

На правах рукописи

Терещенко Ирина Петровна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ВНУТРИУТРОБНЫХ
ИНФЕКЦИЙ В ФОРМИРОВАНИИ И КЛИНИЧЕСКОМ
ПРОЯВЛЕНИИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ
И ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ**

**14.00.16 – патологическая физиология
14.00.10 – инфекционные болезни**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск - 2007

Работа выполнена в Новосибирском государственном медицинском университете Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Максимова Юлия Владимировна

доктор медицинских наук,
профессор

Краснова Елена Игоревна

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук,
профессор

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук,
профессор

Кузнецова Вера Гавриловна

Ведущая организация: ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН (г. Новосибирск)

Защита состоится «___» _____ 2007 года в ___ часов
на заседании диссертационного совета Д 208.096.01
Сибирского государственного медицинского университета
(634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-медицинской библиотеке
Сибирского государственного медицинского университета
(634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние годы отмечен рост частоты внутриутробных инфекций у новорожденных детей, связанный с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией у женщин репродуктивного возраста (Кудашов Н.И. и др., 2001). В то же время расширяется спектр изучаемых возбудителей, возрастает их верификация вследствие появления более информативных методов диагностики (Gensay M. et al., 2001). Использование современных методов изменило качество диагностики перинатальных инфекций и раскрыло новые возможности в изучении инфекционной патологии неонатального периода.

Частота пороков развития в общей структуре врожденной патологии колеблется в пределах от 21 до 41 %, а показатели младенческой смертности при врожденных аномалиях развития в России составляют 405,7 на 100000 родившихся (Володин Н.Н., 2004; Корсунский А.А. и др., 2005). На этом фоне увеличивается количество детей с хромосомной патологией (Бусуек Г.П. и др., 2006). Существующая система мониторинга пороков развития учитывает лишь синдромную структуру перинатальной патологии, не предусматривая расшифровку ее этиологии. В связи с этим требуется дальнейшее изучение их частоты, структуры, этиологии, патогенеза и клинических проявлений. Известны связь аномалий развития с воздействием инфекционных факторов и данные, свидетельствующие о непосредственном влиянии вирусов на хромосомный аппарат клеток (Казанцев А.П., Попова Н.И., 1980; Бергман Р.Е., Воган В.К., 1987).

Решение проблем диагностики внутриутробных (особенно вирусных) инфекций и их профилактики на современном методическом уровне может повлиять на сохранение здоровья будущих поколений (Embleton N.D., 2001; Дроздова С.Г. и др., 2004). Недооценка инфекционной природы заболеваний как ведущей причины патологии исключает возможность реализовать наиболее эффективный этиотропный принцип лечения (Учайкин В.Ф., 2003). Среди внутриутробных инфекций особое место занимает краснуха. Проблема врожденной краснухи связана с тератогенным влиянием вируса на развитие эмбриона и плода (Banatvala J.E., 2004). Сведения о врожденной краснухе для большинства территорий России отсутствуют (Ясинский А.А. и др., 2004). По данным выборочных исследований, в 15 - 65,8 % случаев аномалий развития плод инфицирован вирусом краснухи (Малкова Е.М. и др., 2002).

Использование в диагностике внутриутробных инфекций молекулярно-биологических технологий позволяет глубже изучить тератогенное действие инфекционных агентов, найти методы предупреждения возникновения пороков развития, улучшить результаты их лечения. Однако остается определенная неудовлетворенность результатами молекулярно-биологической диагностики при исследовании клинических образцов крови/сыворотки крови, мочи, спинномозговой жидкости. В ряде случаев использование полимеразной цепной реакции при выраженных клинических проявлениях и отрицательных результатах бактериологического и серологического исследования не позволяет выявить этиологию внутриутробных инфекций. В таких случаях можно предположить, что у

плода и новорожденного ребенка инфекционные патогены концентрируются в тканевом компартменте (Цинзерлинг А.В., Цинзерлинг В.А., 2002).

Увеличение числа аномалий развития связано с недостаточными знаниями о механизмах нарушений гистогенеза и воздействии различных факторов, приводящих к их возникновению. Остается малоизученным действие микроорганизмов, рассматриваемых как тератогенные биологические факторы в патогенезе возникновения аномалий развития.

Цель работы: определить роль внутриутробных инфекций в механизмах формирования врожденных пороков развития и хромосомной патологии; дать клинико-этиологическую и патоморфологическую характеристику внутриутробных инфекций у новорожденных детей с врожденными аномалиями и аутосомными трисомиями.

Задачи исследования:

1. Выявить роль внутриутробных инфекций в формировании врожденных пороков развития, хромосомной патологии и структуре перинатальных потерь.
2. Оценить информативность метода полимеразной цепной реакции для выявления нуклеотидных последовательностей возбудителей внутриутробных инфекций в тканях плодов, мертворожденных и умерших новорожденных детей с врожденными аномалиями и аутосомными трисомиями.
3. Провести клинико-этиологическое исследование внутриутробных инфекций у детей с изолированными и множественными пороками развития, хромосомной патологией.
4. Установить механизмы формирования патологии органов и систем, связанные с локализацией в тканях возбудителей инфекций (вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса краснухи и *Toxoplasma gondii*).
5. Определить особенности структурных изменений органов плодов, мертворожденных и умерших новорожденных детей со сформированными аномалиями развития и хромосомной патологией на фоне течения внутриутробных инфекций.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное клиническое, молекулярно-биологическое и патоморфологическое исследование у новорожденных детей с изолированными и множественными пороками развития и хромосомной патологией. Показано, что в тканевом компартменте (центральной нервной, сердечно-сосудистой, мочевыделительной и пищеварительной системах) возбудители внутриутробных инфекций сохраняются в постнатальном периоде.

Получены новые данные об основных патогенетических механизмах, связанных с присутствием инфекционных агентов в тканях плода, усиливающих тератогенное воздействие вирусов. Проведенная оценка воспалительной реакции, возникшей в гестационном и постнатальном периодах, показала нарушение созревания и дифференцировки тканей, и активацию склерогенеза. Получены данные фундаментального характера о взаимодействии вирусов с тканями плода, приводящих к дисрегуляции процессов эмбриофетогенеза.

Впервые представлены новые данные о современных особенностях клинических проявлений врожденной краснушной инфекции.

Практическая значимость. Диагностика течения внутриутробных инфек-

ций у детей с врожденными аномалиями развития позволяет оценивать их как инфекционных больных и проводить этиотропную терапию, уменьшающую уровень инвалидизации и смертности в данной группе пациентов. Определены основные клиничко-лабораторные признаки течения внутриутробных инфекций у детей с врожденными аномалиями развития. Предложены диагностические критерии внутриутробных инфекций у детей с врожденными пороками развития, основанные на современных методах исследования.

Внедрение в практику. Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры детских инфекционных болезней ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет; внедрены в работу МУЗ Детская городская клиническая больница №4 им. В.С.Гераськова и Детская городская клиническая больница №1 г. Новосибирска.

