

тяжести патологического процесса, что является подтверждением взаимосвязи между параметрами функционального состояния микроциркуляторного русла и показателями метаболической активности эндотелиальных клеток. Повреждение эндотелия сосудов приводит к подавлению процессов ангиогенеза в результате как снижения продукции факторов роста так и снижения чувствительности эндотелиоцитов к проангиогенным стимулам, а развивающаяся вследствие этого гипоксия может способствовать избыточной продукции провоспалительных цитокинов и нарушению механизмов фетопротекции.

### Литература

1. Бурлев В. А., Дубинская Е. Д., Ильясова Н. А. Антиангиогенная терапия в гинекологии: настоящее и будущее. Проблемы репродукции 2005; 6: 14-20.
2. Никитина Л. А., Демидова Е. М., Радзинский В. Е. и др. Роль матриксных белков, цитокинов и факторов ангиогенеза маточно-плацентарного комплекса в регуляции имплантации и плацентации. Акушерство и гинекология 2007; 3: 5-10.
3. Krukier I. Production of NO and oxidative destruction of pro-teins in the placenta during normal pregnancy and placental insufficiency. Bull Exp Biol Med 2003; 136(4):369-71.
4. Учакин П. Н., Учакина О. Н., Тобин Б. В. и др. Нейро-эндокринная регуляция иммунитета. Вестник Российской АМН 2007; 9: 26-32.
5. Хонина Н. А., Пасман Н. М., Останин А. А. и др. Особенности продукции цитокинов при физиологической и осложненной беременности. Акушерство и гинекология 2006; 2: 11-5.
6. Чистякова Г. Н. Иммунные механизмы формирования перинатальной патологии. Автореф. дис...д-ра мед. наук. Челябинск, 2005: 52 с.
7. Чистякова Г. Н., Газиева И. А., Ремизова И. И. и др. Оценка цитокинового профиля при физиологической и патологически протекающей беременности. Цитокины и воспаление 2007; 6(1): 3-8.
8. Sargent I, Redcliffe J, Borzychowski A. et al. The role of the innate immune system in type1/type2 immunity shifts in normal peganancy and pre-eclampsia. AJRI 2004; 51: 460-1.
9. Амчиславский Е. И., Соколов Д. И., Старикова Э. А. и др. Цитокиновый контроль процесса ангиогенеза. Медицинская иммунология 2003; 5(5-6): 493-506.
10. Старикова Э. А., Амчиславский Е. И., Соколов Д. И. и др. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Медицинская иммунология 2003; 5(1-2): 39-48.
11. Брагина Л. Б. Состояние функции эндотелия при физиологическом течении беременности и гестозе. Мать и дитя: материалы 9-го Всероссийского Научного форума. М., 2007: 29-30.
12. Климов В. А. Эндотелий при физиологической беременности. Акушерство и гинекология 2006; 5: 11-4.

## Маркеры нарушения иммунологической адаптации новорожденных, развивавшихся в условиях хронической гипоксии

Г. Н. Чистякова, И. А. Газиева, Е. Ю. Скареднова, И. И. Ремизова

Отделение иммунологии и микробиологии ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

## Markers of the compromised immune adaptation of the newborns developed under the conditions of chronic intrauterine hypoxia

G. N. Chistyakova, I. A. Gazieva, E. J. Skarednova, I. I. Remizova

Federal Agency of High-Tech Medicine, Ural Research Institute of Maternity and Infancy Welfare, Ekaterinburg, Russia

### Резюме

Целью исследования явилась оценка особенностей функционального состояния иммунокомпетентных клеток новорожденных, перенесших хроническое гипоксическое воздействие. Проведено иммунологическое обследование в динамике раннего периода адаптации 47 новорожденных от женщин, беременность которых была осложнена фетоплацентарной недостаточностью (ФПН). Группу сравнения составили 42 здоровых новорожденных от женщин, беременность которых протекала физиологически. Функциональную активность лимфоцитов оценивали методом проточной цитофлюориметрии по уровню экспрессии маркеров CD25, CD95, CD45RO, CD45RA. Функциональное состояние клеток моноцитарно-макрофагальной системы оценивали по спонтанной продукции цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6 методом иммуноферментного анализа. Установлено, что под воздействием перенесенной хронической гипоксии у детей от женщин с ФПН имеет место активация как лимфоцитов, так и клеток моноцитарно-макрофагального ряда. В пуповинной крови новорожденных

Г. Н. Чистякова — д. м. н., доцент, руководитель отделения иммунологии и микробиологии;

И. А. Газиева — к. б. н., старший научный сотрудник отделения иммунологии и микробиологии;

Е. Ю. Скареднова — заочный аспирант;

И. И. Ремизова — к. б. н., научный сотрудник отделения иммунологии и микробиологии.

