

Значение показателей субпопуляций лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных беременных

Н.Л. Громыко¹, Е.И. Барановская¹, Д.Л. Якушев²

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Институт радиобиологии НАН Беларуси

Гомель, Республика Беларусь

Significant differences in content of main lymphocytes subpopulations in HIV positive pregnant women

N.L. Gromyko¹, E.I. Baranovskaya¹, D.L. Yakushev²

¹Gomel State Medical University

Gomel, Belarus

Аннотация

При помощи метода проточной цитофлюориметрии проведено изучение параметров клеточного иммунитета у 35 ВИЧ-позитивных и 48 ВИЧ-негативных беременных. Показано негативное влияние ВИЧ-инфекции на беременность. Выявлены достоверные различия в содержании основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови ($p \leq 0,05$) у ВИЧ-позитивных в отличие от ВИЧ-негативных беременных. Выявлен ряд аномалий фенотипа при ВИЧ-инфекции: повышение экспрессии маркеров поздней активации ($p \leq 0,001$), маркеров апоптоза ($p \leq 0,01$), а также снижение естественных киллеров в периферической крови ($p \leq 0,05$).

Ключевые слова

Проточная цитофлюориметрия, ВИЧ-инфекция, беременность

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), один из острых и актуальных для нашей страны и мира в целом вопрос. На сегодняшний день регистрируются высокие темпы распространения ВИЧ/СПИДа в Беларуси. В связи с возрастанием частоты полового пути передачи инфекции увеличивается

Summary

We studied parameters of cellular immunity in HIV-positive and HIV-negative pregnant women by flow cytometry. HIV-infection has negative influence on pregnancy. Significant differences in content of main lymphocytes subpopulations were revealed in HIV positive pregnant women ($p \leq 0,05$). Some anomalies of lymphocytes phenotype were revealed: high expression of activation markers ($p \leq 0,001$), markers of apoptosis ($p \leq 0,01$) and reducing of natural killers ($p \leq 0,05$) in peripheral blood.

Key words

Flow cytometry, HIV-infection, pregnancy.

количество ВИЧ-инфицированных беременных и рожденных ими детей.

От состояния здоровья матерей зависит исход беременности и состояние здоровья ребенка. Образ жизни, сопутствующая патология, хроническая никотиновая и алкогольная интоксикация, социальный статус женщины от-

носятся к преплацентарным причинам развития плацентарной недостаточности и оказывают неблагоприятное влияние на течение беременности, родов и состояние новорожденного [1].

Во время физиологического развития процесса гестации происходит выраженная перестройка иммунной системы женщины. Белки и гормоны плаценты принимают активное участие в становлении и регуляции адаптационных изменений иммунной системы беременной женщины [2]. При беременности возникают существенные колебания параметров иммунитета со стороны фагоцитарного, Т- и В-клеточного звеньев иммунитета, что в ряде случаев ведет к развитию осложнений беременности, родов и послеродового периода [2].

С учетом важной роли системы иммунитета в поддержании физиологических механизмов гомеостаза актуальным представляется изучение иммунной системы ВИЧ-инфицированных беременных.

Цель работы: изучить клиническое значение основных показателей клеточного иммунитета у ВИЧ-инфицированных беременных.

Материалы и методы

Всего обследовано 83 беременные женщины.

Женщины, включенные в исследование, были разделены на две группы: основная – ВИЧ-инфицированные беременные (35 человек) и контрольная – беременные без ВИЧ-инфекции (48 человек). Критерии включения в основную группу: установленный ВИЧ-положительный статус у беременной. Критерии включения в контрольную группу: ВИЧ-негативные беременные. Критерии исключения из контрольной группы: наличие у беременных хронических инфекционных заболеваний, осложняющих течение беременности и служащих причиной вторичного иммунодефицита; наличие острых вирусных инфекций и аллергических состояний, изменяющих параметры иммунного статуса.

Все беременные включены в исследование после получения информированного письменного согласия.

