

УДК 618.3:616-022.6:612.014+612.017.1

В.П. Чернишов, Т.В. Радиш, С.М. Толкач, С.П. Писарева Серологичний статус, лімфоцитарні субпопуляції і система ФНП-рецептори у ЦМВ-інфікованих вагітних жінок

ДУ «Інститут педіатрії акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ, Україна

PERINATOLOGIYA I PEDIATRIYA. 2017.1(69):39-45; doi 10.15574/PP.2017.69.39

Мета — вивчити стан імунної системи у вагітних жінок залежно від їхнього деталізованого ЦМВ-серологічного статусу.**Пацієнти та методи.** Метод серологічної діагностики використано для визначення наявності IgM, рівня та авідності IgG антитіл до ЦМВ. Імуноферментний аналіз використано для вимірювання рівня ФНП і його розчинних рецепторів I і II типу. Аналіз субпопуляцій лімфоцитів здійснено проточною цитометрією. У цілому 279 ЦМВ-серопозитивних жінок обстежено в терміні 6–12 тижнів вагітності.**Результати.** Більшість (18%) випадків низької авідності ЦМВ IgG виявлено серед жінок із наявністю IgM і низьким рівнем IgG. У 7% жінок із наявним IgM і середнім рівнем IgG та лише в 1% жінок із відсутнім IgM і високим рівнем IgG також визначено низькоавідні антитіла. Авідність IgG антитіл зворотно корелювала з IgM позитивністю ($r=-0,62$; $p<0,05$) і прямо — з рівнем IgG ($r=0,75$; $p<0,05$). В IgM-позитивних жінок із низькою авідністю і низьким рівнем IgG відмічено знижений рівень CD3+, CD3+CD4+ лімфоцитів, високий рівень НК, CD8 позитивних НК і CD3+CD56+ лімфоцитів, у них також виявлено підвищену концентрацію ФНП та зниження рівня його розчинних рецепторів обох типів. В IgM-позитивних жінок із середнім індексом авідності і середнім рівнем IgG також знайдено підвищення НК, CD8-позитивних НК, CD3+CD56+ клітин і підвищений рівень ФНП. В IgM-негативних жінок із високою авідністю і високим рівнем IgG встановлено лише високу кількість CD3+CD56+ клітин.**Висновки.** Серологічний статус недавнього ЦМВ-інфікування (низька IgG авідність + низький рівень IgG + IgM позитивність) і серостатус ЦМВ-реактивації (середня IgG авідність + середній рівень IgG + IgM позитивність) у вагітних жінок асоційований з активацією НК, НКТ-клітин і ФНП. За первинної інфекції і вірусної реактивації вагітні жінки мають імунний статус, який загрожує вагітності.**Ключові слова:** цитомегаловірусна інфекція, вагітність, серологічний статус, авідність, субпопуляції лімфоцитів, природні кілери, НК-подібні Т-лімфоцити, фактор некрозу пухлин.

Serologic status, lymphocyte subsets and the system of TNF-receptors in CMV-infected pregnant women

V.P. Chernyshov, T.V. Radysh, S.M. Tolkach, S.P. Pisareva

SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Purpose — to study immune status in CMV-infected pregnant women according to their detailed serologic status.**Materials and methods.** Serologic diagnostic method was used to determine IgM, level and avidity of IgG antibodies to CMV. ELISA was used for measurement level of TNF and TNF soluble receptors I and II. Lymphocyte subset analysis was carried out with flow cytometry. A total of 279 CMV seropositive women were examined at 6-12 weeks gestation.**Results.** The majority of cases (18%) of low avidity CMV IgG were found among women with positive IgM and low IgG level. The low avidity antibodies were also detected in 7 % of women with positive IgM and medium IgG level, and only 1 % of patients with negative IgM and high IgG level. Avidity of IgG antibodies inversely correlated with IgM positivity ($r=-0,62$; $p<0,05$) and directly correlated with IgG level ($r=0,75$; $p<0,05$). IgM positive women with low avidity and low IgG level had low level of CD3+, CD3+CD4+ lymphocyte, high level of NK, CD8 positive NK and CD3+CD56+ lymphocytes. They also showed increased TNF concentration and decreased level of TNF soluble receptors of both types. High numbers of NK, CD8 positive NK, CD3+CD56+ cells and increased TNF level were found in IgM positive women with medium avidity and medium IgG level. IgM negative women with high avidity and high IgG level showed high level of CD3+CD56+ cells only.**Conclusions.** Serologic status of newly CMV infection (low IgG avidity plus low IgG level plus IgM positivity) and serologic status of CMV reactivation (medium IgG avidity plus medium IgG level plus IgM positivity) in pregnant women associate with NK, NKT-cells and TNF activation. Newly CMV infection and virus reactivation pregnant women causes immune status that put a pregnancy at risk.**Key words:** cytomegalovirus infection, pregnancy, serologic status, avidity, lymphocytes subsets, natural killer, NK-like T-cells, tumours necrosis factor.

