

Т.В. Радиш, В.П. Чернишов

Імунопатофізіологічні особливості перебігу ранньої вагітності у жінок зі звичним невиношуванням

Лимфоцитарные субпопуляции, экспрессия активационных маркеров и активность индуцированных конкавалином (Кона) лимфоцитов была изучена у 58 женщин с привычным невынашиванием (ПН) беременности невыясненного генеза и 22 женщины с неосложненным акушерско-гинекологическим анамнезом (контроль) в 4–7 нед беременности. У беременных с ПН по сравнению с контролем было найдено повышение количества CD16/56⁺-клеток и CD4⁺/CD8⁺ соотношения, а также снижение процента CD19⁺-лимфоцитов. Экспрессия HLA-DR была повышенной на CD3⁺- и CD8⁺-лимфоцитах, а экспрессия CD25 – сниженной на CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16/56⁺-клетках у беременных с ПНБ. По результатам корреляционного анализа, низкая экспрессия CD25 была связана с низкой экспрессией CD8 на натуральных киллерах (НК), высокой экспрессией CD45RA на CD4⁺-хелперах и высокой экспрессией HLA-DR на CD8⁺-цитотоксических клетках. Повышенная частота выявления Кона-индуцированной активации и сниженная Кона-индуцированной супрессии, а также снижение супрессорной активности Кона-индуцированных лимфоцитов обнаруживалась у беременных с ПН. Можно сделать вывод, что у женщин с ПН в ранние сроки беременности наблюдается нарушения в плодово-материнском распознавании, что приводит к формированию неадекватного иммунного ответа на плод, который реализуется дефектом в активации НК, недостаточностью лимитирования Т-цитотоксических клеток и генерации хелперных клеток памяти, снижением количества Т-регуляторных клеток и супрессорной активности.

ВСТУП

Відомо, що дефект материнської імунної відповіді на напівсумісний алогенний трансплантат плоду може бути одним з імовірних механізмів звичного невиношування (ЗН) вагітності [6, 7, 12]. У великій кількості пацієнтів чинники втрати вагітності залишаються нез'ясованими і, за сучасними даними, не менше ніж 80 % цих випадків мають імунологічні причини [9, 17, 32]. Зважаючи на дані вивчення імуноепідеміологічних аспектів звичної втрати вагітності, вони можуть бути класифіковані як нестача, неадекватність або дефект плодово-материнського імунного розпізнавання [12, 17], яке вважається більш генералізованим феноменом, ніж локальний захист усередині матки. Тому вивчення

системних ознак втрати вагітності, що виникає через імунні фактори, є одним з актуальних завдань імунології репродукції.

Дослідження фенотипу і функції лімфоцитів периферичної крові – один з суттєвих моментів, що дозволяють оцінити системну відповідь на плід при фізіологічній вагітності і ЗН. У крові жінок зі звичним викиднем знаходили високу частоту виявлення прекурсорів алоспецифічних цитотоксичних Т-лімфоцитів [13] і спостерігали олігоклональну акумуляцію Т-клітин [20], що на думку авторів, свідчить про участь Т-лімфоцитарних клонотипів у патогенезі звичного викидня і підтверджує важливу роль Т-лімфоцитів у цьому процесі. Частина дослідників вважає, що викидень найчастіше є асоційованим з підвищенням у

