

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Титов В. Ю.¹, Ананкина А. А.², Осипов А. Н.¹, Шалина Р. И.², Иванова Е. А.^{1,2}, Попова М. В.^{1,2}

ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ НИТРИТА И НЕТИОЛАТНЫХ НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЙ В ПЛАЗМЕ МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ

¹ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, кафедра общей и медицинской биофизики, 117997, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, кафедра акушерства и гинекологии педиатрического факультета, 117997, Москва, Россия

Цель исследования – разработка метода ранней диагностики внутриутробной инфекции (ВУИ). Проведено одномоментное исследование маркеров воспаления в венозной крови 60 пациенток с последующей ретроспективной оценкой исходов беременностей и родов. Из них: 33 пациентки со сроком гестации более 37 нед (доношенная беременность) и 27 пациенток, у которых исследование проведено в сроке менее 37 нед с угрозой преждевременных родов (ПР), представляющих основную опасность развития ВУИ. У 27 пациенток диагностирован преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО). Из них 15 – с угрозой ПР. У 8 из них диагностирована ВУИ. У всех пациенток с ПРПО, в том числе с ВУИ, концентрация нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) в плазме крови матери составила $2,3 \pm 1,2$ мкМ, в то время как в норме она не превышает 0,1 мкМ вне зависимости от срока беременности ($p < 0,001$). Применение антибиотиков при ПРПО способствовало нормализации концентрации ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$). Можно предположить, что повышение этого показателя связано с бактериальной инфекцией. Показания других маркеров воспаления: количество лейкоцитов в венозной крови и в мазке влагалищного содержимого, уровень С-РБ достоверно не изменялись как при ПРПО, так и при ВУИ ($p > 0,1$). Поскольку показатель концентрации ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) повышался практически во всех случаях ПРПО, в отличие от всех других, используемых в современной медицине клинических и биохимических показателей, есть очевидный смысл его применения для текущего контроля состояния беременных, особенно при угрозе ПР. О возможности контроля состояния плода по концентрации ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) в крови матери, пока однозначно утверждать нельзя.

Ключевые слова: оксид азота; нитрит; нетиолатные нитрозосоединения, преждевременные роды; преждевременный разрыв плодных оболочек; внутриутробная инфекция.

Для цитирования: Титов В.Ю., Ананкина А.А., Осипов А.Н., Шалина Р.И., Иванова Е.А., Попова М.В. Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме материнской крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 633-639. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639>

Для корреспонденции: Титов Владимир Юрьевич, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. отд. медицинской биофизики; e-mail: vtitov43@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 11.07.2022

Принята к печати 26.07.2022

Опубликовано 14.11.2022

Titov V. Yu.¹, Osipov A. N.¹, Shalina R. I.², Anankina A. A.², Ivanova E. A.^{1,2}, Popova M. V.^{1,2}

THE POSSIBILITY OF DIAGNOSING INTRAUTERINE INFECTION BY THE CONTENT OF NITRITE AND NON-THIOLATE NITROSO COMPOUNDS IN MATERNAL BLOOD PLASMA

¹Department of general and medical biophysics of Russian National Research Medical University n.a. N.I.Pirogov, 117997, Moscow, Russian Federation;

²Department of obstetrics and gynecology of Russian National Research Medical University n.a. N.I.Pirogov, 117997, Moscow, Russian Federation

The aim of the study is to develop a method for early diagnosis of intrauterine infection (IUI). A study of markers of inflammation in the venous blood of 60 pregnant women was conducted. The study was followed by a retrospective assessment of the outcomes of pregnancies and childbirth. Of these, 33 patients with a gestation period of more than 37 weeks (full-term pregnancy) and, accordingly, 27 patients from whom the blood sample was taken at a period of less than 37 weeks – patients with the threat of premature birth (PB). PB is the main factor contributing to the development of IUI. 27 patients were diagnosed with premature rupture of the membranes (PROM). Of these, 15 are with the threat of PB. 8 of them had a diagnosed IUI. In all cases of diagnosed PROM, including those with IUI, the concentration of nitrite and nontiolate nitroso compounds ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) in the mother's blood plasma was 2.3 ± 1.2 μM , while normally it does not exceed 0.1 μM ($p < 0.001$). Regardless of the duration of pregnancy. The use of antibiotics in the case of PROM contributed to the normalization of the concentration ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$). Therefore, increasing of this indicator is result of bacterial infection. Indications of other markers of inflammation: the number of leukocytes in venous blood and in a smear of vaginal contents, the level of C-RB did not significantly change in both PROM and IUI ($p > 0.1$). Since the concentration index ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) increased in almost all cases of PREM, unlike all other clinical and biochemical indicators used in modern medicine, there is an obvious sense of its use for the current monitoring of the health of pregnant women. But it is still impossible to say unequivocally about the possibility of monitoring the fetal health by concentration ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) in the mother's blood.