Серологический статус, лимфоцитарные субпопуляции и система ФНО-рецепторы у ЦМВ-инфицированных беременных женщин

В.П. Чернышов, Т.В. Радиш, С.М. Толкач, С.П. Писарева

ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев, Украина

Цель — изучить состояние иммунной системы беременных женщин в зависимости от их детализированного ЦМВ-серологического статуса.**Пациенты и методы.** Метод серологической диагностики использован для определения наличия IgM, уровня и авидности IgG антител к ЦМВ. Иммуноферментный анализ использован для измерения уровня ФНО и его растворимых рецепторов I и II типа. Анализ субпопуляций лимфоцитов осуществлен проточной цитометрией. В общей сложности 279 ЦМВ-серопозитивных женщин обследованы в сроке 6–12 недель беременности.**Результаты.** Большинство (18%) случаев низкой авидности ЦМВ IgG обнаружены среди женщин с наличием IgM и низким уровнем IgG. У 7% женщин с наличием IgM и средним уровнем IgG и только у 1% женщин с отсутствием IgM и высоким уровнем IgG отмечены низкоавидные антитела. Авидность IgG антител обратно коррелировала с IgM позитивностью ($r=-0,62$; $p<0,05$) и прямо — с уровнем IgG ($r=0,75$; $p<0,05$). У IgM-позитивных женщин с низкой авидностью и низким уровнем IgG определен сниженный уровень CD3+, CD3+CD4+ лимфоцитов, высокий уровень НК, CD8 позитивных НК и CD3+CD56+ лимфоцитов, а также повышенная концентрация ФНО и снижение уровня его растворимых рецепторов обоих типов. У IgM-позитивных женщин со средним уровнем авидности и средним уровнем IgG выявлено повышение НК, CD8-позитивных НК, CD3+CD56+ клеток и повышенный уровень ФНО. У IgM-негативных женщин с высокой авидностью и высоким уровнем IgG отмечен только высокий уровень CD3+CD56+ клеток.**Выводы.** Серологический статус недавнего ЦМВ-инфицирования (низкая IgG авидность + низкий уровень IgG + IgM позитивность) и серостатус ЦМВ реактивации (средняя IgG авидность + средний уровень IgG + IgM позитивность) у беременных женщин ассоциированы с активацией НК, НКТ-клеток и ФНО. При первичном инфицировании и вирусной реактивации беременные женщины имеют иммунный статус, угрожающий беременности.**Ключевые слова:** цитомегаловирусная инфекция, беременность, серологический статус, авидность, субпопуляции лимфоцитов, натуральные киллеры, НК-подобные Т-лимфоциты, фактор некроза опухолей.

Вступ

Цитомегаловірус (ЦМВ) є однією з найпоширеніших і одночасно найзагадковіших інфекцій людини. Особливість ЦМВ полягає в тому, що в імунокомпетентних осіб він найчастіше має безсимптомний перебіг як за первинного зараження, так і в подальшому в разі реактивації інфекційного процесу. Проте за певних умов може набувати тяжких генералізованих форм з ураженням органів і центральної нервової системи. Результати досліджень останніх років змушують поглянути на ЦМВ під новим кутом: вважають, що ЦМВ-інфекція в молодому віці має позитивні наслідки, оскільки викликає генерацію високодиференційованих поліфункціональних CD4+, CD8+ і CD56+ Т-лімфоцитів, які за рахунок перехресного реагування і високої ефекторної активності не тільки контролюють ЦМВ-інфекцію, але й захищають проти інших інфекцій та пухлин [4, 12].

Особливу увагу ЦМВ набуває під час вагітності. Його відносять до найбільш частих чинників конгенітального інфікування, яке призводить до розвитку тяжких захворювань новонародженого. Вроджену ЦМВ-інфекцію вважають провідною інфекційної причиною розумової відсталості, нейросенсорної глухоти і порушень зору в дітей [21]. Інша акушерська проблема, яка виникає у зв'язку з ЦМВ-інфікуванням, полягає в тому, що активна фаза інфекції і вірусна персистенція може провокувати розвиток загрози викидня, тобто є небезпечною для збереження вагітності [2]. Проте таку думку поділяють не всі дослідники, зокрема, отримано переконливі дані про відсутність зв'язку між викиднем і ЦМВ-інфікуванням вагітної жінки [9]. Враховуючи важливу роль у підтримці вагітності імунної системи матері і те, що можливість конгенітального інфікування дитини значною мірою залежить від імунітету матері, постає питання про актуальність вивчення стану імунної системи у вагітних ЦМВ-серопозитивних жінок як у разі первинної інфекції, так і за її реактивації.

Мета роботи — вивчити стан імунної системи у вагітних жінок залежно від їхнього деталізованого ЦМВ-серологічного статусу.

Матеріали та методи дослідження

Імунологічне дослідження проведено у 279 вагітних жінок, які за попередніми результатами скринінгу на TORCH-інфекції виявилися інфікованими ЦМВ: 196 жінок були

ЦМВ IgM позитивні, решта 83 — ЦМВ IgM негативні; серед останніх у 12 виявлено IgG сероконверсію, у 33 — зареєстровано підвищення рівня IgG у двох послідовних дослідженнях, у 38 — рівень IgG значно перевищував верхню межу чутливості методу визначення. За акушерським анамнезом група обстежених була однорідною. 36 ЦМВ-серонегативних жінок із нормальним перебігом вагітності і необтяженим акушерським анамнезом становили контрольну групу. Усі жінки обстежені в терміні вагітності від 6 до 12 тижнів. Лікування, обстеження, використання даних і результатів здійснено із суворим дотриманням принципу поінформованої згоди.

