

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ИММУНОКОНФЛИКТНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Абдрахманова Л.Р.*, Зайнуллин А.А.,
Зайнуллина А.С., Винтер В.Г.

*Республиканская клиническая больница, г. Казань
Казанский государственный университет, кафедра биохимии

Резюме. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного чаще всего являются результатом аллосенсибилизации иммунной системы матери к резус-антигенам плода и выработкой антител, проникающих к плоду.

Было проведено исследование антинуклеарных антител к РНК, нДНК и дДНК в сыворотке крови беременных женщин с резус-аллоиммунизацией и детей с различными формами гемолитической болезни методом ИФА в комплексе с традиционными изосерологическими анализами анти-Rh-АТ. Проведенные исследования на содержание антинуклеарных антител в сыворотке крови беременных с резус-аллоиммунизацией показали, что у женщин, родивших детей с внутриутробной тяжелой степенью ($2,15 \pm 0,26$ отн.ед.), внутриутробной средней степенью ($1,86 \pm 0,39$ отн.ед.) и анемической ($1,56 \pm 0,18$ отн.ед.) формами ГБН наблюдается достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня ААТ к РНК по сравнению с контрольной группой ($0,95 \pm 0,02$ отн.ед., верхний предел порогового уровня – $1,45$ отн.ед.). При проведении корреляционного анализа индивидуальных сывороток крови не было обнаружено высокой степени корреляции между уровнем содержания ААТ к РНК и ДНК и титром Rh-АТ. Выявлено влияние АВО-несовместимости на уровень ААТ к РНК в сыворотке крови беременных. АВО-несовместимость у резус-конфликтных беременных женщин приводила к дополнительному увеличению уровня содержания ААТ к РНК ($2,07 \pm 0,16$ отн.ед.), у беременных женщин совместимых по АВО-системе и несовместимых по резус-фактору с плодом уровень ААТ к РНК составил – $1,68 \pm 0,12$ отн.ед. Наиболее высокое содержание ААТ к РНК наблюдался у женщин, родивших детей с ГБН несовместимых по АВО-системе и совместимых по резус-фактору – $3,55 \pm 0,81$ отн.ед. Содержание ААТ к ДНК в этих группах не превышало порогового уровня.

Исследование уровня антител к РНК при резус-аллоиммунизации является дополнительным неинвазивным критерием, определяющим степень нарушения фетоплацентарного барьера при резус-аллоиммунизации и может использоваться для оценки тяжести заболевания при иммуноконфликтной беременности.

Ключевые слова: ААТ, РНК, ДНК, изоиммунизация, беременность.

Abdrakhmanova L.R., Zajnullin A.A., Zainullina A.S., Vinter V.G.

DETERMINATION OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN IMMUNOINCOMPATIBLE PREGNANCY

Abstract. Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDN) occurs as a result of sensitization of the mother's immune system to red cell antigens of the fetus.

We investigated antinuclear antibodies against RNA, dsDNA and ssDNA in pregnant women with rhesus-alloimmunization by ELISA method in combination with traditional serological analyses of anti-Rh antibodies. It was found that the level of anti-RNA antibodies was higher in the group of pregnant women bearing fetus with severe intrauterine icteric form ($2,15 \pm 0,26$ rel.un.); with average intrauterine icteric form ($1,86 \pm 0,39$ rel.un.) and with anemic form of HDN ($1,56 \pm 0,18$ rel.un.). The normal value was: $0,95 \pm 0,02$ rel.un., the limit level was: $1,45$

rel.un. The level of anti-RNA antibodies differed from control group ($p < 0,05$). Correlation between the level of anti-Rh antibodies and the level of anti RNA and anti-DNA antibodies was not found. It was revealed, that the level of anti-RNA antibodies was higher in Rh-alloimmunized pregnant women bearing fetus with incompatible blood groups and was: $2,07 \pm 0,16$ rel.un., with

Адрес для переписки:

Зайнуллин Алмаз Анасович,
аспирант кафедры биохимии КГУ.
420100 г. Казань, проспект Победы, д.192, кв. 41.
Тел.: (8432)77-51-04.
E-mail: almaz64@mail.ru

compatible blood groups was: $1,68 \pm 0,12$ rel.un. ($p < 0,05$). The highest contents of anti-RNA antibodies was observed in women, bearing fetus with HDN with ABO-incompatibility and Rh-compatibility - $3,55 \pm 0,81$ rel.un. The level of anti-ssDNA and anti-dsDNA antibodies in serum of Rh-alloimmunized pregnant women did not reflect severity of hemolytic disease of fetus and newborn.

We consider, that the determination of anti-RNA antibodies in blood of Rh-alloimmunized pregnant women is one of the additional non-invasive tests for the determination of immunization degree of fetus and newborn and it is one of the parameters of permeability of fetal antigens through placenta, i.e. of transplacental barrier state. (*Med.Immunol.*, 2003, vol.5, N1-2, pp 57-66)

Введение

В настоящее время наблюдается рост рождения детей с гемолитической болезнью. По данным доклада Минздрава России в г. Курске на II Российском съезде медицинских генетиков (2000) гемолитическая болезнь новорожденных (ГБН) в России занимает третье место среди заболеваний после врожденных пороков развития и респираторных нарушений у новорожденных. Анализ динамики заболевания среди недоношенных новорожденных в родильном отделении Республиканской клинической больницы республики Татарстан показал, что с 1994 года ГБН увеличилась с 2,9% до 8,33% и занимает второе-третье место после внутричерепных родовых травм (61,67%), внутриматочной гипоксии и асфиксии (8,33%) [5].

