

Динамика показателей врожденного и адаптивного иммунитета у плодов с гемолитической болезнью, обусловленной резус-конфликтом, перенесших однократное внутриутробное внутрисосудистое переливание крови

Заочн. асп. Э.А. КЕРИМОВА*, д.м.н. Н.В. ПУТИЛОВА, к.м-б.н. С.В. КИНЖАЛОВА, д.м.н., проф. Г.Н. ЧИСТЯКОВА

ФГБНУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» (дир. — проф. Н.В. Башмакова) Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Цель исследования — оценка влияния внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии на динамику показателей врожденного и адаптивного иммунитета пуповинной крови плодов и новорожденных с гемолитической болезнью, обусловленной резус-конфликтом. **Материал и методы.** Исследованы две группы беременных в сроках гестации 25—34-нед. Основную группу составили 16 пациенток с гемолитической болезнью плода по системе Резус, их внутриутробные плоды и новорожденные дети. Группу сравнения составили 10 пациенток без гемолитической болезни плода и их новорожденные. В обеих группах исследовались иммунологические и клинико-биохимические показатели пуповинной крови. В основной группе также проводилось ультразвуковое исследование с доплерометрией для оценки пиковой скорости кровотока в средней мозговой артерии плодов до и после внутриутробной гемотрансфузии. **Результаты.** В основной группе выявлены снижение пиковой скорости кровотока в средней мозговой артерии и повышение уровня гемоглобина у плодов после внутриутробной гемотрансфузии, что свидетельствует об эффективности проведенной манипуляции. В результате иммунологического исследования пуповинной крови обнаружены снижение уровня лимфоцитов у новорожденных, уменьшение компонента С3 системы комплемента, а также повышение количества Т-клеток CD3 и В-лимфоцитов по рецептору IgE (CD3CD23) у плодов, что свидетельствует об ответной реакции клеточного звена адаптивной иммунной системы на гемотрансфузию. **Заключение.** Внутриутробные внутрисосудистые гемотрансфузии не только повышают уровень гемоглобина у плодов, но и приводят к ответной реакции клеточного звена их адаптивной иммунной системы.

Ключевые слова: гемолитическая болезнь плода, внутриутробное внутрисосудистое переливание крови, адаптивный иммунитет.

Changes in innate and adaptive immunity indicators in the fetuses with hemolytic disease caused by Rh incompatibility, who have undergone a single intrauterine intravascular blood transfusion

E.A. KERIMOVA, Correspondence Postgraduate Student; N.V. PUTILOVA, MD; S.V. KINZHALOVA, Cand. Biomed. Sci; Prof. G.N. CHISTYAKOVA, MD

Ural Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ministry of Health of Russia, Yekaterinburg, Russia

Objective — to evaluate the impact of intrauterine intravascular blood transfusion on changes in innate and adaptive immunity indicators in the umbilical cord blood of fetuses and newborns with hemolytic disease caused by Rh incompatibility. **Subject and methods.** Two groups of pregnant women at 25—34 weeks' gestation were examined. A study group consisted of 16 female patients with fetal hemolytic disease according to the Rhesus system, their fetuses in utero, and newborn babies. A comparison group comprised 10 patients without hemolytic disease of their fetus and newborn infants. The immunological, clinical, and biochemical parameters of umbilical cord blood were investigated in both groups. The study group also underwent Doppler ultrasound evaluation to measure the peak blood flow velocity of the fetal middle cerebral artery before and after intrauterine transfusion. **Results.** The study group showed a decrease in the middle cerebral artery peak flow velocity and an increase in elevated fetal hemoglobin levels in fetuses after intrauterine transfusion, which suggests that the performed manipulation was effective. Immunological studies of umbilical cord blood revealed decreases in lymphocyte levels in the newborns and in complement component 3 and a rise in the count of CD3 T cells and B lymphocytes by IgE receptor (CD3CD23) in the fetuses, indicating a response of the cellular component of their adaptive immune system to blood transfusion. **Conclusion.** Intrauterine intravascular transfusions may not only elevate hemoglobin levels in fetuses, but also result in a response of the cell-mediated part of their adaptive immune system.