Якісна детекція IgM та кількісне визначення IgG антитіл до ЦМВ у сироватках крові обстежених жінок проведено методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних наборів реагентів ВектоЦМВ-IgM і ЦМВ-IgG-Iфа-БЕСТ (Вектор-Бест) відповідно. Аналіз здійснено згідно з протоколом, що додається до набору реагентів, із застосуванням планшетного промивача та фотометру Multiscan (Labsystems, Фінляндія). Залежно від вимірних значень, рівень IgG антитіл трактувався як низький, середній або високий.

Визначення авідності IgG антитіл до ЦМВ у сироватках крові обстежених жінок здійснено методом імуноферментного аналізу з використанням комерційного набору реагентів Век-

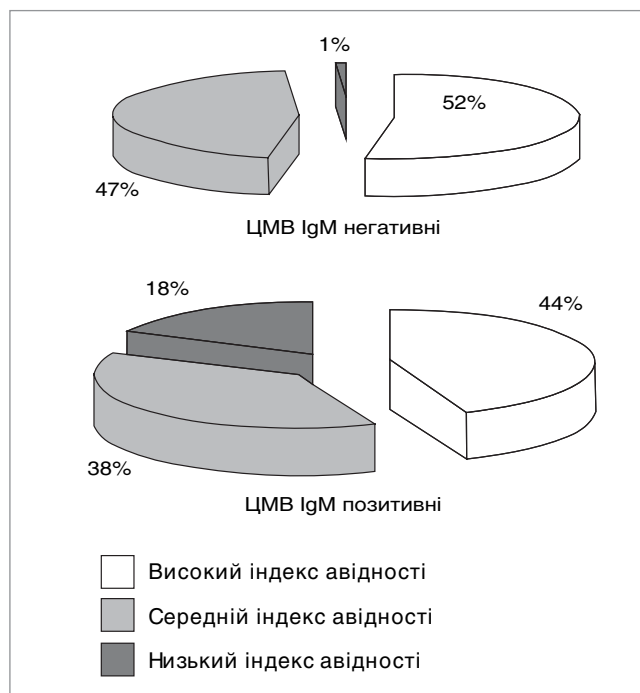


Рис. 1. Частота виявлення високо-, середньо- і низькоавідних ЦМВ IgG антитіл у IgM-негативних та IgM-позитивних вагітних жінок

то ЦМВ-IgG-авідність (Вектор-Бест) згідно з протоколом проведення аналізу, що додається до набору реагентів, та із застосуванням планшетного промивача і фотометру Multiscan (Labsystems). Оцінку авідності IgG антитіл проведено шляхом обробки комплексів антиген-антитіло розчином сечовини, який призводить до денатурації білка, у результаті чого зв'язок низькоавідних антитіл з антигеном руйнується. Співвідношення результатів детекції IgG антитіл в пробі, яка була оброблена сечовиною, до тої, що не була оброблена дисоціюючим агентом, розцінено як індекс авідності. Залежно від значення індексу антитіла класифіковано як низько-, середньо- або високоавідні. За сучасними підходами до тлумачення серологічних даних, низькоавідні IgG засвідчують, що первинне інфікування ЦМВ сталося протягом 3–4 місяців перед обстеженням; високоавідні вказують, що зараження відбулося понад 4 місяці тому; середньоавідні IgG не дають змоги визначити термін інфікування.

Визначення лімфоцитарних субпопуляцій у крові обстежених жінок проведено методом двокольорової проточної цитофлуориметрії. Для цього дослідні зразки крові інкубовано з моноклональними антитілами відповідних специфічностей і проаналізовано на лазерному проточному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, США) з процедурою накладання лейкоцитарного гейту.

Концентрацію фактора некрозу пухлин (ФНП) та його розчинних рецепторів типу 1 (pp55) та 2 (pp75) у крові обстежених жінок визначено із застосуванням імуоферментного аналізу за оригінальною методикою [1]. Для оцінки стану системи ФНП-розчинні рецепто-

ри обчислено молярні співвідношення pp55/ФНП та pp75/ФНП.

Статистичну обробку проведено з використанням програми In Stat для Windows (версія 3.0, Graph Pad Software Inc., Сан-Дієго, США). Вірогідність різниці встановлено за тестом Манна–Уїтні (непарний, непараметричний, двоххвостовий). Використано кореляційний аналіз за Спірменом і Пірсоном. Відмінності вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Відібраним для обстеження ЦМВ-серопозитивним жінкам проводилося повторне серологічне дослідження з визначенням наявності IgM антитіл, рівня та індексу авідності IgG антитіл до ЦМВ. Дослідження ЦМВ IgG авідності показало, що серед IgM негативних вагітних частота виявлення високо- і середньоавідних IgG антитіл була практично однаковою: 52% і 47% відповідно; $p > 0,05$ (рис. 1). Низькоавідні антитіла у цій групі виявлені лише в 1 випадку, що становило менше 1%. Серед IgM позитивних вагітних частки жінок, що мали високо- і середньоавідні IgG антитіла, становили 44% і 38% і були подібними між собою і до групи IgM негативних вагітних ($p > 0,05$). Водночас, IgG антитіла з низьким індексом авідності відмічалися у 35 IgM позитивних жінок, тобто у 18%, що було значно вище ($p < 0,01$), ніж серед IgM негативних (рис. 1).