© Т.В. Радиш, В.П. Чернишов

циркуляції кількості природних кілерів (ПК) та їхньої активності [8, 10]. Так, було показано, що як невагітні, так і вагітні жінки зі звичними викиднями порівняно зі здоровими жінками мали підвищений рівень ПК у периферичній крові [5, 14, 29], а їх висока активність корелювала з наступним викиднем [4, 24, 33]. Водночас у літературі містяться дані, що свідчать про відсутність суттєвих змін кількості та активності ПК при невиношуванні нез'ясованого генезу [2, 3]. Вивчення циркулюючих у крові лімфоцитів показало, що немає одностайної точки зору серед дослідників на зміни, котрі відбуваються у субпопуляційному складі лімфоцитів при ЗН вагітності. Так, у вагітних жінок із ЗН у порівнянні зі здоровими вагітними різні дослідники знаходили підвищену кількість В-лімфоцитів [5, 14] і знижену – Т-лімфоцитів [14], підвищену кількість Т-клітин, Т-супресорів/цитотоксиків і Т-активованих (HLA-DR позитивних) лімфоцитів [3], підвищене співвідношення CD4⁺/CD8⁺ [19, 25], відсутність будь-яких змін [2]. Такі результати свідчать про доцільність подальшого вивчення імунологічних ознак ЗН вагітності, що спостерігаються на системному рівні.

Мета нашого дослідження – вивчення стану лімфоцитарних субпопуляцій, експресії маркерів активації на лімфоцитах та індукованої конканаваліном А (Кона) функції в периферичній крові вагітних жінок із ЗН нез'ясованого генезу.

МЕТОДИКА

Проведено імунологічне обстеження 58 вагітних жінок з ЗН нез'ясованого генезу в терміни 4–6 тиж вагітності; 54 з яких було обстежено також у динаміці вагітності (через 1 тиж) у термінах 5–7 тиж 22. Результати обстеження вагітних жінок з фізіологічним перебігом вагітності і необтяженим акушерсько-гінекологічним анамнезом (4–7 тиж) були контрольними. Матеріалом дослідження була периферична кров.

Визначення лімфоцитарних субпопуляцій, а саме CD3⁺ Т-лімфоцитів, CD19⁺ В-лімфоцитів, CD3⁺16/56⁺ ПК, CD3⁺4⁺ Т-хелперів, CD3⁺8⁺ Т-цитотоксиків, CD4⁺45RA⁺ наївних і CD4⁺45RA⁻ комітованих хелперних клітин проводили за методом двоколірної проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл відповідної специфічності на цитофлуориметрі FACScan з застосуванням програмного забезпечення Simulset Software (“Vecton Dickinson”, США). Дослідження експресії маркерів активації, а саме рецептора інтерлейкіна-2 CD25 і HLA-DR, проводили аналогічним методом. Визначення HLA-DR здійснювали на нативних клітинах крові, CD25 – після нічної стимуляції клітин субоптимальною дозою фітогемаглютиніну (ФГА, “Difco”, США), кінцева концентрація якого в інкубаційному середовищі була 1 мкл/мл.

Дослідження Кона-індукованої функції лімфоцитів проводили наступним чином: моноклеарні клітини крові виділяли загальноприйнятим методом центрифугування на градієнті щільності, після чого клітини інкубували з Кона (“Sigma”, США) у кінцевій концентрації 60 мкг/мл 48 год при 37°C. По закінченні інкубації клітини відмивали, обробляли мітоміцином С у кінцевій концентрації 40 мкг/мл, знову ретельно відмивали. Всі етапи проводили з дотриманням умов стерильності. Активність Кона-індукованих клітин визначали в змішаній культурі лімфоцитів: оброблені Кона (дослід) і необроблені (контроль) моноклеарні клітини дослідженої крові вносили в лунки 96-луночного планшета (“Nunc”, Данія) разом з лімфоцитами донора; для стимуляції донорських лімфоцитів додавали ФГА в кінцевій концентрації 2 мкл/мл; інкубували протягом 72 год при 37°C в атмосфері повітря з 5 % CO₂ за умов 100% і вологості. За 4 год до закінчення інкубації вносили в кожну лунку планшета 4 мл міченого ³H₁-тимідину з питомою активністю 185 ГБк/ммоль (В/О “Ізотоп”, Росія) з метою подальшого врахування ступеня

проліферацію донорських лімфоцитів за інтенсивністю включення тимідину; радіоактивність зразків вимірювали з використанням матеріалів, реагентів та обладнання фірми “Wallak Oy” (Фінляндія). КонА-індуковану супресію або активацію розраховували за формулою:

$$\% \text{ супресії (активації) } = \left(1 - \frac{\text{кількість імпульсів / хв у досліді}}{\text{кількість імпульсів / хв у контролі}}\right) \times 100 \%$$