Диагноз ВИЧ-инфекция был установлен с помощью лабораторного исследования (ИФА, иммунный блот). При анализе течения беременности использованы следующие критерии: клиничко-анамнестический, лабораторный (гематологические, бактериоскопические и бактериологические исследования), инструментальный (данные ультразвукового и доплерометрического исследования).

Исследования иммунного статуса проводились в биохимической лаборатории НИИ радиобиологии НАН Беларуси. Оценку иммунного статуса проводили в 1 и 3 триместре беременности: в сроке беременности 7-14 недель обследовано 10 беременных основной группы и 27 беременных контрольной группы, в сроке беременности 36-40 недель соответственно 25 и 21 беременная.

Материалом для исследования явилась гепаринизированная венозная кровь. Забор крови осуществляли в утреннее время натощак. Анализ производился не позднее 6 часов от момента забора крови. Популяционный и субпопуляционный составы лимфоцитов определяли с помощью проточной лазерной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител с двойной и тройной меткой («Beckman Coulter», США). Для этого была использована CDC-панель: CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5, CD3-FITC/CD95-PE, IgG1-FITC/IgG1-PE, CD25-FITC/CD4-PE/CD3-ECD, CD3-FITC/HLA-DR-PE, CD3-FITC/CD16⁺56-PE, согласно которой определяли содержание Т-лимфоцитов, хелперно-индукторной и супрессорно-цитотоксической субпопуляций Т-лимфоцитов, естественных киллеров и естественных киллеров с фенотипом Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов с маркерами апоптоза. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре «EPICS XL» («Beckman Coulter», США) с помощью программного обеспечения «СХР 2.2» («Beckman Coulter», США). Нормативные данные по изучаемым показателям были предоставлены белорусским представителем «Beckman Coulter». Абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов, несущих соответствующие маркеры, в 1 мкл крови, рассчитывалось относительно абсолютного числа лимфоцитов, принимаемых за 100%. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс (CD4⁺/CD8⁺).

Использовались следующие математико-статистические методы: описательная статистика количественных данных в группах; нормальность распределения количественных признаков в выборке с помощью критерия Шапиро-Уилка; сравнение групп с помощью рангового непараметрического метода критерия Манна-Уитни (при отсутствии нормального распределения признаков); корреляционный анализ (коэффициент корреляции – r) двух признаков непараметрическим методом Спирмена

для оценки направления, силы, статистической значимости корреляционной связи между различными клинико-лабораторными, иммунологическими признаками. Для оценки значимости различия частот наблюдений использован критерий χ^2 - угловое преобразование Фишера.

Результаты и обсуждение

Средний возраст беременных в группах составил $25,3 \pm 2,3$ лет и $26,3 \pm 2,3$ лет соответственно. В основной группе половой путь передачи вируса отмечен в $84 \pm 7,3\%$ случаев, инъекционный в $16,0 \pm 7,3\%$ случаев. Иммуносупрессия легкой степени выявлена у $44,0 \pm 9,9\%$ беременных, средней степени тяжести у $56,0 \pm 9,9\%$ беременных, тяжелая у $8,0 \pm 5,4\%$ женщин. Беременность на фоне диагностированной ВИЧ-инфекции наступила в $52,0 \pm 9,9\%$ случаев. Комбинированную антиретровирусную профилактику передачи вируса от матери к плоду получили 25 беременных.

В исследуемых группах изучена сопутствующая беременности патология. Полученные результаты показали, что у беременных с ВИЧ-инфекцией чаще встречаются заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит у $28,0 \pm 8,9\%$ беременных), дыхательной системы (хронический тонзиллит в $16,0 \pm 7,3\%$ слу-

чаев). Из гинекологических заболеваний у ВИЧ-инфицированных беременных в 2,5 раза чаще встречаются патология шейки матки и хронический сальпингоофорит. Сочетание ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С выявлено у $20,0 \pm 8,0\%$ беременных.

Течение беременности в группе ВИЧ-инфицированных беременных (25 человек) и контрольной группе (21 человек) представлено данными таблицы 1.