Розподіл ЦМВ-серопозитивних жінок за рівнем IgG виявився дуже подібним до такого за індексом авідності: частки жінок із високим, середнім і низьким рівнем IgG становили відповідно 49%, 36% і 15%. Сукупний аналіз рівня і індексу авідності (рис. 2) показав, що у крові вагітних із високим рівнем IgG високоавідні антитіла визначалися частіше за середньоавідні (64% проти 35%; $p < 0,05$), а низькоавідні — лише в 1 випадку. За середнього рівня IgG частота визначення антитіл із високим і середнім індексом авідності була приблизно однаковою (40% і 53% відповідно; $p > 0,05$), при цьому низькоавідні антитіла виявлялися у 7% випадків. У разі низького рівня IgG у жодному випадку не спостерігалось антитіл із високим індексом авідності, а частки зразків із середньо- та низькоавідними антитілами не відрізнялися між собою (42% і 58% відповідно; $p > 0,05$). Високі індекси авідності в жінок із високим рівнем IgG визначалися частіше, ніж із середнім і низьким рівнем ($p < 0,05$), а відсоток виявлення IgG з низькою авідністю серед жінок із

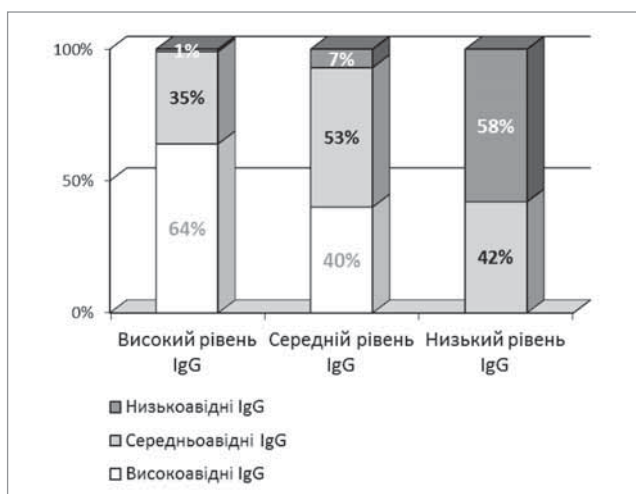


Рис. 2. Частота виявлення анти-ЦМВ IgG із високим, середнім і низьким індексом авідності залежно від рівня IgG антитіл

низьким рівнем IgG був значно вищим ($p < 0,01$), ніж із середнім та високим.

У результаті кореляційного аналізу виявлено, що вірогідний зворотний зв'язок існує між наявністю ЦМВ IgM антитіл та індексом авідності IgG ($r = -0,62$; $p < 0,05$), а також високим рівнем IgG ($r = -0,36$; $p < 0,01$); сильний прямий кореляційний зв'язок — між наявністю ЦМВ IgM антитіл і низьким рівнем IgG ($r = 0,82$; $p < 0,01$) та між рівнем і авідністю IgG ($r = 0,75$; $p < 0,05$).

Результатами численних досліджень продемонстровано, що ризик внутрішньоутробної передачі ЦМВ набагато вищий у жінок, первинно інфікованих під час вагітності, ніж у інфікованих задовго до зачаття, які мають анти-ЦМВ імунітет [20]. Тому провідним завданням діагностики ЦМВ-інфекції під час вагітності стала детекція випадків нещодавнього інфікування. Вирішити це завдання за традиційного підходу до тлумачення результатів серологічної діагностики виявилось неможливим, оскільки ЦМВ-інфекція має атиповий серологічний профіль [9, 20, 23].

У дослідженнях, проведених протягом останніх 20 років, доведено, що вимір ЦМВ IgG авідності є одночасно чутливим і специфічним методом для виявлення вагітних жінок із недавньою первинною інфекцією і, відповідно, підвищеним ризиком вертикальної передачі ЦМВ. Значення визначення ЦМВ IgG авідності підтверджено тим, що за вродженої інфекції новонароджених вона значно знижена у крові матері [16]. IgG авідність визначається як сила, з якою IgG зв'язується з антигенними епітопами, вона «дозріває» поступово протягом 6 місяців після первинного інфікування. Низька ЦМВ IgG авідність є індикатором первинного інфікування протягом попередніх 3–4 місяців, тоді як висока авідність виключає первинне інфікування протягом 4 місяців [20]. Вважають, що ЦМВ-специфічні нейтралізуючі антитіла з високою авідністю з крові матері потрапляють до ембріонального кровообігу і запобігають розвитку вродженого інфікування [8].