Одной из основных причин данного заболевания является резус-аллоиммунизация – тяжелая патология перинатального и постнатального периода, приводящая к мертворождению, ранней детской смертности и инвалидизации детей в виду отсутствия массовой профилактики анти-резусным иммуноглобулином после родов и абортот у резус-отрицательных (Rh(-)) беременных. Скрининговые программы по пренатальной диагностике резус-аллоиммунизации у Rh(-) беременных существуют во многих странах и включают как неинвазивные, так и инвазивные методы диагностики. К неинвазивным методам диагностики относятся – определение резус-антител (Rh-АТ) изосерологическими методами у всех Rh(-) беременных; ультразвуковое исследование плода и плаценты [1, 16, 19]. Инвазивные методы диагностики предполагают: амниоцентез с целью определения билирубина околоплодных вод спектрофотометрическим методом [25] и ПЦР диагностики резус-принадлежности плода по амниоцитам [18, 20, 26]; в ряде случаев применяется кордоцентез с целью определения гемоглобина, билирубина (Bi), группы и резус-принадлежности крови плода и степени тяжести гемолитической болезни плода (ГБП) [4].

В последнее время при диагностике репродуктивной патологии стали применять аутоиммунные маркеры – аутоантитела (ААТ) к хорионическому гонадотропину человека, фосфолипидам, нативной и денатурированной ДНК (нДНК и дДНК) [13, 15]. Продукция аутоантител является одним из универсальных механизмов иммунопатологии, лежащих в основе ряда репродуктивных осложнений. Так, известна роль антифосфолипидных антител при невынашивании беременности, первичном и вторичном бесплодии, неудачных попытках искусственного оплодотворения с переносом эмбриона [15].

Практически неизученным является роль антител к нуклеиновым кислотам при иммуноконфликтной беременности – резус- и АВО- аллоиммунизации. В связи с этим нами была поставлена задача – изучение уровня антител к нДНК, дДНК и РНК у беременных и женщин, родивших детей с гемолитической болезнью по Rh - и АВО- системе.

Материалы и методы

Группы обследованных. Были обследованы сыворотки крови пациентов с резус-аллоиммунизацией: 57 женщин на сроке беременности 20-40 недель, проходящих обследование в медико-генетическом центре РКБ и 69 рожениц с новорожденными детьми из родильного отделения РКБ г. Казани. В контрольную группу вошли 8 здоровых беременных женщин совместимых с мужем по группам крови. Были взяты сыворотки крови у 250 здоровых доноров для определения уровня содержания ААТ к нуклеиновым кислотам в норме и установления пороговых значений.

Определение ААТ к нуклеиновым кислотам методом ИФА. ААТ к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах (НПО "Полимед", г. Санкт-Петербург) по методикам, разработанным авторами [2, 7]. Для сравнения воспроизводимости результатов в разные дни и на разных планшетах в качестве контроля использовали пул сывороток крови здоровых доноров с низкими титрами, обозначенную как "стандарт". Полученные данные выражали в относительных единицах (отн. ед.), вычисленных по формуле:

$$\text{отн. ед.} = \frac{\text{ОП}_{450-630} \text{ исследуемой сыворотки}}{\text{ОП}_{450-630} \text{ стандарта}}$$

Измерения оптической плотности проводили на приборе Opsys MR ("Dynex", США) при длинах волн 450 и 630 нм.

О чувствительности и воспроизводимости ИФА судили, соответственно, по среднему арифметическому (М) и коэффициенту вариации (С) из повторов каждой индивидуальной сыворотки. В работе использовали результаты экспериментов, в которых С не превышает 5-10% - общепринятого значения для данного теста [3]. Для определения среднего уровня ААТ к нуклеиновым кислотам в обследованной группе людей вычисляли взвешенное среднее ($\bar{x}$), которое позволяет учитывать точность определения среднего арифметического для индивидуальных сывороток [10].

В качестве РНК-антигена использовали суммарную дрожжевую РНК (НПО «Вектор», г. Новосибирск), которую дополнительно депротеинизировали фенольным методом до соотношения оптических плотностей $E_{260}/E_{280} = 2,3$. В качестве ДНК-антигена использовали очищенный ($E_{260}/E_{280} = 1,86$) коммерческий препарат ДНК (НПО «Вектор», г. Новосибирск). Денатурированную ДНК готовили следующим образом: прогревали раствор ДНК (50 мкг/мл) с добавлением 0,05% формальдегида в течение 15 минут при 100°C с последующим быстрым охлаждением на льду. О степени денатурации судили по гиперхромному эффекту, который составил 30%.

Полученные препараты РНК, нДНК и дДНК разливали по порциям и хранили в замороженном состоянии при -20°C.

Определение антирезусных антител серологическим методом. Определение антирезусных антител проводили по общепринятой методике – непрямой реакции Кумбса [9]. Количество антител выражали в титрах.

Спектрофотометрическое определение билирубина у новорожденных. Определение билирубина у новорожденных проводили по унифицированному методу по диазореакции в присутствии акселератора (метод Ендрасика – Клеггорна – Грофа). Концентрацию билирубина в сыворотке крови выражали в мкмоль/л [9].

Статистическая обработка. Статистическая обработка полученных результатов выполнялась на персональном компьютере: Windows 98; Microsoft Excel 2000 (пакет статистических программ).

Результаты

Изучение уровня содержания ААТ к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови 250 здоровых доноров позволило нам установить пороговые уровни ($\pm 2\sigma$) которые составили (в отн. ед.) для ААТ к РНК – $0,95 \pm 0,50$; для ААТ к нДНК – $1,00 \pm 0,40$; для ААТ к дДНК – $1,12 \pm 0,40$.