Key words: nitric oxide; nitrite; nontiolate nitroso compounds; premature birth; premature rupture of fetal membranes; intrauterine infection.

For citation: Titov V. Yu., Osipov A. N., Shalina R. I., Anankina A. A., Ivanova E. A., Popova M. V. The possibility of diagnosing intrauterine infection by the content of nitrite and non-thiolate nitroso compounds in maternal blood plasma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): (in Russ.). 633-639. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639>

For correspondence: *Titov Vladimir Yurievich*, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Medical Biophysics, Institute of Translational Medicine; e-mail: vtitov43@yandex.ru

Information about authors:

Titov V. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-2639-7435>;
Osipov A. N., <https://orcid.org/0000-0001-7244-2818>;
Shalina R. I., <https://orcid.org/0000-0001-7121-1663>;
Anankina A. A., <https://orcid.org/0000-0002-0223-0868>;
Ivanova E. A., <https://orcid.org/0000-0003-3635-1550>;
Popova M. V., <https://orcid.org/0000-0002-3671-780X>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Received 11.07.2022

Accepted 26.07.2022

Published 14.11.2022

Введение. В структуре перинатальной заболеваемости и смертности внутриутробная инфекция (ВУИ) занимает ведущее место [1-4]. Одним из основных факторов риска развития ВУИ является преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО), произошедший до 37 недели гестации [5-7]. Антенатальная диагностика ВУИ затруднена тем, что этот процесс у матери может проходить бессимптомно [8]. УЗИ способно зафиксировать изменения, развившиеся вследствие уже начавшегося процесса [8]. Методы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, требуют инвазивного вмешательства (амниоцентез, кордоцентез). Их применение оправдано при наличии клинических симптомов [9]. Необходим неинвазивный метод, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью, с возможностью массового и систематического контроля.

Предложен метод ранней диагностики воспалительных процессов, основанный на регистрации содержания нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) в плазме крови при помощи запатентованного ферментного сенсора, основанного на обратимом ингибировании фермента каталазы нитритом и нитрозосоединениями и утрате ими способности ингибировать под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы этих соединений [10-12]. Впоследствии сенсоры, основанные на этом принципе, предложены рядом исследователей [13-16]. Нитрит и нетиолатные нитрозосоединения являются продуктами взаимодействия супероксидного аниона, продуцируемого активированными лейкоцитами, с соединениями – депо оксида азота [17-19]. У этих соединений в плазме нет эффективных конкурентов за супероксид. В норме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ находятся в концентрации менее 0,1 мкМ, поскольку неактивированные лейкоциты не продуцируют супероксид. Содержание в плазме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в концентрации свыше 0,15 мкМ свидетельствует о наличии в организме воспалительного процесса [20]. Определение $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ может быть высокочувствительным и высокоспецифичным методом ранней диагностики воспаления, значения которого не зависят от индивидуальных особенностей.

У беременных с диагностированным ПРПО концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в крови увеличивается до 1 мкМ и выше [21].

Цель исследования – определить возможность использования показателей концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме крови матери для диагностики ВУИ.

Материал и методы. Проведено одномоментное исследование маркёров воспаления в венозной крови 60 беременной пациентки с последующей ретроспективной оценкой исходов беременностей и родов.

Группы разделены в зависимости от срока гестации и наличия ПРПО: Ia группа (группа контроля) – пациентки со сроком гестации ≥ 37 недель с целым плодным пузырьком ($n=21$), Ib – пациентки со сроком гестации ≥ 37 недель и ПРПО ($n=12$), IIa – пациентки с угрозой ПР с целым плодным пузырьком ($n=12$), IIb – пациентки с угрозой ПР (<37 недель) и ПРПО (без ВУИ новорожденного) ($n=7$), IIc – пациентки с угрозой ПР (<37 недель), ПРПО и наличием ВУИ ($n=8$).

Критерии включения: информированное согласие на участие в исследовании, одноплодная беременность, для групп Ia и Ib – срок гестации ≥ 37 недель, для групп IIa, b, c – срок гестации ≥ 22 и <37 недель.

Критерии исключения: антенатальная гибель и врождённые пороки развития у плода, антибактериальная терапия накануне госпитализации (7 дней и менее), воспалительные заболевания матери в стадии обострения.

Диагностика преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) осуществлялась с помощью теста на подтекание околоплодных вод – AmniSure ROM Test, основанного на выявлении во влажной среде поддерживаемом плацентарного α -микроглобулина α -1 (РАМG-1), продуцируемого клетками децидуальной оболочки, присутствующего в норме только в околоплодных водах [22].