основной группы зафиксировано увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры негативной активации и снижение численности лимфоцитов, несущих рецепторы к факторам выживания, на фоне повышенного уровня проапоптотических медиаторов в сыворотке. Преобладание процессов негативной активации лимфоцитов сопровождается смещением соотношения клеток памяти и наивных клеток в сторону некоммутированных лимфоцитов. Выявленные маркеры могут служить проявлением нарушения ранней иммунологической адаптации этих детей и критерием риска развития перинатальной патологии.

**Ключевые слова:** новорожденные, хроническая гипоксия, иммунокомпетентные клетки, маркеры активации, цитокины.

## Resume

The research was aimed at the estimation of the peculiarities of the functional state of the immunocompetent cells of newborns come through chronic hypoxic influence. Immunological examination during early adaptation period was performed in 47 newborns of the women with pregnancy, complicated by fetoplacental insufficiency (FPI). Group of comparison consisted of 42 healthy newborns of women with physiological pregnancy development. Lymphocytes' functional activity was estimated by flow cytometric method using the expression of CD25, CD95, CD45RO, CD45RA. Functional status of the monocytes-macrophages was estimated by the spontaneous production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , и IL-6 using immunoenzyme analysis. It has been diagnosed that under the influence of chronic hypoxia activation of lymphocytes and monocytes-macrophages group cells took place in the newborns. In the umbilical blood of the newborns from the main group increased quantity of cells, expressing negative activation markers and decrease of the number of lymphocytes which have receptors to the factors of surviving, on the background of the increased serum level of apoptosis mediators, has been diagnosed. Dominance of the negative activation of lymphocytes is accompanied by the dislocation of memory cells and na $\acute{v}$ e cells proportion towards noncommitted lymphocytes. The revealed markers may be the sign of the damage of early immunological adaptation of these children and may be used as the criterion of the risk of perinatal pathology development.

**Key words:** newborns, chronic hypoxia, immunocompetent cells, markers of activation, cytokines

## Введение

Первая неделя жизни ребенка представляет собой период функциональной перестройки всех органов и систем. Роль иммунной системы в период ранней постнатальной адаптации чрезвычайно важна. В процессе перехода из стерильных условий внутриутробного развития в условия повышенной антигенной нагрузки неизбежно изменяется состояние различных звеньев иммунной системы. В результате одновременно происходят разнонаправленные процессы: постепенное становление адекватного иммунного ответа, формирование иммунологической памяти и поддержание иммунологической толерантности, сдерживание возможного развития гиперергических реакций и воспаления. Установление оптимального баланса этих процессов в период новорожденности определяет способность организма ребенка к полноценной адаптации к условиям внеутробной жизни.

Влияние хронической гипоксии в период внутриутробного развития значительно затрудняет постнатальную адаптацию новорожденных и увеличивает вероятность развития заболеваний в последующие периоды жизни. Гипоксия является фактором неинфекционной природы, способным вызывать запуск цитокинового каскада в качестве ответа иммунокомпетентных клеток на активацию [1, 2, 3]. Чем раньше плод начинает испытывать воздействие неблагоприятных факторов, тем более выражены у новорожденного нарушения функций различных систем гомеостаза. В современной литературе большое количество работ посвящено исследованию роли моноци-

тарно-макрофагального звена в регуляции иммунного ответа новорожденных детей [4, 5, 6]. Системное повышение концентраций провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, а также колониестимулирующих факторов возникает в процессе распознавания и представления антигенов макрофагами и является необходимым для активации, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, изменения функционального состояния нейтрофилов. Гипоксическое воздействие, по данным литературы, также вызывает усиленный выброс цитокинов клетками моноцитарно-макрофагальной системы [7, 8]. Поскольку основными продуцентами IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6 являются именно клетки моноцитарно-макрофагального ряда, уровень спонтанной продукции этих медиаторов позволяет оценить функциональную активность данных клеток. В то же время функциональное состояние лимфоцитов новорожденных, развивавшихся в условиях хронической гипоксии, остается малоизученным.

Одним из критериев нормального протекания раннего периода адаптации новорожденных является соотношение факторов выживаемости и регуляторов, способствующих ускоренной гибели иммунокомпетентных клеток. Изменение уровня экспрессии маркеров готовности к апоптозу или пролиферации свидетельствует о нарушении баланса эндогенных стимуляторов, оказывающих иммунорегулирующее влияние на процессы активации лимфоцитов. Мембранные рецепторы к IL-2 (CD25) являются маркерами позитивной акти-

вазии клеток, в то время как усиленная экспрессия Fas-рецептора (CD95) служит проявлением негативной активации лимфоцитов. Уровень экспрессии этих молекул связан с выработкой про- (TNF- $\alpha$ ) и антиапоптотических (IL-2) факторов, дефицит или усиленный синтез которых определяет направление иммунного ответа.