Положения, выносимые на защиту:

- 1.Формирование изолированных и множественных пороков развития, хромосомной патологии и прерывание беременности связаны с внутриутробными инфекциями, вызванными вирусами простого герпеса, цитомегалии, краснухи и *Toxoplasma gondii*.
- 2.Выделение нуклеиновых кислот инфекционных патогенов из тканевых образцов и биологических жидкостей в перинатальном периоде является маркером инфекционного процесса.
- 3.У новорожденных с пороками развития и аутосомными трисомиями инфекции, вызванные вирусами простого герпеса, цитомегалии, краснухи и *Toxoplasma gondii* проявляются тяжелым клиническим течением заболевания, обусловленным исходом внутриутробно протекающего воспалительного процесса.
- 4.Непосредственное или опосредованное воздействия инфекционных агентов на ткани эмбриона и плода приводят к выраженным структурным изменениям пораженных органов.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на XIII, XIV научно-практических конференциях «Актуальные вопросы современной медицины» (Новосибирск, 2003, 2004); XI международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, 2003); научно-практической конференции «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2003); VI Российском съезде врачей-инфекционистов (С-Петербург, 2003); Третьем конгрессе педиатров-инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей. Инфекция и иммунитет» (Москва, 2004); на ежегодной конференции студентов и молодых ученых «Авиценна 2005» (Новосибирск, 2005); Российской научно-практической конференции «Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины» (С-Петербург, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Этапная реабилитация и профилактика инфекционных заболеваний у детей» (С-Петербург, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 6 в центральных рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Содержание диссертации изложено на 145 страницах машинописного текста. Диссертационная работа состоит из вве-

дения, 6 глав, выводов и списка литературы, иллюстрирована 26 таблицами и 50 рисунками. Библиография включает 141 отечественный и 218 зарубежных источников.

Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан, проанализирован и описан лично автором.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены анализ историй болезни, клиническое наблюдение и обследование 116 новорожденных детей, находившихся на лечении в инфекционном отделении патологии новорожденных и недоношенных детей Муниципальной детской клинической больницы № 4 (МДКБ № 4) и хирургическом отделении Детской городской клинической больницы № 1 (ДГКБ № 1) (г. Новосибирск) в 2002 - 2005 годах. Практически все дети поступали в отделение в течение первой недели жизни. Распределение больных по полу было следующим: мальчиков 62 (53,4 %) и девочек 54 (46,6 %).

Проанализированы протоколы патологоанатомического исследования и изучены тканевые фрагменты 78 плодов и новорожденных детей, предоставленные прозектурой ДГКБ №1. Среди них: 31 плод с гестационным возрастом 18 - 27 недель, 10 мертворожденных детей и 37 детей с ВПР, умерших в неонатальном и раннем младенческом периодах (рис. 1).

Во всех 194 случаях использован молекулярно-биологический метод для определения этиологии ВУИ. Среди новорожденных детей выделены три группы наблюдения (табл. 1). В основу первых двух групп определен принцип распространенности в организме ВПР: I группа - изолированные пороки, локализованные в одном органе (92 ребенка), II группа – множественные пороки развития, локализованные в органах двух и более систем (38 детей); III группа - аутосомные трисомии (64 человека).

Таблица 1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ГРУПП И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы исследования	Количество наблюдений			Всего
	I группа	II группа	III группа	
Клинический	49	9	58	116
Патоморфологический	43	29	6	78
Молекулярно-биологический	92	38	64	194

Примечание: I группа – изолированные пороки развития; II группа – множественные ВПР; III группа – аутосомные трисомии.

В I группу были включены новорожденные со следующими пороками развития: с пороками сердца - 36 человек; с пороками развития нервной системы – 30 детей; с пороками развития опорно-двигательного аппарата 8 новорожденных; с пороками развития желудочно-кишечного тракта и передней брюшной стенки – 8 детей; с пороками почек - 10 человек.

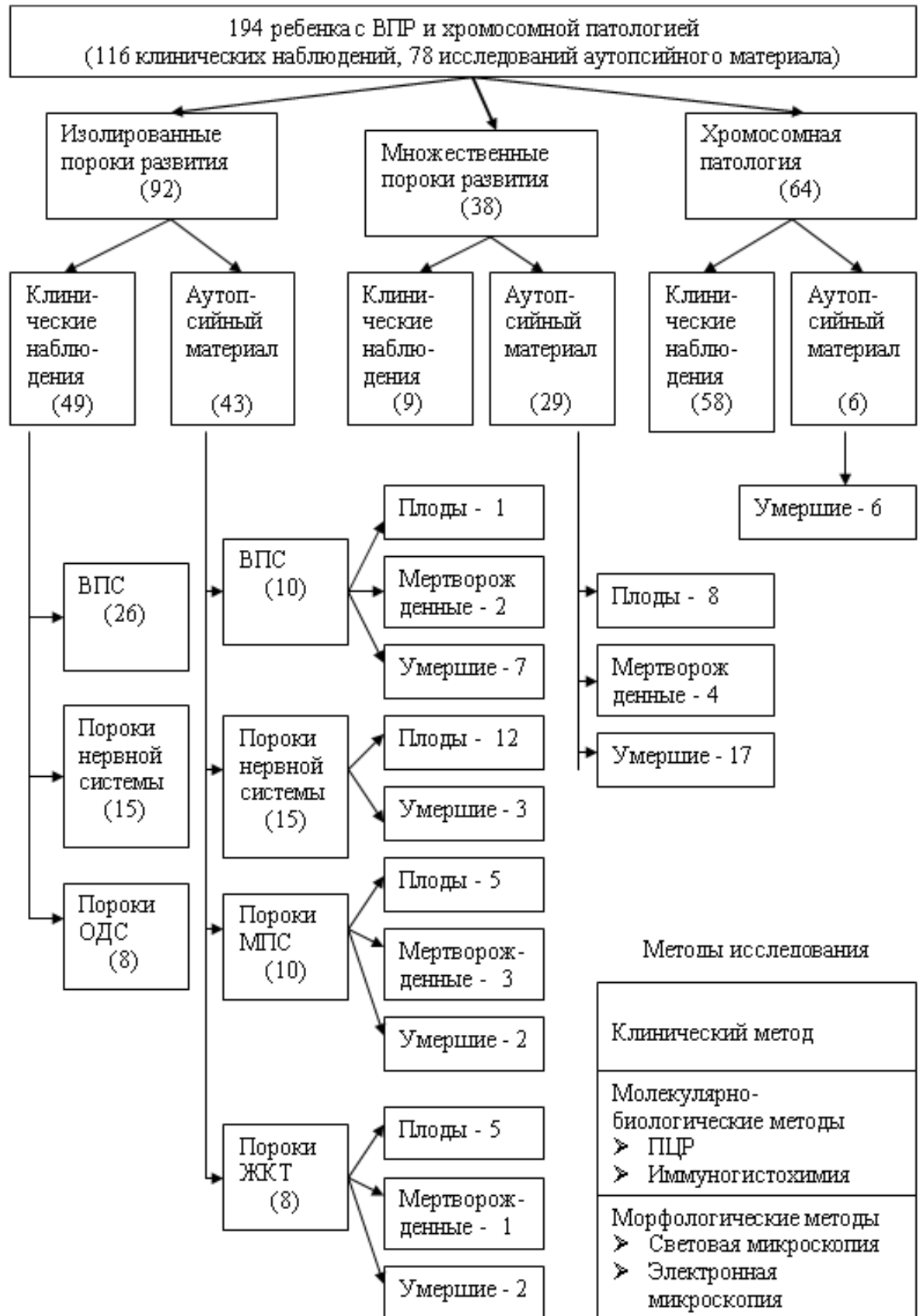


Рис. 1. Дизайн исследования.