Для контроля воспалительных процессов определяли С-реактивный белок, используя иммуноферментный метод для количественного определения *in vitro* С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека, обозначаемый как метод «С-реактивный белок высокочувствительный» (или hsCRP ELISA). Данный тест основан на принципе твёрдофазного непрямого ИФА. Использован также показатель числа лейкоцитов.

Определение содержания нитрита и нитрилатных нитрозосоединений в плазме. В экспериментах использованы реактивы: Na-фосфат однозамещённый, натрия хлорид, перекись водорода, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, нитрит калия, нитрат натрия, ЭДТА, глутатион (Sigma, США). Содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ определяли с помощью ферментного сенсора, принцип работы которого основан на свойстве нитрита (NO_2^-), S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нитрилатных нитрозосоединений, не содержащих железа (RNO), ингибировать фермент каталазу в присутствии галоид-ионов с примерно равной эффективностью. ДНКЖ утрачивают ингибирующий эффект в среде, содержащей хелатор железа, разрушающий комплекс (ЭДТА), и ловушку NO (оксигемоглобин). RSNO трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа и тиолов и приобретают их свойства. Нитрит и RNO не трансформируются в ДНКЖ в нейтральной среде, следовательно, не разрушаются хелаторами железа и сохраняют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO. Других эффективных ингибиторов каталазы плазма не содержит. Чувствительность метода – 50 нМ [10, 17, 20].

Для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ у больных отбиралась кровь в количестве 2 мл. Для предотвращения свертывания крови использован раствор гепарина – 0,1 мл 1% раствора на 10 мл крови. Плазму получали путём центрифугирования образцов на центрифуге ЦУМ-1 при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отделяли от эритроцитов и использовали для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [10, 17, 20].

Определение активности каталазы осуществлялось калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение перекиси водорода [17].

Диагноз угрозы преждевременных родов (ПР) устанавливался на основании жалоб на нерегулярные спастические боли в животе и поясничной области, подтекание околоплодных вод, по данным объективного исследования: повышенный тонус матки, укорочение шейки матки.

Диагностика ВУИ. Диагностика осуществлялась согласно клиническим рекомендациям по внутриутробной пневмонии, утверждённым российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины и российским обществом неонатологов [23]. Диагностика осуществлялась в первые 72 часа жизни ребёнка по клинико-лабораторным признакам, включающим температуру тела, проявления сердечно-сосудистой недостаточности, респираторные нарушения и ряд других проявлений. Лабораторные признаки ВУИ включали лейкоцитарную формулу, СРБ, анализ мочи, рентгенограмма грудной клетки. О течении у ребёнка инфекционного процесса свидетельствует наличие как минимум двух клинических и одного лабораторного признака. Основной критерий диагностики врождённой пневмонии – наличие инфильтративных теней на рентгенограмме лёгких (в первые 3-е суток жизни) [23].

Статистическая обработка данных. Для статистического анализа и построения графиков использован пакет статистических программ IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, США) и StatTech v. 2.8.4 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (число исследуемых в группах менее 50). С учётом соответствия нормальному распределению количественные показатели описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение двух независимых групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнено с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проведены с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий). Критерием статистической значимости полученных результатов считали общепринятую в медицинской статистике величину $p < 0,05$.

Таблица 1

Характеристика групп по возрасту, ИМТ, сроку гестации на момент взятия пробы, паритету беременностей и родов

Показатели	Своевременные роды (n=33)		Угроза преждевременных родов (n=27)			p
	Ia ПРПО «-» (M±SD), n=21	Ib ПРПО «+» (M±SD), n=12	IIa ПРПО «-» (M±SD), n=12	IIb ПРПО «+» без ВУИ (M±SD), n=7	IIc ПРПО «+» с ВУИ (M±SD), n=8	
Возраст, годы	29,9±6,0	32,9±6,0	34,3±5,5	27,4±5,5	34,3±4,2	0,080
ИМТ, кг/м ²	23,7±4,0	23,7±3,9	24,5±4,0	22,6±2,9	25,5±6,1	0,790
Срок гестации, нед	40,1±1,0	39,4±1,1	33,9±2,4	34,9±0,9	33,1±2,3	<0,001*
Паритет беременностей	2±2	2±1	3±1	2±1	4±2	0,097
Паритет родов	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	0,346

Примечание. * – Различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Перинатальные исходы новорожденных в зависимости от срока гестации, наличия ПРПО и ВУИ

Параметры	После 37 недель (n=33)		До 37 недель (угроза ПР) (n=27)	
	ПРПО«+», n=12	ПРПО«-», n=21	ПРПО«+», n=15	ПРПО«-», n=12
Здоровые дети	9 (75%)	16 (76%)	1 (7%)	0 (0%)
ВУИ	0 (0%)	0 (0%)	8 (53%)	0 (0%)
Осложнения, не связанные с воспалением	3 (25%)	5 (24%)	6 (40%)	12 (100%)

Результаты. Общая характеристика групп и перинатальные исходы беременностей и родов. Общая характеристика групп по возрасту, ИМТ, сроку гестации на момент взятия пробы, паритету беременностей и родов представлена в табл. 1. Состав групп статистически значимо не отличался по возрасту, ИМТ и паритету беременностей и родов ($p>0,05$). Статистически значимые различия в сроке гестации соответствуют критериям разделения когорт.