Нами была обследована группа здоровых беременных женщин, совместимых с мужьями по группам крови. У здоровых беременных женщин на момент родов уровень аутоантител к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови достоверно не отличался от показателей здоровых доноров и составил (в отн. ед.): к РНК – $1,07 \pm 0,10$; к нДНК – $0,94 \pm 0,09$; к дДНК – $0,98 \pm 0,14$. Эта обследованная группа рожениц была использована в качестве контроля при изучении уровня ААТ к НК в сыворотке крови беременных женщин с различными формами резус- и АВО-аллоиммунизации (табл.1).

Проведенные исследования на содержание антинуклеарных антител в сыворотке крови у женщин, родивших детей с внутриутробной и анемической формой ГБН, показали, что наблюдается достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня ААТ к РНК по сравнению с контрольной группой (табл.1).

Наиболее высокий уровень ААТ к РНК при резус-конфликтной беременности был обнаружен в

группе матерей, родивших детей с внутриутробной ГБП тяжелой степени – $2,15 \pm 0,26$ отн.ед. (табл.1). Зафиксирован случай беременности с отеочной формой ГБП и внутриутробной гибели плода на сроке 20 недель, при этом уровень антител к РНК в сыворотке крови матери составил 5,0 отн.ед. В данной группе повышенный уровень антител к РНК (верхний предел порогового уровня – 1,45 отн.ед.) выявился в 82% (табл.7). При этом уровень ААТ к РНК в группах с послеродовой формой ГБН не имел достоверных отличий от уровня контроля независимо от степени тяжести заболевания. Колебания в уровне ААТ к РНК составляли от $0,97 \pm 0,20$ до $1,39 \pm 0,15$ отн.ед. При сравнении общих групп с внутриутробной и послеродовой формами ГБП были выявлены статистически достоверные различия ($p < 0,01$) в уровне ААТ к РНК ($2,07 \pm 0,22$ и $1,34 \pm 0,12$ отн.ед. соответственно). При исследовании Rh(-) беременных, у которых при родах проявились различные формы ГБП, во 2-м триместре беременности было выявлено повышение уровня содержания ААТ к РНК ($1,48 \pm 0,10$ отн. ед., $p < 0,05$). Уровень содержания ААТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови у беременных и рожениц с различными формами ГБП не превышал верхнего предела порогового уровня (табл.1).

Нами была исследована также сыворотка крови новорожденных от матерей с иммуноконфликтами на наличие антинуклеарных антител. У детей с послеродовой формой ГБН легкой степени было обнаружено повышенное содержание ААТ к РНК ($1,84 \pm 0,83$ отн.ед.). При внутриутробной форме ГБП средней степени наблюдалось повышение уровня содержания ААТ к дДНК ($2,38 \pm 0,64$ отн.ед.).

Выявлено влияние АВО-несовместимости на уровень ААТ к РНК в сыворотке крови беременных. АВО-несовместимость у резус-конфликтных беременных приводила к дополнительному увеличению уровня содержания ААТ к РНК (табл.2). Но наиболее высокое содержание ААТ к РНК наблюдался у женщин, родивших детей с ГБН по АВО-системе совместимых по резус-фактору – $3,55 \pm 0,81$ отн.ед. Повышенный уровень ААТ к РНК в этой группе выявлялся у 100% обследованных (табл.7). Содержание ААТ к ДНК в обеих группах не превышало порогового уровня (табл.2).

При исследовании содержания ААТ к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови резус-конфликтных беременных с отягощенным (ОАА) и неотягощенным акушерским анамнезом было выявлено, что ОАА не влияет на содержание ААТ к РНК. У пациенток с ОАА и без ОАА было обнаружено повышенное содержание ААТ к РНК ($1,55 \pm 0,14$ и $1,65 \pm 0,13$ отн. ед. соответственно) по сравнению с контрольной группой. Разница в уровне ААТ к РНК в этих двух группах между собой была недостоверной. При этом содержание ААТ к ДНК не имело достоверных отличий от контрольных показателей (табл.3).

Содержание антител ко всем трем антинуклеарным антигенам в сыворотке крови беременных, имевших в крови Rh-АТ и родивших детей без ГБН, не превышало верхнего предела порогового уровня.

В некоторых случаях было обнаружено даже достоверное снижение уровня ААТ к нДНК и дДНК у Rh(-) женщин без Rh-АТ, родивших детей без ГБН ($0,56 \pm 0,06$ и $0,63 \pm 0,09$ отн.ед. соответственно) и ААТ к нДНК у Rh(+) беременных несовместимых с мужьями по группам крови ($0,61 \pm 0,03$ отн.ед.) по сравнению к контрольной группе (табл.4).

При исследовании зависимости титра Rh-АТ, определяемых серологическим методом и уровня антигенов к РНК и ДНК, выявляемых методом ИФА, была обнаружена тенденция к повышению уровня ААТ к РНК с повышением титра Rh-АТ до 1:32 (табл. 5). Однако при проведении корреляционного анализа индивидуальных сывороток крови с помощью про-

граммы Microsoft Excel 2000 не было обнаружено высокой степени корреляции между уровнем содержания ААТ к РНК и титром Rh-АТ (табл.6).

Обсуждение

Для установления степени гемолитической болезни и Rh(-) принадлежности плода при наличии резус-антител от предшествующих беременностей является актуальным использование современных и поиск новых методов диагностики резус-аллоиммунитизации, по результатам которых можно будет оценить тяжесть и форму заболевания, определить стратегию лечения и оптимальный срок родоразрешения.

