

АНАЛИЗ Т- И В-КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

**Батурина И.Л., Логинова Ю.В., Емельянов И.В., Никушкина К.В.,
Зотова М.А., Никонова Т.И.**

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Невынашивание беременности по определению ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения) — это наличие в анамнезе у женщины 2 и более беременностей, закончившихся спонтанным выкидышем на сроках от зачатия до 22 недель беременности. Привычное невынашивание беременности (ПНБ) является одной из актуальных проблем бесплодных браков и составляет от 5 до 20% в структуре невынашивания беременности. 80% от всех идиопатических случаев ПНБ связано с иммунологическими нарушениями. В настоящее время, многие исследователи уделяют большое внимание изучению влияния Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки в формировании иммунологического ответа на аллогенный трансплантат и формирование иммунологической толерантности. Однако интерес представляет тот факт, что гормон беременности ХГ (хорионический гонадотропин) обладает выраженным иммуносупрессивным действием, за счет регуляции функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов. Доказано, что ХГ способствует повышению Treg на периферии и привлечению этих клеток в зону имплантации эмбриона, формируя, таким образом, иммунологическую толерантность во время беременности. Однако нет данных о влиянии ХГ на Т и В-клетки разного уровня дифференцировки при ПНБ. Проведен корреляционный анализ между Т- и В-клетками разного уровня дифференцировки и уровнем ХГ у женщин с ПНБ. Установлена зависимость низкого уровня ХГ со снижением наивных Т- и В-клеток при одномоментном повышении эффекторных клеток памяти CD8⁺ (Тem), что может являться плохим прогностическим признаком особенно на ранних сроках беременности.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, В-клетки, невынашивание беременности, проточная цитометрия

Адрес для переписки:

Батурина Ирина Леонидовна
Научно-исследовательский институт иммунологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64а.
Тел.: 8 (904) 977-36-01.
E-mail: irisha_baturina@mail.ru

Address for correspondence:

Baturina Irina L.
Research Institute of Immunology, South Ural Medical State
University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64a.
Phone: 7 (904) 977-36-01.
E-mail: irisha_baturina@mail.ru

Образец цитирования:

И.Л. Батурина, Ю.В. Логинова, И.В. Емельянов, К.В. Никушкина, М.А. Зотова, Т.И. Никонова «Анализ Т- и В-клеток различного уровня дифференцировки и их прогностическая роль при невынашивании беременности» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 181-186.
doi: 10.46235/1028-7221-395-ETA
© Батурина И.Л. и соавт., 2020

For citation:

I.L. Baturina, Yu.V. Loginova, K.V. Nikushkina, I.V. Emelyanov, M.A. Zotova, T.I. Nikonova "Evaluating T and B cell lineage differentiation stage and related prognostic impact in miscarriage", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 181-186.
doi: 10.46235/1028-7221-395-ETA
DOI: 10.46235/1028-7221-395-ETA

EVALUATING T AND B CELL LINEAGE DIFFERENTIATION STAGE AND RELATED PROGNOSTIC IMPACT IN MISCARRIAGE

Baturina I.L., Loginova Yu.V., Nikushkina K.V., Emelyanov I.V., Zotova M.A., Nikonova T.I.

South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The WHO (World Health Organization) defines miscarriage as two or more pregnancies documented in woman medical history ended up with spontaneous miscarriage at stage of up to 22 weeks of pregnancy from conception. Habitual miscarriage of pregnancy (HMP) is one of high priority problems for infertile marriages comprising 5-20% among other causes of miscarriage. As many as 80% of all idiopathic HMP cases are associated with immune-related disorders. Currently, many researchers have been paying more attention to examining effects of T and B cells at varying differentiation stage in developing immune response against allogenic graft and formation immunological tolerance. However, it is worth noting that pregnancy-associated human hormone chorionic gonadotropin (HCG) exhibits a marked immunosuppressive effect by regulating regulatory T (Treg) cell functional activity. It has been proven that HCG contributes to increasing Tregs level in periphery and recruiting them to the embryo implantation zone, thus establishing immunological tolerance during pregnancy. However, no data regarding HCG effects on T and B cells at various differentiation stage were obtained during HMP. A correlation analysis between frequency of T and B cells at various differentiation stage and level of serum HCG in women with HMP was performed. It was found that low level HCG was associated with decreased naive T and B cell frequency paralleled with elevated percentage of effector memory CD8⁺ (Tem) that may serve as a poor prognostic sign especially in early stage of pregnancy.