Перинатальные исходы новорожденных представлены в табл. 2. В группе своевременных родов большая часть детей родилась здоровой, без перинатальных осложнений: 75,0% и 76,2% при наличии и отсутствии ПРПО, соответственно. Остальные дети родились без признаков ВУИ, осложнения связаны с хронической гипоксией, дистресс-синдромом, незрелостью или переносимостью, аспирацией околоплодных вод, диабетической фетопатией.

В группе с угрозой ПР и наличием ПРПО роды произошли в сроке $33,5\pm 2,2$ нед. Только у одной из 12 пациенток с ПРПО родились здоровые дети, не нуждавшиеся в дополнительной респираторной поддержке и дальнейшем переводе на второй этап выхаживания. У 8 новорожденных диагностирована ВУИ после рождения. У остальных 6 – недоношенные с различными перинатальными осложнениями: синдром дыхательных расстройств у новорожденных, церебральная депрессия, преходящая ишемия миокарда. В группе преждевременных родов без ПРПО все дети родились без признаков ВУИ, все осложнения связаны с недоношенностью.

Соотношение концентрации (NO_2^-+RNO) в венозной крови матери с диагностированными ПРПО и ВУИ. Данные по некоторым клиническим и биохимическим показателям крови, образцы которой взяты у пациенток с угрозой преждевременных родов и госпитализированных в сроке доношенной беременности, с наличием и отсутствием ПРПО приведены в табл. 3. У всех пациенток с ПРПО как при своевременных, так и при преждевременных родах имело место повышение концентрации NO_2^-+RNO в плазме крови матери до $1,3-5,5$ мкМ. В среднем, у пациенток, у которых в последующем родился ребенок с ВУИ, среднее значение показателя концентрации NO_2^-+RNO – $2,3\pm 1,1$ мкМ.

При оценке значений концентрации (NO_2^-+RNO) получены следующие результаты: $2,4\pm 0,8$ и $2,4\pm 1,0$ мкМ, у пациенток с ПРПО при своевременных и преждевременных родах, соответственно. У пациенток без ПРПО: $0,4\pm 0,3$ и $0,8\pm 0,5$ мкМ при своевременных и

преждевременных родах, соответственно. Установлены статистически значимые различия между показателями пациенток с ПРПО и без ($p<0,001$). Это средние значения. В отсутствие ПРПО при доношенной беременности в 85,7% случаев, а при недоношенной в 50% концентрация (NO_2^-+RNO) менее 0,1 мкМ/л, что, согласно нашим данным характерно для нормы – отсутствия какого-либо воспаления [10, 17, 20, 21]. Показания других маркеров воспаления: количество лейкоцитов (WBC), уровень СРБ в венозной крови, лейкоциты в мазке влагалищного содержимого не информативны ($p>0,1$).

У 9 пациенток выявлена повышенная концентрация NO_2^-+RNO в крови (от 0,6 до 2,8 мкМ), но не диагностировано ПРПО. 3 пациентки с доношенной беременностью, 6 – с угрозой ПР (табл. 3).

При доношенной беременности повышение наблюдалось при гестационном пиелонефрите в стадии ремиссии (1) и вагините (1), у одной пациентки воспалительных процессов в организме матери не наблюдалось. Все пациентки с угрозой преждевременных родов (6) выписаны из стационара беременными с положительным эффектом от проводимой терапии: 5 – поступили повторно с доношенным сроком гестации, 1 – родила преждевременно. У 3-х пациенток – хронический цистит, у 1 – вагинит при поступлении, 1 – гестационный пиелонефрит в стадии ремиссии, 1 – перенесла коронавирусную инфекцию в начале III триместра беременности. Из тех, кто родил своевременно: 1 ребенок родился с признаками крайней незрелости (несмотря на доношенный срок), 1 – с ВПР сердечно-сосудистой системы (в связи с чем исключен из дальнейшего анализа), 3 – здоровы.

По патогистологическому исследованию последа признаков восходящей амниотической инфекции не обнаружено, все дети без признаков инфицирования.