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з урахуванням сучасних вимог до статистичної обробки медичної інформації в наукових, експериментальних і клінічних дослідженнях [1]. Результати представляли у вигляді середніх значень і стандартної похибки ($M \pm m$). Для оцінки вірогідності різниці показників між групами використовували непараметричні та параметричні методи статистичного аналізу з урахуванням критерію t Стьюдента, критерію U Манна-Уїтні (для оцінки різниці між групами), або критерію T Вілкоксона (для оцінки різниці в динаміці обстеження). Виявлення зв'язку між показниками оцінювали за результатами визначення коефіцієнта кореляції r_s Спірмана. Всі обчислені критерії вважали за статистично вірогідні при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У вагітних жінок із ЗН, як у 4–6, так і в 5–7 тиж спостерігалось зниження відсотка В-лімфоцитів і підвищення рівню ПК у крові порівняно з контрольною групою (табл. 1). При цьому кількість Т-лімфоцитів залишалася незмінною щодо контролю в обидва терміни вагітності. Протягом одного тижня не було динаміки кількості $CD3^+$, $CD19^+$ та $CD16/56^+$ у крові вагітних з ЗН. Рівень $CD3^+4^+$ (Т-хелперних) і $CD3^+8^+$ (Т-цитотоксичних) лімфоцитів у крові вагітних з ЗН також суттєво не відрізнявся від такого в крові жінок контрольної групи, причому відмінність змін спостерігалася в обидва досліджені терміни вагітності. Водночас співвідношення $CD4^+/CD8^+$ у крові вагітних з ЗН було значно вищим, ніж у контролі, як в 4–6, так і в 5–7 тиж вагітності, при цьому співвідношення $CD3^+4^+/CD3^+8^+$ залишалось незмінним щодо контролю (див. табл. 1). Зміни протягом одного тижня кількості Т-хелперних і Т-цитотоксичних лімфоцитів, а також співвідношення клітин були відсутні.

Підвищення співвідношення $CD4^+/CD8^+$ у крові вагітних із ЗН пояснюється тим фактом, що у них спостерігалось значне зниження кількості $CD3^+8^+$ -клітин порівняно з контролем в обидва досліджені терміни

Таблиця 1. Лімфоцитарні субпопуляції (%) в крові вагітних жінок зі звичним невиношуванням нез'ясованої етіології ($M \pm m$)

Показник	Здорові вагітні (контроль; n=22)	Вагітні зі звичним невиношуванням	
		4–6 тиж (n=58)	5–7 тиж (n=54)
$CD3^+$	71,91±0,83	70,86±0,64	71,11±0,62
$CD19^+$	12,34±0,64	10,37±0,41*	9,94±0,26*
$CD16/56^+$	11,25±0,62	16,71±0,73*	17,09±0,72*
$CD3^+4^+$	41,64±1,09	41,24±0,67	41,62±0,71
$CD3^+8^+$	26,91±0,93	27,05±0,66	26,67±0,57
$CD4^+/CD8^+$	1,30±0,08	1,44±0,04*	1,48±0,05*
$CD3^+4^+/CD3^+8^+$	1,62±0,11	1,59±0,06	1,61±0,05
$CD3^+8^+$	8,00±0,60	4,31±0,33*	3,85±0,29*
$CD4^+45RA^+$	12,96±1,20	16,52±0,78*	15,43±0,91*
$CD4^+45RA^-$	30,82±0,85	25,98±0,85*	26,28±0,91*

Примітка. Тут і в табл. 2, 3 * вірогідність різниці порівняно з показником у контрольній групі ($P < 0,05$); ** порівняно з показником у термін вагітності 4–6 тиж ($P < 0,05$)

