

А.В. Макогон, О.Ю. Леплина, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных, А.А. Останин

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА ПЛОДА ВО ВТОРОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск
Родильный дом муниципальной клинической больницы №1, Новосибирск

Статья посвящена исследованию онтогенетических особенностей иммунитета человека на основе сравнительного анализа показателей гемоиммунограмм здоровых плодов 22-26 недель гестации, новорожденных детей и взрослых доноров крови. Фетальную кровь получали из пуповинной вены плода с помощью кордоцентеза. Установлено, что иммунная система плода и новорожденного ребенка на начальных этапах онтогенетического развития существенно отличается от иммунитета взрослого человека, во-первых, количественными диспропорциями и, во-вторых, функциональной незрелостью иммунокомпетентных клеток. Выявленные особенности свидетельствуют о физиологической незрелости иммунной системы плода/новорожденного, которая не позволяет обеспечить достаточный уровень эффективной противoinфекционной защиты в антенатальном и раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: иммунитет плода, кордоцентез, пуповинная кровь, онтогенез

В настоящее время одним из актуальных направлений современной перинатологии являются исследования, направленные на изучение закономерностей становления и формирования фетального иммунитета в процессе внутриутробного развития [1]. Это обусловлено тем, что именно иммунная система обеспечивает поддержание гомеостаза организма плода и новорожденного ребенка в условиях стресса и высокой антигенной нагрузки в родах и в раннем постнатальном периоде. При этом считается, что недостаточность тех или иных звеньев иммунитета плода играет ведущую роль в чувствительности к внутриутробному инфицированию.

До недавнего времени при изучении внутриутробной инфекции (ВУИ) основное внимание исследователей было сконцентрировано на состоянии здоровья беременной женщины и оценке возможного риска трансмиссии инфекционного заболевания от матери ребенку. С разработкой и внедрением в клиническую практику новых, инвазивных методов пренатальной диагностики, таких, как амниоцентез и кордоцентез, появилась возможность непосредственного изучения функциональных и количественных характеристик иммунитета плода в норме и при инфекционном воздействии.

Целью настоящей работы явилось исследование онтогенетических особенностей иммунитета человека на основе сравнительного анализа показателей гемоиммунограмм здоровых плодов 22-26 недель гестации, новорожденных детей и взрослых доноров крови.

Материалы и методы

В исследования были включены относительно здоровые женщины в возрасте от 18 лет до 41 года (средний возраст 26 ± 3 лет), у которых беременность протекала без осложнений и была прервана во втором триместре гестационного периода по социальным показаниям (средний срок беременности составил 24 недели). Индукция выкидыша осуществлялась путем интраамниального введения 25 мг энзапроста. Отсутствие внутриутробной инфекции у плода было подтверждено документально результатами бактериологического и гистологического исследования abortивного материала и/или последа. Обследование женщин проводилось в условиях родильного дома и включало соматический и акушерско-гинекологический анамнез, ультразвуковое исследование (УЗИ) плода, доплерографию, кардиотокографию, клинико-лабораторные (общий анализ крови, мочи), биохимические и микробиологические исследования. Ультразвуковые исследования выполняли на аппаратах Aloka 680 и Aloka 2000 с применением импульсной доплерографии и цветового доплеровского картирования.

Объектом исследования являлась плодовая кровь (группа № 1, $n=8$), полученная до прерывания беременности из пуповинной вены плода с помощью кордоцентеза, который выполняли двухигльным способом (иглами 18 G и 22 G) под ультразвуковым контролем, а также пуповинная кровь здоровых новорожденных детей (группа № 2, $n=7$) и венозная кровь взрослых доноров в возрасте от 18 до 40 лет (группа № 3, $n=20$).

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной крови в градиенте плотности фикола-верографина. Клетки в концентрации $0,1 \times 10^6$ /лунку культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров IV (AB) группы крови при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали конканавалин А (КонА, Sigma) и моноклональные анти-CD3-антитела (анти-CD3-мАТ, Медбио-спектр, г. Москва) в конечной концентрации 15 и 1 мкг/мл соответственно. Интенсивность пролиферации оценивали через 72 ч по включению ³H-тимидина (1 мКи/лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования.

Методом проточной цитофлуориметрии (FACS, Becton Dickinson), используя соответствующие моноклональные антитела (ОО «Сорбент», Москва), определяли содержание различных субпопуляций клеток (CD3⁺-, CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, CD20⁺-В-лимфоцитов, CD16⁺-NK-клеток), а также относительное количество лимфоцитов и моноцитов, экспрессирующих HLA-DR антигены. Рассчитывали величину иммунорегуляторного CD4/CD8 индекса.

