

УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПРИ РЕЗУС-ИЗОИММУНИЗИРОВАННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Л.Р. Абдрахманова, Б.Г. Садыков, А.А. Зайнуллин

Республиканская клиническая больница (главрач — Р.Г. Фатихов) МЗ РТ, г. Казань

Гемолитическая болезнь новорожденных (ГБН) в России диагностируется приблизительно у 0,6% из них [6]. Известны 19 основных эритроцитарных групповых систем, объединяющих более 100 антигенов, а также многочисленные частные и общие с другими тканями эритроцитарные антигены [9]. Как правило, эритроциты ребенка имеют некоторые отцовские антигены, отсутствующие у матери. Вместе с тем ГБН обычно развивается вследствие несовместимости плода и матери по резус- или АВО-антигенам, редко — по другим антигенным системам (ввиду их меньшей иммуногенности).

Bowman J. [10] пишет о том, что резус-изоиммунизация (Rh-ИИ) обычно возникает вследствие кровотечения, которое встречается в 75% беременностей. Если своевременно не определяется резус-иммунизация, гемолитическая болезнь плода (ГБП) может привести к ядерной желтухе или отечной форме ГБП соответственно в 25% случаев. Заменное переливание крови (ЗПК) новорожденным решило проблему ядерной желтухи. В настоящее время для прогнозирования тяжелой ГБП есть следующие методы исследования: анамнез (предшествующее рождение детей с ГБП, гемотрансфузии несовместимой крови), серологические исследования — титр резус-антител в крови матери, спектрофотометрия (СФМ) амниотической жидкости (АЖ), ультразвуковая (УЗ) оценка плода и плаценты, кордоцентез для определения фетального состояния плода. Rh и Kell состояние антигена может быть определено путем проведения молекулярно-генетической (ДНК) диагностики амниотических вод.

Н.Б. Горюшина [2], исследуя биофизический профиль плода у беременных с Rh-изосенсибилизацией, определила прогностически неблагоприятными ареактивный нестрессовый тест, угнетение дыхательной и двигательной активности, снижение мышечного тонуса плода. Выраженность многоводия и утолщения плаценты коррелировала с тяжестью ГБП и ГБН. Характерными морфологическими признаками плаценты при ГБП являются ее замедленное созревание, отек и дистрофия структурных элементов хориона. Надежным критерием наличия

ГБП служит УЗ плацентометрия. В то же время нарушение структуры плаценты и, особенно, ее преждевременная степень созревания считаются нехарактерными признаками при резус-конflikте.

J.G. Ouzouian, H.A. Monteriro, O.M. Alsulyman [20] ретроспективно проанализировали отчеты УЗИ беременных с Rh-ИИ. Были измерены BVOD (наружный межвентрикулярный размер в диастоле) и значения процентов. У 63 плодов, у которых были определены данные критерии, Rh (анти D)-конфликт встретился в 66% случаев изоиммунизации: 20 (32%) новорожденным потребовалось ЗПК, 43 (68%) — нет. У 17 (27%) плодов BVOD был выше, чем 95-я перцентиль (нормативные показатели), и 10 (59%) новорожденным выполнено ЗПК. Новорожденные этой группы имели также значительно меньшие гематокриты при рождении ($37,7 \pm 13,0\%$ против $46 \pm 9\%$), и у них была проведена более продолжительная интенсивная терапия ($10,7 \pm 10,0$ против $4,7 \pm 3,6$ дня), чем у пациентов, у которых BVOD был ниже, чем 95-я перцентиль. BVOD, соответствующий 95-й перцентиль, имел чувствительность, равную 50%, специфичность — 84% и прогностическое значение — 59%, в предсказании необходимости новорожденному ЗПК. По заключению этих авторов, у беременных с изоиммунизацией BVOD, равный или выше 95-й перцентили, связан с относительно большей вероятностью анемии у новорожденного и ЗПК. Хотя данное измерение недостаточно чувствительно для использования в качестве единственного параметра в прогнозе ГБН, тем не менее оно может быть полезным как атравматичное дополнение при исследовании Rh-ИИ.

По данным Михайлова А.В. [3] и других авторов, анамнестические данные Rh-ИИ женщины и величины титра Rh-антител в ее крови не позволяют с достаточной вероятностью прогнозировать возможность развития тяжелых форм ГБП при наступлении беременности. Однократное УЗ исследование дает возможность однозначно установить диагноз только при развитии отека у плода, хотя динамическое наблюдение за его состоянием с начала беременности имеет существенно большее значение. Возможность

оценки косвенных (не всегда высокоспецифичных и чувствительных) УЗ признаков ГБП, нередко не соответствующих степени гемолитической анемии (ГА), не удовлетворяют современным клиническим требованиям. Исследования кровотока в фетоплацентарной системе при помощи доплерографии не позволили выявить диагностические критерии оценки тяжести ГБП. По-видимому, изменения артериальной, венозной и внутрисердечной гемодинамики проявляются только при развитии отека плода, что свидетельствует о вторичности природы сердечно-сосудистой недостаточности при ГА.