Влияние антибактериальной терапии при ПРПО на значение показателя NO_2^-+RNO . При угрозе преждевременных родов с наличием ПРПО в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава РФ от 2020 [24] проводилась антибактериальная терапия. Применение антибиотиков приводило к снижению содержания NO_2^-+RNO до нормы (табл. 4), что свидетельствует о наличии бактериального компонента в развитии патологического процесса, приводящего к активации фагоцитов, показателем чего является повышение концентрации NO_2^-+RNO [17, 20]. Беременные, у которых произошла нормализация показателя в результате антибактериальной терапии, родили детей без признаков ВУИ. Послеродовый пе-

Частота встречаемости значений концентрации NO_2^-+RNO , СРБ, лейкоцитов в венозной крови беременных и в мазке влагалищного содержимого у пациенток в зависимости от срока гестации, наличия ПРПО и ВУИ

Показатели	Своевременные роды (n=33) n (%)		Угроза преждевременных родов (n=27) n (%)		
	Ia ПРПО «-», n=21	Ib ПРПО «+», n=12	IIa ПРПО «-», n=12	IIb ПРПО «+» без ВУИ, n=7	IIc ПРПО «+» с ВУИ, n=8
NO_2^-+RNO , мкМ/л					
<0,1	18 (85%)	0 (0%)	6 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
0,1-1,0	1 (5%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
1,0-2,0	0 (0%)	2 (17%)	3 (25%)	5 (71%)	5 (63%)
≥2,0	2 (10%)	10 (83%)	2 (17%)	2 (29%)	3 (37%)
СРБ, мг/л (норма: до 6,0 мг/л)					
<1	6 (28%)	2 (17%)	1 (8%)	2 (29%)	0 (0%)
1,0-6,0	14 (67%)	9 (75%)	9 (75%)	5 (71%)	5 (63%)
≥6	1 (5%)	1 (8%)	2 (17%)	0 (0%)	3 (37%)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ (норма: (4-9) $\times 10^9/\text{л}$)					
≤9	8 (38%)	2 (17%)	6 (50%)	3 (43%)	3 (37%)
>9	13 (62%)	10 (83%)	6 (50%)	4 (57%)	5 (63%)
Число лейкоцитов в мазке, шт. в поле зрения (норма: <10 шт. в поле зрения)					
≤10	11 (52%)	7 (58%)	4 (33%)	5 (71%)	7 (87%)
>10	10 (48%)	5 (42%)	8 (67%)	2 (29%)	1 (13%)

риод протекал без особенностей. Беременная, у которой показатель остался повышенным, родила ребёнка с установленным диагнозом ВУИ; по заключению патогистологического исследования последа отмечено, что плацента с признаками восходящей амниотической инфекции, представленной мембранитом, субхориальным интервиллуситом, хориоамнионитом, васкулитом сосудов пуповины.

Повышение (свыше 0,1 мкМ) концентрации NO_2^-+RNO отмечено у всех пациенток с ПРПО. Обращает на себя внимание наличие нормальных значений лейкоцитов в венозной крови и СРБ у большинства пациенток (табл. 3).

Возникает вопрос, какими процессами обусловлены повышения концентрации (NO_2^-+RNO) при ПРПО в венозной крови: происходящими в организме матери, в плодных оболочках или в тканях плода. NO_2^-+RNO в последнем случае из крови плода должны попасть в кровь матери. Для этого целесообразно проведение одновременного исследования состава нитрозосоединений в крови из пуповины и венозной крови матери.

Соотношение концентраций (NO_2^-+RNO) в венозной крови матери и в крови из пуповины. Исследование показало, что у всех пациенток с ПРПО при содержании в крови матери (NO_2^-+RNO) повышенной концентрации (более 0,1 мкМ), увеличение показателя регистрировалось и в крови пуповины, причём в несколько большей концентрации (табл. 5 (1-6)). В двух случаях при концентрации (NO_2^-+RNO) в крови матери менее 0,1 мкМ, в крови плода из пуповины выяв-

лено значительное повышение ($1,3\pm 0,2$ и $2,6\pm 0,3$ мкМ, соответственно) концентрации этих соединений. При этом роды своевременные, через естественные родовые пути, дети родились здоровыми, оцененные 8/9 по шкале Апгар. Все представленные в табл. 5 образцы материнской крови, содержащие более 0,1 мкМ NO_2^-+RNO , принадлежали пациенткам с диагностированным ПРПО. При нормальном течении беременности концентрация (NO_2^-+RNO) вплоть до родов менее 0,1 мкМ.

Обсуждение. Задача ранней диагностики ВУИ включает раннее выявление инфицирования и контроль за эффективностью лечения.

