CD8-/CD95+	$8,95 \pm 0,03$	$5,71 \pm 0,19^*$

CD8+ CD4-/CD95+	1,64 ± 0,04	11,05 ± 0,19*
CD16+ CD3+/CD95+	0,15 ± 0,004	7,87 ± 0,45*
CD56+ CD3+/CD95+	0,05 ± 0,001	6,35 ± 0,28*

Примечание:* - $p < 0,05$

При исследовании функциональных свойств лимфоцитов плодовой части пуповинной крови при ПН и листериозе были выявлены следующие отклонения от контрольных данных (табл. 2).

Так, в отличие от показателей контрольной группы, при плацентарной недостаточности, обусловленной листериозом, увеличена локализация CD25+ маркера ранней активации, ответственного за процессы пролиферации клеток, на CD3+CD19-, CD4+CD8-, CD8+CD4-, CD16+CD3+, CD56+CD3+ лимфоцитах, что указывает на увеличение пролиферативной активности зрелых Т-, хелперно-индукторных, супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, а также усиление функций натуральных киллерных клеток ($p < 0,05$).

Локализация CD95+ маркера, опосредующего апоптоз, была достоверно увеличенной на лимфоцитах плодовой части пуповинной крови при ПН и листериозе в сравнении с контролем ($p < 0,05$). Это касалось зрелых Т-, супрессорно-цитотоксических Т- и натуральных киллерных клеток CD16+, CD56+ фенотипов, что свидетельствовало о готовности данных клеток к гибели ($p < 0,05$).

Исключение составили CD4+CD8- хелперно-индукторные Т-лимфоциты, осуществляющие протективный иммунный ответ, у которых механизмы апоптоза были снижены. Таким образом, при ПН, обусловленной листериозом, функциональная активность клеток плодовой части пуповинной крови значительно отличалась от аналогичных данных контрольной группы ($p < 0,05$).

Выводы. Проведенные исследования в пуповинной крови при ПН и листериозе в сравнении с контрольной группой указывают на значительные изменения иммунологических параметров на локальном уровне. Получены

данные об увеличении при данной патологии в плодовой части пуповинной крови количества Т-, В-, хелперно-индукторных, супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, нарастании числа натуральных киллерных клеток (CD16+, CD56+), увеличении количества активированных Т-, В-, NK-клеток по HLA-DR+, снижении количества клеток с CD25+, CD95+ рецепторами, а также изменении функций лимфоидных клеток.

Результаты исследования свидетельствуют о глубоких нарушениях в иммунной системе при ПН и листериозной инфекции, которые могут служить причиной патологии развития плода. Это диктует необходимость раннего выявления инфицированности листериями для предупреждения осложнения беременности плацентарной недостаточностью.

Список литературы:

1. Ермолаева С.А. Генетические механизмы вирулентности *Listeria monocytogenes* //Генетика.– 2001.– 37.– С. 286-293.
2. Куттыкжанова Г.Г., Попова Н.В. и соав. Листериоз// Медицина. – 2004. – №1.– С.52-55.
3. Лаврова Д.Б., Самсыгина Г.А., Михайлов А.В. и др. Скрининговое выявление листерий у новорожденных // Педиатрия. – 1998.– №5.– С.10-15.
4. Ломунова М.А., Талаев В.Ю. Клетки трофобласта плаценты человека: пути их созревания и взаимодействие с иммунной системой// Иммунология. – 2007. – № 1. – С. 49–58.
5. Нафеев А.А, Тетерина Н.Г., Харитонов В.М. и соав. Листериоз как проявление внутриутробной инфекции//Акушерство и гинекология – 2005.– №1.– С.50-51.
6. Проданова Е.В., Рогожина И.Е., Чехоницкая М.П., Гришаева П.А. Сравнительная доплерометрическая оценка эффективности терапии беременных с фето-плацентарной недостаточностью// Российский Вестник акушера-гинеколога.– 2011.– №2. – С. 79-82.
7. Рогожин Д.В., Ожегов А.М., Заворыгин С.А. Листериоз у детей// Педиатрия. –2004.– №4.– С. 71-76.
8. Савельева Г.М., Курцер М.А., Клименко П.А. Интранатальная охрана здоровья плода. Достижения и перспективы// Акушерство и гинекология.– 2005. – №3.– С.3-7.
9. Серов В.Н. Плацентарная недостаточность// Трудный пациент.– 2005.– 3(2). – С.17-20.