Примечание: ВПС – врожденные пороки сердца, ОДС – опорно-двигательная система, МПС – мочеполовая система, ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Во II группу наблюдения включены дети с множественными врожденными пороками развития (МВПР) органов и систем. У 9 новорожденных исследовался клинический материал, в 29 случаях проведена диагностика секционного материала. В III группу наблюдения вошли дети с аутосомными трисомиями: 63 новорожденных с синдромом Дауна и один ребенок с синдромом Патау. У всех детей с хромосомной патологией диагноз был подтвержден кариологическим анализом.

Среди умерших основная часть больных новорожденных детей умерла в неонатальном периоде (62,2 %), из них 13,5 % новорожденных детей умерло в первые сутки жизни, в раннем неонатальном периоде – 37,8 %. В 12 случаях (32,4 %) причиной смерти являлись пороки развития не совместимые с жизнью. Среди плодов и умерших больных новорожденных детей было 51,3 % мальчиков и 48,7 % девочек.

В проведенном анализе сведений о патологическом влиянии на организм родителей физико-химических факторов, наличия генетических и хромосомных заболеваний не обнаружено ни в одном случае. В исследование не включали беременных с тяжелыми экстрагенитальными заболеваниями, эндокринными, аутоиммунными заболеваниями, иммуноконфликтной беременностью, с неблагоприятным воздействием лекарственных препаратов, которые сами по себе могли привести к акушерской патологии, пороку развития, либо затруднить молекулярно-биологическое исследование.

Клинико-лабораторные методы обследования включали общие анализы крови и мочи, биохимическое исследование крови. Инструментальные методы включали проведение рентгенологического и ультразвукового исследования. Дети осматривались окулистом, невропатологом, кардиологом, отоларингологом, генетиком, хирургом.

Метод молекулярно-биологической диагностики внутриутробных инфекций. Методом ПЦР проведено определение ДНК вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ), *Toxoplasma gondii* (Tg), а также возбудителей хламидиоза (*Chlamydia trachomatis*). РНК вируса краснухи (ВК) определялась методом ОТ-ПЦР (обратной транскрипции) (Петрова И.Д. и др., 2000). Для исследования использовались образцы крови (100 мкл) и мочи (0,5 - 1,0 мл). Выделение ДНК из клинических образцов проводилось с помощью фенольного метода.

Для ПЦР анализа архивного материала исследовали образцы тканей миокарда, печени, головного и спинного мозга, почек, тонкого кишечника, легких, залитых в парафиновые блоки. Площадь исследуемого тканевого фрагмента 2 - 3 мм². Получение ДНК инфекционных агентов из секционного материала проводилось после депарафинирования исследуемого образца ксилолом с последующей инкубацией в течение 1,5 часов, при температуре 56⁰С в буфере (10М NaOH, 5М NaCl, 10% SDS, саркозил, 1 ТЕ буфер).

При детекции РНК ВК из архивных образцов, после депарафинирования, фрагмент ткани инкубировался 1 час при температуре 56⁰С с использованием саркозила и 8М гуанидинхлорида. В полученный гомогенат добавляли РНК-носитель. Проведение экстракции продолжалось на холоде с использованием смеси, содержащей фенол кислый, хлороформ, изоамиловый спирт. Для анализа

ПЦР-амплифицированной ДНК и РНК инфекционных агентов использовалась электрофоретическая детекция в 2% агарозном геле.

Обследование выполнялось с письменного согласия родителей пациентов в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2004). При постановке ПЦР использовали амплификационные наборы «Вектохлами-ДНК-ампли-100», «Векто-ЦМВ-ДНК-ампли-100», «Векто-ВПГ-ДНК-ампли-100», «Векто-Рубелла-РНК-ампли-100», «ВектоТоксо-ДНК-ампли-100». Исследования проведены в клинко-диагностической лаборатории ЗАО «Вектор-Бест» (зав. лаб. – к.б.н. О.Н. Гришаева).

Методы патолого-гистологического и ультраструктурного исследования. Для световой микроскопии образцы (всего 280) тканей фиксировали в 10 % растворе формалина, обезжизняли по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта. Просмотр препаратов и микрофотосъемка проводились на световом микроскопе AxioImager Z1 (фирмы Carl Zeiss, Jena, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования образцы (всего 90) тканей и пунктатов везикул при герпесвирусной инфекции помещали в раствор 4 % параформальдегида, приготовленном на питательной среде Игла, при температуре 4°C. Образцы дофиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия, заливали в смесь эпона и аралдита. С блоков, залитых в смесь эпоксидных смол, готовили полутонкие и ультратонкие срезы на ультратоме Ultracut, (фирмы Reichert-Jung, Австрия). Полутонкие срезы окрашивали 1 % раствором азур II. Ультратонкие срезы контрастировали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе Hitachi-600 (Япония).

Иммуногистохимический метод. Для иммуногистохимических реакций использовали противокраснушную сыворотку с высоким титром IgM и IgG, в качестве положительного контроля брали культуру клеток, зараженную вирусом краснухи генотипа 1g. После депарафинизации срезы обрабатывали в микроволновой печи при температуре 120° в течение 7 минут, затем - 1,5 % водным раствором перекиси водорода. Срезы инкубировали с блокирующей сывороткой. Инкубацию срезов с краснушной сывороткой проводили 30 - 60 минут при комнатной температуре во влажной камере. Промывали в фосфатном буфере (pH 7,2-7,4). Затем срезы инкубировали с биотинированными антителами (affinity-purified anti-immunoglobulin, panspecific), использовали авидин-биотинный комплекс фирмы Novocastra Lab. Ltd (United Kindom). Продукт реакции выявляли раствором диаминобензида или VIP (наборы Vector Lab., USA).

Морфологические исследования выполнены в отделе микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов (зав. – д.б.н. Е.И.Рябчикова) ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка проведена с использованием программы для расчетов с помощью электронных таблиц Microsoft Excel в среде Windows XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Актуальность и социальная значимость проблем ВУИ и ВПР требует изучения их этиологической структуры в различных группах новорожденных, уточнения степени риска инфицирования и частоты персистенции инфекции. В течение последних лет прослеживается тенденция к увеличению доли ВПР среди остальной патологии от 19,4 до 42,8 %.

Средний возраст матерей, родивших детей с пороками развития, составил в I группе - $24,4 \pm 1,1$ лет, во II группе - $26,95 \pm 2,2$ лет, в III - группе $28,52 \pm 1,7$ лет ($p < 0,05$). При изучении акушерско-гинекологического анамнеза у женщин выявлены различные воспалительные заболевания репродуктивной системы и органов малого таза (38,1 %): эндометрит, аднексит, периаднексит, сальпингит, сальпингоофорит, цистит, эрозии шейки матки, кольпит, вульвовагинит. На контакт с больными манифестными формами острых респираторных вирусных инфекций указали 14,9 % беременных. Признаки течения хронической ВМИ выявлены у 92,8 % обследованных женщин. Угрозу прерывания беременности и фетоплацентарную недостаточность диагностировали у 91,8 % человек.