Показано, що виявлення IgM антитіл є чутливим маркером первинного ЦМВ-інфіку-

вання, проте його специфічність невисока, оскільки IgM також виявляється за вірусної реактивації, доволі довго «зберігається» після первинного інфікування в деяких людей [20], а також стабільно продукується під час хронічної інфекції [23]. Лише чверть ЦМВ IgM серопозитивних пацієнтів мають гостру інфекцію, підтверджену високою авідністю IgG, в інших випадках термін інфікування становить понад три місяці або його неможливо визначити [19]. Вважають, що за позитивних або граничних результатів тестування ЦМВ IgM імовірність вродженої ЦМВ-інфекції зростає в разі низької авідності IgG або ультразвукових ознак аномалій у плода [16]. Показано, що високий рівень ЦМВ IgG серопозитивності спостерігається за відсутності вірусної ДНК (за результатами полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу [9], тому не може бути ознакою реплікації вірусу. Вміст IgG антитіл після первинного інфікування ЦМВ зростає поступово протягом довгого часу, саме тоді розвиваються ЦМВ-специфічні антитіла, нейтралізуюча дія яких, вочевидь, підсилюється внаслідок реінфекції і реактивації [23]. Однак у ході скринінгу вагітних на TORCH-інфекції застосовується традиційне визначення анти-ЦМВ IgG і IgM антитіл, тому є важливим за цими показниками відібрати для подальшого визначення авідності жінок із підозрою на первинне інфікування. За отриманими нами даними, ЦМВ IgM серопозитивні жінки з низьким і середнім рівнем IgG потребують обов'язкового визначення індексу авідності антитіл, оскільки саме в них найчастіше підтверджується недавнє первинне інфікування.

Отримані нами результати в сукупності з наведеними даними інших сучасних досліджень дають змогу сформулювати три типи серологічного статусу, які відповідають різним формам інфекційного процесу і, відповідно, ризику внутрішньоутробного ЦМВ-інфікування плода (табл. 1). Високий індекс авідності і високий рівень IgG за відсутності IgM антитіл характеризує інфекцію як давню, латентну й контрольовану з боку імунної системи і виз-

Таблиця 1

Основні типи серологічного статусу ЦМВ-інфікованих вагітних жінок

| Серологічний показник | Ризик інфікування плода/форма ЦМВ | | |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | низький /давня латентна | не визначений / реактивація | високий /первинна |
| Індекс авідності ЦМВ IgG | високий | середній | низький |
| ЦМВ IgM антитіла | відсутні | наявні | наявні |
| Рівень ЦМВ IgG | високий | середній | низький або середній |

Таблиця 2

Концентрація фактора некрозу пухлин, його розчинних рецепторів та молярні співвідношення (M±m) у ЦМВ інфікованих вагітних жінок залежно від типу серологічного статусу

| Серологічний статус | n | ФНП, пг/мл | Pp55, нг/мл | Pp75, нг/мл | Pp55/ФНП | Pp75/ФНП |
|-----------------------------------|----|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Низький ризик / латентна інфекція | 28 | 2,56±0,27 | 2,98±0,18 | 4,53±0,22 | 0,68±0,11 | 1,04±0,13 |
| Невизначений ризик / реактивація | 51 | 3,76±0,29* | 2,65±0,31 | 3,52±0,25 | 0,44±0,09* | 0,73±0,12* |
| Високий ризик / первинна інфекція | 35 | 4,02±0,32* | 2,36±0,27* | 2,81±0,14* | 0,39±0,04* | 0,51±0,09* |
| Негативний (контроль) | 36 | 2,39±0,12 | 3,25±0,09 | 4,83±0,19 | 0,76±0,04 | 1,13±0,05 |

Примітка: * – вірогідність різниці $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Таблиця 3

Лімфоцитарні субпопуляції (M±m) у ЦМВ-інфікованих вагітних жінок залежно від типу серологічного статусу

| Серологічний статус | n | Показник, % | | | |
|-----------------------------------|----|-------------|----------|-----------|----------|
| | | CD3+ | CD19+ | CD3+CD4+ | CD3+CD8+ |
| Низький ризик / латентна інфекція | 28 | 70,3±1,1 | 11,2±0,9 | 39,7±1,6 | 26,1±1,3 |
| Невизначений ризик / реактивація | 51 | 66,9±1,3 | 12,4±0,7 | 40,2±1,2 | 28,1±1,4 |
| Високий ризик / первинна інфекція | 35 | 62,6±1,8* | 13,6±0,9 | 32,5±1,7* | 26,6±0,9 |
| Негативний (контроль) | 36 | 70,6±1,7 | 12,8±0,8 | 41,6±1,1 | 28,2±1,2 |

Примітка: к – вірогідність різниці $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою

начає ризик вертикальної передачі вірусу як низький. Середні індекс авідності та рівень IgG за наявності IgM вказують на високу імовірність реактивації ЦМВ-інфекції, але не надають потрібної діагностичної інформації щодо ризику інфікування плода. Низькоавідні IgG антитіла в сукупності з їхнім низьким або середнім рівнем та наявністю IgM відповідають недавньому (щонайбільше 4 місяці) первинному ЦМВ-інфікуванню в жінки, неспроможності специфічного імунітету і, відповідно, високому ризику інфікування плаценти і плода (табл. 1). Серостатуси, інакші від описаних, є проміжними, визначення ризиків внутрішньоутробного інфікування в таких випадках можливе після додаткового обстеження або неможливе взагалі.

