

© Коллектив авторов, 2003

А. В. Шабалдин, А. Н. Глушков, Л. М. Казакова, Т. А. Симонова, Л. А. Логинова,
Н. К. Жулинская, С. А. Чистякова

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ ЦНС У ПЛОДА

Отдел иммунологии рака КемНЦ СО РАН, Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ,
Областной перинатальный центр г. Кемерово, РФ

Авторы наблюдали и обследовали 40 беременных женщин, у плодов которых по данным УЗИ были выявлены различные пороки развития ЦНС, а также 18 семейных пар, в которых женщины страдали первичной невынашиваемостью беременности (ПНБ). Контрольную группу составили 33 семейные пары с физиологическим течением беременности у женщин. Типирование HLA DR выполняли стандартным удлинённым лимфо-цитотоксическим тестом. Также исследовали иммунные взаимодействия в системе «мать — плод» с помощью использования двунаправленного варианта смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) супругов и определяли блокирующую активность женской сыворотки (БАС) на СКЛ. Авторы выявили ассоциации HLA DR фенотипа родителей с развитием врожденных пороков развития ЦНС у плода — положительные для HLA DR5 и отрицательные для HLA DR4 и, вероятно, для HLA DR6. Также выявлено, что отсутствие иммунного распознавания в СКЛ, отсутствие БАС и сочетание этих двух нарушений в группе женщин с врожденными пороками развития ЦНС у плода встречаются значительно чаще, чем в контрольной группе. Подобная частота указанных нарушений установлена и в группе женщин с ПНБ.

Authors observed and examined 40 pregnant women whose fetuses had different CNS malformations diagnosed by US examination and 18 couples in which women had history of habitual abortion (HA). 33 couples with physiologic pregnancy were examined as control group. HLA-DR typing was performed by standard prolonged lymphocytotoxic method. Immune relations in «mother — fetus» system were studied with usage of bidirected variant of couple mixed lymphocytes culture (MLC); authors also studied blocking activity of female serum (BAS) on MLC. Authors showed association of parental HLA-DR phenotype and fetal congenital malformations — positive correlation for HLA-DR5 and negative correlation for HLA-DR4 and, may be, for HLA-DR6. They also showed that absence of immune distinguish in MLC, absence of BAS and combination of these two disorders were more frequent in women whose fetuses had CNS malformation then in control group. The rate of these disorders in women with HA was similar.

Ранняя диагностика и прогнозирование врожденных пороков развития плода (ВПРП), особенно таких тяжелых, как ВПРП ЦНС, является актуальной проблемой перинатологии. Одним из перспективных подходов к ее решению представляется поиск генетических маркеров. Анализ генов главного комплекса гистовместимости человека (HLA) положительно зарекомендовал себя в диагностике многих заболеваний человека, в том числе в педиатрической практике [9], в частности, при детском церебральном параличе [7].

Однако до сих пор не было попыток выявить ассоциации или взаимосвязи генов HLA и ВПРП.

Ранее нами было установлено, что подбор супружеских родительских пар по генам HLA DR в общей популяции носит неслучайный характер. Мы допускаем, что при ВПРП этот процесс может иметь своеобразные особенности, однако это предположение нуждается в доказательствах.

Известно, что нарушения иммунных взаимодействий матери и плода на фенотипическом уровне во

многим определяют развитие некоторых видов перинатальной патологии, в частности, первичной невынашиваемости беременности (ПНБ) [6]. Остается открытым вопрос, имеют ли место подобные нарушения при ВПРП и каковы их иммуногенетические особенности.

Задачами настоящего исследования явились: выявление иммуногенетических маркеров ВПРП; установление особенностей подбора супружеских пар при ВПРП; определение характера иммунных взаимодействий матери и плода при ВПРП; сравнительная оценка частоты ВПРП и ПНБ на иммуногенетическом и иммунофенотипическом уровнях.