Из 194 беременностей 32 (16,5 %) закончились самопроизвольным выкидышем или были прерваны по медицинским и социальным показаниям. В двух случаях причиной согласия на прерывание беременности был контакт с больным манифестной формой краснухи. Родоразрешение на сроке 29-31 неделя произошло в 7 случаях, 32-34 недели – в четырех, 35-37 недель – у 13 женщин. Средняя масса при рождении составила в I – группе - $2910,13 \pm 100,08$ г, во II группе - $2762,8 \pm 235,8$, в III – $3062,8 \pm 131,6$ ($p < 0,05$). Несмотря на нарушение адаптации, инфекционный токсикоз, наличие порока развития, дефицит массы тела имели только 50 новорожденных детей (25,8 %).

В состоянии асфиксии извлечено 6 новорожденных, имевших пороки сердца и пороки развития ЦНС. В тяжелом состоянии родился 41 ребенок, в основном - это новорожденные с тяжелыми пороками ЦНС и с тяжелыми пороками сердца. Общее состояние было расценено как средней степени тяжести у 93 детей (47,9 %), в удовлетворительном состоянии родилось 19 человек (9,8 %).

Общее состояние всех детей уже через 12 - 24 часа после рождения ухудшалось: развивались признаки инфекционного токсикоза, пневмония с дыхательной недостаточностью, изменялись гемодинамические показатели. На момент поступления в больницу дети имели признаки интоксикации: кожные покровы бледно-серого цвета или с мраморным рисунком, отмечались плохая прибавка массы тела, вялое сосание, синдром рвоты и срыгивания. Среди новорожденных с ВПС состояние ухудшалось за счет поражения сердечно-сосудистой системы и развития кардиоваскулярных расстройств.

В дальнейшем у детей отмечалось затяжное течение пневмонии с развитием дыхательной недостаточности, изменением гемодинамических показателей, застоем в малом круге кровообращения. Объективно отмечались нарушения сердечного ритма (тахикардия, брадикардия, атриовентрикулярные блокады), расширение границ относительной сердечной тупости, тенденция к артериальной

гипотензии, пастозность подкожной клетчатки. Внутриутробная пневмония диагностирована у 98,8 % детей. У 59,4 % детей были конъюнктивит и омфалит.

Основными клинико-неврологическими нарушениями у детей с изолированными пороками нервной системы были различные нарушения сознания, судорожный синдром, глазодвигательные расстройства, бульбарные и псевдобульбарные парезы, центральные тетрапарезы и парапарезы. Неврологические нарушения у детей со спинномозговой грыжей осложнялись течением восходящей инфекции с развитием менингеального синдрома.

Диагноз конъюгационной желтухи был выставлен в 87,4 % случаев. Клинически отмечалась желтушность кожных покровов различной интенсивности. При биохимическом исследовании крови был повышенный уровень непрямого билирубина. У 35 детей - изолированное повышение трансаминаз (АлТ, АсТ). Течение фетального гепатита было диагностировано у 21 ребенка, учитывая гепатомегалию, желтушный синдром, диффузные изменения паренхимы печени по данным ультразвукового исследования, повышенный уровень трансаминаз (АлТ, АсТ), гипербилирубинемия за счет повышения прямой фракции.

Исследование клинического материала у новорожденных детей с пороками развития выявило в 56,8 % случаев наличие РНК ВК (рис. 2). В тканевых образцах плодов, мертворожденных и умерших детей РНК ВК выделялась в 20,5 % наблюдений, причем одинаково равно в группах детей с изолированными и множественными пороками развития.

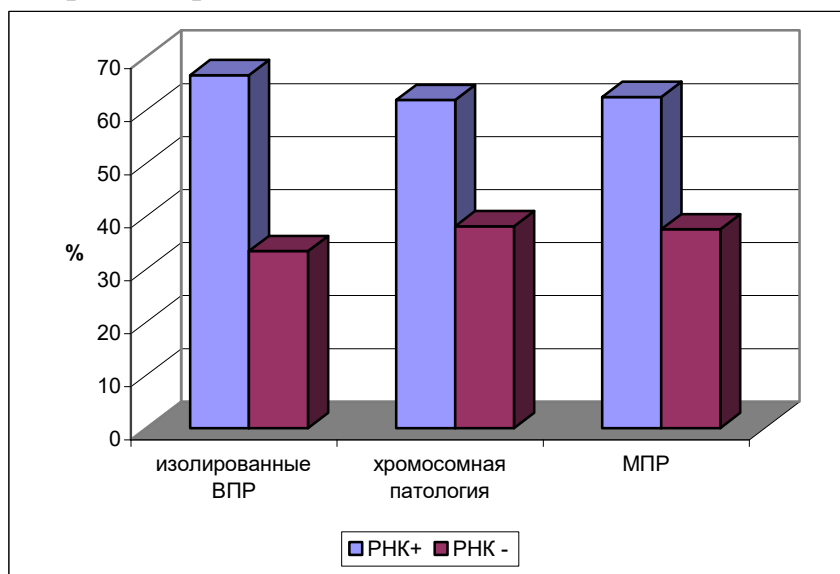


Рис. 2. Выделение РНК вируса краснухи из клинического материала новорожденных детей с пороками развития и хромосомной патологией.

Обнаружение нуклеотидных последовательностей ВК в клиническом материале и в органах абортусов и новорожденных детей подтвердило персистенцию вируса. Длительное присутствие вируса в организме связано с наличием дефектных клеток иммунного ответа, уменьшением продолжительности жизни инфицированных клонов клеток, ограничивающих экскрецию вируса после их элиминации, а также с селективной иммунной толерантностью к белку Е1 ВК (O'Shea S. et al., 1992; Mauracher C.A. et al., 1993).

В тканях плода ВК снижает скорость размножения зараженных клеток, и сроки выживания этих клеток становятся значительно короче по сравнению со сроками выживания незараженных клеток (Atreya C.D. et al., 2004). В результате происходит задержка тканевой дифференцировки и развитие гипотрофии плода. ВК помимо подавления митотической активности клеток, способен индуцировать апоптоз (Hofmann J. et al., 2000). При ультраструктурном исследовании органов детей с врожденной краснухой выраженные апоптотические изменения ядер клеток преобладали в лимфоидных органах и гепатоцитах.

Сравнивая данные представленные в литературе с результатами собственного исследования, можно высказать предположение об особенностях и своеобразии течения клиники краснушной инфекции на современном этапе (рис. 3). В целом, клиническое течение заболевания соответствовало генерализованной форме ВУИ, но не имело каких-либо специфических признаков, позволяющих диагностировать врожденную краснуху без использования современных методов исследования. В первую очередь, следует отметить увеличение частоты поражения центральной нервной системы и формирования ВПС, а также пороков опорно-двигательного аппарата. При этом не отмечено изменений гемограмм и появления экзантемы. Намного реже встречаются поражения глаз. В то же время в неонатальном периоде трудно судить о поражении органов слуха и прогнозировать умственное развитие детей.

