

УДК 612.017+618.2[616.98:578.828 HIV

## Значение показателей субпопуляций лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных беременных

Н.Л. Громыко<sup>1</sup>, Е.И. Барановская<sup>1</sup>, Д.Л. Якушев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Институт радиобиологии НАН Беларуси

Гомель, Республика Беларусь

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

N.L. Gromyko<sup>1</sup>, E.I. Baranovskaya<sup>1</sup>, D.L. Yakushev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gomel State Medical University

Gomel, Belarus

### Аннотация

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

### Ключевые слова

Проточная цитофлюориметрия, ВИЧ-инфекция, беременность

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

### Summary

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

### Key words

Flow cytometry, HIV-infection, pregnancy.

количество ВИЧ-инфицированных беременных и рожденных ими детей.

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

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

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

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

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

### Материалы и методы

Всего обследовано 83 беременные женщины.

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

Все беременные включены в исследование после получения информированного письменного согласия.

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

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

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

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

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

### Результаты и обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

Примечания:

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

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

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

**Таблица 2**  
**Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови в группах**

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

Примечания:

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

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

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

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

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

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

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

Нами выявлены статистически достоверные отличия в группах по содержанию естественных киллеров ( $CD3-CD(16+56)^+$ ) в периферической крови ( $p \leq 0,05$ ). Снижение количества естественных киллеров в группе ВИЧ-инфицированных приводит к возникновению угрозы невынашивания беременности ( $r=-0,39$ ), развитию фетоплацентарной недостаточности ( $r=-0,43$ ), появлению острых респираторных заболеваний ( $r=-0,32$ ). Естественные киллеры выполняют функцию иммунного надзора, играют важную роль в первичной иммунной защите [4]. Снижение количества данных клеток у ВИЧ-инфицированных беременных может приводить к ухудшению противовирусной и противоопухолевой защиты в послеродовом периоде и способствовать развитию оппортунистических заболеваний.

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

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

### Выводы

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

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

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

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

## Литература

---

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