Наші висновки щодо серологічної діагностики відповідають сучасній діагностичній тактиці за ЦМВ-інфекції, яку на теперішній час слід вважати визначеною. Однак щодо лікувальної стратегії досі залишається багато питань, які можна вирішити лише з урахуванням ступеня ураження органів, імунного статусу і супутніх захворювань [18]. У цьому контексті особливого значення набуває дослі-

дження імунного статусу вагітної жінки залежно від її ЦМВ-серостатусу, на що вказують роботи попередніх років [6]. Тому в нашій роботі результати дослідження лімфоцитарних субпопуляцій, ФНП і його розчинних рецепторів у ЦМВ-інфікованих вагітних жінок проаналізовано залежно від типу серологічного статусу.

За дослідження ФНП та його рецепторів з'ясовано, що в жінок із серостатусом, який відповідає латентній інфекції і низькому ризику внутрішньоутробного інфікування, продукція ФНП та його розчинних рецепторів 55 і 75 і, відповідно, молярні співвідношення відповідали таким у контрольній групі (табл. 2). За серостатусу «невизначений ризик / реактивація» концентрація ФНП була підвищеною, рівень pp55 і pp75 не відрізнявся від контрольного, проте обидва молярні співвідношення виявилися зниженими. За серологічного статусу високого ризику / первинної інфекції спостерігалось як підвищення рівня ФНП, так і зниження концентрації обох його розчинних рецепторів і молярних співвідношень (табл. 2).

Дослідження основних лімфоцитарних популяцій у крові ЦМВ-інфікованих вагітних показало, що за серологічного статусу, який

Таблиця 4

Вміст природних кілерів і ПК-подібних лімфоцитів (M±m) у ЦМВ-інфікованих вагітних жінок залежно від типу серологічного статусу

| Серологічний статус | n | Показник, % | | |
|-----------------------------------|----|--------------|-----------|-----------|
| | | CD3-CD16/56+ | CD3+CD56+ | CD3-CD8+ |
| Низький ризик / латентна інфекція | 28 | 14,4 1,7 | 12,6 1,4* | 43,9 3,7 |
| Невизначений ризик / реактивація | 51 | 19,6 1,5* | 10,5 1,0* | 64,1 3,3* |
| Високий ризик / первинна інфекція | 35 | 20,2 1,9* | 14,0 1,1* | 57,2 4,0* |
| Негативний (контроль) | 36 | 11,7 0,8 | 2,8 0,9 | 48,4 2,9 |

Примітка: к – вірогідність різниці $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

відповідає низькому та невизначному ризику внутрішньоутробного інфікування, у стані субпопуляцій зміни не спостерігалися. Водночас, серостатус високого ризику супроводжувався зниженням кількості CD3+

T-лімфоцитів і CD3+CD4+ T-хелперів (табл. 3). Такі зміни є типовими для періоду реконвалесценції за інфекційного процесу і опосередковано засвідчують нещодавнє первинне ЦМВ-інфікування.

Окремо ми проаналізували вміст CD3-CD16/56+ природних кілерів (ПК), CD8 позитивних ПК, які визначали як CD3-CD8+, та ПК-подібних T-лімфоцитів із фенотипом CD3+CD56+ (табл. 4). Кількість ПК виявилася підвищеною порівняно з контролем у крові жінок із реактивацією та первинним інфікуванням, але не з латентною інфекцією. Вміст CD3+CD56+ клітин у ЦМВ-інфікованих жінок усіх трьох визначених серологічних типів значно перевищував такий у контролі. Кількість CD8 позитивних ПК була вищою, ніж у контрольній групі, в жінок із серотипами «невизначений ризик / реактивація» і «високий ризик / первинна інфекція» (табл. 4).

Відомо, що в імунокомпетентних осіб ЦМВ-інфекція викликає розвиток активної специфічної імунної відповіді, до якої залучені усі типи ефекторних T-лімфоцитів, включаючи ПК-подібні клітини, а також ПК [4, 6, 12, 17]. ЦМВ-індуковані ефекторні T-клітини спроможні підсилювати або провокувати системне і локальне запалення, вони продукують переважно прозапальні цитокіни, зокрема ФНП- α і інтерферон- γ , накопичуються поблизу ендотелію судин і здатні до його ураження [5, 7]. Це є важливим моментом, оскільки патогенетичні механізми викидня реалізуються через запалення в ендотелії судин плаценти. До того, регуляція материнської імунної функції через компоненти запалення має першорядне значення для успішної вагітності, а дисбаланс прозапальних і протизапальних цитокінів та хемокінів може спричинити аномальне запалення і призвести до ускладнення або втрати вагітності [14]. Таким чином, активна ЦМВ-інфекція призводить до такого стану імунної системи, який створює загрозу для збереження вагітності.