Keywords: fetal hemolytic disease, intrauterine intravascular blood transfusion, adaptive immunity.

В основе гемолитической болезни плода и новорожденного (ГБПН) лежит иммунологическая несовместимость крови матери и плода по различным антигенам, в 95% наблюдений — по резус-фактору.

В последние годы в связи с широким внедрением кордоцентеза расширены возможности диагностики и лечения гемолитической болезни плода (ГБП), а также изуче-

ния ее патогенеза. Благодаря кордоцентезу становится возможным не только диагностировать ГБП, оценить степень тяжести заболевания и определить показания к проведению внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии плоду, но и оценить показатели крови развивающегося плода, изучить влияние на них внутриутробных гемотрансфузий. Как в зарубежной, так и в отечественной литературе данный вопрос широко дискутируется [1—9].

Пуповинная кровь является уникальной средой, отражающей колебания гомеостаза в системе мать—плацента—плод, а также содержащая большое количество клеток-предшественников, ростовых факторов и цитокинов, определяющих развитие плода в антенатальном и раннем постнатальном периодах. Физиологическое и особенно патологическое течение беременности оказывает влияние на клеточный состав пуповинной крови новорожденных. По ряду показателей пуповинная кровь, полученная сразу после рождения ребенка и пережатия пуповины, отличается от показателей крови внутриутробного плода [10—16].

В России удельный вес резус-иммунизированных женщин достигает 1,2%, число случаев ГБН колеблется от 0,1 до 2,5%, в структуре перинатальной заболеваемости она составляет 9,9%, перинатальной смертности — 1,46% [5, 17—19]. Результаты эпидемиологических исследований, проведенных в различных регионах страны, существенно отличаются от данных зарубежных авторов. Беременность с тяжелыми формами ГБПН часто осложняется угрозой прерывания, преэклампсией, задержкой роста плода, что требует преждевременного родоразрешения, в том числе оперативным путем [20—24].

Несмотря на колоссальные успехи, достигнутые в последние десятилетия в этой области, проблема предотвращения уже запущенного процесса ГБПН далека от своего решения и требует дальнейшего изучения.

Цель настоящего исследования — оценка влияния внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии на динамику показателей врожденного и адаптивного иммунитета пуповинной крови плодов и новорожденных с гемолитической болезнью, связанной с резус-конфликтом.

Материал и методы

Обследованы две группы беременных, в сроках гестации 25—34 нед. Основную группу составили 16 пациенток с ГБП, обусловленной резус-конфликтом, родоразрешенных в сроках гестации 25—34 нед, путем кесарева сечения, их плоды и новорожденные.

Группу сравнения составили 10 пациенток, родоразрешенных в те же сроки гестации абдоминальным способом по причинам, не связанным с резус-конфликтом, и их новорожденные.

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России (протокол №9 от 16.02.17). В соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра, у всех женщин, которым планировалось проведение внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии, до момента включения в исследование было получено добровольное информированное согласие на проведение данной операции и использование биологического материала.

Диагноз ГБП устанавливали после проведения диагностического кордоцентеза, основным показанием к вы-

полнению которого было увеличение пиковой систолической скорости кровотока в средней мозговой артерии плода (ПССМА).

При анализе числа беременностей и родов у пациенток установлено, что в основной группе многорожавших было 8 женщин, имевших в анамнезе 3 беременности и более, среди которых гемолитическая болезнь новорожденных наблюдалась у 3 пациентов. В группе сравнения была одна многорожавшая.