Концентрацию иммуноглобулинов класса G, M, A в сыворотке пуповинной крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием соответствующих диагностических наборов (производства НПП «Медицинская иммунология», Москва).

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной, па-

раметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 5.0».

Результаты и обсуждение

При сравнении показателей гемограмм здоровых плодов, новорожденных и взрослых доноров крови были выявлены значительные различия (таблица 1). Из представленных данных видно, что в периферической крови плодов достоверно снижено количество лейкоцитов и изменен их клеточный состав. При этом зарегистрирован относительный и абсолютный лимфоцитоз, тогда как содержание полиморфноядерных лейкоцитов резко снижено и составляет в среднем 20%.

Преобладание лимфоцитов у плода представляется закономерным явлением онтогенеза иммунной системы [2, 3]. Абсолютный лимфоцитоз сохранялся и в раннем постнатальном периоде, что было обусловлено прежде всего высоким содержанием лейкоцитов в пуповинной крови новорожденных. Однако следует отметить, что по относительному составу основных субпопуляций клеток крови (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов) новорожденные уже не отличались от взрослых доноров. В то же время количество эритроцитов и уровень гемоглобина были в максимальной степени увеличены у новорожденных детей, что отличало их как от здоровых плодов, так и взрослых доноров крови.

Оценка клеточного состава пуповинной крови плодов, полученной при кордоцентезе, свидетельствовала, что лимфопоэз является доминирующим направлением кроветворения на этапе эмбриогенеза, тогда как активность гранулоцитарно-макрофагальных предшественников снижена. К моменту родов гемопоэз новорожденного

Таблица 1

Показатели гемограмм в исследуемых группах

Показатель	Группа № 1 (n=8)	Группа № 2 (n=7)	Группа № 3 (n=20)	P _U
Эритроциты ($\times 10^{12}$ /л)	4,1 \pm 0,3	6,0 \pm 0,19	4,5 \pm 0,08	P ₁₋₂ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
Гемоглобин (г/л)	131 \pm 9,6	210 \pm 11	139 \pm 2,6	P ₁₋₂ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
Лейкоциты ($\times 10^9$ /л)	3,3 \pm 0,3	14,8 \pm 2,2	6,7 \pm 0,8	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	1,5 \pm 0,02	7,7 \pm 1,6	7,3 \pm 1,2	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	19,4 \pm 4,0	65 \pm 3,0	65,3 \pm 2,1	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01
Лимфоциты (%)	74 \pm 3,8	21,8 \pm 2,1	26,9 \pm 1,5	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01
Лимфоциты ($\times 10^9$ /л)	2,5 \pm 0,2	3,14 \pm 0,5	1,65 \pm 0,09	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
Моноциты (%)	4,5 \pm 0,7	5,0 \pm 1,5	2,9 \pm 0,4	P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05

Примечание: P_U – достоверность различий показателей в группах (U – непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

приобретал характеристики здорового взрослого человека, что проявлялось формированием нормальной структуры клеточного состава периферической крови. Однако в раннем постнатальном периоде отмечали высокую интенсивность процессов лимфо- и эритропоэза, о чем свидетельствовало повышенное содержание в пуповинной крови лейкоцитов, лимфоцитов и эритроцитов.

Сравнительная оценка показателей иммунного статуса здоровых доноров крови, новорожденных детей и плодов показала (таблица 2 и 3), что по своим количественным и функциональным параметрам иммунная система на начальных этапах онтогенеза (в антенатальном и в раннем постнатальном периоде) существенно отличается от иммунитета взрослого человека.

Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению со здоровыми донорами в периферической крови плодов достоверно снижено процентное содержание общей субпопуляции CD3⁺-Т-лимфоцитов, увеличен иммунорегуляторный индекс вследствие количественного дефицита CD8⁺-Т-клеток, резко снижено содержание CD16⁺ натуральных

киллерных клеток, а также моноцитов с высоким уровнем экспрессии HLA-DR антигенов. В то же время зарегистрировано 2-кратное увеличение относительного содержания CD20⁺-В-клеток и HLA-DR⁺-лимфоцитов.

Следует отметить, что при столь выраженных изменениях относительного состава абсолютное количество CD4⁺-Т-лимфоцитов и CD20⁺-В-клеток в крови плодов значительно превышает аналогичные показатели здоровых доноров.