Keywords: chorionic gonadotropin, T cells, B cells, miscarriage, flow cytometry

Введение

Невынашивание беременности по ВОЗ – это наличие в анамнезе у женщины 2 и более беременностей, закончившихся спонтанным выкидышем на сроках от зачатия до 22 недель беременности. В настоящее время принята классификация привычного выкидыша (ПВ) в зависимости от срока прерывания беременности: до 12 недель – ранние ПВ; 12-22 недели – поздние ПВ; с 28 недели – преждевременные роды [1].

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – это полиэтиологическая патология. При спорадическом выкидыше действие повреждающих факторов имеет проходящий характер и не наносит вреда репродуктивному здоровью женщины [1, 2]. К таким, например, можно отнести агрессивную антибиотикотерапию, которая может привести к нарушению формирования гамет и формированию генетически неполноценного нежизнеспособного плода, и как следствие к прерыванию беременности. Однако, в 1-5% женщин, у которых первая беременность закончилась спонтанным прерыванием, находят эндогенные причины, препятствующие нормальному развитию эмбриона. Это впоследствии приводит к повторным прерываниям беременности и фор-

мированию симптомокомплекса привычного выкидыша (ПВ). Установлено, что привычный выкидыш составляет от 5 до 20% в общей структуре ПНБ. Риск развития последующего выкидыша после первого составляет 13-17%, после 2 предшествующих прерываний – 36-38%, а вероятность 3-го – возрастает до 45%. Учитывая это, многие специалисты по ПНБ, относят семейные пары, имеющие в анамнезе 2 последовательных выкидыша к категории ПВ с последующим обязательным обследованием в перинатальных центрах.

Среди всех установленных причин ПНБ выделяют также идиопатические, когда генез заболевания остается не уточненным. Установлено, что в 80% случаев идиопатического ПНБ причиной являются нераспознанные иммунологические нарушения.

Большинство исследований последних лет направлено на изучение влияния Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки в формировании иммунологического ответа на аллогенный трансплантат и формирование иммунологической толерантности. С наступлением беременности и имплантации, для сохранения эмбриона, в организме женщины начинается перестройка нейроиммунноэндокринной регуляции, в пер-

вую очередь влияющая на функциональную активность факторов врожденного иммунитета (нейтрофилов, макрофагов, их цитокиновой регуляции, хемокинов, NK-клеток), а во вторую – факторов специфического иммунитета (Т- и В-лимфоцитов различного уровня дифференцировки и антител), обеспечивая так называемую – иммунологическую толерантность [3, 4, 5]. Примечательно, что в ранний гравидарный период эндометрий активно инфильтрируют В-клетки, которые вырабатывают АPLA-антитела против отцовских HLA-антигенов, именно эти антитела защищают плод от материнских NK-клеток, способствующих отторжению плода [3]. Установлено, что гормон беременности ХГ (хорионический гонадотропин) обладает выраженным иммуносупрессивным действием, за счет регуляции функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов. Доказано, что ХГ способствует повышению Treg на периферии и привлечению этих клеток в зону имплантации эмбриона, формируя, таким образом, иммунологическую толерантность во время беременности [6]. Однако нет данных о влиянии ХГ на Т- и В-клетки разного уровня дифференцировки при ПНБ.

В исследованиях, проведенных ранее в Челябинском НИИ иммунологии было установлено, что при ПНБ происходит увеличение количества активированных наивных В-клеток и уменьшение первичных наивных В-клеток, при одновременном повышении наивных Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺) и эффекторных клеток памяти CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов (ТЕМ) [4, 5]. С одной стороны, это может свидетельствовать об активном участии активированных наивных В-клеток в выработке АТ против плода, а с другой стороны, повышение ТЕМ CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов, которые мигрируют в место имплантации эмбриона, могут способствовать его гибели за счет прямого цитолитического действия этих клеток. Однако какова взаимосвязь данных показателей и их влияние на прогноз течения имплантационного процесса до сих пор до конца не изучено.

Цель – установление взаимосвязи уровня хорионического гонадотропина (ХГ) и Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки периферической крови у пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

Материалы и методы

В иммунологической лаборатории Медицинского университета г. Челябинска в 2015–2019 гг. было проведено исследование 50 образцов венозной крови у женщин в возрасте от 20 до 36 лет. Все пациентки были разделены на две группы: А – контроль (условно здоровые женщины, n = 20);

В – женщины с верифицированным диагнозом ПНБ, (n = 30). Исследование субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Navios™ производства Beckman Coulter (BC), США. Окраску образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя, указанными в инструкции к реактивам.