References

1. Ermolaeva S.A. Geneticheskie mekhanizmy virulentnosti *Listeria monocytogenes* [Hygienic mechanisms of *Listeria monocytogenes* virulence]. *Genetika*, 2001, no. 37, pp. 286-293 (in Russian).
2. Kuttykzhanova G.G., Popova N.V. i soav. Listerioz [Listeriosis]. *Meditcina*, 2004, no. 1, pp. 52-55 (in Russian).
3. Lavrova D.B., Samsygina G.A., Mikhaylov A.V. i dr. Skriningovoe vy-yavlenie listeriy u novorozhdennykh [Screening diagnosing of *Listeria* in newborns]. *Pediatrics*, 1998, no. 5, pp.10-15 (in Russian).
4. Lomunova M.A., Talaev V.Yu. Kletki trofoblasta platsenty cheloveka: puti ikh sozrevaniya i vzaimodeystvie s immunnou sistemoy [Human placental trophoblast cells: ways of their growth and interaction with the immune system]. *Immunologiya*, 2007, no. 1, pp. 49–58 (in Russian).
5. Nafeev A.A., Teterina N.G., Kharitonov V.M. i soav. Listerioz kak proyavlenie vnutriutrobnoy infektsii [Listeriosis as a manifestation of intrauterine infection]. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2005, no. 1, pp. 50-51 (in Russian).
6. Prodanova E.V., Rogozhina I.E., Chekhonitskaya M.P., Grishaeva P.A. Sravnitel'naya doplerometricheskaya otsenka effektivnosti terapii beremennykh s fetoplatsentarnoy nedostatochnost'yu [Comparative Doppler evaluation of the efficiency of therapy of pregnant women with fetoplacental insufficiency]. *Rossiyskiy Vestnik akushera-ginekologa*, 2011, no. 2, pp. 79-82 (in Russian).
7. Rogozhin D.V., Ozhegov A.M., Zavorygin S.A. Listerioz u detey [Listeriosis in children]. *Pediatrics*, 2004, no. 4, pp. 71-76 (in Russian).
8. Savel'eva G.M., Kurtser M.A., Klimenko P.A. Intranatal'naya okhrana zdorov'ya ploda. Dostizheniya i perspektivy [Intranatal protection of fetus health]. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2005, no. 3, pp. 3-7 (in Russian).
9. Serov V.N. Platsentarnaya nedostatochnost' [Placental insufficiency]. *Trudnyy patsient*, 2005, no. 3(2), pp.17-20 (in Russian).

Жиенбаев Кайрат Рахметбаевич – к.м.н., с.н.с. отдела лабораторных исследований
НЦАГиП, тел: 8-705-511-22-88 kayratikzh@list.ru

Дзоз Людмила Стефановна – к.б.н., с.н.с. отдела лабораторных исследований НЦАГиП

Тохтакулинова Гузель Касымхановна – м.н.с. отдела лабораторных исследований
НЦАГиП

Кравцова Наталья Валерьевна – д.м.н., в.н.с. отдела лабораторных исследований
НЦАГиП, тел: 8-701-345-84-21, nat_kravtsova@mail.ru

Базылбекова Зейнеп Омирзаковна – д.м.н., заведующая отделом патологии
беременности НЦАГиП

Республиканское государственное предприятие на правах хозяйственного ведения
«Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» Министерства

здравоохранения и социального развития Республики Казахстан, Республика Казахстан, 050020, г. Алматы, пр. Достык 125.

Zhienbaev Kayrat Rakhmetbaevich – Candidate of Medical Science, senior researcher of the department of laboratory investigations, Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine, phone: 8-705-511-22-88, e-mail: kayratikzh@list.ru

Dzoz Lyudmila Stefanovna - Candidate of Biological Science, senior researcher of the department of laboratory investigations, Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine

Tokhtakulina Guzel Kasymkhanovna - junior researcher of the department of laboratory investigations, Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine

Kravtsova Natalya Valeryevna – Doctor of Medical Science, leading researcher of the department of laboratory investigations, Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine, phone: 8-701-345-84-21, e-mail: nat_kravtsova@mail.ru

Bazylbekova Zeynep Omirzakovna - Doctor of Medical Science, head of the department of pregnancy pathology, Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine

Republican State Enterprise on the Right of Economic Use “Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine” of the Ministry of Healthcare and Social Development of the Kazakhstan Republic, 125, Dostyk av., 050020, Almaty, Kazakhstan Republic