Отримані нами дані підтверджують це припущення. У жінок із первинним інфікуванням і реактивацією знайдено порушення в системі ФНП-розчинні рецептори: підвищення концентрації самого фактора і послаблення

нейтралізації його системної дії розчинними рецепторами обох типів. ФНП є надважливим компонентом розвитку запалення, він відіграє суттєву роль у процесі вагітності та у формуванні її ускладнень [13]. Водночас, втрата вагітності асоційована не стільки зі змінами в продукції самого ФНП, скільки з недостатнім синтезом його розчинних рецепторів pp55 і pp75 та, відповідно, нестачею нейтралізації цими рецепторами прозапальної дії ФНП [3]. Тобто, за нашими даними, недавнє первинне інфікування і реактивація ЦМВ створюють загрозу для вагітності.

Це підтверджують отримані нами результати про підвищення кількості ПК і підсилення на них експресії CD8 у жінок із серологічними типами, які відповідають первинному інфікуванню і реактивації ЦМВ. Відомо, що підвищення вмісту натуральних кілерів у крові і особливо підсилення їхньої цитотоксичної активності є типовим для невиношування вагітності [15]. Показано, що як зниження, так і підвищення експресії CD8 на ПК-клітинах супроводжує суттєві зміни в цитотоксичності останніх та асоційоване з репродуктивними невдачами [10]. Тобто зміни кількості і поверхневого фенотипу ПК, знайдені у нашому дослідженні, засвідчують, що в жінок із реактивацією та первинним ЦМВ-інфікуванням вагітність перебігає на несприятливому імунному фоні.

У всіх ЦМВ-інфікованих жінок незалежно від їхнього деталізованого серологічного статусу відмічається суттєве підвищення кількості CD56 позитивних T-лімфоцитів. Так звані ПК-подібні T-клітини з фенотипом CD3+CD56+ є основною складовою популяції цитокін-індукованих кілерів [22], які здійснюють протипухлинний захист, а також контролюють вірусні інфекції, зокрема, відіграють суттєву роль у специфічній анти-ЦМВ імунній відповіді [11]. На нашу думку, підвищення вмісту ПК-подібних T-лімфоцитів у ЦМВ-інфікованих жінок не пов'язане з перебігом вагітності, а є характерним для будь-якої форми ЦМВ-інфекції.

Висновки

Низькоавідні антитіла, які засвідчують нещодавнє первинне ЦМВ-інфікування, найчастіше (18%) визначаються в разі, коли за первинного скринінгу виявлено сполучення наявності IgM з низьким рівнем IgG антитіл до ЦМВ. Частота визначення низькоавідних антитіл найнижча (<1%) серед жінок із відсутністю IgM і високим рівнем IgG.

За результатами серологічного аналізу, у ЦМВ-інфікованих жінок визначаються щонайменше три серостатуси. Відсутність IgM, високий рівень і високий індекс авідності IgG антитіл засвідчують латентну ЦМВ-інфекцію в жінки і низький ризик інфікування плода. Наявність IgM, низький або середній рівень і низький індекс авідності IgG дають змогу визначити недавнє первинне ЦМВ-інфікування жінки та високий ризик вертикальної передачі вірусу. Наявність IgM, середній рівень і середній індекс авідності IgG вказують на високу імовірність реактивації ЦМВ-інфекції і не дають змоги визначити

ризик інфікування плода без додаткових досліджень.