Проведено иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови в исследуемых группах (табл.2). При анализе экспрессии основных маркеров лимфоцитов периферической крови не обнаружено различий в содержании общего количества лейкоцитов, лимфоцитов, а также популяции $CD3^+$ лимфоцитов в исследуемых группах. Однако существенно изменяется экспрессия $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов у беременных с ВИЧ-инфекцией ($p < 0,001$) по сравнению с группой контроля в различные trimestры беременности. Соответственно изменяется иммунорегуляторный индекс. Снижение количества Т-лимфоцитов-хелперов приводит к возникновению инфекционных осложнений во время беременности. В основной группе выявлена умеренная отрицательная корреляционная связь между количе-

Таблица 1
Осложнения беременности в основной (1) и контрольной (2) группах по триместрам

Осложнения беременности и сопутствующая патология		1 триместр	2 триместр	3 триместр
Неспецифический вагинит	1	6 ($24,0 \pm 8,5\%$)***	10 ($40,0 \pm 9,7\%$)	13 ($52,0 \pm 9,9\%$)
	2	1 ($4,7 \pm 4,6\%$)*	1 ($4,7 \pm 4,6\%$)*	2 ($9,5 \pm 6,4\%$)*
Кандидозный вульвовагинит	1	3 ($12,0 \pm 6,5\%$)	2 ($8,0 \pm 5,4\%$)	5 ($20,0 \pm 8,0\%$)
	2	2 ($9,5 \pm 6,4\%$)	2 ($9,5 \pm 6,4\%$)	0
Угроза прерывания	1	3 ($12,0 \pm 6,5\%$)	4 ($16,0 \pm 7,3\%$)	1 ($4,0 \pm 3,9\%$)
	2	3 ($14,2 \pm 7,6\%$)	1 ($4,7 \pm 4,6\%$)	0
Железодефицитная анемия	1	5 ($20,0 \pm 8,0\%$)***	13 ($52,0 \pm 9,9\%$)	14 ($56,0 \pm 9,9\%$)
	2	1 ($4,7 \pm 4,6\%$)*	3 ($14,2 \pm 7,6\%$)*	4 ($19,0 \pm 8,5\%$)*
Острые респираторные вирусные инфекции	1	2 ($8,0 \pm 5,4\%$)**	7 ($28,0 \pm 8,9\%$)	4 ($16,0 \pm 7,3\%$)
	2	2 ($9,5 \pm 6,4\%$)	4 ($19,0 \pm 8,5\%$)	0
Инфекция мочевыводящих путей	1	1 ($4,0 \pm 3,9\%$)	3 ($12,0 \pm 6,5\%$)	3 ($12,0 \pm 6,5\%$)
	2	0	0	0
Фетоплацентарная недостаточность	1	0	1 ($4,0 \pm 3,9\%$)	7 ($28,0 \pm 8,9\%$)
	2	0	0	0

Примечания:

1-*по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$)

2-***по сравнению со 2 триместром ($p < 0,05$)

3-***по сравнению с 3 триместром ($p < 0,05$)