Табл. 1. ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ И ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ (ГБ) ПО Rh-СИСТЕМЕ НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ, Rh-АНТИТЕЛ И БИЛИРУБИНА

Диагноз	Кол-во	Матери				Дети			
		ААТ к РНК (отн.ед.)	ААТ к нДНК (отн.ед.)	ААТ к дДНК (отн.ед.)	Титр Rh-АТ	ААТ к РНК (отн.ед.)	ААТ к нДНК (отн.ед.)	ААТ к дДНК (отн.ед.)	Ві (мкмоль/л)
ГБ внутриутробная, желтушная форма, тяжелая степень	11	2,15±0,26**	1,03±0,08 ^а	0,99±0,09 ^а	1:16-1:32	1,39±0,32	0,96±0,12	1,06±0,19	138,8±15,4
ГБ внутриутробная, желтушная форма, средняя степень	10	1,86±0,39*	0,80±0,05 ^а	0,98±0,07 ^а	1:8-1:16	1,14±0,20	1,33±0,51	2,38±0,64	116,2±12,3
Всего, ГБ внутриутробная форма	21	2,07±0,22**	0,92±0,05 ^а	0,99±0,05 ^а	1:16	1,26±0,18	1,16±0,27	1,75±0,37	127,5±10,0
ГБ послеродовая, желтушная форма, тяжелая степень	3	0,97±0,2 ^а	1,11±0,70 ^а	0,62±0,25 ^а	1:8-1:16	0,85±0,25	0,65±0,05	0,58±0,22	51,0±5,0
ГБ послеродовая, желтушная форма, средняя степень	13	1,39±0,15 ^а	0,86±0,07 ^а	1,27±0,15 ^а	1:8	1,06±0,11	1,09±0,16	1,87±0,48	46,5±4,3
ГБ послеродовая желтушная форма, легкая степень	6	1,30±0,20 ^а	0,74±0,12 ^а	1,02±0,25 ^а	1:4-1:8	1,84±0,83	0,83±0,25	0,91±0,35	61,8±10,7
Всего, ГБ послеродовая форма	22	1,34±0,12 ^а	0,82±0,06 ^а	1,10±0,11 ^а	1:8	1,22±0,21	0,98±0,12	1,49±0,34	53,1±4,7
ГБ, анемичная форма	8	1,56±0,18*	0,94±0,08 ^а	0,92±0,15 ^а	1:8-1:16	1,27±0,38	0,90±0,15	0,82±0,15	64,4±6,1
Беременные с Rh-АТ во II триместре, родивших детей с различными формами ГБ	25	1,48±0,10*	0,87±0,04 ^а	1,12±0,09 ^а					
Контрольная группа (беременные совместимые с мужем по группам крови)	8	1,07±0,10	0,94±0,09	0,98±0,14					
Здоровые доноры	250	0,95±0,02	1,00±0,02	1,12±0,02					

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:

* - достоверно при $p < 0,05$; ** - достоверно при $p < 0,01$; ^а - не достоверно.

На данный момент основные методы диагностики (определение резус антител и УЗИ) [16, 17, 19, 23, 26], применяемые в широкой практике являются лишь скрининговыми методами для определения наличия резус-аллоиммунизации и исключения отечных форм ГБП. Определенный прогресс в диагностике и лечении ГБП был, достигнут после начала применения кордоцентеза под ультразвуковым контролем в целях извлечения крови из вены пуповины и определения гематологических показателей плода. По мнению Михайлова А.В. [4] использование кордоцентеза, обеспечивающего непосредственный доступ в кровоток плода, позволяет производить непосредственное лечение плода внутриматочными переливаниями донорской крови в сочетании с альбумином, что на сегодняшний день практически может решить вопрос

Табл. 2. ВЛИЯНИЕ АВО-АЛЛОИММУНИЗАЦИИ У ИММУНОКОНФЛИКТНЫХ БЕРЕМЕННЫХ НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ (ОТН. ЕД.)

Форма заболевания	Кол-во	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Беременные с АВО-изоиммунизацией, родившие детей с ГБН по АВО-системе, не совместимые по Rh	5	2,07±0,16**	0,85±0,06"	0,90±0,16"
В анамнезе ГБН по АВО, совместимые по Rh	3	3,55±0,81**	1,53±0,39"	1,20±0,40"
Несовместимые по Rh, совместимые по АВО с ребенком	43	1,68±0,12**	0,92±0,04"	1,03±0,06"
Несовместимые по Rh и по АВО с ребенком	13	1,96±0,19**	0,83±0,06"	1,02±0,09"
Контрольная группа (беременные совместимые с мужем по группам крови)	8	1,07±0,10	0,94±0,09	0,98±0,14
Здоровые доноры	250	0,95±0,02	1,00±0,02	1,12±0,02

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:
** - достоверно при $p<0,01$; " – не достоверно

Табл. 3. ВЛИЯНИЕ ОТЯГОЩЕННОГО АКУШЕРСКОГО АНАМНЕЗА (ОАА) НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ У РЕЗУС-КОНФЛИКТНЫХ БЕРЕМЕННЫХ (ОТН.ЕД.)

Диагноз	Кол-во	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Беременные без ОАА	32	1,65±0,13**	0,84±0,06"	0,93±0,06"
Беременные с ОАА и гемотрансфузиями	23	1,55±0,14*	0,98±0,05"	1,07±0,09"
Контрольная группа (беременные совместимые с мужем по группам крови)	8	1,07±0,10	0,94±0,09	0,98±0,14
Здоровые доноры	250	0,95±0,02	1,00±0,02	1,12±0,02

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:
* - достоверно при $p<0,05$; ** - достоверно при $p<0,01$; " – не достоверно

Табл. 4. СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ У БЕРЕМЕННЫХ, РОДИВШИХ ДЕТЕЙ БЕЗ ГБН (ОТН.ЕД.)