Серологічний статус ЦМВ-інфікованих вагітних жінок має безпосередній зв'язок з їхнім імунним статусом. Найбільш численні і глибокі порушення відмічаються в жінок із серостатусом первинного інфікування, незначні — у жінок із серостатусом латентної інфекції. Характер змін у продукції ФНП і його розчинних рецепторів, а також у кількості ПК і експресії на них CD8 засвідчує, що за недавнього первинного інфікування та в разі реактивації ЦМВ формується імунний статус, який є небезпечним для вагітності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Применение кооперативных моноклональных антител в иммуноферментном анализе для определения фактора некроза опухолей человека / М.А. Водяник, В.П. Чернишов, Л.И. Омельченко, Е.В. Куценко // Український біохімічний журнал. — 2001. — Т. 73, № 6. — С. 77—83.
2. Чешик С.Г. Цитомегаловирусная инфекция и спонтанные аборт у женщин в I и II триместрах беременности / С.Г. Чешик, Л.Б. Кистенева // Вопросы вирусологии. — 2016. — Т. 61, № 2. — С. 74—78.
3. Chernyshov V.P. Lack of soluble TNF-receptors in women with recurrent spontaneous abortion and possibility for its correction / V.P. Chernyshov, M.A. Vodyanik, S.P. Pisareva // Am. J. Reprod. Immunol. — 2005. — Vol. 54 (5). — P. 284—291.
4. CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4+ T cell subset coexpressing CD57 and CD154 / A. Pera, A. Vasudev, C. Tan [et al.] // J. Leukoc. Biol. — 2016. — Aug 26. — Pii: jlb.4A0316—112R.
5. Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4+ T Cells Targeted to Vascular Endothelium / A. Pachnio, M. Ciaurri, J. Begum [et al.] // PLoS Pathog. — 2016. — Vol. 8; № 12 (9). — e1005832.
6. Cytomegalovirus sero positivity dramatically alters the maternal CD8+ T cell repertoire and leads to the accumulation of highly differentiated memory cells during human pregnancy / D. Lissauer, M. Choudhary, A. Pachnio [et al.] // Hum. Reprod. — 2011. — Vol. 26 (12). — P. 3355—3365.
7. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage / P.J. Van de Berg, S.L. Yong, E.B. Remmerswaal [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2012. — № 19. — P. 772—779.
8. Cytomegalovirus-specific, high-avidity IgG with neutralizing activity in maternal circulation enriched in the fetal bloodstream / N. Nozawa, J. Fang-Hoover, T. Tabata [et al.] // J. Clin. Virol. — 2009. — Vol. 46, Suppl. 4. — S58—63.
9. Detection of cytomegalovirus, human parvovirus B19, and herpes simplex virus-1/2 in women with first-trimester spontaneous abortions / Y. Zhou, G. Bian, Q. Zhou [et al.] // J. Med. Virol. — 2015. — Vol. 87 (10). — P. 1749—1753.
10. Dons'koi BV. Accentuated hypo- and hyper-NK lymphocyte CD8 expression is a marker of NK subsets' imbalance and is predictive for reproductive failures / B.V. Dons'koi // Immunobiology. — 2015. — Vol. 220 (5). — P. 649—655.
11. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity / A. Pievani, G. Borleri, D. Pende [et al.] // Blood. — 2011. — Vol. 118 (12). — P. 3301—3310.
12. Effect of age and latent CMV infection on CD8+ CD56+ T cells (NKT-like) frequency and functionality / F. Hassouneh, C. Campos, N. Lopez-Sejas [et al.] // Mech. Ageing. Dev. — 2016. — Vol. 158 (2). — P. 38—45.
13. Golic M. Tumor Necrosis Factor- α , Uterine Natural Killer Cells, and Pregnancy / M. Golic, F.C. Luft, R. Dechend // Hypertension. — 2016. — Vol. 68 (5). — P. 1108—1109.
14. Inflammation in Complicated Pregnancy and Its Outcome / R.R. Kalagiri, T. Carder, S. Choudhury [et al.] // Am. J. Perinatol. — 2016. — Vol. 33 (14). — P. 1337—1356.
15. Intravenous Immunoglobulin G Improves Pregnancy Outcome in Women with Recurrent Pregnancy Losses with Cellular Immune Abnormalities / S.K. Lee, J.Y. Kim, A.R. Han [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. — 2016. — Vol. 75 (1). — P. 59—68.
16. Low IgG avidity and ultrasound fetal abnormality predict congenital cytomegalovirus infection / A. Sonoyama, Y. Ebina, I. Morioka [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84, № 12. — P. 1928—1933.
17. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8(+) T cells, CD4(+) T cells, and NK cells / F.A. Vieira Braga, K.M. Hertoghs, R.A. van Lier, K.P. van Gisbergen // Eur. J. Immunol. — 2015. — Vol. 45 (9). — P. 2433—2445.
18. Nakase H. Cytomegalovirus Colitis, Cytomegalovirus Hepatitis and Systemic Cytomegalovirus Infection: Common Features and Differences / H. Nakase, H. Herfarth // Inflamm. Intest. Dis. — 2016. — № 1 (1). — P. 15—23.
19. Pregnancy outcomes of mothers with detectable CMV-specific IgM antibodies: a three-year review in a large Irish tertiary referral maternity hospital / R.J. Drew, P. Stapleton, H. Abu [et al.] // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. — 2015. — Vol. 2015 (2015). — Art. ID 218080. — 5 p.
20. Prince H.E. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV-infection during pregnancy / H.E. Prince, M. Lape-Nixon // Clin. Vaccine Immunol. — 2014. — Vol. 21 (10). — P. 1377—1384.
21. Pusztaí R. Mother-to-fetus transmission of cytomegalovirus. A review / R. Pusztaí, A. Lukacsi, I. Kovacs // Acta Microbiol Immunol Hung. — 2004. — Vol. 51 (4). — P. 385—401.
22. The dual-functional capability of cytokine-induced killer cells and application in tumor immunology / Q. Zhang, X.Y. Liu, T. Zhang [et al.] // Hum. Immunol. — 2015. — Vol. 76 (5). — P. 385—391.
23. Viral Persistence Induces Antibody Inflation without Altering Antibody Avidity / S.P. Welten, A. Redeker, R.E. Toes, R.V. Arens // J. Virol. — 2016. — Vol. 90 (9). — P. 4402—4411.

Сведения об авторах:

Чернишов Виктор Павлович — д. мед. н., проф., зав. лабораторией иммунологии ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-90-61.

Радий Татьяна Владимировна — к. биол. н., н. с. лаборатории иммунологии ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-92-63.

Толкач Сергей Николаевич — к. мед. н., ст. н. с. отделения научных проблем невынашивания беременности ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-80-64.

Писарева Светлана Петровна — д. мед. н., проф., гл. н. с. отделения научных проблем невынашивания беременности ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-80-64.

Статья поступила в редакцию 12.01.2017 г.