Таблица 2
Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови в группах

Показатель	Основная группа		Контрольная группа	
	1 триместр (n=10)	3 триместр (n=25)	1 триместр (n=27)	3 триместр (n=21)
Лейкоциты, кл\мкл Me (25%-75%)	5700 (5100-7900)	7000 (6300-9700)	6400# (5100-7000)	8000 (7100-8800)
Лимфоциты, % Me (25%-75%)	30 (27-31)	22 (20-26)	28 (25-32)	23 (18-26)
T-лимфоциты CD3 ⁺ , % Me (25%-75%)	77 (73-84)	77,5 (72,5-78,9)	65,1 (61,6-70,4)	76,9 (71,2-78,9)
T-лимфоциты CD3 ⁺ , кл\мкл Me (25%-75%)	1385 (1203-1598)	1213 (1020-1475)	1196 (990-1283)	1239 (1085-1496)
T-хелперы CD4 ⁺ , % Me (25%-75%)	21 * (16-23)	33,2** (21,7-38,7)	37,1 (34,9-43)	46,3 (37,6-52,1)
T-хелперы CD4 ⁺ , кл\мкл Me (25%-75%)	384 * (289-680)	462 ** (376-684)	657 ## (546-766)	758 (675-865)
T-цитотоксические CD8 ⁺ , % Me (25%-75%)	53 ** (46-63)	43,9 ** (35,5-52,4)	28,8 (24,4-33)	25,3 (22,3-31,6)
T-цитотоксические CD8 ⁺ , кл\мкл Me (25%-75%)	876 ** (855-1060)	725 *** (547-935)	491 (392-553)	505 (406-576)
ИРИ Me (25%-75%)	0,39 ** (0,25-0,58)	0,76 ** (0,38-1,09)	1,45 (1,2-1,7)	1,42 (1,2-1,6)
Естественные киллеры, CD3-CD(16+56) ⁺ , % Me (25%-75%)	-	5,05 * (2,1-7,5)	-	8,62 (5,2-11)
T-клетки с киллерной активностью CD3 ⁺ CD(16+56) ⁺ , %Me (25%-75%)	-	4,0 (0,9-8,2)	-	3,2 (1,3-5,8)
T-лимфоциты с маркерами поздней активации CD3 ⁺ DR ⁺ , %Me (25%-75%)	-	2,9 ** (1,4-6,7)	-	0,6 (0,5-1,7)
Активированные T-хелперы CD4 ⁺ CD25 ⁺ , % Me (25%-75%)	-	1,4*** (0,8-1,6)	-	2,4 (2,0-3,9)
Активированные T-лимфоциты CD3 ⁺ CD25 ⁺ , % Me (25%-75%)	-	1,15 *** (0,7-1,45)	-	2 (1,8-3,8)
Клетки с маркерами апоптоза CD95 ⁺ , % Me (25%-75%)	-	63,4 *** (54,9-71,0)	-	51,1 (44,5-58,2)

Примечания:

1-# статистически значимые различия по сравнению с 3 триместром контрольной группы (p<0,001)

2-## статистически значимые различия по сравнению с 3 триместром контрольной группы (p<0,05)

3-* статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

4-** статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p<0,001)

5-*** статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p<0,01)

ством Т-лимфоцитов-хелперов и частотой неспецифического вагинита ($r=-0,39$), частотой острых респираторных заболеваний ($r=-0,41$), частотой инфекций мочевыводящих путей ($r=-0,33$). Кроме того установлена положительная прямая корреляционная связь между содержанием цитотоксических лимфоцитов в периферической крови и частотой инфекционных заболеваний мочевыделительной системы ($r=0,52$). У ВИЧ-негативных женщин с увеличением срока беременности снижается гестационная иммуносупрессия, что проявляется статистически значимым ($p \leq 0,05$) повышением количества $CD4^+$ субпопуляций лимфоцитов в 3 триместре гестации. Это связано с уменьшением выработки продуктов фетоплацентарного комплекса, снижением иммуносупрессивного действия белков и гормонов плаценты. Иммунологические изменения при ВИЧ-инфекции, связанные с гестационной перестройкой, не восстанавливаются к концу беременности, что может приводить к осложнениям после родоразрешения, а также более быстрой прогрессии заболевания в послеродовый период.

Снижение общего количества $CD4^+$ лимфоцитов при ВИЧ-инфекции приводит к статистически значимому ($p \leq 0,01$) уменьшению экспрессии $CD4^+CD25^+$ субпопуляции лимфоцитов. $CD4^+CD25^+$ клетки играют ключевую роль в поддержании и сохранении беременности [3]. В нашем исследовании уменьшение содержания данной популяции клеток у ВИЧ-инфицированных беременных привело к возрастанию частоты угрозы невынашивания беременности ($r=-0,30$).