Для анализа дифференцировки В-лимфоцитов по основным субпопуляциям использовали АТ CD-38 – PE; Anti-Human IgD-FITC (Beckman Coulter, США) выделяли «первичные наивные клетки» с фенотипом IgD⁺CD38⁻ (Vm1) и «активированные наивные клетки» с фенотипом IgD⁺CD38⁺ (Vm2), центробласты и центроциты – IgD⁻CD38⁺ (Vm3+Vm4), ранние покоящиеся В-клетки памяти – IgD⁻CD38⁻ (Vm5). Дифференцировку Т-клеток изучали согласно установленной классификации, все лимфоциты были разделены на 4 субпопуляции: 1- наивные Т-клетки (Tn); 2 – центральные клетки памяти (Tcm), 3 – эффекторные клетки памяти (Tem); 4 – периферические клетки памяти (Temra) в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови женщин [7].

Для проведения корреляционного анализа из группы женщин с ПНБ были выбраны 10 пациенток, у которых ретроспективно был известен уровень ХГ. Анализ проводился в одной лаборатории, методом ИФА, с использованием тест-системы АЛКОР БИО, производства Санкт-Петербург, Россия. Срок прерывания беременности у всех выбранных пациенток был на 4–5 неделе.

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью программы Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение

Анализ дифференцировки В-клеток показал, что достоверные отличия субпопуляций В-лимфоцитов отмечались только по Vm1- и Vm2-клеткам по сравнению с группой А (контроль). В группе – В (с ПНБ) наблюдалось увеличение количества активированных наивных В-лф (Vm2) и уменьшение первичных наивных В-лф Vm1 по сравнению с группой А (контроль) (табл. 1).

Установлено, что красный костный мозг подают клетки с фенотипом IgD⁺CD38⁻ (Vm1) – “virgin naive” В-лимфоциты, а после активации антигеном инициируется антигензависимая стадия развития В-клеток, которая проходит в В-зависимых зонах периферических лимфатических узлов и такие клетки называются активированные наивные клетки с фенотипом IgD⁺CD38⁺ (Vm2). Возможно, что повышенное количество Vm2-клеток способствует отторжению аллоген-

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, $M \pm m$

TABLE 1. SUBPOPULATION COMPOSITION OF T AND B LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH HABITUAL MISCARRIAGE, $M \pm m$

Показатели Indicators	Группы Groups	
	Контроль (А) Control (A)	Пациентки с невынашиванием беременности (В) Patients with miscarriage (B)
IgD⁺CD38⁻, × 10⁹/л (Вm1) IgD ⁺ CD38 ⁻ , × 10 ⁹ /л (Bm1)	291,4±30,5	151,0±19,9 $p_{A-B} = 0,03^*$
IgD⁺CD38⁺, × 10⁹/л (Вm2) IgD ⁺ CD38 ⁺ , × 10 ⁹ /л (Bm2)	869,8±20,5	974,4±31,4 $p_{A-B} = 0,03^*$
CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺, × 10⁹/л (Тn) CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ , × 10 ⁹ /л (Tn)	917,0±27,5	947,6±26,0 $p_{A-B} = 0,03^*$
CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ × 10⁹/л (Тn) CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ × 10 ⁹ /л (Tn)	821,8±24,8	898,1±36,8 $p_{A-B} = 0,05^*$
CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻ × 10⁹/л (Тem) CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ × 10 ⁹ /л (Tem)	398,1±34,2	508,1±24,2 $p_{A-B} = 0,0012^*$

Примечание. В таблице приведены только те показатели, которые достоверно изменились. $p \leq 0,05$ – достоверные различия; p_{A-B} – различия между исследуемыми показателями подгруппы В от подгруппы А.

Note. The Table shows only those indicators that have significantly changed. $p \leq 0.05$, significant differences; p_{A-B} , differences between the studied indicators of subgroup B from subgroup A.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ХГ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ НА СРОКЕ ПРЕРЫВАНИЯ 4-5 НЕДЕЛЬ, $M \pm m$ (n = 10)

TABLE 2. HG LEVEL IN WOMEN WITH HABITUAL MISCARRIAGE ON TERMINATION OF 4-5 WEEKS, $M \pm m$ (n = 10)

Показатель Indicator	Нормы указанные в тест-системе для 4-5 недель беременности (МЕ/л) Norms indicated in the test system for 4-5 weeks of pregnancy (ME/l)	Пациентки с ПНБ (МЕ/л) Patient with habitual miscarriage (ME/l)
Хорионический гонадотропин (ХГ) Chorionic gonadotropin (HG)	10 000-30 000	8500±600

ного трансплонтата путем образования специфических АТ.

