

УДК 616-053.31:616.98-08:615.2

О. І. ЖДАНОВИЧ, д-р мед. наук, Т. В. КОЛОМІЙЧЕНКО, канд. техн. наук,

І. В. КОХАНОВ, канд. мед. наук

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

КЛІНІЧНИЙ ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ ІН'ЄКЦІЙНИХ РОЗЧИНІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ У ЛІКУВАННІ НОВОНАРОДЖЕНИХ З ВНУТРІШНЬОУТРОБНИМ ІНФІКУВАННЯМ

Ключові слова: клінічний досвід, ін'єкційний розчин, імуноглобулін, лікування, новонароджені, внутрішньоутробне інфікування

Однією з найбільш важливих проблем перинатальної медицини на сьогодні є прогресуюче зростання внутрішньоутробного інфікування плода. Частота його коливається від 6 до 30% [6, 7].

У разі внутрішньоутробного інфікування плода мертвонароджуваність досягає 14,9–16,8%, а рання неонатальна захворюваність – 5,3–27,4%. Питома вага внутрішньоутробних інфекцій серед причин мертвонароджування і ранньої дитячої смертності досягає 40% [1, 3, 4].

Особливо це стосується інфекцій, що входять до складу TORCH-комплексу: *Toxoplasma* – токсоплазменна інфекція, *other* – інші, *Rubella* – краснуха, *Cytomegalovirus* – цитомегаловірус, *Herpes* – герпес.

Ризик інфікування новонароджених значний і за даними різних авторів варіює від 40 до 75% [1, 3, 6, 7, 8].

Збільшення розповсюдженості TORCH-інфекцій і відсутність достатньо ефективного лікування зумовлюють актуальність розроблення нових технологій лікування новонароджених від матерів з TORCH-інфекцією.

Враховуючи зміни системи імунітету у дітей від TORCH-інфікованих матерів [2, 5], можна зробити припущення, що в лікуванні внутрішньоутробного інфікування, окрім етіотропної, необхідна імунокоригувальна терапія. Найбільш перспективним у лікуванні таких інфекцій є використання препаратів на основі специфічних імуноглобулінів.

Мета роботи – оцінити ефективність застосування специфічних імуноглобулінів під час лікування новонароджених з внутрішньоутробним інфікуванням токсоплазмозом.

Матеріали та методи дослідження

Порушення імунологічної реактивності організму новонароджених з внутрішньоутробним інфікуванням токсоплазмозом стали теоретичним підґрунтям для включення до комплексу лікування таких дітей препарату, дія якого направлена на корекцію виявлених змін, а саме нейтралізацію ендотоксину та нормалізації стану імунної системи організму. Таким препаратом обрано специфічний «Імуноглобулін людини проти *Toxoplasma gondii*».

Імуноглобулін проти *Toxoplasma gondii* людини (*Immunoglobulinum contra Toxoplasma gondii humanum*) виготовлений Київським ЗАТ «Біофарма». Препарат є білковою фракцією сироватки або плазми крові імунізованих донорів, перевірених на відсутність антитіл до ВІЛ-1, ВІЛ-2, до вірусу гепатиту

С та поверхневого антигену вірусу гепатиту В, очищеної та концентрованої методом фракціонування спиртово-водними осадниками, яка пройшла стадію вірусної інактивації сольвент-детергентним методом, з високим вмістом антитіл до *Toxoplasma gondii*. Вміст білка в 1,0 мл препарату від 0,09 г до 0,11 г. Прозора або ледь опалесціююча, безбарвна або жовтувата рідина. Препарат не містить консерванту і антибіотиків. Діючі речовини – антитіла, активні по відношенню до *Toxoplasma gondii*. 1 мл препарату містить не менше 600 МО антитіл до *Toxoplasma gondii*; допоміжні речовини – гліцин (глікокол, кислота амінооцтова), натрію хлорид. Імунологічні та біологічні властивості – препарат містить у високій концентрації антитіла, специфічні до *Toxoplasma gondii*, в одній дозі (1,5 мл) – не менше 900 МО.

Для дослідження ефективності лікування 30 новонароджених від матерів, інфікованих токсоплазмою, у яких під час цитоімунологічного дослідження плаценти верифіковано токсоплазменну інфекцію, розподілено на 2 групи: основну – 15 дітей, які отримували базисну терапію з включенням специфічного антитоксоплазменного імуноглобуліну та порівняння – 15 дітей, які отримували лише базисну терапію. Препарат призначали по 0,5 мл/кг один раз на 3 дні курсом по 5 ін'єкцій внутрішньом'язово додатково до базисної терапії.