У женщин обеих групп исследовали иммунологические показатели (лейкоциты, лимфоциты, CD3+, CD4+, CD8+, CD16/56, CD3CD23, CD54+, CD3CD95, компоненты C3 и C4 системы комплемента) и клинико-биохимические (гемоглобин, общий билирубин) при родоразрешении. В основной группе эти же показатели дополнительно анализировали до и после внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии. Показанием к гемотрансфузии являлось снижение уровня гемоглобина менее 100 г/л и гематокрита менее 30% в пуповинной крови плода. Использовали четырехкратно отмытую резус-отрицательную эритроцитарную взвесь 0 (I) группы.

С целью контроля эффективности лечения проводили ультразвуковое исследование с доплерометрией для оценки ПССМА плодов до и после внутриутробной гемотрансфузии.

Имунофенотипирование лимфоцитов осуществляли методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе FACS Calibur с использованием наборов моноклональных антител. Клинико-биохимические показатели определялись на автоматических анализаторах ABX MICROS 60, MINDRAY BC 5300, HUMASTAR-600.

Критерии включения: наличие диагностированной гемолитической болезни плода по резус-фактору и новорожденного ребенка; отсутствие гемолитической болезни у пациентки и ее недоношенного новорожденного родоразрешенной в аналогичных сроках гестации.

Критерии исключения: многоплодная беременность; тяжелая экстрагенитальная патология матери; системные иммунные заболевания матери; ВПП плода; неиммунная водянка плода.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью стандартных компьютерных программ Microsoft Excel XP. Сравнение средних значений двух выборочных совокупностей проводили с определением *t*-критерия Стьюдента и уровня значимости (*p*). Статистически достоверным считали различия, уровень значимости (*p*) которых был менее 0,05. Данные представлены в виде среднего значения (*M*) и ошибки среднего (*m*).

Результаты и обсуждение

При анализе результатов доплерометрического исследования плодов до внутриутробного внутрисосудистого переливания крови и после него выявлено достоверное уменьшение значений ПССМА с $62,23 \pm 12,91$ до $47,15 \pm 4,1$ Мом ($p < 0,05$). При оценке результатов лабораторного исследования их пуповинной крови выявлено достоверное повышение уровня гемоглобина плодов с $72,71 \pm 16,27$ до $146,40 \pm 26,31$ г/л ($p < 0,05$). Концентрация общего билирубина достоверно значимых отличий не имела $80,45 \pm 35,15$ мкмоль/л против $85,20 \pm 22,71$ мкмоль/л ($p > 0,05$).

В результате анализа иммунологических показателей пуповинной крови у плодов с ГБ в связи с резус-конфликтом после однократного внутриутробного внутрисосуди-

Таблица 1. Динамика иммунологических показателей пуповинной крови плодов с ГБ до ВПК и после него, а также в момент их рождения; основная группа: $n=16$; ($M \pm m$)

Показатель	До ВПК	После ВПК	<i>p</i>	Новорожденные
Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	9,54 \pm 13,05	5,68 \pm 0,75	0,265	8,93 \pm 5,67
Лимфоциты, %	62,50 \pm 28,45	52,00 \pm 5,83	0,220	45,31 \pm 16,54
CD3+ (Т-клетки), %	32,02 \pm 31,79	67,00 \pm 12,85	0,032	51,70 \pm 26,88
CD4+, %	36,00 \pm 19,73	43,60 \pm 16,49	0,244	35,83 \pm 12,77
CD8+, %	14,25 \pm 6,63	16,40 \pm 3,58	0,261	18,17 \pm 4,62
CD 16/56, %	2,25 \pm 0,89	2,62 \pm 0,80	0,412	3,67 \pm 2,16
CD19+, %	16,00 \pm 9,78	15,20 \pm 6,06	0,437	17,67 \pm 4,68
CD3CD23, %	5,13 \pm 2,64	9,50 \pm 0,71	0,028	7,00 \pm 2,61
CD54+, %	14,38 \pm 7,89	14,20 \pm 4,92	0,483	17,20 \pm 3,90
CD3CD95, %	2,38 \pm 1,06	3,00 \pm 0,71	0,136	3,00 \pm 1,79
С3, мг/дл	78,12 \pm 26,83	33,20 \pm 25,07	0,033	93,22 \pm 60,73
С4, мг/дл	11,14 \pm 2,67	12,53 \pm 6,01	0,288	12,30 \pm 5,43

Примечание. ВПК — внутриутробное переливание крови.