	Кол-во	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Беременные, родившие Rh (-) детей	6	1,05±0,12"	0,84±0,08"	0,69±0,09"
Rh (-) беременные родившие детей без ГБН, без Rh-антител	8	0,90±0,08"	0,56±0,06**	0,63±0,09*
Rh (+) беременные, несовместимые с мужем по группам крови	8	1,13±0,18"	0,61±0,03*	0,75±0,05"
Беременные Rh(-) с наличием Rh-антител, родившие Rh(+) детей без ГБН	5	1,09±0,14"	1,02±0,15"	0,95±0,12"
Контрольная группа (беременные совместимые с мужем по группам крови)	8	1,07±0,10	0,94±0,09	0,98±0,14
Здоровые доноры	250	0,95±0,02	1,00±0,02	1,12±0,02

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:
* - достоверно при $p<0,05$; ** - достоверно при $p<0,01$; " – не достоверно

Табл. 5. ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ ОТ ТИТРА Rh-АТ У РЕЗУС-КОНФЛИКТНЫХ БЕРЕМЕННЫХ

Кол-во человек	Титр Rh-АТ, определенных серологическим методом	Уровень антител к нуклеиновым кислотам, определенных методом ИФА (отн.ед.)		
		АТ к РНК	АТ к нДНК	АТ к дДНК
4	1:2	1,10±0,12	1,15±0,46	0,93±0,21
13	1:4	1,30±0,17	0,74±0,07	0,99±0,14
14	1:8	2,19±0,35	1,01±0,10	1,10±0,13
10	1:16	1,79±0,31	0,80±0,14	0,98±0,13
2	1:32	2,70±1,70	0,66±0,04	1,10±0,30
2	1:64	1,23±0,43	0,90±0,30	0,71±0,41

терапии тяжелых форм ГБП. Однако широкое применение кордоцентеза с целью определения состояния плода может вызвать рост иммунизации и инфицирования. Применять данный метод, на наш взгляд, необходимо только в крайних случаях, например, при отягощенном акушерском анамнезе.

Есть мнение некоторых авторов, что титр резус-антител и их биологическая активность не обязательно совпадают, так как титр обычно характеризует зафиксированное количество антител в реакции с эритроцитами и не указывает на количество свободных антител в растворе. При высокой связывающей способности антител при одних и тех же выявляющих эритроцитов титр их будет более высоким, чем у антител низкой связывающей способности, хотя их концентрации будут и одинаковы [8]. При исследовании зависимости тяжести и формы ГБН от титра Rh-АТ в сыворотке крови матерей нами была выявлена тенденция увеличения среднего значения титра Rh-АТ в исследуемой группе от тяжести ГБН (табл.1). Однако индивидуальные показатели титра Rh-АТ колебались в широких пределах от 1:4 до 1:64 и по их присутствию было сложно определить тяжесть заболевания и поставить точный диагноз ГБН (табл.7).

Внедренные в клиническую практику в начале 60-х гг. инвазивные методы изучения околоплодных вод предоставили новые диагностические возможности, на основании которых определялась тактика ведения аллоиммунизированной беременности в течение более 20 лет. Определение величины отклонения оптической плотности амниотической жидкости при длине волны 450нм (ΔOD-450), вызванного присутствием билирубина, существенно улучшило раннюю диагностику ГБН и соответственно снизило показатели перинатальной заболеваемости и смертности при этой патологии беременности. Однако последующие исследования показали достаточно высокий уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов этого метода диагностики. По данным Садыкова Б.Г. с соавторами [6] диагностическая ценность спектрофотометрии составила 81,8%. При учете только данных спектрофотометрического исследования билирубина околоплодных вод могут иметь как переоценка, так и недооценка степени тяжести заболевания плода. К ним относятся технические погрешности при выполнении исследования, примесь к околоплодным водам мекония или крови,

значительные колебания объема амниотической жидкости (многоводие, маловодие) и другие. Трудности интерпретации изменения уровня билирубина заставляют искать дополнительные тесты для улучшения антенатальной диагностики.

В последнее время все большее внимание обращают на себя аутоиммунные маркеры при диагностике репродуктивной патологии [11, 13, 15]. Достаточно часто обнаруживаются антитела к собственным антигенам при разных патологиях беременности, причем спектр этих ААТ постоянно расширяется с использованием более новых методик. Marchalonis J.J. с коллегами обнаружили ААТ к бета-цепям рецепторов Т-клеток при двух случаях аллоиммунизации у человека: при ренальной трансплантации и беременности [22]. Были также выявлены антифосфолипидные ААТ при следующих патологиях: при невынашивании беременности, потери плода во втором и третьем триместре. У таких беременных имелись симптомы сходные с аутоиммунной патологией [15]. При привычном невынашивании беременности и при бесплодии были также найдены ААТ к нДНК у 7-30% и антинуклеарные антитела у 22-33% обследованных женщин [13]. Однако по данным других авторов антинуклеарные ААТ не оказывают значительного влияния на аллоиммунизацию и спонтанные абортс неизвестной этиологии [21].

Наше внимание привлекло недостаточная изученность уровней антител к нуклеиновым кислотам, особенно ААТ к РНК, при иммуноконфликтной беременности.

Анализ сывороток крови здоровых беременных женщин показал, что уровень ААТ к нуклеиновым кислотам не отличается достоверно от показателей здоровых доноров. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Mouthon с соавторами исследовали сыворотку крови на содержание аутоантител к собственным антигенам у здоровых женщин в третий триместр беременности, молодых девушек и взрослых мужчин. Авторы не обнаружили различий между этими группами в уровне и репертуаре аутоантител к собственным антигенам [24].