Ефективність лікування оцінювали за показниками клінічного стану дітей та показниками імунітету.

Усім дітям проведено імунологічне обстеження. Матеріалом обстеження була периферична венозна кров.

Визначення лімфоцитарних субпопуляцій у крові здійснювали за методом двокольорової проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл. Зразки цільної крові у об'ємі 50 мкл взмичували у полістиролові пробірки (Falcon, США), до зразків крові додавали реагенти моноклональних антитіл у об'ємі 10 мкл. Для визначення поверхневого фенотипу клітин використовували моноклональні антитіла (Becton Dickinson, США), мічені флюоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC) та фікоеритрином (PE). Перелік показників, що визначали, подано в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Перелік лімфоцитарних субпопуляцій

Фенотип клітин	Субпопуляція лімфоцитів
CD3+	Т-лімфоцити
CD19+	В-лімфоцити
CD3+4+	Т-хелпери
CD3+8+	Т-цитотоксика
CD3–CD16/56+	Природні кілери (ПК)

Кров ретельно перемішували з реагентами моноклональних антитіл струшуванням на приладі Minigen, пробірки розміщували у темряві та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хв. По закінченню інкубації в кожен пробірку додавали по 1 мл лізуючого розчину Lising Solution (Becton Dickinson, США) для лізису еритроцитів, струшували на приладі Minigen, після чого залишали про-

бірки за кімнатної температури на 10 хв. Двічі відмивали клітини крові у надлишку поліфосфатного буфера центрифугуванням протягом 5 хв при 2 000 об/хв. Надосад після другого центрифугування видаляли, додавали в кожну пробірку по 500 мкл поліфосфатного буфера, знову струшували на Minigen для гомогенізації осаду клітин, після чого зразки були готові для аналізу на проточному цитофлуориметрі.

Отримані зразки аналізували на лазерному проточному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, США) в режимі SIMULSET (Becton Dickinson, США) з процедурою накладання лейкоцитарного гейту. У кожній пробі аналізували не менш ніж 2 000 клітин.

Для визначення абсолютної кількості клітин у кожному зразку підраховували кількість лейкоцитів.

Для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів крові на знежирене предметне скло наносили дозатором 20 мкл крові у вигляді краплі, в краплю додавали 100 мкл розчину латексу з концентрацією 25 млн часток в 1 мл. Вміст краплі обережно та ретельно перемішували скляною паличкою. Скло з препаратом краплі розміщували у вологій камері і інкубували в термостаті за температури 37 °С протягом 45 хв. По закінченню інкубації вологу камеру зі склом переносили в холодильник і інкубували 2 год при 4 °С для зупинки реакції фагоцитозу. Після зупинки реакції на скло наносили дистильовану воду для лізису еритроцитів в препараті, залишали на 3–10 хв, видаляли (зливали) гемолизований розчин. Скло розміщували вертикально і висувували на повітрі, препарат фіксували етанолом і фарбували 0,05%-м розчином метиленового синього 5–10 хв. Пофарбовані мазки досліджували морфологічно під іммерсією на світловому мікроскопі.

Досліджували 200 клітин з урахуванням кількості клітин, що поглинули частинки латексу та кількості частинок латексу, що поглинула кожна клітина. Визначали показники фагоцитозу: активність фагоцитозу – відсоток клітин, що здійснили фагоцитоз (поглинання частинок латексу) та інтенсивність фагоцитозу – середнє арифметичне число частинок латексу, що поглинула 1 клітина.

Для визначення показника комплементу гемолітичного 50 (CH50) – 50%-ї літичної активності комплементу у дослідній сироватці крові відносно еритроцитів вівці – здійснювали приготування гемолітичної системи – сенсibilізованих еритроцитів вівці. Для цього 5 мл стерильно відібраної крові вівці тричі відмивали центрифугуванням у желатин-вероналовому буфері (GVB). Готували розведення гемолітичної сироватки і змішували 5 мл 5%-ї суспензії еритроцитів з 5 мл розведеної гемолітичної сироватки, інкубували 30 хв за 37 °С. По закінченню інкубації відмивали еритроцити три рази. Готували 5 мл 5%-ї суспензії сенсibilізованих еритроцитів.