Изучение дифференцировки Т-клеток показало повышение наивных CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (Тn) при одновременном повышении эффекторных CD8⁺ лимфоцитов (Тem) по сравнению с группой контроля.

Учитывая вышеизложенное, мы решили провести корреляционный анализ взаимосвязей достоверно измененных показателей. Была установлена обратная зависимость между повышением активированных наивных В-клеток

(Вm2) ($r = -0,79$ при $p = 0,03$) и снижением наивных В-клеток (Вm1) А также прямая корреляционная связь между повышением наивных CD8⁺ лимфоцитов (Тn) при одновременном повышении эффекторных CD8⁺ лимфоцитов (Тem) ($r = 0,82$ при $p = 0,0012$).

Далее мы провели анализ взаимосвязей между низким уровнем ХГ (табл. 2) и установленными ранее показателями.

Была установлена прямая отрицательная взаимосвязь между низким уровнем ХГ и снижением наивных В-клеток (Вm1) ($r = 0,69$) и выраженная

обратная зависимость между уровнем ХГ и эффекторными CD8⁺ лимфоцитов (Tem) ($r = 0,95$).

Выводы

Учитывая вышеизложенное, мы предположили, что ХГ взаимосвязан с механизмами, формирующими иммунологическую толерантность матери к аллогенному эмбриону не только за счет привлечения Т-регуляторных клеток, которые угнетают иммунологическую реактивность, но и за счет Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки. Доказано, что во время течения нормальной беременности наблюдается увеличение

пула наивных клеток в популяции Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов на фоне снижения эффекторных (Tem) и периферических клеток памяти (Temra) [1, 2]. Однако при ПНБ происходит снижение наивных Т- и В-клеток при одновременном повышении эффекторных клеток памяти (Tem), что в совокупности с низким уровнем ХГ может быть плохим прогностическим фактором для течения беременности. Полученные данные требуют дальнейшего изучения для более глубокого понимания иммунорегуляторных механизмов ПНБ и разработки прогностических критериев течения беременности, особенно на ранних сроках.

Список литературы / References

1. Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Раев М.Б. Роль хорионического гонадотропина и его пептидных фрагментов в регуляции экспрессии IDO моноцитами человека // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 306-310. [Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khrantsov P.V., Raev M.B. The role of chorionic gonadotropin and its peptide fragments in the regulation of IDO expression by human monocytes. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 306-310. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расшир. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2nd edition. Ekaterinburg: URO RAS, 2014. 576 p.]
3. Кудряшова А.В. Дифференцировка CD8⁺ клеток памяти при беременности // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 1. С. 79-82. [Kudryashova A.V. Differentiation of CD8⁺ memory cells during pregnancy. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 1, pp. 79-82. (In Russ.)]
4. Лупояд В.С., Бородай И.С., Аралов О.Н., Щербина И.Н. Привычное невынашивание беременности: современный взгляд на старую проблему // Международный медицинский журнал, 2011. № 4. С. 54-60. [Lupoyad V.S., Boroday I.S., Aralov O.N., Shcherbina I.N. Habitual miscarriage: a modern look at the old problem. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal = International Medical Journal*, 2011, Vol. 4, pp. 54-60. (In Russ.)]
5. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4⁺T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, pp. 1189-1199.
6. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Ann. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
7. van der Zee M., Dik W.A., Kap Y.S., Dillon M.J. Synthetic human chorionic gonadotropin-related oligopeptides impair early innate immune responses to *Lysteria monocytogenesis* in mice. *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 201, no. 7, pp. 1072-1080.

Авторы:

Батурина И.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Логина Ю.В. — младший научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никושкина К.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Baturina I.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Loginova Yu.V., Junior Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Емельянов И.В. — старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Зотова М.А. — научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никонова Т.И. — старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Emelyanov I.V., Senior Laboratory Assistant, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Zotova M.A., Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikonova T.I., Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 03.07.2020
Принята к печати 12.07.2020

Received 03.07.2020
Accepted 12.07.2020