При исследовании уровня содержания ААТ к трем антинуклеарным антигенам – РНК, нДНК и дДНК в сыворотке крови беременных и рожениц с иммуноконфликтами было выявлено повышение

Табл. 6. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ УРОВНЕМ АТ К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ, Rh АТ И Vi У МАТЕРЕЙ И ДЕТЕЙ ПРИ ИММУНОКОНФЛИКТНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ (%)

Внутриутробная ГБП тяжелой степени									
		Матери				Дети			
		АТ к РНК	АТ к нДНК	АТ дДНК	Rh АТ	АТ к РНК	АТ к нДНК	АТ дДНК	Vi
Матери	АТ к РНК	100							
	АТ к нДНК	11	100						
	АТ дДНК	62	75	100					
	Rh АТ	- 35	-15	-36	100				
Дети	АТ к РНК	40	55	42	-30	100			
	АТ к нДНК	-9	77	60	-1	62	100		
	АТ дДНК	-23	31	32	-21	32	71	100	
	Vi	0	24	44	-21	29	27	46	100
Внутриутробная ГБП средней степени									
Матери	АТ к РНК	100							
	АТ к нДНК	58	100						
	АТ дДНК	9	45	100					
	Rh АТ	39	-14	25	100				
Дети	АТ к РНК	-8	6	-30	-21	100			
	АТ к нДНК	-9	-3	-60	-34	69	100		
	АТ дДНК	-2	-5	-42	-33	97	78	100	
	Vi	-5	-13	15	5	48	23	41	100
Послеродовая ГБН средней степени									
Матери	АТ к РНК	100							
	АТ к нДНК	70	100						
	АТ дДНК	25	51	100					
	Rh АТ	-12	1	18	100				
Дети	АТ к РНК	18	21	25	-24	100			
	АТ к нДНК	11	42	23	90	-9	100		
	АТ дДНК	-20	-12	9	86	-7	79	100	
	Vi	-15	-19	5	27	-23	-16	43	100
Послеродовая ГБН легкой степени									
Матери	АТ к РНК	100							
	АТ к нДНК	61	100						
	АТ дДНК	33	20	100					
	Rh АТ	-45	-34	-30	100				
Дети	АТ к РНК	67	-27	-23	99	100			
	АТ к нДНК	70	66	87	-17	-27	100		
	АТ дДНК	35	29	95	-6	7	91	100	
	Vi	14	-17	-56	-16	81	-52	-52	100
Анемичная форма ГБП									
Матери	АТ к РНК	100							
	АТ к нДНК	3	100						
	АТ дДНК	8	-28	100					
	Rh АТ	51	-23	31	100				
Дети	АТ к РНК	71	-37	-12	73	100			
	АТ к нДНК	-56	43	-5	-9	-32	100		
	АТ дДНК	-12	-42	19	29	41	50	100	
	Vi	-9	61	-19	-83	-49	24	-15	100

уровня содержания антител только к РНК при внутриутробной и анемичной формах ГБП. Причем достоверное увеличение содержания ААТ к РНК при этих формах наблюдалось уже во 2-м триместре беременности. Перед родами уровень ААТ к РНК достигал максимальных значений, в зависимости от патологии и степени тяжести. Наиболее высокий уро-

вень ААТ к РНК при резус-конфликтной беременности был обнаружен в группе женщин, родивших детей с внутриутробной ГБП тяжелой степени (табл. 1). Послеродовые формы ГБН разной степени тяжести не вызывали повышения уровня ААТ к РНК по сравнению с контролем. Уровень ААТ к РНК при внутриутробной форме ГБП статистичес-

Табл. 7. ЗАВИСИМОСТЬ НАЛИЧИЯ ВЫСОКОГО УРОВНЯ ААТ К РНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МАТЕРЕЙ И ДЕТЕЙ, Rh-АТ У БЕРЕМЕННЫХ И ВІ У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ (%)

Диагноз	кол-во	ААТ к РНК		Rh-АТ						Bi
		матери	дети	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
ГБП внутриутробная, желтушная форма, тяжелая степень	11	82	30	0	27	18	36	-	18	50
ГБП внутриутробная, желтушная форма, средняя степень	10	40	30	22	33	22	-	22	-	77
Всего, ГБП внутриутробная форма	21	62	32	10	30	20	20	10	10	-
ГБН послеродовая, желтушная форма, тяжелая степень	2	0	0	50	-	-	50	-	-	0
ГБН послеродовая, желтушная форма, средняя степень	13	31	18	10	10	60	20	-	-	0
ГБН послеродовая желтушная форма, легкая степень	6	33	25	0	50	33	17	-	-	83
Всего, ГБН послеродовая форма	22	32	18	12	22	44	22	-	-	-
ГБН, анемичная форма	8	38	16	-	20	40	40	-	-	-
Беременные с Rh-АТ во II триместре, родивших детей с различными формами ГБН	25	40	-							-
Беременные с АВО-иммунизацией, родившие детей с ГБН по АВО-системе	5	80	50							-
В анамнезе ГБН по АВО, совместимые по Rh	3	100	-							-
Совместимые по АВО с ребенком	43	44	-							-
Несовместимые по АВО с ребенком	13	77	-							-
Беременные без ОАА	32	41	-							-
Беременные с ОАА и гемотрансфузиями	23	52	-							-

ки достоверно отличался ($p < 0,01$) от уровня ААТ к РНК как при послеродовой форме ГБН, так и по сравнению с контролем. Исследование сывороток крови детей с различными формами ГБН на изменение уровней ААТ к нуклеиновым кислотам не позволили выявить закономерной зависимости от патологии. Таким образом, наблюдается определенная корреляция уровня ААТ к РНК только у беременных женщин от формы и степени тяжести ГБП при иммуноконфликтной беременности.