Благодаря внедрению в клиническую практику в начале 60-х годов инвазивных методов получения околоплодных вод, появились новые диагностические возможности, позволившие разработать тактику ведения изоиммунизированных беременных, применяемую в течение более 20 лет. Определение оптической плотности АЖ при длине волны 450 нм (присутствие билирубина) существенно улучшило раннюю диагностику ГБП и соответственно снизило перинатальную заболеваемость и смертность. Однако последние исследования показали высокий уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов этого метода диагностики. По данным Б.Г. Садыкова и др. [5], диагностическая ценность СФМ составила 81,8%. Прогресс был достигнут в результате широкого применения кордоцентеза под УЗ контролем в целях извлечения крови из вены пуповины и определения гематологических показателей плода. Использование кордоцентеза позволило непосредственно лечить плод путем внутриматочных переливаний донорской крови в сочетании с альбумином, что на сегодняшний день практически может решить проблему лечения тяжелых форм ГБП.

D. Depkes, R. Meerman, F. Vandenbussche [14] изучали взаимоотношение уровня гемоглобина и размеров селезенки по УЗИ. У 28 изоиммунизированных беременных было произведено 85 последовательных кордоцентезов. Результаты показали взаимосвязь между периметром селезенки и недостатком фетального гемоглобина. УЗ обнаружение спленомегалии позволяет прогнозировать внутриутробную анемию плода при Hb ниже $5^{\circ}SD$ от нормального значения в 44 (94%) из 47 случаев. Следовательно, изменение периметра селезенки может быть вспомогательным средством при УЗ эхоскопии у беременных, изоиммунизированных по эритроцитарным антигенам.

G. Mari, F. Rahman, P. Olofsson [17] определяли фетальный гематокрит и пик систолической скорости в средней мозговой артерии при доплерографии до и после внутриутробного переливания крови плоду с Rh-ИИ. Срок гестации составлял 27 недель. До ЗПК фетальный гематокрит варьировал от 5,9 до 30%, во время процедуры кордоцентеза — от 24,8 до 53%. До процедуры систолическая скорость была равна $46,2 \pm 10,7$ см/с, во время нее — $31,7 \pm 9,5$ см/с ($P < 0,01$). Таким образом, увеличение фетального гематокрита значительно уменьшает пик систолической скорости в средней мозговой артерии. Авторы считают, что доплерография может применяться для определения фетальной анемии плода при Rh-ИИ.

Диагностический и терапевтический кордоцентез привел к небольшому уменьшению периферического сопротивления [7]. Значительные разногласия наблюдались только в случаях с уровнем гематокрита меньше 20%, сравниваемых со значениями более 40%, или при гематокрите после переливания крови менее 30%. Авторы приходят к выводу, что уменьшение периферического сопротивления может быть следствием увеличения в объеме крови и ее достаточной оксигенации, улучшающих фетальную перфузию. Они считают, что эхография и доплерография неинформативны в клинических наблюдениях при Rh-ИИ.

Вторая проблема при Rh-ИИ, которую необходимо обсудить, — это определение при данной беременности резус-отрицательной — Rh(-) принадлежности плода при наличии резус-антител от предшествующих беременностей или гемотрансфузий. И, наконец, третья проблема — это недоношенность новорожденного в результате преждевременного родоразрешения при Rh-ИИ беременности.

Е. Быкова, С. Гнедой, Л. Иванова [1], исходя из своего опыта, пишут о том, что у 30% беременных с Rh(-) принадлежностью крови, имеющих антитела к Rh(D)-антигену (изосенсибилизации, развившейся после предыдущих беременностей или несовместимых гемотрансфузий), при последующей беременности рождаются дети с Rh(-) принадлежностью крови. Всем таким беременным проводят от 3 до 5 курсов неспецифической десенсибилизирующей терапии. При наличии изосенсибилизации наряду с консервативной терапией осуществляют иммунорекоррекцию и неоднократно диагностические амниоцентезы, что может спровоцировать преждевременное прерывание беременности и усугубить иммунореконфликт. Кроме того, эти беременные, как правило,

родоразрешаются на сроке 36—38 нед. Все это неблагоприятно отражается на течении беременности, а преждевременное ее прерывание — и на плоде.