Схожие закономерности обнаруживаются и в пуповинной крови здоровых новорожденных. По сравнению с донорами у них так же, как и у плодов, достоверно снижено относительное (но не абсолютное) содержание CD3⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, HLA-DR^{high}-моноцитов. Доля CD20⁺-В-клеток и HLA-DR⁺-лимфоцитов в целом по группе новорожденных приближается к среднему уровню взрослых доноров, что, вероятно, можно рассматривать в качестве тенденции, направленной на «выравнивание» структуры субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в раннем постнатальном периоде. Тем не менее, аб-

Таблица 2

Показатели иммунного статуса в исследуемых группах

Показатель	Группа № 1 (n=8)	Группа № 2 (n=7)	Группа № 3 (n=20)	P _U
CD3 ⁺ -Т-лимфоциты (%)	59±2,0	57±6,7	68,3±1,0	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,05
CD3 ⁺ -Т-лимфоциты (×10 ⁹ /л)	1,45±0,14	1,72±0,3	1,15±0,06	P ₂₋₃ <0,01
CD4 ⁺ -Т-лимфоциты (%)	36,6±4,7	36±5,5	42,3±1,3	
CD4 ⁺ -Т-лимфоциты (×10 ⁹ /л)	0,91±0,13	1,12±0,25	0,51±0,06	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
CD8 ⁺ -Т-лимфоциты (%)	17,7±2,0	22±1,6	27,0±1,0	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
CD8 ⁺ -Т-лимфоциты (×10 ⁹ /л)	0,45±0,09	0,7±0,12	0,39±0,06	P ₁₋₂ <0,05 P ₂₋₃ <0,01
CD4/CD8	2,2±0,4	1,8±0,4	1,6±0,1	P ₁₋₃ <0,05
CD20 ⁺ -В-лимфоциты (%)	22,0±2,2	14,6±2,8	11,2±0,3	P ₁₋₃ <0,01 P ₁₋₂ <0,05
CD20 ⁺ -В-лимфоциты (×10 ⁹ /л)	0,53±0,06	0,48±0,11	0,26±0,03	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,05
CD16 ⁺ -NK-клетки (%)	8,8±1,7	10,8±5,0	16,0±1,3	P ₁₋₃ <0,01
HLA-DR лимфоциты (%)	24,6±2,6	16±2,4	13,5±1,8	P ₁₋₃ <0,01 P ₁₋₂ <0,05
HLA-DR моноциты (%)	80,6±10,5	88,6±4	92±4,0	
HLA-DR ^{high} моноциты (%)	25,6±1,1	23±1,5	44,0±2,0	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
Экспрессия HLA-DR на моноцитах (MF)	356±112	150±15	291±32	P ₁₋₂ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
IgG (г/л)	2,8±0,8	7,9±0,8	9,4±0,6	P ₁₋₃ <0,01 P ₁₋₂ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
IgM (г/л)	0,25±0,15	0,18±0,1	2,2±0,33	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01
IgA (г/л)	0,44 ± 0,09	0,22±0,12	1,4±0,11	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01

Примечание: P_U достоверность различий показателей в группах (U – непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

солютное количество всех субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в крови новорожденных так же, как и у плодов, значительно превышает параметры взрослых доноров и свидетельствует о большей интенсивности Т- и В-лимфопоэза на начальных этапах онтогенеза.

В то же время исследование пролиферативной активности МНК в культуре *in vitro* (таблица 3) и оценка сывороточного уровня иммуноглобулинов четко указывают на функциональную незрелость циркулирующих Т- и В-лимфоцитов плодов и новорожденных. Так, в обеих группах (особенно в антенатальном периоде) в отличие от взрослых доноров концентрация иммуноглобулинов класса G, М и А была резко снижена (таблица 2).

Кроме того, по сравнению с донорами в группе обследованных плодов регистрировали почти 2-кратное снижение спонтанной пролиферации, а также уровня пролиферативного ответа МНК при стимуляции моноклональными анти-CD3-антителами и митогеном конканавалином А соответственно по классическому (через CD3-Т-клеточный рецепторный комплекс) и альтернативному (через адгезивные молекулы) пути активации. В подгруппе новорожденных средние значения спонтанной и КонА-индуцированной пролиферации МНК находились на уровне здоровых доноров крови. Тем не менее, Т-клетки новорожденных сохраняли низкую реактивность в ответ на стимуляцию по классическому пути активации анти-CD3-антителами.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что иммунная система плода и новорожденного ребенка на начальных этапах онтогенетического развития существенно отличается от иммунитета взрослого человека, во-первых, количественными диспропорциями и, во-вторых, функциональной незрелостью иммунокомпетентных клеток.