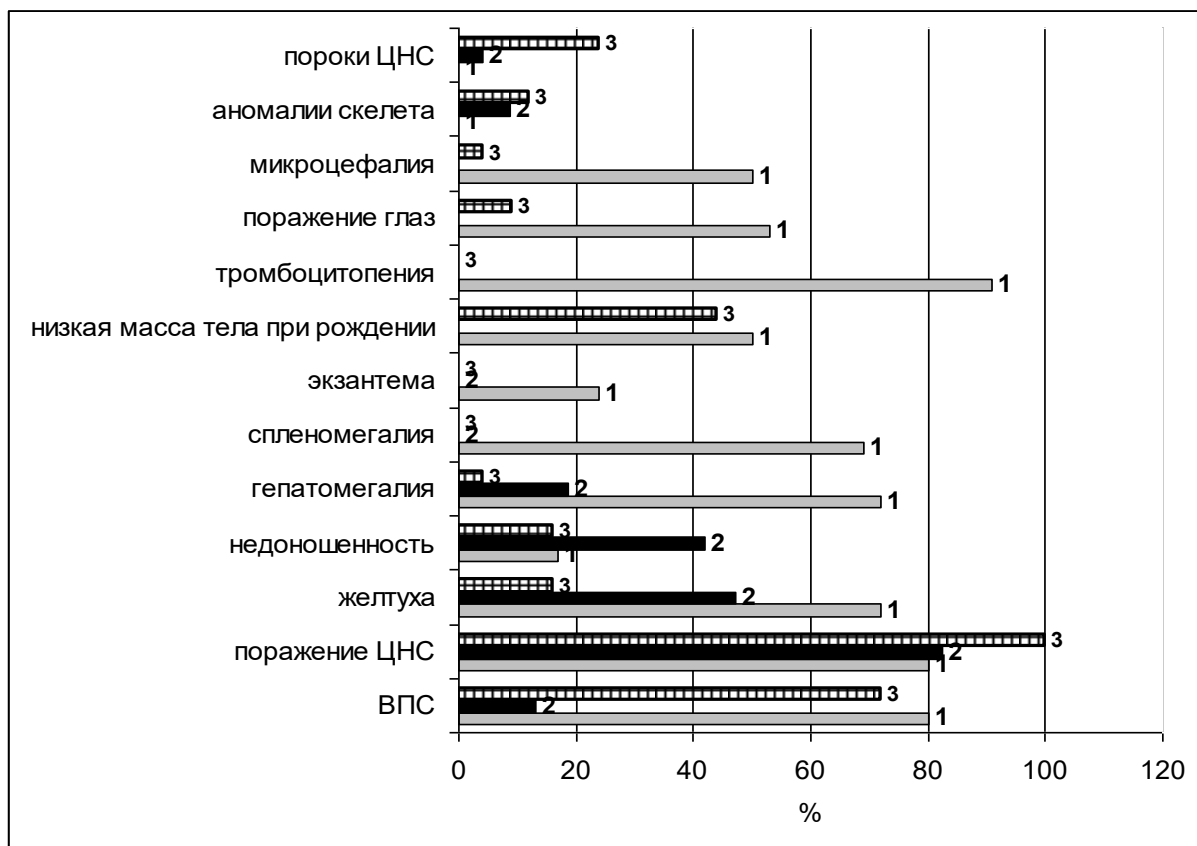


Рис. 3. Сравнение данных об особенностях течения краснушной инфекции у новорожденных детей. 1 - по данным Казанцева А.П., Поповой Н.И., 1980; 2 - по данным Нисевич Л.Л. и соавт., 1992; 3 - собственные данные.

Синдром Дауна (СД) является наиболее частой не летальной аномалией (Bell R. et al., 2003). Популяционная частота СД составляет 1,32:1000 – 2:1000. Частота синдрома Патау (синдром трисомии 13) с учетом мертворождений составляет примерно 1 случай на 6000 (Лазюк Г.И., 1979). С помощью молекулярно-биологических методов исследования крови и тканевых образцов детей с хромосомной патологией в 56,3 % наблюдений детектирована РНК ВК. ДНК-содержащие вирусы выделены в 12,5 % случаев преимущественно в аутопсийном материале. Наличие или отсутствие маркеров и клиники ВУИ не зависело от цитогенетической формы СД. С ВУИ могут быть связаны изменения популяционной частоты СД. Известно, что во времени она носит периодический характер, обусловленный многофакторностью причин его возникновения (Гинзбург Б.Г., 1998; 2000). Предполагается, что цикличность возникновения СД в популяции может совпадать со вспышками вирусных заболеваний.

На втором этапе выхаживания состояние 93,9 % детей с СД и положительными результатами ПЦР оценивалось как тяжелое или очень тяжелое. Признаки типичного фенотипа СД сочетались с ВПС у 31 ребенка (93,9 %). Именно поражение сердечно-сосудистой системы и развитие недостаточности кровообращения обуславливало тяжесть состояния. У больных СД поражение сердечно-сосудистой системы является наиболее частой и специфической аномалией и встречается в 40 % случаев (Sandri C. et al., 2004). Среди ВПС преобладали атриальные септальные дефекты (54,6 %) (дефекты межпредсердной перегородки и открытое овальное окно) и атриовентрикулярные септальные дефекты (21,2 %) (атрио-вентрикулярная коммуникация, дефект межпредсердной перегородки в сочетании с дефектом межжелудочковой перегородки), что соответствует литературным данным (Bell R. et al., 2003).

Присутствие дополнительных пороков значительно увеличивало тяжесть состояния детей и риск неблагоприятного исхода. В сочетании с ВПС выявлены: атрезия прямой кишки (3,0 %), мембрана двенадцатиперстной кишки (3,0 %), синдактилия (3,0 %), микроцефалия (3,0 %), гидронефроз (6,1 %), атрезия хоан (3,0 %). В процессе наблюдения у всех детей с положительными результатами ПЦР отмечено течение сопутствующих заболеваний: пневмонии (100 %), конъюнктивита (63,9 %), омфалита (36,1 %), везикулопустулеза (8,3 %).

При морфологическом исследовании и постановке иммуногистохимической реакции у детей с СД локализация краснушного антигена выявлена в цитоплазме нейронов головного мозга: гранулы хромогена располагались вдоль внутренней поверхности цитоплазматической мембраны или в виде небольших скоплений на одном из полюсов цитоплазмы, находились в структуре стенок сосудов. В тимусе выявлена инверсия слоев, опустошение мозгового и коркового вещества. Выражен полиморфизм телец Гассалья, их количество увеличено и превышает 20-30 в одной дольке. Преобладали тельца Гассалья незрелого типа с сохранившимися лимфоидными клетками. В тимусе краснушный антиген выявлен в структуре отдельных тимических телец, а также в цитоплазме интердигитатных и эпителиальных медуллярных клеток. В печени отмечена дископлексация печеночных балок, жировая дистрофия гепатоцитов, холестаз, умеренная лимфоцитарная инфильтрация паренхимы, полнокровие; фиброз и крупные очаги лимфо-

цитарной инфильтрации в области ворот, интенсивная моноклеарная инфильтрация на границе с паренхимой печени. В печени небольшое количество красного антигена находилось в цитоплазме гепатоцитов.

Детекция ДНК ВПГ, ЦМВ и Tg в исследованных тканевых фрагментах 78 плодов и новорожденных детей с ВПР различных органов и систем предполагала как течение ВУИ, так и формирование ВПР, зависящее от инфицированности плода. Высокая частота распространенности данных патогенов в популяции, наличие латентного носительства и субклинического течения заболевания у женщин не позволили диагностировать инфекционный процесс в периоде беременности. Положительные результаты ПЦР получены у умерших детей в 67 случаях (85,9 %). Отрицательные результаты ПЦР отмечены в 11 случаях (14,1 %). В 14 наблюдениях (17,9 %) обнаружена ДНК ЦМВ. В 10 случаях (12,8 %) ДНК ВПГ: у 8 детей ВПГ 1 типа, у 1 ребенка - ВПГ 1 и 2 типа и в 1 случае ВПГ 2 типа. В 6 наблюдениях (7,7 %) выделялась ДНК Tg.