Эксперименты Al-Mufti с соавторами подтвердили гипотезу, что содержание фетальной РНК в крови матери значительно выше, чем уровень соответствующей ДНК [14]. Причиной этого процесса является то, что антирезусные антитела матери, проникая в кровоток плода при недостаточной функции фетоплацентарного барьера, поражают у плода клетки эритропоэтического ростка костного мозга и других эмбриональных кроветворных органов. В незрелых эритроцитах ядро подвергается постепенной деградации до полной элиминации, в этих клетках усиленно идет транскрипция и трансляция мРНК для синтеза белков, особенно гемоглобина, происходит постепенный переход от синтеза фетального гемоглобина к «обычному». В таких клетках, по сравнению с обычными, снижено количество ДНК, вместе с тем количество РНК в цитоплазме значительно выше. В результате разрушения незрелых фетальных эритроцитов в крови плода значительно повышается концентрация РНК. Проницаемость трансплацентарного барьера приводит к тому, что фетальные мРНК затем попадают в кровь матери и вызывают выработку антител к РНК. Эти предположения согласуются с полученными нами результатами. В наших исследованиях только внутриутробные и анемичные формы гемолитической болезни сопровождаются увеличением уровня ААТ к РНК в сыворотке крови матери (табл. 1). При этих формах ГБП поражение эритроцитов плода происходит уже на ранних стадиях, начиная со второй половины беременности, развития кроветворной системы. Повышенный уровень ААТ к РНК обнаружен нами уже во второй половине беременности при различных формах ГБП (табл. 1). Таким образом, увеличение уровня антител к РНК будет зависеть напрямую от барьерных функций плаценты, поэтому исследование уровня антител к РНК при резус-аллоиммунизации является дополнительным неинвазивным критерием дородовой диагностики, определяющим степень нарушения фетоплацентарного барьера при резус-аллоиммунизации.

По данным американских акушеров, которые приводит Шабалов Н.П., несовместимость по АВО-антигенам, приводящая к ГБН, обычно бывает при группе крови матери O(I) и группе крови ребенка A(II). При этом риск резус-аллоиммунизации составляет 16 %, если мать и ребенок не совпадают по АВО групповым антигенам, и 1,5%, если они по ним совместимы. Они обуславливают развитие ГБН при двойной несовместимости ребенка и матери, т.е. мать O(I) Rh(-), ребенок A(II) Rh(+) или B(III) Rh(+), как правило, с A- или B- антигенами. По его личным

данным лишь в 3-6% случаев несовместимости плода и матери по АВО- и резус- антигенам (O(I) группа крови у матери и ребенок с A(II), B(III) группой или Rh(-) мать и Rh(+) ребенок) [12]. В проведенных нами исследованиях АВО-несовместимость у резус-конфликтных беременных приводила к дополнительному увеличению уровня содержания ААТ к РНК. Однако при ГБП по АВО-системе и совместимости по резус-антигену наблюдается наиболее высокий уровень ААТ к РНК в группе, превышая этот показатель при резус-несовместимости в группе с тяжелой внутриутробной формой ГБП более чем в 1,5 раза. Полученные результаты согласуются с литературными данными о более высоком вкладе АВО-антигенов, чем резус-антигенов, в отягощенность при ГБП.

Для того чтобы выяснить влияет ли отягощенный акушерский анамнез на повышение уровня содержания ААТ к РНК, нами были обследованы две группы: беременные женщины, у которых были предыдущие рождения детей с ГБН, мертворождения, отечные формы ГБН, гемотрансфузии несовместимой кровью, и беременные с резус-аллоиммунизацией возникшей впервые при данной беременности. У пациенток с ОАА и без ОАА было обнаружено достоверное ($p < 0,05$) повышение содержания ААТ к РНК по сравнению с контрольной группой. Разница в уровне ААТ к РНК в этих двух группах была недостоверной. Вероятно, повышение уровня антител к РНК не связано с предшествующей иммунизацией и, является, скорее всего, результатом проникновения антигена данного плода через плаценту и выработкой антител к РНК у матери.

Проведенный корреляционный анализ на содержание антинуклеарных, антирезусных АТ и билирубина в индивидуальных сыворотках крови матерей и детей с помощью программы Microsoft Excel 2000 не выявил закономерностей и высокой степени корреляции между этими показателями (табл.6). Высокая степень корреляции была выявлена между ААТ к дДНК и РНК (97%) у детей с внутриутробной формой ГБН средней степени, но при тяжелой степени внутриутробной ГБН корреляция достигала только 32%. Высокая степень корреляции между ААТ к нДНК и дДНК и Rh-АТ (90 и 86% соответственно) встречалась у детей с послеродовой формой ГБН средней степени, а при послеродовой форме легкой степени корреляция между этими антигенами была отрицательной, в то время как корреляция между ААТ к РНК и Rh-АТ в данной группе достигала 99%. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что каждый показатель является независимым друг от друга. Возможно, это связано с недостаточно большим объемом исследуемых групп (от 6 до 13 человек) и дальнейшие исследования в этом направлении необходимо продолжить.

На данный момент только сочетание нескольких методов диагностики могут дать объективную картину и более точный диагноз при резус-конфликтной беременности. Повышение уровня содержания ААТ к РНК при внутриутробной и анемичной форме ГБП наблюдается на сроке беременности 20-40

недель. Для пренатальной диагностики, при высоком риске возникновения ГБП, в случае необходимости выбора тактики лечения и времени родоразрешения наиболее оптимальным сроком является 35-37 неделя беременности. Оценив клинические данные и результаты исследований, мы считаем, что изменение уровня ААТ к РНК может служить показателем состояния фетоплацентарного барьера. Наблюдается устойчивая зависимость между уровнем ААТ к РНК и тяжестью заболевания при внутриутробной форме ГБП. Этот показатель может использоваться как дополнительный критерий для оценки тяжести заболевания при иммуноконфликтной беременности.