Выявленная нами физиологическая незрелость иммунной системы здоровых плодов/новорожденных согласуется с данными литературы. Так, Neubert R.T. и др. [13], а также D'Arena G. и др. [8] провели сравнительные фенотипические исследования и показали, что среди лимфоцитов

пуповинной крови новорожденных в отличие от периферической крови взрослых доноров преобладают «наивные» CD4⁺CD45RO⁻CD45RA⁺CD29^{low}-Т-клетки и практически полностью отсутствуют CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻CD29^{high}-Т-клетки-памяти. Кроме того, свидетельством незрелости фетальных клеток считают более низкий уровень экспрессии на них рецепторов к IL-2 (CD25) [17, 21], молекул Fas (CD95) и Fas-L [9], а также снижение относительного содержания общей популяции CD3⁺-Т-лимфоцитов в сочетании с повышенным количеством CD19⁺-В-клеток [8, 19, 20]. При этом отмечается, что несмотря на диспропорции в относительном содержании различных субпопуляций лимфоцитов их абсолютное количество в пуповинной крови значительно выше, чем у здоровых доноров. Возможным механизмом увеличения количества фетальных клеток, вероятно, является их повышенная устойчивость к апоптозу, обусловленная как снижением экспрессии Fas-рецептора и Fas-лиганда [9], так и более высоким уровнем экспрессии апоптоз-протективных BCL-2 генов [20].

К проявлениям функциональной незрелости лимфоцитов относят более низкое содержание в пуповинной крови цитокинпродуцирующих клеток (CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, NK-клеток, моноцитов) [5, 11], отсутствие в сыворотке пуповинной крови ростовых факторов, необходимых для усиления митогенной реактивности Т-клеток [6], низкий уровень естественной цитотоксической активности лимфоцитов [14, 16], неэффективное межклеточное взаимодействие, обусловленное низкой экспрессией HLA-DR и CD40 молекул на антигенпрезентирующих клетках и В-лимфоцитах соответственно [4]. Нами также показано снижение относительного содержания HLA-DR^{high} моноцитов в крови плодов и новорожденных. Кроме того, было установлено, что фетальные клетки в отличие от МНК взрослых доноров характеризуются низким уровнем пролиферативного ответа в культурах, стимулированных КонА и/или анти-CD3-МАТ. Важно отметить, что дефект пролиферативного ответа Т-клеток при стимуляции анти-CD3-антителами сохраняется также и в раннем постнатальном периоде.

Таблица 3

Прролиферативная активность моноклеарных клеток здоровых плодов, новорожденных и взрослых доноров крови

Пролиферация (имп/мин)	Группа № 1 (n=8)	Группа № 2 (n=7)	Группа № 3 (n=20)	P _U
Спонтанная	1470±260	2240±380	2430±215	P ₁₋₃ <0,05
КонА-индуцированная	32000±8370	61380±10370	58330±3990	P ₁₋₃ <0,05 P ₁₋₂ <0,05
Анти-CD3-индуцированная	13990±2610	9220±1660	28350±1800	P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,01

Примечание: P_U достоверность различий показателей в группах (U – непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Дополнительным свидетельством функциональной незрелости лимфоцитов плодов и новорожденных является низкий уровень иммуноглобулинов в сыворотке пуповинной крови. В течение многих лет вопрос о способности фетальных клеток продуцировать иммуноглобулины класса G, M и A оставался дискуссионным. Однако современными исследованиями убедительно показано, что у плода как человека, так и лабораторных животных *in vivo*, а также в тканевых культурах синтезируются все основные классы иммуноглобулинов [3, 7, 12, 15, 18]. Кроме того, весомым аргументом, подтверждающим способность фетальных клеток продуцировать IgA, является также обнаружение этого белка в сыворотке крови плодов и новорожденных от пациенток, страдающих агаммаглобулинемией A [10].

Несмотря на вышеперечисленные особенности, состояние иммунной системы доношенного новорожденного нельзя отнести к иммунодефицитным [1]. Считается, что здоровый новорожденный ребенок имеет особое, отличное от взрослых, но с биологической точки зрения целесообразное состояние иммунитета, которое препятствует развитию избыточных реакций системного воспаления, аутоиммунных процессов, деструкции собственных органов и тканей. Специфические особенности неонатальной иммунной системы помогают ребенку выжить в условиях интенсивной колонизации кожи и слизистых оболочек микрофлорой. Иммунная система настроена на постепенное приобретение информации об окружающем мире в раннем детском возрасте и последовательное формирование нормергического иммунного ответа.