В 37 (47,4 %) случаях был найден нуклеиновый материал одновременно нескольких возбудителей. Наиболее часто встречалось сочетание ВПГ и ЦМВ – в 19 наблюдениях (24,4 %); сочетание ВПГ и Tg - в 9 случаях (11,5 %); Tg и ЦМВ инфекции - в двух наблюдениях (2,6 %). В 7 случаях (8,97 %) обнаружена ДНК и ВПГ, и цитомегаловируса, и Tg. Таким образом, подтверждена высокая степень тератогенности ВПГ, ЦМВ и Tg. Возникновение врожденных аномалий при микст-инфекции в 47,4 % случаев предполагало усложнение механизма формирования порока за счет повышения антигенного воздействия.

Среди плодов 18 - 27 недель гестации положительный результат получен в 29 наблюдениях (93,5 %). ДНК ЦМВ выделена в 8 случаях (25,8 %), ДНК Tg - в 4 (12,9 %), ДНК ВПГ - в 2 наблюдениях (6,5 %). Нуклеиновый материал одновременно двух возбудителей определялся в 11 случаях (35,5 %), одновременно трех возбудителей - в 4 (12,9 %) наблюдениях. Практически в половине случаев (48,9 %) отмечалась микст-инфекция. Наиболее часто у плодов поражались нервная (38,7 %) и мочеполовая система (19,4 %), в 19,4 % случаев выявлены МВПР.

У мертворожденных детей из 8 положительных результатов (80,0 %) ДНК ВПГ определялась у двоих детей, у одного ребенка выделена ДНК ЦМВ, у одного - ДНК Tg. В четырех случаях у мертворожденных детей найдены сочетания ДНК ВПГ и ЦМВ (2 ребенка), а также ВПГ и Tg (2 ребенка). Преобладали нарушения формирования мочеполовой системы, а также развитие МВПР. Указанная, как основная причина смерти мертворожденных детей, анте- и интранатальная асфиксия являлась симптомокомплексом, отражающим течение ВУИ.

Среди детей, умерших в неонатальном и раннем младенческом периодах, положительные результаты ПЦР получены у 30 (81,1 %). В 18 наблюдениях обнаружены различные сочетания возбудителей: ДНК ВПГ и ЦМВ у 12 детей (32,4 %), ДНК ВПГ и Tg - у 3 (8,15 %), ДНК одновременно трех возбудителей обнаружена у трех младенцев. Наиболее часто (43,2 %) причиной смерти являлись МВПР, второе по частоте место занимали ВПС (32,4 %).

ДНК ЦМВ и ВПГ чаще выделялась из ткани печени и головного мозга, реже из ткани миокарда и легких. ДНК Tg преимущественно определялась в образцах печени, реже в миокарде, головном мозге и других органах. Детекция нук-

леотидных последовательностей инфекционных патогенов из тканей аномально развитых органов выявило ведущую роль инфекционного процесса в формировании ВПР. При светооптическом исследовании показаны воспалительные изменения исследуемых органов (течение гепатита с исходом в цирроз, вялотекущие энцефалиты, фиброэластоз миокарда, пневмонии); ультраструктурное исследование обнаружило наличие вирусов в пораженных органах.

У детей с аномалиями развития желудочно-кишечного тракта, выявлены дисплазия и дистрофия эпителия, гетеротопия и изменения структуры ганглионарных образований. Эпителий характеризовался полиморфизмом, прослеживались участки с цилиндрическим, кубическим и многослойным эпителием. Основным патологическим процессом явилось воспаление на фоне атрофически-склеротического процесса, сопровождавшееся отеком, нарушениями микроциркуляции и воспалительно-клеточной инфильтрацией.

Состояние респираторной ткани отличалось гетерогенностью. В просветах альвеол встречались десквамированные альвеолоциты с выраженными дистрофическими изменениями цитоплазмы, макрофаги и лимфоциты, их количество значительно увеличивалось при развитии пневмонии. Наличие лейкоцитов в просветах альвеол характерно для всех наблюдений и соответствовало присоединившейся или развившейся внутриутробной пневмонии. Выявленные метаплазия и гиперплазия эпителия бронхов, длительно существующий ателектаз, интраальвеолярный и интерстициальный отек, склероз межальвеолярных перегородок, деэндотелизация и мускуларизация сосудов системы легочной артерии свидетельствовали о развитии бронхолегочной дисплазии, связанной с инфекциями перинатального периода.

Присутствие в тканях нуклеотидных последовательностей инфекционных агентов может рассматриваться как проявление инфекционного процесса. Продолжающееся влияние инфекционного агента на ребенка и после родов усугубляет тяжесть уже имеющейся врожденной патологии.

В основе межклеточных влияний у эмбриона лежит интеграция белков в группах клеток и формирование объединений более сложного порядка. Экзогенные факторы, воздействующие на эмбрион, а также эндогенные воздействия, определяющиеся состоянием гомеостаза организма матери, могут вмешиваться во взаимодействия клеток, нарушая нормальный процесс эмбриогенеза. Особое влияние на эмбриофетогенез оказывают вирусные инфекции, которые выступают в роли внешних поражающих факторов (при течении острой инфекции или при восходящем инфицировании), и воздействуют на плод изменениями в репродуктивной системе женщины, снижением иммунологических резервов.

Вирусемия и бактериемия при течении пренатального инфекционного процесса, кроме непосредственного воздействия на плод после адсорбции возбудителей на эпителии плодных оболочек и контаминации околоплодных вод, вызывают сложный комплекс патологических процессов в организме беременной женщины, исходом которых является гипоксия, приводящая к инициации целого ряда процессов и появлению факторов, негативно воздействующих на клетку и индуцирующих апоптоз.

В качестве индукторов апоптоза выступают вирусы, а так же белковые и

окислительные продукты поврежденной вирусом клетки. Нарушающийся процесс апоптоза приводит к повреждениям структур эмбриона, а изменения на тканевом уровне исключают возможность полноценного функционирования органа в постнатальном периоде. Таким образом, через механизм апоптотической реакции проявляется опосредованное действие инфекции на формирование аномалий развития. Увеличенное количество ядер с морфологическими признаками апоптоза характеризовало его дисрегуляцию. Ультраструктурный анализ выявил большое число апоптотических клеток в лимфоидных и других органах.

В фетальном периоде при инфицировании и заболевании плода наблюдаются дистрофические и некробиотические процессы, а также нарушения кровообращения, усугубляющие течение гипоксии и поддерживающие персистенцию инфекционных агентов. Полиорганность поражения плода определяется существованием хронической инфекции. Нарушая процесс морфогенеза, инфекционный агент способен сохраняться в организме плода и поддерживать течение инфекции, что при онтогенетическом развитии полноценного воспалительного ответа приведет в постнатальном периоде к формированию аномалий.