Согласно результатам исследований Д.К. Нажмутдиновой [4], иммунологический конфликт при беременности встречается достаточно часто и считать, что данная проблема решена, — преждевременно. Это касается прежде всего СДР, частота которого увеличивается по мере утяжеления иммунного конфликта и ГБН. При беременности с Rh-ИИ в фетоплацентарном комплексе происходят такие изменения, которые создают благоприятный фон для нарушения синтеза сурфактанта в альвеолоцитах II типа и ведут к недоразвитию респираторной системы плода в целом. Нарушение структуры плаценты, сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях клеток плаценты, снижение функции печени матери и плода, нарушение функционального состояния монооксидазной системы печени плода, гипоксия плода при Rh-ИИ — все это усугубляет тяжесть ГБН и нарушает синтез легочного сурфактанта.

Как известно, 56% резус-положительных лиц гетерозиготны по Rh (D)-гену [23]. Гетерозиготные отцы по Rh (D)-гену имеют шанс рождения Rh(-) ребенка у Rh(-) матери в 50% случаев. Высокая вероятность рождения Rh(-) ребенка в подобных случаях делает необходимой пренатальную диагностику резус-принадлежности плода. Одним из наиболее часто используемых методов определения резус-статуса плода является измерение уровня билирубина в АЖ. Однако для исследования динамики изменения концентрации билирубина необходимы неинвазивные процедуры.

Определение резус-принадлежности плода методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет снизить количество инвазивных процедур. Для этого метода можно использовать практически любой биологический материал плода (ворсины хориона или плаценты, амниоциты, кровь из пуповины плода) на любых сроках беременности [22]. Группа генов, определяющих резус-статус, локализуется в хромосоме 1 (p34—p36) [12, 18]. Наиболее важный из них — Rh (D): он кодирует мембраноассоциированный D-антиген, который и определяет в основном резус-статус. Продукты другого гена, RhC/c/E — C/c- и E/e-белки, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта, оказывают значительно меньшее влияние на резус-статус [16]. Rh (D)-ген отсутствует в хромосомах у Rh(-) субъектов [11].

О высокой чувствительности и специфичности методов ПЦР по определению Rh (D)-гена при использовании различных праймеров пишут J. Aubin J, C. Le Kim, I. Mourou [8], особенно экзона 10 (первый метод), экзона 7 (второй), экзона 4 (третий) и интрона 4 (четвертый). Обнаружение сигнала с D-положительными и D-отрицательными смесями возможно при содержании 0,001% D-положительных клеток первым-третьим методами.

G. Crombach, F. Picard, M. Beckmann [13] установили надежность определения фетального резус D-генотипа на амниоцитах с использованием сдвоенной ПЦР. Был изучен 41 образец амниотических вод у Rh-ИИ беременных. Генотип был правильно предсказан и подтвержден серологически. Авторы пришли к выводу, что определение фетального Rh D-генотипа по амниоцитам — безопасный метод, который улучшает прогноз в отношении ведения беременных с Rh-ИИ.

Опыт работы по определению ДНК (экзона 10, интрона между экзонами 4 и 5) из 0,3—2,0 мл амниотических вод, полученных при амниоцентезе у Rh(-) женщин, был проанализирован Т.Н. Muller, I. Lammers, S. Gran [20]. Пренатальный генотип был успешно установлен приблизительно в 90% случаев (в 229 из 256) и подтвержден результатами серологического анализа у новорожденных.

Al. Mufti, C. Howard, T. Overton [19] сообщают об обнаружении фетальной РНК в материнской крови при Rh-ИИ для определения Rh (D) плода. Они считают, что обратная транскриптазная полимеразная реакция (ТЦР) для определения фетальной РНК является более чувствительной и точной (P=0,03), чем ПЦР из геномной ДНК в пренатальном определении Rh (D) типа крови. Так, прогноз фетального Rh (D) типа крови при использовании ТЦР оказался точным в 28 из 35 случаев, а ПЦР — в 22 из 35. Rh(+) определен в первом случае в 12 из 19 наблюдений, во втором — в 6 из 19.

Целью работы J. Yankowith, S. Li, C. Weiner [24] была оценка точности метода определения фетального Rh C/c/E состояния путем постановки ПЦР на образцах, полученных от пациентов, у которых RhC/c/E состояние было установлено с помощью стандартных серологических методов. По заключению авторов, использование ПЦР помогает для оценки Rh C/c/E сенсibilизации, но встречается несколько образцов антиген-положительных личностей, имеющих отрицательный антиген. Дальнейшее изучение должно определить, отражает ли это полиморфизм, мутацию, ошибки кода

или их комбинацию. Молекулярно-генетические методы помогают в определении сенсибилизации в 96% случаях.