Наши данные показали, что при ПРПО у всех пациенток происходило увеличение концентрации NO_2^-+RNO , являющееся индикатором активации фагоцитов (табл. 3, 4). По-видимому, ПРПО сопряжён с активацией фагоцитов, принимающих участие как в реакциях воспаления, так и в изменении структуры плодных оболочек. Согласно современным представлениям, как при инфекционном, так и при неинфекционном воспалительном процессе происходит активация toll-like рецепторов, расположенных на иммунокомпетентных и эндотелиальных клетках на границе соприкосновения клеток матери и плода [25-27]. Запущенные иммунные механизмы ведут к активации фагоцитов, что, в свою очередь, может привести к активации эндогенных матричных металлопротеиназ с запуском процессов коллагенолиза, деградации, разрыва внеклеточного матрикса [28, 29]. Активация фагоцитов способствует развитию оксидативного стресс-

Содержание NO₂⁻+RNO в плазме крови у беременных с ПРПО на фоне антибактериальной терапии*

№ пациентки	Срок гестации, нед	NO ₂ ⁻ +RNO (мкМ/л) до начала АБТ	Продолжительность АБТ (сут) и применяемый препарат	NO ₂ ⁻ +RNO (мкМ/л) после проведения АБТ
1	33-34	5,1±0,5	7 сут, цефтриаксон	<0,1
2	33-34	5,3±0,5	11 сут, цефтриаксон	0,2±0,1
3	35	1,6±0,2	6 сут, цефтриаксон	<0,1
4	30,9	2,5±0,3	8 сут, цефтриаксон	1,4±0,2

Примечание. * – представлены значения в виде M±SD, число измерений показателя у одной пациентки n=4.

Таблица 5

Содержание NO₂⁻+RNO (мкМ/л) в венозной крови матери и в крови из пуповины при родах*

№ пациентки*	Венозная кровь матери	Кровь из пуповины
1	2,1±0,2	5,8±0,3
2	2,0±0,3	3,1±0,3
3	3,8±0,3	5,3±0,4
4	1,9±0,2	3,6±0,3
5	4,9±0,3	5,4±0,4
6	2,1±0,2	2,7±0,2
7	<0,1	<0,1
8	<0,1	<0,1
9	<0,1	1,3±0,2
10	<0,1	2,6±0,3

Примечание. * – С 1 по 6 – пациентки с диагностированным ПРПО, 5 – новорожденный с ВУИ, 1-4 – срок гестации ≥37 нед, 5-6 – срок гестации <37 недель. Представлены значения в виде M±SD, число измерений показателя у одной пациентки n=4.

са с повышением плацентарной митохондриальной активности и выработкой активных форм кислорода, мишенью для которых может являться коллаген плодных оболочек [29]. Концентрация NO₂⁻+RNO нормализуется в течение нескольких суток при антибактериальной терапии (табл. 4). Разрыв плодных оболочек сопряжён с инфицированием, приводящем к активации фагоцитов.

Факт ПРПО и сопутствующего инфицирования с высокой (близкой к 100%) вероятностью возможно выявить по концентрации NO₂⁻+RNO в крови матери.

Но каково состояние плода? Возникает другой вопрос – где происходит процесс, ведущий к образованию (NO₂⁻+RNO): в крови матери или в крови плода? В какой мере содержание (NO₂⁻+RNO) в крови матери отражает их содержание в крови и тканях плода, если эти соединения мы рассматриваем как высокочувствительные маркёры активации фагоцитов [17, 20]. Сравнение данных содержания (NO₂⁻+RNO) в венозной крови матери и в крови из пуповины показывает, что линейная корреляция между ними отсутствует. Наличие (NO₂⁻+RNO) в крови из пуповины при отсутствии в крови матери (см. табл. 4) можно объяснить кратковременным снижением кислородной насыщенности крови во время родов. Кратковременная гипоксия способствует

продукции супероксида и активации лейкоцитов [30-32]. Кровь из пуповины можно исследовать только после родов (или с помощью инвазивных методик во время беременности), в то время как интерес представляет диагностика в антенатальном периоде.

Согласно современным представлениям, ПРПО представляет собой патологию плодных оболочек, при которой ось воспаление – окислительный стресс играет главную роль в создании путей, которые могут привести к ослаблению мембран клеток посредством различных процессов [29, 30]. ПРПО не просто включает воспаление плодных оболочек, но последнее является его возможной причиной. Наши данные об увеличении концентрации (NO₂⁻+RNO) в крови у всех пациенток с ПРПО – факт, подтверждающий такие представления. Эффект антибиотиков, зафиксированный в этой работе (см. табл. 4) и в предыдущей, свидетельствует о вкладе бактерий в этот процесс. В случае нормальных родов при своевременном излитии вод увеличения концентрации (NO₂⁻+RNO) в крови не происходило (см. табл. 5), т. е., в этих ситуациях каких-либо воспалительных процессов в плодных оболочках не происходит. Поскольку показатель концентрации (NO₂⁻+RNO) повышался, практически, у всех пациенток с ПРПО, в отличие от всех других, используемых в современной медицине клинических и биохимических показателей, имеется очевидное показание его применения для текущего контроля состояния беременных, особенно при угрозе ПР. Но вопрос: можно ли по концентрации (NO₂⁻+RNO) в крови матери контролировать состояние плода пока остается открытым.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4-6, 8, 13-16, 18-20, 22, 25-32 см. REFERENCES)

1. Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Сергеева А.В., Каткова Н.Ю., Сенягина Н.Е. Эпидемиология внутриутробных инфекций: учебное пособие. Н. Новгород: «Ремедиум Приволжье»; 2019.
3. Куклина Л.В., Кравченко Е.Н. Роль внутриутробной инфекции в перинатальной смертности. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(5): 245-50.
7. Новикова В. А., Пенжоян Г. А., Рыбалка Е. В., Аутлева С. Р., Васина И. Б., Филина К. В. Нерешенные вопросы преждевременных родов при преждевременном разрыве плодных оболочек. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2012; 12(4):25-31.
9. Сидорова И. С., Макаров И. О., Матвиенко Н. А. Внутриутробная инфекция: диагностика, профилактика и лечение. М.: МЕД-пресс-информ; 2008.
10. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Горский В.А., Агапов М.А., Иванова А.В., Балякин Ю.В., Камчатнов П.Р., Жданова С.Г. Способ

- диагностики острого неспецифического воспалительного процесса. Патент РФ № 2461831; 2012.
11. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф., Степура И.И. Определение нитрита и нитрозосоединений в биосистемах калориметрическим методом. *Биофизика*. 2010; 55(1): 95-106.
 12. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Механизм ингибирования каталазы нитро- и нитрозо – соединениями. *Биохимия*. 2008; 73(1): 113-8.
 17. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Крейнина М.В., Ванин А.Ф. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении. *Биофизика*. 2013; 58 (5): 857-70.
 21. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Балицкий С.П., Шалина Р.И. Ранняя диагностика хориоамнионита и внутриутробного инфицирования при преждевременном излитии околоплодных вод по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 58(12): 7-10.
 23. Антонов А.Г., Байбарина Е.Н., Балашова Е.Н., Дегтярев Д.Н., Зубков В.В., Иванов Д.О. и др. Врожденная пневмония (клинические рекомендации). *Неонатология: Новости. Мнения. Обучение*. 2017; 4: 133-48.
 24. Клинические рекомендации «Преждевременные роды». Минздрав РФ; 2020. Разработчики: Российское общество акушеро-гинекологов и Ассоциация акушерских анестезиологов-реаниматологов. Доступно по адресу: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331_1. (Дата обращения: 30 июня 2022 г.)
-
- #### REFERENCES
1. Poslova L.Yu., Kovalishena, O.V., Sergeeva A.V., Katkova N.Yu., Senyagina N.E. Epidemiology of intrauterine infections: a training manual [Epidemiologiya vnutriutrobnikh infektsii: uchebnoe posobie]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'e; 2019. DOI: 10.21145/978-5-906125-72-9_2019. (in Russian)
 2. Klein J. O. Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant. J. Remington, J. O. Klein, C. B. Wilson. WB Elsevier Saunders Company, PA, USA. 2011: 918-1041.
 3. Kuklina L.V., Kravchenko E.N. The role of intrauterine infection in perinatal mortality. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(5):245-50. DOI: 10.18821/0044-197X-2019-63-5-245-250. (in Russian)
 4. Liu L., Johnson H.L., Cousens S., Perin J., Scott S., Lawn J.E. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. *Lancet*. 2012; 379(9832): 2151-61. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1.
 5. Blencowe H., Cousens S., Chou D., Oestergaard M., Say L., Moller A.B., Kinney M., Lawn J. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod. Health* 10, 2013; Suppl 1: S2. DOI: 10.1186/1742-4755-10-S1-S2.
 6. Purisch S.E., Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol.*, 2017; 41(7):387-91. DOI: 10.1053/j.semperi.2017.07.009.
 7. Novikova V.A., Penzhoian G.A., Rybalka E.V., Autleva S.R., Vasina I.B., Filina K.V. Unsolved problems of preterm birth in premature rupture of fetal membranes. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2012; 12(4):25-31. (in Russian)
 8. Sciaky-Tamir Y., Hershkovitz R., Mazor M., Shelef I., Erez O. The use of imaging technology in the assessment of the fetal inflammatory response syndrome—imaging of the fetal thymus. *Prenatal Diagnosis*. 2015; 35:413-9. DOI: 10.1002/pd.4560.
 9. Sidorova I.S., Makarova I.O., Matvienko N.A. Intrauterine infection: diagnosis, prevention and treatment. Moscow: MEDpress-inform; 2008. (in Russian)
 10. Titov V.Yu., Osipov A.N., Gorsky V.A., Agapov M.A., Ivanova A.V., Balyakin Yu.V., Kamchatnov P.R., Zhdanova S.G. Method of diagnosis of acute nonspecific inflammatory process. Patent RF No. 2461831; 2012. (in Russian)
 11. Titov V., Petrenko Yu., Vanin A., Stepuro I. Detection of nitrite and nitrosocompounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method. *Biophysics*. 2010; 55 (1): 77-86. DOI: 10.1134/S0006350910010148.