Морфологически нарушения развития плода выражались в ряде основных процессов: задержке роста, формировании гипоплазии или гиперплазии отдельных тканей, органов и систем. Выявленные нами в аномально развитых органах признаки дисплазии и гипертрофии эпителия, наличие интенсивного склерозирования паренхиматозных тканей и слизистых оболочек представляет собой процесс дисрегенерации соединительной ткани вследствие пренатального воспаления. Ответная реакция плода на любое повреждение, включая инфекцию, стереотипна, и определяется этапом онтогенеза, состоянием механизмов реализации воспаления, неспецифической иммунологической реактивности, способностью к специфическому иммунному и тканевому ответу. Известно, что воспалительная реакция в развернутом виде невозможна на ранних этапах эмбриогенеза (рис. 4). В тканях умерших детей выявлены вирусные частицы или их нуклеотидные последовательности и воспалительная реакция могла развиваться в любые сроки при неблагоприятных условиях, вызвав течение воспаления на фоне сформированного ВПР. В вилочковой железе у ребенка с СД был обнаружен антиген ВК, что предполагало повреждение вирусом дендритных клеток и развитие иммунодефицитного состояния. ВК найден и в тканях спинного мозга у больного с синдромом Верднига-Гошмана, прослежено влияние вируса на процесс деструкции миелиновых волокон. В целом, формирование ВПР можно рассматривать как исход инфекционного процесса, морфологическим субстратом которого являются признаки воспаления или его последствий.

Таким образом, развитие инфекции у беременных женщин может сопровождаться следующими исходами: гибелью эмбриона или плода, преждевременным прерыванием беременности, мертворождением, развитием ВУИ или эрадикацией инфекции (рис.5). При развитии ВУИ возбудители вызывают патологические изменения, которые проявляются в виде прямого цитопатического воздействия и деструкции клеток, воспаления, дисрегуляции апоптоза и, в конечном итоге, нарушения резорбции провизорных органов и процессов их формирования. В результате этого возникают ВПР. Однако

пластичность системы мать-плацента-плод оставляет вероятность течения ВУИ без развития аномалий. Наличие инфекционных патогенов в тканях способствует их прогрессивной альтерации. Исходом данных процессов может быть течение ВУИ, гибель новорожденного ребенка, а также формирование аномальных структур уже в постнатальном периоде.



Рис. 4. Механизм формирования пороков развития на фоне течения воспалительной реакции во внутриутробном периоде.

Обследование беременных женщин на наличие цитомегаловирусной инфекции, герпеса и токсоплазмоза (напряженность иммунитета, сероконверсия), вакцинация против краснухи, а также грамотный подход к планированию беременности, методам обследования беременной женщины, антенатальная, пренатальная диагностика (комплексные диагностические мероприятия) могут снизить рождение детей с ВПР. Кроме того, проведение соответствующих профилактических мер уменьшит число детей с СВК, являющихся резервуаром инфекции (выделяющих вирус в течение 1 - 3 лет), и позволит, в общем, снизить заболеваемость краснухой, далее прогнозировать ситуацию, и, в конечном счете, подойти к ликвидации данной инфекции.

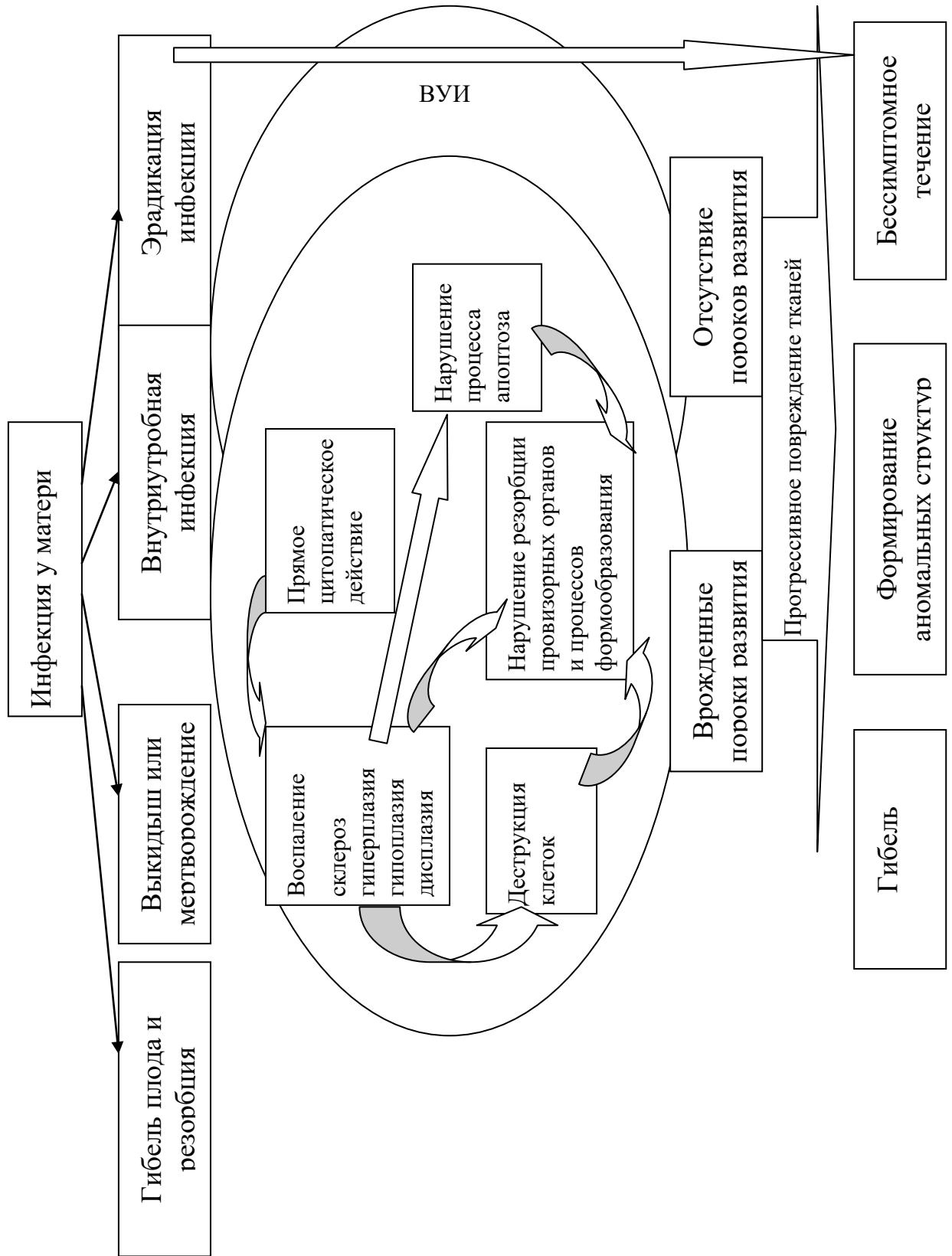


Рис.5. Схема формирования пороков развития при внутриутробных инфекциях.