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей пуповинной крови новорожденных основной группы и группы сравнения ($M \pm m$)

Показатель	Основная группа ($n=16$)	Группа сравнения ($n=10$)	<i>p</i>
Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	8,93 \pm 5,67	4,05 \pm 0,13	0,07
Лимфоциты, %	45,31 \pm 16,54	71,50 \pm 3,87	0,01
CD3+, %	51,70 \pm 26,88	66,50 \pm 5,32	0,16
CD4+, %	35,83 \pm 12,77	48,25 \pm 6,50	0,06
CD 8+, %	18,17 \pm 4,62	17,00 \pm 2,58	0,33
CD16/56, %	3,67 \pm 2,16	3,25 \pm 1,71	0,38
CD19+, %	17,67 \pm 4,68	16,50 \pm 3,42	0,34
CD3CD23, %	7,00 \pm 2,61	5,25 \pm 0,96	0,12
CD54+, %	17,20 \pm 3,90	15,00 \pm 4,08	0,22
CD3CD95%	3,00 \pm 1,79	2,00 \pm 0,82	0,22
С3, мг/дл	93,22 \pm 60,73	134,15 \pm 7,82	0,11
С4, мг/дл	12,30 \pm 5,43	13,58 \pm 7,71	0,38

стого переливания крови прослеживалась следующая динамика (**табл. 1**).

При исследовании иммунологических показателей пуповинной крови плодов после гемотрансфузии получено увеличение CD3+ (Т-клетки) и CD3CD23 (В-клетки), а также достоверно значимое уменьшение компонента С3 системы комплемента. Выявленные иммунологические изменения могут быть следствием ранней реакции иммунной системы плода в ответ на внутриутробную гемотрансфузию.

Сравнительный анализ иммунологических показателей пуповинной крови новорожденных обеих групп показал статистически значимые отличия (**табл. 2**).

При исследовании иммунологических показателей пуповинной крови новорожденных выявлено достоверное снижение уровня лимфоцитов у новорожденных основной группы (45,31 \pm 16,54) по сравнению с таковым у новорожденных группы сравнения (71,50 \pm 3,87) при $p < 0,05$. По результатам остальных показателей достоверных отличий не выявлено.

Таким образом, ранняя реакция иммунной системы на внутрисосудистую гемотрансфузию демонстрирует «умение» плода развивать ответную реакцию клеточного звена адаптивной иммунной системы (CD3+, CD3CD23, лимфоциты) еще с периода внутриутробной жизни.

Возможно, выявленные нами иммунологические изменения могут быть использованы при определении кратности внутриутробных гемотрансфузий, прогноза течения периода ранней адаптации, а также для своевременной коррекции возникающих отклонений у детей с гемолитической болезнью по резус-фактору.

Выводы

1. Проведение внутриутробной гемотрансфузии способствует уменьшению гипоксии плода и является эффективным методом коррекции анемии, что подтверждается снижением пиковой скорости кровотока в средней мозговой артерии плода и повышением уровня его гемоглобина.