Van-den-Veyver, K. Moise [25] рассмотрели все статьи, в которых было описано использование ПЦР для изучения Rh(D), опубликованные в мире с 1991 по 1996 г. Полученные результаты сравнивали с данными серологических исследований для определения чувствительности, специфичности, положительных и отрицательных прогностических значений, основанных на анализе ДНК. Всего было проанализировано 500 случаев, в которых были использованы четыре различных набора олигонуклеотидов-праймеров. Чувствительность и специфичность ПЦР достигала 98,7% и 100% соответственно, положительные и отрицательные прогностические значения — 100% и 96,9%. В пяти случаях Rh(D)-положительные плоды были неправильно диагностированы: два плода погибли, одному потребовалось ЗПК, четвертому — фототерапия, о пятом плоде данных нет. Теоретическая модель показала, что амниоцентез с ПЦР как основной метод для оценки фетального состояния плода приведет к четырехкратному сокращению числа перинатальных потерь по сравнению с таковыми при пункции пуповины (кордоцентезом) и серологических исследованиях.

Представленные данные литературы позволяют рассматривать определение резус-статуса плода путем молекулярно генетической диагностики (ДНК, РНК) как по крови матери, так и по околоплодным водам, полученным при амниоцентезе под контролем УЗИ, возможно, доплерометрии эффективными прогностическими критериями Rh-ИИ. Они вполне сопоставимы с такими классическими методами, как анамнез, серологические исследования, определение билирубина в околоплодных водах СФМ методом. В зависимости от использования тех или иных методов диагностики может быть выбрана соответствующая тактика лечения и определен срок родоразрешения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быкова Е., Гнедой С., Иванова Л. и др. // Клинико-лабор. диагн. — 1995. — № 6. — С. 83—84.
2. Горюшина Н.Б. Биофизический профиль плода у беременных с резус-изосенсибилизацией: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1996.
3. Михайлов А.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике. — М., 1996.
4. Нажмутдинова Д.К. Профилактика осложнений при резус-конфликтной беременности и ГБН: Автореф. дисс. ...докт. мед. наук. — Ташкент, 1995.
5. Садыков Б.Г., Игнатъева Д.П., Бородин Ю.И., Субханкулова А.Ф., Абдрахманова Л.Р. Иммуноконфликтная беременность и тактика родоразрешения (практическое пособие). — Казань, 1998.
6. Шабалов Н.П. Неонатология. — СПб, 1997.
7. Albrecht A., Deutinger J., Stumpflen I. et al. // *Ultraschall-Med.* — 1996. — Vol. 17. — P. 171—174.
8. Aubin J., Le Van Kim C., Mouro I. et al. // *Br. J. Haematol.* — 1997. — Vol. 98. — P. 356—364.
9. Avent N.D. // *Br. J. Biomed. Sci.* — 1997. — Vol. 54. — P. 16—37.
10. Bowman J. // *Semin Perinatol.* — 1997. — Vol. 21. — P. 39—44.
11. Colin Y., Cherif-Zahar B. et al. // *Blood.* — 1991. — Vol. 78. — P. 2747—2752.
12. Cherif-Zahar B., Gardner F.H. et al. // *Hum. Genet.* — 1991. — # 86. — P. 398—400.
13. Crombach G., Picard F. et al. // *Br. J. Obstet. Gynecol.* — 1997. — Vol. 104. — P. 15—19.
14. Depkes D., Meerman R., Vandebussche F. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1993. — Vol. 169. — P. 121—128.
15. Iskaros J., Kingdom J., Morrison J., Rodeck C. // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 1998. — Vol. 11. — P. 432—437.
16. Le Van Kim C., Cherif-Zahar B., Raynal V. et al. // *Blood.* — 1992. — Vol. 80. — P. 1074—1078.
17. Mari G., Rahman F. et al. // *J. Matern Fetal Med.* — 1997. — Vol. 6. — P. 206—208.
18. Marsh W.L., Chaganti R.S. et al. // *Science.* — 1974. — Vol. 183. — P. 966—968.
19. Mufti Al., Howard C., Overton T. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1998. — Vol. 179. — P. 210—214.
20. Muller T.H., Lammers I., Gran S. // *Beir infusionsther Transfusionsmed.* — 1997. — Vol. 34. — P. 210—204.
21. Ouzouian J.G., Monteriro H.A. et al. // *J. Repord. Med.* — 1997. — Vol. 42. — P. 342—346.
22. Phillip R. // *New Eng. J. of Med.* — 1993. — Vol. 329. — P. 607—610.
23. Race R.R., Sanger R. *Blood groups in man* // 6th ed. Oxford, England: Blackwell Scientific, 1975.
24. Yankowith J., Li S., Weiner C. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1997. — Vol. 176. — P. 1107—1111.
25. Van-den-Veyver I., Moise K. // *Obstet. Gynecol.* — 1996. — Vol. 88. — P. 1061—1067.

Поступила 27.11.99.