Суспензію еритроцитів розкапували по 0,1 мл у лунки круглодонного 96-лункового планшету. До кожної лунки додавали по 0,1 мл попередньо розведених дослідних зразків (використовували робочі розведення 1:20, 1:40, 1:80, 1:120). Планшет вміщували у термостат для інкубації при 37 °С протягом 30 хв. Після закінчення інкубації планшет центрифугували на кутовій центрифuzі 5 хв за 1 000 об/хв, відбирали надосад з кожної лунки і переносили його до нового планшету. Оптичну густину в надосадах визначали фотометрією на приладі Multiscan (Фінляндія). Активність комплементу у дослідному зразку розраховували відповідно до коефіцієнтів Крота і виражали у літичних одиницях (ЛО).

Визначення рівнів інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) та інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) у сироватці крові

здійснювали твердофазним імуноферментним методом з використанням тест-систем виробництва ООО «Цитокин» (Росія) відповідно до інструкції, що додається до набору реагентів.

Результати дослідження та обговорення

Виходячи з зазначеного, для лікування новонароджених від TORCH-інфікованих матерів в комплекс лікувальних заходів рекомендують включати специфічні імуноглобуліни людини залежно від збудника інфекції на підставі патенту про застосування препарату у вагітних і дітей. Препарати виготовлені Київським ЗАТ «Біофарма». Це – вітчизняні специфічні препарати для лікування інфекції, що їх готують з донорської крові.

Окрім лікування імуноглобулінами залежно від загальноклінічного стану інфікованим дітям здійснювали посиндромну терапію, антибактеріальну терапію, вітамінотерапію.

Під впливом рекомендованого лікування відмічена тенденція до більш швидкого зникнення жовтяниці, в кінці першого місяця життя її частота становила у дітей основної групи 6,7%, а у дітей групи порівняння – 20,0%.

Позитивний вплив застосування специфічного імуноглобуліну можна відмітити також на перебіг інших дизадаптаційних синдромів. Так, неврологічні порушення спостерігали у 13,3% дітей основної групи проти 33,3% дітей групи порівняння; порушення з боку системи травлення відмічали у 6,7% дітей основної групи проти 13,3% дітей групи порівняння; гіпоглікемію визначали лише у 6,7% дітей групи порівняння. Інших розладів після проведеного курсу лікування у новонароджених основної групи не спостерігали, а в групі порівняння різні порушення спостерігали у поодиноких випадках: дихальні розлади у 13,3%, порушення в системі гемостазу у 6,7%, порушення терморегуляції у 6,7% дітей.

Результати визначення відносної кількості лімфоцитів, субпопуляцій лімфоцитів та співвідношення хелпери/супресори ($CD4^+/CD8^+$) у периферичній крові дітей після проведення терапії свідчать (табл. 2), що після лікування відбувається нормалізація відносної кількості лімфоцитів та $CD3^+$ Т-лімфоцитів, чого не відмічено у групі порівняння. Як до, так і після лікування відносна кількість $CD3^+4^+$ Т-хелперів/індукторів та співвідношення $CD4^+/CD8^+$ була значно знижена у дітей обох груп. Однак після лікування спостерігали достовірне збільшення кількості $CD3^+4^+$ Т-хелперів/індукторів та співвідношення хелпери/супресори відносно стану до лікування, тобто є достовірною тенденція до нормалізації цього показника.

Застосування специфічного імуноглобуліну, який має імуномодулювальні властивості, у новонароджених від матерів з токсоплазменною інфекцією, приводить до достовірних змін в системі неспецифічної резистентності організму (табл. 3), про що свідчить тенденція до нормалізації показників фагоцитарної функції. Після лікування показники активності та інтенсивності фагоцитозу новонароджених, які отримували лікування з включенням імуноглобуліну, не відрізнялись від показників дітей групи контролю. У дітей групи порівняння зберігалася фагоцитарна гіпофункція (знижена активність фагоцитозу).

Під час дослідження впливу імуноглобуліну на систему комплементу виявлено, що у новонароджених після лікування з використанням імуноглобуліну активність комплементу (CH50) не відрізнялась від показників групи контролю, в групі новонароджених, які отримували лише базисну терапію, цей показник залишався зниженим.