 12. Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F. Mechanism of Inhibition of Catalase by Nitro and Nitroso Compounds. *Biokhimiya (Moscow)*. 2008; 73 (1): 92-6. DOI: 10.1134/s0006297908010148.
 13. Gahlaut A., Hooda V., Gothwal A. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors for rapid assessment of the nitrite toxicity: recent advances and perspectives. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2019; 49 (1): 32-43. DOI: 10.1080/10408347.2018.1461551.
 14. Dhull V., Gahlaut A., Gothwal A., Hooda V., Duhan J.S. Nitrite biosensors: analytical tools for determination of toxicity due to presence of nitrite ions. *Biotechnology: Prospects and Applications*, 2012: 217-26. DOI: 10.1007/978-81-322-1683.
 15. Zazoua A., Hnaïen M., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S., Kherrat R. A new HRP/catalase biosensor based on microconductometric transduction for nitrite determination. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 29(6): 1919-22. DOI:10.1016/j.msec.2009.03.008.
 16. Mousty C., Cosnier S., Chen H., Chen L. A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering C*. 2008; 28(5-6): 726-30. DOI:10.1016/j.msec.2007.10.015.
 17. Titov V., Osipov A., Kreinina M., Vanin A. Features of Metabolism of Nitric Oxide in Normal State and Inflammation. *Biofizika*. 2013; 58 (5): 676-88. DOI: 10.1134/S0006350913050163.
 18. Shumayev K., Gubkin A., Serezhenkov V., Lobysheva I., Kosmachevskaya O., Ruuge E. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*. 2008; 18 (1): 37-46. DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
 19. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54(4): 469-87.
 20. Titov V., Osipov A., Vanin A. The Ability of Blood Plasma to Inhibit Catalase in the Presence of Chloride is a Highly Sensitive Indicator of Deposited Nitric Oxide and Leukocyte Activation. *Current Enzyme Inhibition*, 2020; 16 (2): 172-80. DOI:10.2174/1573408016999200429123919.
 21. Titov V.Yu., Osipov A.N., Balitsky S.P. Shalina R.I. Early diagnostics of chorion and amnion inflammation and antenatal infecting at a premature rupture of membranes by nitrite and non-thiolate nitroso compounds content evaluation in blood plasma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2013; 58(12): 7-10. (in Russian)
 22. Lee S., Lee J., Seong H., Lee S., Park J., Romero R. et al. The clinical significance of a positive Amniscure test in women with term labor with intact membranes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2009; 22(4): 305-10. DOI: 10.1080/14767050902801694.
 23. Antonov A.G., Baibarina E.N., Balashova E.N., Degtyarev D.N., Zubkov V.V., Ivanov D.O. et al. Congenital pneumonia (clinical recommendations). *Neonatologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2017; 4:133-48. DOI: 10.24411/2308-2402-2017-00049. (in Russian)
 24. Clinical recommendations “Premature birth”. Ministry of Health of the Russian Federation. 2020. Developers: The Russian Society of Obstetricians and Gynecologists and the Association of Obstetric Anesthesiologists and Resuscitators. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331_1. (Accessed June 30, 2022). (in Russian)
 25. Szubert M., Weteska M., Zgliczynska J., Olszak O., Zgliczynska M., Kalinka J. et al. The association between imbalances in vaginal microflora and duration of pregnancy as well as selected maternal and neonatal parameters. *Ginekologia Polska* 2021; 92(9):7. DOI: 10.5603/GP.a2021.0035.
 26. Kemp M.W. Preterm Birth, Intrauterine Infection, and Fetal Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5:574. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00574.
 27. Min A.M., Saito M., Simpson J.A., Kennedy S.H., Nosten F.H., McGready R. Placental histopathology in preterm birth with confirmed maternal infection: A systematic literature review. *PLoS ONE*. 2021; 16(8):1-21. DOI: 10.1371/journal.pone.0255902.
 28. Green E.S., Arck P.C. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. *Semin Immunopathol.* 2020; 42:413-29. DOI:10.1007/s00281-020-00807-y.
 29. Menon R., Richardson L.S. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol*. 2017, 41(7):409-19. DOI: 10.1053/j.semperi.2017.07.012.
 30. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. Oxford: University press; 2015.
 31. Umbrello M., Dyson A., Feelisch M., Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013; 19(14):1690-710. DOI: 10.1089/ars.2012.4979.
 32. Fago A., Jensen F.B. Hypoxia tolerance, nitric oxide, and nitrite: lessons from extreme animals. *Physiology (Bethesda)*. 2015; 30(2):116-26. DOI: 10.1152/physiol.00051.2014.