ВЫВОДЫ

1. Врожденные пороки развития и хромосомная патология у детей связаны с внутриутробными инфекциями, возбудители которых (вирус простого герпеса, цитомегаловирус, вирус краснухи и *Toxoplasma gondii*) способны к длительному сохранению в пораженных органах. Выделение нуклеотидных последовательностей вирусов простого герпеса, цитомегалии, краснухи и *Toxoplasma gondii* из тканей 93,5% плодов подтверждает их роль в прерывании беременности.
2. Использование метода полимеразной цепной реакции при исследовании тканей плодов, мертворожденных и умерших детей с пороками развития и аутосомными трисомиями позволило в 88,5% случаев определить локализацию возбудителей инфекций гестационного периода.
3. В структуре внутриутробных инфекций, вызванных вирусом простого герпеса, цитомегаловирусом, вирусом краснухи и *Toxoplasma gondii*, у новорожденных детей с аномалиями развития и хромосомной патологией преобладает врожденная краснуха (56,8%). Внутриутробные инфекции у детей с пороками развития и новорожденных с хромосомной патологией характеризуются признаками воспалительных заболеваний в постнатальном периоде.
4. В основе формирования врожденных аномалий развития выявлены прямое цитопатическое действие, альтеративно-продуктивное воспаление, изменение процесса апоптоза, обусловленные нахождением инфекционных патогенов в тканях плода и приводящие к нарушению резорбции провизорных органов и процессов формообразования.
5. У абортированных плодов, мертворожденных и умерших детей с врожденными пороками развития и аутосомными трисомиями течение воспалительного процесса сопровождается развитием деструктивных, дистрофических, диспластических и гипертрофических изменений, склерозом и нарушением кровообращения в аномально развитых органах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У новорожденных детей с врожденными пороками развития и хромосомной патологией необходимо проводить обследование для обнаружения и определения локализации маркеров инфекций (вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса, вируса краснухи и *Toxoplasma gondii*).
2. В первые дни после рождения ребенка с пороками развития или с хромосомной патологией для детекции инфекционных патогенов необходимо использовать метод полимеразной цепной реакции и иммуногистохимическое исследование.
3. При положительном результате полимеразной цепной реакции показана кроме корректирующей, противовирусная и/или антибактериальная терапия с учетом выделенных возбудителей.
4. Рождение ребенка с пороками развития и хромосомной патологией требует обследования женщины с использованием полимеразной цепной реакции и иммуно-

ферментного анализа для выявления этиологии хронических вирусных инфекций и проведения соответствующей коррекции с целью планирования последующих беременностей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

ПЦР-диагностика микст-инфекций у новорожденных детей / Е.М.Малкова, О.Н. Гришаева, М.П. Гришаев и др. // Генодиагностика в современной медицине. - Москва, 2000. - С. 16-17.

Стереоморфометрическое исследование респираторной ткани легких у недоношенных детей при синдроме дыхательных расстройств / Е.М.Малкова, П.И. Коломейцев, П.В.Терещенко и др. // Новые методы диагностики, лечения заболеваний и управления в медицине. - Новосибирск, 2000. - С. 154-155.

Изучение роли краснухи при врожденных пороках развития / Е.М.Малкова, О.Н. Гришаева, И.Я. Извекова и др. // Актуальные вопросы современной медицины. – Новосибирск, 2003. – С.83-84.

Комплексная лабораторная диагностика краснухи / М.П.Гришаев, М.А.Смердова, О.Н. Гришаева и др. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы XI международной конференции. – Ялта-Гурзуф, 2003. – С. 262-263.

Современные проблемы диагностики краснухи / Е.М.Малкова, М.П. Гришаев, М.А. Смердова и др. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. - Новосибирск, 2003. – С. 182-196.

Влияние вируса краснухи на возникновение врожденных пороков развития / Е.М.Малкова, О.Н. Гришаева, И.Я. Извекова и др. // VI Российский съезд врачей-инфекционистов. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 229.

Значение молекулярно-биологической диагностики вирусных инфекций у детей с врожденными пороками развития / К.Е. Скляр, Е.М. Малкова, И.П. Терещенко и др. // Актуальные вопросы современной медицины. – Новосибирск, 2004. – С. IV-9.

Изучение роли вируса краснухи в формировании врожденных пороков развития методом РТ-ПЦР / Е.М.Малкова, И.П.Терещенко, О.Н. Гришаева и др. // Детские инфекции. – 2004. - № 3. – С. 5-8.

Редкие варианты клинических форм хламидийной инфекции у новорожденных / Е.М.Малкова, О.Н. Гришаева, Г.Д. Корабельщиков и др. // Детские инфекции. - 2004. - № 4. - С. 74-76.

Определение взаимосвязи внутриутробных инфекций и врожденных пороков развития по результатам исследования секционного материала / И.П. Терещенко, Е.М. Малкова, Е.И. Краснова и др. // Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей (инфекция и иммунитет). – Москва, 2004. – С.222-223.

Терещенко И.П. Определение взаимосвязи внутриутробных инфекций и врожденных пороков развития по результатам исследования секционного материала / И.П. Терещенко // Материалы ежегодной конференции студентов и молодых ученых «Авиценна 2005». -Новосибирск, 2005. – С.151.

Роль внутриутробных инфекций в механизмах формирования врожденных пороков развития/ К.Е.Скляр, Е.М. Малкова, Н.В. Рязанцева и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. - № 1. – С. 80-84.

Детекция нуклеиновых кислот инфекционных патогенов в тканях детей с врожденными пороками развития / Е.М.Малкова, И.П. Терещенко, О.Н. Гришаева и др. // Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины. – С-Петербург, 2006. – С. 202-203.

Выделение ДНК *Toxoplasma gondii* в тканевых образцах у детей с пороками развития / И.П. Терещенко, Е.М. Малкова, О.Н. Гришаева и др. // Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины. – С-Петербург, 2006. – С. 286-287.

Диагностика внутриутробных инфекций с использованием полимеразной цепной реакции у детей с врожденными пороками развития и хромосомной патологией / И.П. Терещенко, Е.М. Малкова, О.Н. Гришаева и др. // Этапная реабилитация и профилактика инфекционных заболеваний у детей. – С-Петербург, 2006. – С.69.

Механизмы формирования врожденных аномалий развития при внутриутробных инфекциях / Е.М.Малкова, К.Е. Скляр, О.Н. Гришаева и др. // Детская хирургия. – 2006. - №4. – С. 25-27.

Врожденная краснуха у ребенка с болезнью Дауна / Е.М.Малкова, И.П.Терещенко, О.Н. Гришаева и др. // Детские инфекции. – 2006. - №3. – С. 74-76.

Обнаружение ДНК возбудителей внутриутробных инфекций в тканях детей с врожденными пороками развития / И.П. Терещенко, Е.М. Малкова, О.Н. Гришаева и др. // Инфекционные болезни. – 2006. - № 3. – С. 30-34.

Обнаружение маркеров внутриутробных инфекций у детей с синдромом Дауна / Е.М.Малкова, И.П. Терещенко, И.Д. Петрова и др. // Детские инфекции. – 2007. - №1. – С. 42-45.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВПГ – вирус простого герпеса

ВПР – врожденные пороки развития

ВПС – врожденный порок сердца

ВК – вирус краснухи

ВУИ – внутриутробные инфекции

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МПС – мочеполовая система

МВПР – множественные врожденные пороки развития

ОДС – опорно-двигательная система

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СД – синдром Дауна

СВК – синдром врожденной краснухи

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦНС – центральная нервная система

Tg – *Toxoplasma gondii*

Отпечатано в типографии Новосибирского
государственного технического университета
630092, г. Новосибирск, пр. К.Маркса, 20,
тел./факс (383) 346-08-57
формат 60x84/16, объем 1,5 п.л., тираж 100 экз.,
заказ № , подписано в печать 27.04.07 г.