Відносна кількість лейкоцитів, лімфоцитів та субпопуляцій лімфоцитів
у крові інфікованих новонароджених в динаміці лікування

Група обстежених	Час обстеження	Значення показника (%)						Співвідношення CD4 ⁺ /CD8 ⁺
		лімфоцити	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD16/56 ⁺	CD3 ⁺ 4 ⁺	CD3 ⁺ 8 ⁺	
Основна	До лікування	(41,4±2,1)*	(44,6±5,3)*	(20,3±0,1)*	(8,4±1,0)*	(26,4±1,5)*	(26,5±1,4)*	(0,99±0,2)*
	Після лікування	(48,1±1,1) #	(62,3±1,2) #	23,7±1,7	10,8±0,5	(38,1±1,9)* #	23,4±1,7	(1,80±0,21)* #
	До лікування	(40,3±1,5)*	(51,2±1,5)*	(21,3±0,8)*	(7,9±0,9)*	(28,6±1,2)*	(26,8±1,3)*	(1,09±0,14)*
Порівняння	Після лікування	(42,1±2,2)*	(53,0±1,3)*	22,8±1,7	11,3±0,6	(31,4±1,9)*	23,5±1,7	(1,22±0,21)*
Контрольна		49,0±2,5	62,5±1,0	25,0±1,3	12,5±1,1	44,0±1,5	21,5±0,9	2,20±0,18

П р и м і т к а. * – Достовірність різниці порівняно з показником групи порівняння ($P < 0,05$);

– достовірність різниці з показниками до лікування ($P < 0,05$).

**Показники неспецифічної резистентності у крові новонароджених
від матерів, інфікованих токсоплазмою, в динаміці лікування**

Група обстежених за терміном лікування	Значення показника				
	Активність фагоцитозу, %	Інтенсивність фагоцитозу	СН50, ЛО	ІЛ-6, пкг/мл	ІЛ-8, пкг/мл
Основна: до лікування	(30,82±1,57)*	(6,18±0,34)*	(24,61±1,88)*	(23,58±2,89)*	(21,47±2,98)*
після лікування	(39,79±1,64)#^	(4,88±0,33)^	29,09±2,24	(11,54±1,18)^	(13,78±1,56)^
Порівняння: до лікування	(31,74±1,26)*	(6,08±0,30)*	(25,07±1,63)*	(23,12±3,11)*	(22,21±2,54)*
після лікування	(34,04±1,74)*	5,19±0,37	(23,1±2,14)*	(13,61±1,28)^	(15,50±1,29)*^
Контрольна: 3–5 доба	38,63±1,46	3,85±0,33	30,79±2,37	14,50±2,51	13,16±2,20
30–35 доба	42,16±1,96	4,32±0,35	30,01±2,46	10,77±0,93	11,02±0,92

П р и м і т к и: 1. * – різниця достовірна щодо показника дітей контрольної групи ($P < 0,05$);

2. # – різниця достовірна щодо показника дітей групи порівняння ($P < 0,05$);

3. ^ – різниця достовірна щодо показника дітей до лікування ($P < 0,05$).

Концентрація прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8 в динаміці лікування достовірно знизилась у новонароджених обох досліджених груп. У дітей основної групи обидва показника не відрізнялись від значень новонароджених контрольної групи, у дітей групи порівняння показник ІЛ-8 залишився достовірно підвищеним. Такі результати не дають змогу остаточно визначити, чи впливає той чи інший вид лікування, зокрема специфічний імуноглобулін, безпосередньо на продукцію прозапальних цитокінів. Як традиційне лікування, так і лікування з включенням антитоксоплазменного специфічного імуноглобуліну знижує антигенне навантаження, унаслідок чого знижується активність протиінфекційного запального процесу і, відповідно, спадає продукція прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8.

Отже, застосування специфічного антитоксоплазменного імуноглобуліну дає змогу досягти повної нормалізації фагоцитарної функції і усунути дисфункціональні зміни показників неспецифічної резистентності організму.

Під час застосування препарату не відмічено побічних явищ, препарат добре переносився пацієнтами.

Таким чином, застосування в комплексній терапії внутрішньоутробно інфікованих новонароджених вітчизняних специфічних імуноглобулінів людини призводить до нормалізації фізіологічних захисних механізмів організму, нейтралізації збудника та його токсичних продуктів, що сприяє швидшому поліпшенню клінічного стану новонародженого, зменшенню тривалості лікування та зниженню вираженості дезадаптаційних синдромів за рахунок усунення дисфункціональних імунних порушень.