Нами выявлены статистически достоверные отличия в группах по содержанию естественных киллеров ($CD3^+CD16^+56^+$) в периферической крови ($p \leq 0,05$). Снижение количества естественных киллеров в группе ВИЧ-инфицированных приводит к возникновению угрозы невынашивания беременности ($r=-0,39$), развитию фетоплацентарной недостаточности ($r=-0,43$), появлению острых респираторных заболеваний ($r=-0,32$). Естественные киллеры выполняют функцию иммунного надзора, играют важную роль в первичной иммунной защите [4]. Снижение количества данных клеток у ВИЧ-инфицированных беременных может приводить к ухудшению противовирусной и противоопухолевой защиты в послеродовом периоде и способствовать развитию оппортунистических заболеваний.

Существенно изменена экспрессия активационных маркеров у ВИЧ-инфицированных беременных. Нами выявлено статистически значимое ($p \leq 0,001$) увеличение уровня экспрессии HLA-DR на лимфоцитах периферической крови. Усиление экспрессии активационных маркеров сопряжено с увеличением частоты острых респираторных вирусных инфекций ($r=0,60$) и инфекций мочевыводящих путей ($r=0,34$) у беременных с ВИЧ-инфекцией. В патогенезе иммунологических нарушений при ВИЧ-инфекции важную роль играет активация клеток иммунной системы, последствия которой крайне неблагоприятны, так как размножение вируса происходит только в активированных Т-клетках [5]. Это способствует увеличению вирусной нагрузки в крови матери и повышает риск передачи вируса от матери к плоду.

Проведенные исследования выявили увеличение в группе ВИЧ-инфицированных беременных числа клеток с мембранным маркером готовности к апоптозу $CD95^+$ ($p \leq 0,01$). При этом выявлена умеренная отрицательная корреляционная связь между количеством $CD95^+$ и $CD4^+$ клеток, что характеризует высокую чувствительность лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу. Активированные Т-клетки наиболее чувствительны к апоптозу, что подтверждается положительной умеренной силы корреляционной связью ($r=0,38$) между экспрессией $CD95^+$ и HLA-DR на лимфоцитах периферической крови. Fas-зависимый апоптоз является основным механизмом апоптотической гибели клеток при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях [6].

Выводы

1. ВИЧ-инфекция и беременность оказывают взаимное негативное влияние. Иммуносупрессия, связанная с ВИЧ-инфекцией, осложняет течение беременности у данного контингента женщин. В то же время беременность сама по себе способствует более выраженному снижению иммунологической реактивности у ВИЧ-инфицированных женщин.
2. При ВИЧ-инфекции гестационная иммуносупрессия не восстанавливается к концу срока беременности в отличие от здоровых беременных ($p \leq 0,05$).
3. У ВИЧ-инфицированных беременных снижение количества Т-лимфоцитов-хелперов, а также естественных киллеров приводит к возникновению инфекционно-воспалительных осложнений, таких как неспецифичес-

кий вагинит ($r=-0,39$), острые респираторные заболевания ($r=-0,41$), инфекции мочевыводящих путей ($r=-0,33$). На этом фоне выше частота развития фетоплацентарной недостаточности инфекционного генеза.

4. Наряду со снижением количества $CD4^+$ клеток, при ВИЧ-инфекции возникает ряд

аномалий фенотипа лимфоцитов, повышается экспрессия маркеров активации ($p \leq 0,001$), апоптоза ($p \leq 0,01$), что в свою очередь приводит к более выраженному уменьшению количества Т-лимфоцитов-хелперов, а также к возрастанию вирусной нагрузки в крови матери.

Литература

1. Кудяков В.И., Орджоникидзе Н.В., Тютюнник В.Л. Плацентарная недостаточность и инфекция. М., 2004, 494 с.
2. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Иммуитет беременной женщины. М.: Медицинская книга, 2003, 226 с.
3. Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S. (et al.). Decidual and peripheral blood $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10, 347-353.
4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. М.:МИА; 2003, 604 с.
5. Ситдыкова Ю.Р., Серебровская Л.В., Кравченко А.В. Влияние высокоактивной антиретровирусной терапии на систему иммунитета больных с ВИЧ-инфекцией. *Терапевтический архив*, 2002, 11, 80-82.
6. Поташнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами. *Иммунология*, 2002, 4, 237-242.