Материалы и методы исследования

Нами были обследованы 40 беременных женщин, у плодов которых по данным ультразвукового исследования были выявлены те или иные ВПРП ЦНС (1-я группа). Структура ВПРП ЦНС была следующей: анэнцефалия — 10 случаев, гидроцефалия — 11, менингомиелоцеле — 6, синдром Арнольда—Киари II — 9, экзэнцефалия — 1, spina bifida — 3. Одновременно были обследованы их мужья.

Во 2-ю группу сравнения вошли 18 семейных пар, в которых женщины страдали ПНБ.

Контрольную группу составили 83 семейные пары с физиологическим течением беременности у женщин.

Поиск генетических маркеров ВПРП в системе главного комплекса гистосовместимости мы начали с области HLA DR. Типирование HLA DR выполняли стандартным удлиненным лимфоцитотоксическим тестом [3]. В-лимфоциты получали из венозной крови методом адсорбции на нейлоновом волокне. Все необходимое оборудование и реактивы для типирования получены из НИИ гематологии и переливания крови г. Санкт-Петербург. Типирующая панель включала 40 сывороток к 7 антигенам HLA DR и 3 контрольных сыворотки. Для расчета частот HLA DR антигенов использовали стандартные генетико-статистические методы [3].

Для исследования иммунных взаимодействий в системе «мать—плод» использовали двунаправленный вариант смешанной культуры лимфоцитов супругов (СКЛ) и определяли блокирующую активность женской сыворотки (БАС) на СКЛ по методике, описанной ранее [5].

Учет результатов в СКЛ проводили с помощью специального коэффициента (Кскл), который рассчитывали из отношения уровня пролиферации в контрольных лимфоцитах (отдельно матери и отца) к уровню пролиферации в опытных (смешанных) лимфоцитах. Этот коэффициент в норме не должен превышать 0,7 [4].

БАС определяли путем внесения 10% исследуемой женской сыворотки вместо эмбриональной телячьей сыворотки при постановке реакции СКЛ. Действие женской сыворотки считали блокирующим, если коэффициент СКЛ с женской сывороткой был выше коэффициента СКЛ с эмбриональной телячьей сывороткой [5].

В группе семей с ВПРП и в контрольной группе семей проверяли гипотезу случайного подбора семейных пар по локусу HLA DR. Для этого мы оценивали отклонение наблюдаемых частот всех встречавшихся комбинаций HLA DR мужчин и женщин от ожидаемых (расчетных) в

соответствии с частотами фенотипов при помощи критерия χ^2 . Расчетная формула включала поправку Йейтса на непрерывность. Достоверность результатов оценивали при удвоенном уровне значимости, в соответствии с рекомендациями для двустороннего χ^2 теста [1].

Попарное сравнение ожидаемой и наблюдаемой частоты производили с помощью Т-критерия Фишера для долей [2] и коэффициента ассортативности α по формуле:

$$\alpha = \frac{N_o - N_n}{N_o}, \text{ где}$$

N_o — ожидаемое количество случаев, N_n — наблюдаемое количество случаев (адаптировано из [2]).

При этом положительный знак ассортативности указывает на предпочтение в образовании супружеской пары, а отрицательный — на избегание такого рода контактов.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлена частота встречаемости HLA DR антигенов в супружеских парах всех обследованных групп. Видно, что HLA DR5 антиген значительно чаще представлен у родителей в группе ВПРП ЦНС по сравнению с контролем (46,2% и 23,4% соответственно). Эти различия наиболее выражены и статистически значимы при сравнении женского HLA DR фенотипа. У мужчин в семьях с ВПРП ЦНС частота встречаемости указанного антигена также превышает контрольный показатель, однако эти различия не достигают статистической достоверности.

В то же время HLA DR4 антиген, как в семейных парах, так и отдельно у родителей, вообще не обнаружен при ВПРП, и разница с контролем статистически значима. Такая же тенденция характерна и для HLA DR6 антигена — он выявляется в благополучных семейных парах и отсутствует при ВПРП ЦНС, но статистическая значимость проявилась только у мужчин в сравниваемых группах. Возможно, при увеличении числа наблюдений она будет достигнута.