В то же время совершенно очевидно, что из-за своей физиологической незрелости иммунитет плода/новорожденного не может обеспечить достаточный уровень эффективной противомикробной защиты в антенатальном и раннем постнатальном периоде. Недостаточность (количественная и функциональная) многих звеньев фетального иммунитета во многом определяет повышенную чувствительность плода к внутриутробному инфицированию.

Ontogenetic features of fetal immunity in the second trimester of pregnancy

A.V. Makagon, O.Yu. Leplina, N.M. Pasman, H.R. Chernykh, A.A. Ostanin

The immunological parameters of fetal immunity in healthy pregnant women in the second gestation trimester in comparison with healthy newborns and adult donors were studied to evaluate the ontoge-

netic features of human immunity. Fetal blood was obtained by cordocentesis from umbilical vein. In contrast to adult the immune system of fetus and newborns was characterized by quantitative disproportion and functional immaturity of immunocompetent cells. These observations demonstrated that due to physiological immaturity the immune system of fetus/newborns is unable to support the effective anti-infectious defense during ante- and post-natal period.

Литература

1. Таболин В.А., Володин Н.Н., Дегтярева М.В. и др. // Int. J. on Immunorehabilitation. — 1997. — № 6. — С. 112-122.
2. Хлыстова З.С. Становление системы иммуногенеза плода человека. — М., 1987.
3. Arkachaisri T., Ballow M. // Immunology and Allergy Clinics of North America. — 1999. — Vol. 19. — № 2. — P. 253-276.
4. Bona C., Bot A. // Immunologist. — 1997. — Vol. 5. — № 1. — P. 5-9.
5. Chalmers I.M., Janossy G., Contreras M., Navarrete C. // Blood. — 1998. — Vol. 92. — № 1. — P. 11-18.
6. Cohen S.B., Morgan C.L., Perez-Cruz I., et al. // Hum. Immunol. — 2000. — Vol. 61. — № 2. — P. 111-114.
7. Cukrowska B., Sinkora J., Reháková Z., Splichal I. // Folia Microbiol. (Praha). — 1995. — Vol. 40. — P. 421-430.
8. D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., et al. // Haematologica. — 1998. — Vol. 83. — № 3. — P. 197-203.
9. Drenou B., Choqueux C., Ghalbourni A., et al. // Bone Marrow Transplant. — 1998. — Vol. 22, Suppl. 1. — S. 44-47.
10. Hahn-Zoric M., Carlsson B., Björkander J., et al. // Pediatr. Res. — 1992. — Vol. 32. — P. 150-154.
11. Krampera M., Tavecchia L., Benedetti F., Nadali G., Pizzolo G. // Haematologica. — 2000. — Vol. 85. — № 7. — P. 675-679.
12. Makori N., Tarantal A.F., Lü F.X. et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2003. — Vol. 10. — P. 140-153.
13. Neubert R.T., Delgado I., Webb J.R., et al. // Teratog. Carcinog. Mutagen. — 2000. — Vol. 20. — № 4. — P. 171-193.
14. Nguyen Q.H., Roberts R.L., Ank B.J., et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1998. — Vol. 5. — № 1. — P. 98-104.
15. Quan C.P., Forestier F., Bouvet J.P. // Am. J. Reprod. Immunol. — 1999. — Vol. 42. — P. 219-225.
16. Risdon G., Gaddy J., Stehman F.B., Broxmeyer H.E. // Cell. Immunol. — 1994. — Vol. 154. — № 1. — P. 14-24.
17. Saito S., Morii T., Umekage H., et al. // Blood. — 1996. — Vol. 87. — № 8. — P. 3344-3350.
18. Schroeder H.W.Jr., Zhang L., Philips J.B. // Blood. — 2001. — Vol. 98. — № 9. — P. 2745-2751.
19. Series I.M., Pichette J., Carrier C., et al. // Early Hum. Dev. — 1994. — Vol. 26. — № 2. — P. 143-154.
20. Villaseñor-Bustamante S., Alvarado-De La Barrera C., Richaud-Patin Y., et al. // Scand. J. Immunol. — 1999. — Vol. 49. — № 6. — P. 629-632.
21. Zola H., Ridings J., Elliott S., et al. // Hum. Immunol. — 1998. — Vol. 59. — № 10. — P. 615-624.