Список литературы

1. Абрахманова Л.Р., Садыков Б.Г., Зайнуллин А.А. Ультразвуковые и молекулярно-генетические методы диагностики при резус-изоиммунизированной беременности // Каз. Мед. Журнал. – 2000. – N 5. – С.427-430.
2. Зайнуллина А.С., Саттарова Л.И., Зайнуллин А.А. и др. Иммуноферментное определение антител к РНК на полистироловых планшетах отечественного производства // Биотехнология. – 2000. – N 2. – с.84-89.
3. Иммуноферментный анализ (пер. с англ.) / Под ред. Нго Н.Н., Ленхоффа Г. М. – М.: Мир, 1988. – 446 с.
4. Михайлов А.В. Тактика ведения при изоиммунизированной беременности и иммунном отеке плода. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / Под ред. Миткова В.В., Медведева М.В. – II том – М.: Видар, 1996. – 301 с.
5. Рыбкина Н.Л. Структура заболеваемости и перинатальной смертности недоношенных новорожденных // Материалы VI межрегионального съезда акушер-гинекологов, педиатров, терапевтов «Профилактика - основа деятельности врача первичного звена». – Самара. – 1999. – С.162-163.
6. Садыков Б.Г., Игнатъева Д.П., Бородин Ю.И. и др. Иммуноконфликтная беременность и тактика родоразрешения. Практическое пособие. – Казань, 1998. – 70 с.
7. Саттарова Л. И., Гафиятуллина Л. А., Аглиуллина Д. Г., Винтер В.Г. Оптимизация иммуноферментной тест-системы для определения аутоантител к ДНК // Биотехнология. – 1994. – N 11-12. – С.38-41.
8. Серов В.Н., Стрижаков А.И., Маркин С.А. Руководство. Практическое акушерство. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
9. Справочник. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Меньшикова В.В. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
10. Тейлор Д. Введение в теорию ошибок. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
11. Тимохина В.И., Подосиников И.С., Гурина О.П. и др. Особенности иммунорегуляции и развития аутоиммунного синдрома у новорожденных и детей раннего возраста при внутриутробной инфекции, родовой травме и гипоксии // Медицинская Иммунология. – 2002. – том 4, N 2. – С.285-286.
12. Шабалов Н.П. Неонатология, в 2-х томах. – Санкт-Петербург: Специальная литература, 1997. – 1052 с.
13. Шляхтенко Т.Н., Сельков С.А., Попова М.В., Федоренко А.В. Аутоиммунные маркеры репродуктивной патологии // Медицинская Иммунология. – 2002. – том 4, N 2. – С.287-288.
14. Al-Muffti R., Howard C., Overton T., Holzgreve W., Gaenshirt D., Fisk N.M., Bennet P.R. Detection of fetal messenger ribonucleic acid in maternal blood to determine fetal RhD status as a strategy for noninvasive prenatal diagnosis // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – Vol. 179, N 1. – P. 210-214.
15. Branch D.W. Antiphospholipid antibodies and reproductive outcome: the current state of affairs // J. Reprod. Immunol. – 1998. – Vol. 38, N 1. – P.75-87.
16. Divakaran T.G., Waugh J., Clark T.J. et al. Noninvasive techniques to detect fetal anemia due to red blood cell alloimmunization: a systematic review // Obstet. Gynecol. – 2001. – Vol. 98, N3. – P.509-517.
17. Furundarena J.R., Ibisite A., Burgueta Y. et al. Rh(D) alloimmunization and pregnancy. Analysis of the causes after prophylaxis introduction // Sangre. – 1999. – Vol.44, N6. – P. 429-433.
18. Huang C.H. Alteration of Rh gene structure and expression in human dCCee and DCW-red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity // Blood. – 1996. – Vol.88, N6. – P.2326-2333.
19. Iskaros J., Kindom J., Morrison J.J., Rodeck C. Prospective non-invasive monitoring of pregnancies complicated by red cell alloimmunization // Ultrasound Obstet. Gynecol. – 1998. – Vol.11, N6. – P.432-437.
20. Lighten A.D., Overton T.G., Sepulveda W. et al. Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1995. – Vol.173, N4. – P.1182-1185.
21. Malinowski A., Zeman K., Banasic M. et al. Efficiency of lymphocyte immunization by the partner in prevention of unexplained recurrent spontaneous abortion. II. Immunologic prognostic factors // Genecol. Pol. – 1997. – Vol.68, N4. – P. 173-180.
22. Marchalonis J.J., Kaymaz H., Schluter S.F. et al. Autoantibodies to T-cell receptor beta chains in human heart transplantation: epitope and spectrotpe analyses and kinetics of response // Exp. Clin. Immunogenet. – 1996. – Vol.13, N3-4. – P. 181-191.
23. Moise K.J. Changing trends in the management of red blood cell alloimmunization in pregnancy // Arch. Pathol. Lab. Med. – 1994. – Vol. 118, N4. – P. 421-428.
24. Mouthon L., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D. Analysis of self-reactive antibody repertoires in normal pregnancy // J. Autoimmun. – 1998. – Vol.11, N3. – P. 279-286.
25. Rahman F., Detti L., Ozcan T. et al. Can a single measurement of amniotic fluid delta optical density be safely used in the clinical management of Rhesus-alloimmunized pregnancies before 27 weeks gestation? // Acta Obstet. Gynecol. Scand. – 1998. – Vol.77, N8. – P.804-807.
26. Van den Veyver I.B., Moise K.J. Jr. Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization // Obstet. Gynecol. – 1996. – Vol.88, N6. – P.1061-1067.

поступила в редакцию 28.11.2002
отправлена на доработку 10.02.2003
принята к печати 11.04.2003