Таким образом, впервые выявлены ассоциации HLA DR фенотипа родителей с развитием ВПРП ЦНС у плода — положительные для HLA DR5 и отрицательные для HLA DR4 и, вероятно, для HLA DR6. Иными словами, наличие HLA DR5 у родителей свидетельствует о высоком риске развития ВПРП ЦНС, а наличие HLA DR4 и, вероятно, HLA DR6 — о низком риске.

Если HLA DR антигены обоих родителей играют такую важную роль в возникновении ВПРП ЦНС, особенности формирования «семейного» фенотипа при этой патологии приобретают особое значение. Ранее мы обнаружили, что взаимный выбор супругов носит неслучайный характер по антигенам HLA DR [7]. Иными словами, женщины с определенными антигенами HLA DR отдают большее или меньшее предпочтение мужчинам с теми или иными HLA DR антигенами. То же самое можно сказать и о мужчи-

Таблица 1

Частота встречаемости HLA DR аллелей в супружеских парах при ВПРП ЦНС у детей

HLA DR	Контрольная группа			Врожденные пороки развития ЦНС у плода			Привычное невынашивание беременности		
	всего (n = 166)	женщины (n = 83)	мужчины (n = 83)	всего (n = 80)	женщины (n = 40)	мужчины (n = 40)	всего (n = 36)	женщины (n = 18)	мужчины (n = 18)
1	29,2	26,4	33,8	25,0	15,0	35,0	27,2	27,8	27,8
2	31,2	28,8	33,8	46,2	45,0	47,5	50,0	55,8*	44,4
3	22,2	20,4	26,4	22,5	25,0	20,0	13,9	11,1	16,6
4	14,4	14,4	14,4	0,0*	0,0*	0,0*	16,7	11,1	22,2
5	23,4	20,4	26,4	46,2*	57,5*	35,0	22,2	11,1	33,3
6	13,8	9,6	18,0	0,0	0,0	0,0*	27,7	38,9*	16,6
7	21,0	27,6	15,6	18,8	20,0	17,5	13,9	11,1	22,2

*p<0,05 при сравнении показателей с контрольной группой.

нах. Это биологическое явление обеспечивает фенотипическое разнообразие в живой природе и обозначается как ассортативность. Однако у человека оно изучено недостаточно, в частности, почти ничего не известно об особенностях выбора брачного партнера по локусу HLA DR при различных заболеваниях. В табл. 2 и 3 представлены полученные нами данные об ассортативности по локусу HLA DR в семьях, рождающих здоровых детей, и в семьях с ВПРП ЦНС у детей.

В контрольной группе выявлено высокодостоверное отклонение от нулевой гипотезы случайного выбора супругов по этому локусу ($\chi^2 = 157, p < 0,005$), что указывает на избирательное, ассортативное образование супружеской пары. Так, попарное сравнение ожидаемых и наблюдаемых частот в этой группе обнаруживает 28 достоверных случаев ассортативности для комбинации мужского и женского фенотипов HLA DR (табл. 2). При этом полностью отсутствует ассортативное предпочтение партнера с идентичным антигеном, то есть во всех без исключения случаях происходит выбор несходного по HLA DR антигену

партнера. Более того, выявлены 3 случая отрицательной ассортативности (для антигенов HLA DR2, HLA DR3, HLA DR5). То есть носители этих одноименных антигенов избегают образования супружеского союза. Эти наблюдения полностью соответствуют существующим представлениям относительно важности поддержания высокого уровня полиморфизма в системе HLA и отбора против гомозигот [8].

Совсем иная ситуация наблюдается в семьях с ВПРП ЦНС у детей. В этой группе нет достоверного отклонения от нулевой гипотезы случайного выбора супруга по локусу HLA DR ($\chi^2 = 1,02, p < 0,05$). Это указывает на то, что в группе семей с данной патологией образование родительских пар происходит преимущественно случайно. При попарном сравнении ожидаемых и наблюдаемых частот комбинаций мужских и женских HLA DR в этой группе обнаруживается всего 5 достоверных случаев ассортативности (табл. 3) против 28 в контроле. При этом 4 из 5 выявленных случаев ассортативности не совпадают с контрольной группой.