**Цель исследования:** выявить особенности функционального состояния иммунокомпетентных клеток новорожденных, перенесших хроническое гипоксическое воздействие.

### Материал и методы

Проведено иммунологическое обследование в динамике раннего периода адаптации 47 новорожденных от женщин, беременность которых была осложнена фетоплацентарной недостаточностью (ФПН). Группу сравнения составили 42 здоровых новорожденных от женщин, беременность которых протекала физиологически. Уровень экспрессии маркеров функционального состояния лимфоцитов (CD25, CD95, CD45RO, CD45RA) определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием моноклональных антител того же производителя. Функциональное состояние клеток моноцитарно-макрофагальной системы оценивали по спонтанной продукции цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6. Уровень данных медиаторов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «Biosource» (Бельгия).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ «Statistica» 6.0, для оценки значимости различий между сравниваемыми группами применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

### Результаты

Оценка уровня экспрессии маркеров активации в динамике периода ранней адаптации показала, что по сравнению со здоровыми детьми у новорожденных основной группы в пуповинной крови наблюдалось снижение абсолютного содержания клеток памяти в популяции Т-хелперов в 2,4 раза (таблица).

Количество наивных клеток, напротив, проявляло тенденцию к увеличению. Снижение численности CD4+CD45RO+ -клеток сопровождалось усилением экспрессии Fas-рецептора в популяции Т-лимфоцитов. Так, в сравнении со здоровыми детьми количество клеток, обнаруживающих готовность к программированной гибели, увеличивалось в 1,4 раза. Содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к IL-2 у новорожденных от женщин, беременность которых осложнилась ФПН, снижалось в 1,7 раза в сравнении с показателями здоровых новорожденных.

Оценка функционального состояния лимфоцитов на 5-7 сутки жизни показала, что уровень экспрессии вышеуказанных рецепторов в периферической крови детей основной группы приближался к значению здоровых новорожденных, за исключением рецептора к IL-2. Численность популяции CD3+CD25+ оставалась сниженной в 1,5 раза.

Таким образом, для новорожденных, развивавшихся в условиях хронической гипоксии, было характерно статистически значимое снижение количества клеток памяти в популяции Т-хелперов, содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к IL-2, увеличение численности Т-клеток, несущих маркер готовности к апоптозу и тенденция к увеличению количества наивных Т-лимфоцитов.

К концу периода ранней адаптации данные показатели приближались к значениям, характерным для здоровых новорожденных,

Таблица. Экспрессия маркеров активации лимфоцитами крови новорожденных от женщин с ФПН ( $M \pm \sigma$ )

Показатель, $10^9/л$	Динамика обследования	Здоровые новорожденные (n=42)	Новорожденные от женщин с ФПН (n=47)
CD4CD45RO	Первые минуты	$1,06 \pm 0,83$	$0,44 \pm 0,25^{***}$
	5-7 сутки	$0,99 \pm 0,43$	$0,97 \pm 0,23$
CD3CD95	Первые минуты	$0,14 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,03^{***}$
	5-7 сутки	$0,47 \pm 0,59$	$0,47 \pm 0,11$
CD3CD45RA	Первые минуты	$1,98 \pm 1,08$	$2,42 \pm 1,50$
	5-7 сутки	$2,64 \pm 1,22$	$2,87 \pm 0,37$
CD3CD25	Первые минуты	$0,25 \pm 0,11$	$0,15 \pm 0,03^{***}$
	5-7 сутки	$0,30 \pm 0,21$	$0,20 \pm 0,03^{**}$

Примечание. Звездочками отмечена достоверность различий с показателями здоровых новорожденных: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ .

за исключением численности CD3+CD25+-клеток.

Анализ фенотипических особенностей лимфоцитов пуповинной крови позволяет сделать вывод о том, что под воздействием перенесенной хронической гипоксии у детей от женщин с ФПН происходит увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры негативной активации и снижается численность лимфоцитов, несущих рецепторы к факторам выживания. Увеличение количества клеток, обнаруживающих готовность к апоптозу, свидетельствует о возросшей степени подверженности Т-лимфоцитов негативной селекции и является одним из факторов, отражающих нарушение иммунорегуляции в постнатальном периоде. Оценка соотношения факторов выживаемости и гибели клеток позволяет заключить, что у детей, развивавшихся в условиях хронической гипоксии, преобладают процессы негативной активации иммунокомпетентных клеток.