2. Снижение уровня лимфоцитов у новорожденных, а также уменьшение компонента С3 системы комплемента и повышение CD3+ (Т-клеток) и В-лимфоцитов по рецептору IgE (CD3CD23) у плодов свидетельствуют об ответной реакции клеточного звена адаптивной иммунной системы на гемотрансфузию.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Макагон А.В., Андрушина И.В. Диагностика и лечение гемолитической болезни плода. *Акушерство и гинекология*. 2012;1:43-48. [Makagon AV, Andrushina IV. Diagnosis and treatment of hemolytic disease of the fetus. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012;1:43-48. (In Russ.)].
- Белуга М.В. Диагностика и внутриутробная коррекция анемии при гемолитической болезни плода. *Гродненский государственный медицинский университет*. 2012;2:38:37-40. [Beluga MV. Diagnosis and intrauterine correction of anemia in hemolytic disease of the fetus. *Grodnenskiy gosudarstvennyy meditsinskii universitet*. 2012;2:38:37-40. (In Russ.)].
- Шейбак Л.Н. Современные представления об особенностях гемолитической болезни плода и новорожденного. *Гродненский государственный медицинский университет*. 2015;1:49:134-138. [Sheibak LN. Modern ideas about the features of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Grodnenskiy gosudarstvennyy meditsinskii universitet*. 2015;1:49:134-138. (In Russ.)].
- Минеева Н.В. Группы крови человека (основы иммунологии). Санкт-Петербург. 2010;360. [Mineeva NV. Gruppy krovi cheloveka (osnovy immunologii). *Human blood groups (the basis of immunology)*. St. Petersburg. 2010;360 (In Russ.)].
- Дронова А.В. Возможности ультразвукового исследования в диагностике и внутриутробной коррекции гемолитической болезни плода. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2015;5:5:623. [Dronova AV. Possibilities of ultrasound investigation in diagnosis and intrauterine correction of fetal hemolytic disease. *Vyulleten' meditsinskikh internet-konferentsii*. 2015;5:5:623. (In Russ.)].
- Харкевич О.Н., Семенчук В.Л., Белуга М.В., Войнилович Т.И. Алгоритм проведения кордоцентеза и внутриутробной гемотрансфузии. Минск: Изд. Центр БГУ. 2010;12. [Kharkevich O.N., Semenchuk V.L., Beluga M.V., Voinilovich T.I. *Algoritm provedeniya kordocentеза i vnutriutrobnoi gemotransfuzii*. (Algorithm for carrying out cordocentesis and intrauterine blood transfusion). Minsk: Izd. Center of BGU. 2010;12. (In Russ.)].
- Федорова Н.И., Тетрашвили Н.К., Файзуллин Л.З., Карнаухов В.Н., Амбрумянц Д.В., Сидельникова В.М. Неинвазивная диагностика резус-принадлежности плода по крови матери на ранних сроках беременности. *Вестник РУДН: Серия Медицина*. 2009;6:137-141. [Fedorova NI, Tetruashvili NK, Faizullin LZ, Karnaukhov VN, Ambrumyants DV, Sidel'nikova VM. Non-invasive diagnosis of Rh-factor of blood fetus in early pregnancy. *Vestnik RUDN: Seriya Meditsina*. 2009;6:137-141. (In Russ.)].
- Конопляников А.Г. Современные аспекты патогенеза гемолитической болезни плода и новорожденного. *Вестник РГМУ*. 2008;6:38-42. [Konoplyannikov AG. Modern aspects of the pathogenesis of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Vestnik RGMU*. 2008;6:38-42. (In Russ.)].
- Баранов А.А., Володин Н.Н., Самсыгина Г.А. Рациональная фармакотерапия детских болезней. М.: Литтерра. 2007;123. [Baranov AA, Volodin NN, Samsygina GA. *Ratsional'naya farmakoterapiya detskikh boleznei*. (Rational pharmacotherapy of childhood diseases). Moscow: Litterra. 2007;123. (In Russ.)].
- Румянцев А.Г., Румянцев С.А. Пуповинная кровь как источник информации о состоянии плода. *Педиатрия*. 2012;3:76-91. [Rumyantsev AG, Rumyantsev SA. Pupovinnaya krov' kak istochnik informatsii o sostoyanii ploda. *Pediatriya*. 2012;3:76-91. (In Russ.)].