Таблица 2

Ассортативность* в выборе брачного партнера по локусу HLA DR в контрольной группе семей

Фенотипы мужчин	Фенотипы женщин							
	HLA DR1	HLA DR2	HLA DR3	HLA DR4	HLA DR5	HLA DR6	HLA DR7	Blank
HLA DR1		0,9**				1,2		0,4**
HLA DR2		0,5**			0,9	1,4	0,5**	0,6**
HLA DR3			0,8*	0,7**			0,7**	0,8**
HLA DR4					1,7			0,7**
HLA DR5	1,2		1,4		0,8**			
HLA DR6		0,6**			0,9**			
HLA DR7	2,3	1,4	3,1	2,2		4,2		
Blank		0,5**	0,8			1,7	0,5**	

Здесь и в табл.3: * указаны только достоверные отличия показателей; ** случаи отрицательной ассортативности.

Таблица 3

Частота встречаемости антигенов HLA DR1-DR7 у родителей детей с врожденными пороками развития ЦНС

Фенотипы мужчин	Фенотипы женщин							
	HLA DR1	HLA DR2	HLA DR3	HLA DR4	HLA DR5	HLA DR6	HLA DR7	Blank
HLA DR1			0,7					
HLA DR2	1,0**							
HLA DR3	1,0						6,0**	
HLA DR4								
HLA DR5								
HLA DR6								
HLA DR7								
Blank					0,6			1,8

Интересно отметить и еще один факт в данном феномене (см. табл. 2). Женщины контрольной группы, имеющие HLA DR5 антиген (связан с высоким риском ВПРП ЦНС), избегают вступать в брак с мужчинами с этим же антигеном — коэффициент ассортативности достоверно отрицательный. Наоборот, предпочтение отдается мужчинам, имеющим HLA DR4 (связан с низким риском ВПРП ЦНС) — коэффициент ассортативности достоверно положительный. В семьях с ВПРП ЦНС у детей никакой ассортативности по антигенам риска нет.

Таким образом, избирательное предпочтение в выборе супругов по HLA DR4 при одновременном избегании выбора по HLA DR5 является значимым биологическим механизмом предупреждения развития ВПРП ЦНС у детей. «Игнорирование» этого механизма или его неэффективность повышают риск возникновения указанной патологии.

Другим механизмом ограничения рождаемости потомства с ВПРП ЦНС и накопления в популяции «дефектных» особей является спонтанное прерывание беременности. Для проверки этой гипотезы в случае с ВПРП ЦНС мы сравнили иммунные взаимодействия в системе «мать — плод» в семьях с ПНБ и в семьях с ВПРП ЦНС у детей (табл. 4).

Выяснилось, что отсутствие иммунного распознавания в СКЛ, отсутствие БАС и сочетание этих двух нарушений в группе с ВПРП ЦНС у детей встречаются значительно чаще, чем в контрольной группе. При этом частоты указанных нарушений при ВПРП ЦНС у детей сопоставимы с таковой при ПНБ. По понятным объективным причинам мы не могли установить долю участия ВПРП в ПНБ. Однако очевидно, что в случае с ВПРП ЦНС иммунные взаимоотношения матери и плода на фенотипическом уровне направлены на избавление от «дефектного» плода и предотвращение рождения ущербного ребенка.

Причиной нарушений этих взаимодействий может быть иммунодефицит у матери или отца, который проявляется в данном случае слабой взаимной реакцией СКЛ супругов. Косвенно это подтверждается высокой частотой оппортунистических инфекций в семьях с ВПРП ЦНС у детей (хламидиоз, гарднереллез, ЦМВ-инфекция, выявляемые с помощью ПЦР). В группе с ВПРП ЦНС у детей данные инфекции суммарно выявлены в 58,9% случаев, при ПНБ — в 51,2%, а в контрольной группе — лишь у 18,7%.