Это подтверждается и смещением соотношения клеток памяти и наивных клеток в сторону последних. Таким образом, изменение соотношения клеток пуповинной крови, обнаруживающих готовность к пролиферации или апоптозу, на фоне снижения количества клеток памяти у детей, подвергшихся хроническому гипоксическому воздействию, может служить ранним диагностическим признаком гипоксического воздействия на функциональное состояние лимфоцитов. Сохраняющееся к концу раннего периода адаптации снижение численности Т-клеток, экспрессирующих рецептор к IL-2, указывает на нарушение иммунологической адаптации новорожденного и является и критерием риска развития патологии в последующие месяцы и годы жизни.

Активность иммунокомпетентных клеток оценивают в том числе по уровню продукции ими медиаторов межклеточного взаимодействия. Функциональное состояние моноцитов характеризуется содержанием в крови цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , поскольку эти клетки вносят основной вклад в продукцию провоспалительных медиаторов. Концентрация IL-1 $\beta$  в пуповинной крови новорожденных от женщин с ФПН превышала уровень данного показателя в группе здоровых детей в 1,4 раза, уровень IL-6 — в 26 раз, а содержание TNF- $\alpha$  — в 47 раз. К 5-7 суткам жизни концентрация IL-1 $\beta$  у новорожденных основной группы приближалась к значениям здоровых детей. Содержание IL-6 и TNF- $\alpha$  к концу первой недели жизни у детей от женщин с ФПН продолжало снижаться, однако уровень данных медиаторов в 9,4 и 8,3 раза превышал значения этих цитокинов у детей группы сравнения.

Повышенное содержание провоспалительных цитокинов в пуповинной крови детей, перенесших во внутриутробном периоде хроническое гипоксическое воздействие, свидетельствует об активации, наряду с лимфоцитами, клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Повышенное содержание TNF- $\alpha$  на протяжении всего раннего неонатального периода новорожденных от женщин с ФПН сопровождается повышенной экспрессией Fas-антигена (CD95) в пуповинной крови и снижением численности лимфоцитов, несущих рецепторы к факторам выживания (CD25) в течение первой недели жизни ребенка.

Таким образом, изменение соотношения лимфоцитов, обнаруживающих готовность к пролиферации или апоптозу в сторону преобладания клеток, экспрессирующих маркеры запрограммированной гибели, на фоне повышенного уровня проапоптотических факторов в сыворотке крови новорожденных, перенесших хроническое гипоксическое воздействие, может служить проявлением нарушения ранней иммунологической адаптации этих детей и критерием риска развития перинатальной патологии.

## Литература

1. Гнусаев С. Ф., Шибяев А. Н., Федерякина О. Б. Сердечно-сосудистые нарушения у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Педиатрия. 2006; 1: 9-14.
2. Володин Н. Н., Дегтярева М. В., Дегтярев Д. Н. и др. Особенности иммунологической адаптации у новорожденных детей в норме, при респираторном дистресс-синдроме и при пневмонии бактериальной этиологии. Int. J. on Immunorehabilitation. 1999; 11: 82-91.
3. Александрова Ю. Н. Роль системы цитокинов в патологии перинатального периода. Педиатрия. 2006; 4: 116-8.
4. Герасимова М. М., Самсонова Е. Г., Гнусаев С. Ф. Клинико-патогенетическое значение интерлейкина-1 $\alpha$  при гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2006; 3: 18.
5. Володин Н. Н., Дегтярева М. В., Симбирцев А. С. и др. Роль про- и противовоспалительных цитокинов в иммунной адаптации новорожденных детей. International Journal on Immunorehabilitation. 2000; 2(1): 175-85.
6. Дегтярева М. В., Дегтярев Д. Н., Володин Н. Н., Ковальчук Л. В. Роль интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли- $\alpha$  у новорожденных детей в норме и при патологии. Педиатрия; 1996; 1: 93-97.
7. Seghaye M.-C., Heyl W., Grabitz R.G. et al. The Production of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Neonates Assessed by Stimulated Whole Cord Blood Culture and by Plasma Levels at Birth. Biology of the Neonate. 1998; 73 (4): 220-27.
8. Bessler H., Mendel C., Straussberg R., Gurary N., Aloni D., Sirota L. Effects of Dexamethasone on IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  Production by Mononuclear Cells of Newborns and Adults. Biology of the Neonate. 1999; 75 (4): 225-33.