- Broxmeyer HE. Cord Blood: biology, immunology, banking, and clinical transplantation. *American Association of Blood Banks Bethesda Maryland*. 2004;455.
- Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells [review]. *Int J Cell Cloning*. 1990;8:Suppl. 1:76-91.
- Рациональная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии: монография*. Под ред. Кулакова В.И., Серова В.Н. М.: Литтерра. 2013;720. [Ratsional'naya farmakoterapiya v akusherstve i ginekologii: Monografiya. (Rational pharmacotherapy in obstetrics and gynecology: Monograph). Ed. Kulakov VI, Serov VN. Moscow: Litterra Publ. 2013;720. (In Russ.)].
- Филиппов О.С. Плацентарная недостаточность. М.: МЕДпресс-информ. 2009;160. [Filippov OS. *Platsentarnaya nedostatochnost'*. (Placental insufficiency). Moscow: MEDpress-inform Publ. 2009;160. (In Russ.)].
- Krishna U, Bhalerao S. Placental insufficiency and fetal growth Restriction. *J Obstet Gynaecol India*. 2011;5:505-511.
- Чистякова Г.Н. Состояние клеточного и гуморального иммунитета у детей, перенесших гемолитическую болезнь новорожденного. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2015;4:5:22-26. [Chistyakova GN. The state of cellular and humoral immunity in children who underwent haemolytic disease of the newborn. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2015;4:5:22-26. (In Russ.)].
- Айламазян Э.К. *Изоиммунизация при беременности*. Ст.-Петербург: Н-Л. 2012;27. [Ailamazyan EK. *Izoimmunizatsiya pri beremennosti*. (Isoimmunization in pregnancy). St. Petersburg: N-L. 2012;27. (In Russ.)].
- Гемолитическая болезнь плода у беременных с резус-сенсibilizацией. Диагностика, лечение, профилактика: методическое письмо Минздравоохранения России №154/10/2-12699. М. 2011;24. [Metodicheskoe pis'mo Minzdravsotsrazvitiya Rossii № 154/10/2-12699. (Methodical letter of the Ministry of Health and Social Development of Russia №154/10/2-12699). Moscow. 2011;24. (In Russ.)].
- Сидельникова В.М. *Гемолитическая болезнь плода и новорожденного*. М.: Триада-Х. 2004;192. [Sidel'nikova VM. *Gemolitičeskaya bolez'n' ploda i novorozhdennogo*. (Hemolytic disease of the fetus and newborn). Moscow: Triada-X Publ. 2004;192. (In Russ.)].
- Кувшинова Л.А., Шемякина О.О., Петренко Ю.В. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. Клинико-практические аспекты. *Детская медицина Северо-Запада*. 2010;1:34-40. [Kuvshinova LA, Shemyakina OO, Petrenko YuV. Hemolytic disease of the fetus and newborn. Clinical and practical aspects. *Detskaya meditsina severo-zapada*. 2010;1:34-40. (In Russ.)].
- Савельева Г.М., Шалина Р.И., Курцер М.А., Клименко П.А., Сичинава Л.Г., Панина О.Б., Плеханова Е.Р., Выхристюк Ю.В., Лебедев Е.В. *Акушерство и гинекология. Руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006;1027. [Savel'eva GM, Shalina RI, Kurtser MA, Klimentko PA, Sichinava LG, Panina OB, Plekhanova ER, Vykhristyuk YuV, Lebedev EV. *Akusherstvo i ginekologiya. Rukovodstvo dlya vrachei*. (Obstetrics and gynecology. Guidelines for doctors). Moscow: GEOTAR-Media Publ. 2006;1027. (In Russ.)].
- BCSH guideline for the use of anti D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *H. Qureshi. Transfus Med*. 2014;24:1:8-20.
- Anti-D administration after spontaneous miscarriage for preventing Rhesus alloimmunisation. L. Karanth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;CD009617.
- Errors in anti-D immunoglobulin administration: retrospective analysis of 15 years of reports to the UK confidential haemovigilance scheme. P.H. Bolton-Maggs. *BJOG*. 2013;120:7:873-878.

Поступила 12.07.17