Другая причина — наличие некоторых общих антигенов HLA DR у супругов. Так, общий фенотип HLA DR1, HLA DR5 встречался у 10% супругов с ВПРП ЦНС у детей, в то время, как в контрольной

Таблица 4

Частота нарушений иммунных взаимодействий в системе «мать — плод» в группах с различной репродуктивной патологией и в контрольной группе

Показатели иммунных взаимодействий в системе «мать—плод»	Контрольная группа (n=83)	Врожденные пороки развития ЦНС у плода (n=40)	Привычное невынашивание беременности (n=18)
Отсутствие иммунного распознавания в СКЛ	32,4	65,0*	60,5*
Отсутствие БАС на СКЛ	32,4	62,5*	72,5*
Сочетание этих нарушений	20,4	47,5*	60,5*

* $p < 0,05$ при сравнении показателей с контрольной группой.

группе общих фенотипов HLA DR между супругами вообще не выявлялось. В отличие от ВПРП ЦНС в группе семей с ПНБ встречались общие антигены, но не фенотипы. Так, при ПНБ наиболее часто встречался общий для супругов антиген HLA DR2 (27,8%), в контрольной группе этот антиген был общим лишь для 4,8% семейных пар.

Кроме того, между ВПРП ЦНС и ПНБ имели место и иммуногенетические различия по отдельным антигенам. Так, HLA DR6 антиген вообще не встречался в группе ВПРП ЦНС, но достаточно высоко экспрессировался в группе с ПНБ. Статистическая достоверность по этому антигену была достигнута среди женщин с ВПРП ЦНС у детей и ПНБ (0% против 38,9%; $p < 0,05$).

Это указывает, что при сходстве фенотипических проявлений нарушения иммунных взаимодействий матери и плода при ВПРП ЦНС и ПНБ иммуногенетическая основа сравниваемых патологических состояний может быть разной.

Таким образом, показатели СКЛ супругов и БАС могут служить дополнительными параклиническими критериями в прогнозировании и ранней диагностике ВПРП ЦНС у детей с HLA DR типированием.

Очевидно, что поиск генетических маркеров ВПРП ЦНС не может ограничиваться только HLA DR. Настоящая работа подтвердила перспективность выбранного направления и необходимость изучения других локусов HLA. Более того, особое значение приобретает влияние межаллельных взаимодействий как внутри одного генома, так и двух родительских геномов на развитие указанной патологии.

Вместе с тем уже сейчас полученные данные могут быть полезными практическому врачу для прогнозирования и даже предупреждения ВПРП ЦНС у детей. Используя HLA DR типирование, можно не только контролировать, но и в доступной степени регулировать планирование семьи. При этом показатели СКЛ супругов и БАС уточняют вероятность развития ВПРП ЦНС у детей. Предлагаемый нами методический подход может быть применен и при наступившей беременности в качестве дополнительного критерия ранней диагностики этой группы заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейр Б. Анализ генетических данных. — М., 1995. — 423 с.
2. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. — М., 1991. — 245 с.
3. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика. — М., 1983. — 208 с.
4. Самбург М. Б. // Иммунология. — 1991. — № 2. — С. 30–32.
5. Шабалдин А. В. Генетические и фенотипические особенности становления иммунитета у детей первого года жизни г. Кемерово: Дисс. ... канд. мед. наук. — Томск, 1997. — 167 с.
6. Шабалдин А. В., Казакова Л. М., Глушков А. Н. // Педиатрия. — 1998. — № 5. — С. 4–7.
7. Ievtushenko O. S. // Lik Sprava. — 1998. — Vol. 5. — P. 120–122.
8. Hedrick P. W. // Genetica. — 1998–99. — Vol. 104, № 3. — P. 207–214.
9. Shabaldin A. V., Glushkov A. N. // Russ. J. Immunol. — 1999. — Vol. 4. — № 1. — P. 9–18.