Результати проведених досліджень дають змогу рекомендувати специфічний «Імуноглобулін людини проти *Toxoplasma gondii*» для лікування новонароджених від матерів з токсоплазменною інфекцією для впровадження в практику роботи акушерських, неонатологічних та дитячих відділень.

В и с н о в к и

1. Встановлено, що застосування в комплексній терапії внутрішньоутробно інфікованих новонароджених специфічних імуноглобулінів людини призводить до нормалізації фізіологічних захисних механізмів організму, нейтралізації збудника та його токсичних продуктів, що сприяє швидшому поліпшенню клінічного стану новонародженого, зменшенню тривалості лікування та зниженню вираженості диз-адаптаційних синдромів за рахунок усунення дисфункціональних імунних порушень.

2. Під час застосування препарату не відмічено побічних явищ, препарат добре переносився пацієнтами.

3. Результати проведених досліджень дають змогу рекомендувати специфічний «Імуноглобулін людини проти *Toxoplasma gondii*» для лікування новонароджених від матерів з токсоплазменною інфекцією для впровадження в практику роботи акушерських, неонатологічних та дитячих відділень.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Антонов О. В., Антонова И. В., Добаиш О. В. Внутриутробные инфекции и врожденные пороки развития у плода и новорожденных детей (обзор) // Детские инфекции. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 64–66.

2. Беспалова Е. Я., Воробьева А. М., Руденко Н. Н. Состояние иммунной системы новорожденных со сложными врожденными пороками сердца, серопозитивных к вирусам простого герпеса, цитомегаловирусу, токсоплазме / Мат. конференції «Герпесвірусні інфекції – клініка, лікування, діагностика». – К., 2002. – С. 11–12.

3. Врожденные, перинатальные и неонатальные инфекции. Пер. с англ. / Под ред. А. Гриноу, Дж. Осборн, Ш. Сазерленд. – М.: Медицина, 2000. – 288 с.

4. Инфекционные болезни у детей. Пер. с англ. / Под ред. Д. Марри. – М., Практика, 2006. – 928 с.

5. Когут О. В., Лихачева А. С. Клинико-иммунологические особенности течения внутриутробных инфекций у новорожденных // Медицина сегодня и завтра. – 2001. – № 4. – С. 83–86.

6. Перинатальные инфекции: Практ. пособие / Под ред. А. Я. Сенчук, З. М. Дубосарская. – М.: МИА, 2005. – 318 с.

7. Фризе К., Кахель В. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных. Пер. с нем. – М.: Медицина, 2003. – 424 с.

8. Gilbert R., Dezateux C. Newborn screening for congenital toxoplasmosis: feasible, but benefits are not established // Arch. Dis. Child. – 2006. – V. 91. – P. 629–631.

Надійшла до редакції 31. 01. 2013.

А. И. Жданович, Т. В. Коломийченко, И. В. Коханов
ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ЛЕЧЕНИИ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВНУТРИУТРОБНЫМ ИНФИЦИРОВАНИЕМ

Ключевые слова: клинический опыт, инъекционный раствор, иммуноглобулин, лечение, новорожденные, внутриутробное инфицирование

А Н Н О Т А Ц И Я

В результате проведенного исследования показано, что применение в комплексной терапии внутриутробно инфицированных новорожденных специфических иммуноглобулинов человека приводит к нормализации физиологических защитных механизмов организма, нейтрализации возбудителя и его токсичных продуктов, что способствует более быстрому улучшению клинического состояния новорожденного, уменьшению длительности лечения и снижению выраженности дизадаптационных синдромов за счет устранения дисфункциональных иммунных нарушений.

A. I. Zhdanovich, T. V. Kolomiichenko, I. V. Kohanov
State Institution «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of National Academy of Medical Science of Ukraine», Kyiv

CLINICAL EXPERIENCE WITH THE INJECTION IMMUNOGLOBULIN SOLUTION IN TREATMENT NEWBORNS WITH INTRAUTERINE INFECTION

Key words: clinical experience, injection solution, immunoglobulin, therapy, newborns, intrauterine infection

А B S T R A C T

Shown that the use in the treatment of in utero infected newborns specific human immunoglobulins leads to normalization of physiological defense mechanisms, neutralizing agent and its toxic products, which contributes to more rapid improvement in the clinical condition of the newborn, reduced treatment duration and reduce the severity of disadaptation syndromes by eliminating dysfunctional immune violations.

Електронна адреса для листування з авторами: tanyakolom@gmail.com