вагітності (див. табл. 1). Наявність такого зв'язку між співвідношенням CD4⁺/CD8⁺ і рівнем CD3⁺8⁺-лімфоцитів підтверджується наявністю вірогідної зворотної кореляції, яка становила: $r=-0,26$ ($P<0,05$) для вагітних із ЗН у 4–6 тиж; $r=-0,42$ ($P<0,01$) для вагітних з ЗН у 5–7 тиж; $r=-0,45$ ($P<0,01$) для контрольної групи. Окрім цитотоксичних лімфоцитів, іншою субпопуляцією, що несе CD8-маркер є ПК. Оскільки у вагітних із ЗН не спостерігалось зниження кількості CD3⁺8⁺-лімфоцитів, отримані результати можуть свідчити про зниження експресії CD8 ПК у вагітних з ЗН порівняно зі здоровими вагітними (контролем). Наявність кореляційного зв'язку між кількістю CD3⁺8⁺- і CD16/56⁺-лімфоцитів у вагітних із ЗН в обидва терміни обстеження та у контрольній групі підтверджує таке припущення: $r=0,60$ ($P<0,01$) для вагітних із ЗН у 4–6 тиж; $r=0,52$ ($P<0,01$) – у 5–7 тиж; $r=0,74$ ($P<0,01$) для контрольної групи.

Дослідження кількості CD4⁺45RA⁺-клітин (наївних або некомітованих хелперних лімфоцитів) показало, що у вагітних із ЗН цей показник був значно підвищеним порівняно з контролем у 4–6 і 5–7 тиж (див. табл. 1). Відповідно, відсоток комітованих хелперів (клітин пам'яті) з фенотипом CD4⁺45RA⁻ було зниженим у крові вагітних із ЗН порівняно з контролем в обидва досліджені терміни. Істотних змін числа CD4⁺45RA⁺- і CD4⁺45RA⁻-лімфоцитів протягом тижня у жінок із ЗН не спостерігалось (див. табл. 1).

Експресія маркера пізньої та/або тривалої активації HLA-DR на CD3⁺- і CD8⁺-лімфоцитах була значно підвищеною у жінок із ЗН в обидва терміни вагітності порівняно з контролем, водночас число CD4⁺DR⁺-лімфоцитів суттєво не відрізнялося від контролю (табл. 2). Вивчення експресії маркера ранньої активації лімфоцитів CD25 на клітинах різних субпопуляцій лімфоцитів показало наявність суттєвої нестачі щодо контролю кількості клітин з фенотипом CD3⁺25⁺, CD4⁺25⁺ у крові вагітних із ЗН. Така нестача спостерігалася в 4–6 тиж вагітності тільки для CD3⁺25⁺, а в 5–7 тиж – для обох субпопуляцій клітин. Водночас, кількість CD3⁺25⁺- і CD4⁺25⁺-клітин знижувалася в динаміці дослідження і в 5–7 тиж була вірогідно нижчою, ніж у 4–6 тиж вагітності. Подібна картина спостерігалася і при аналізі числа CD8⁺25⁺- і CD16/56⁺25⁺-лімфоцитів, причому кількість CD8⁺25⁺ продовжувала зменшуватися в динаміці дослідження протягом тижня.

Визначення кореляцій між кількістю клітин різного фенотипу показало, що при фізіологічному перебігу вагітності (в контрольній групі) існує безпосередній зв'язок між експресією маркерів активації HLA-DR і CD25 на CD8⁺-лімфоцитах, на що вказує наявність прямої кореляції між кількістю CD8⁺DR⁺ та CD8⁺25⁺-клітин ($r=0,94$; $P<0,01$), а також зв'язок між числом CD25 позитивних CD4⁺-клітин і кількістю наївних хелперів, що експресують CD45RA ($r=0,69$; $P<0,01$). У групі

Таблиця 2. Експресія маркерів активації на лімфоцитарних субпопуляціях (%) в крові вагітних жінок зі звичним не виношуванням нез'ясованої етіології (M±m)

Показник	Здорові вагітні (контроль; n=22)	Вагітні зі звичним невиношуванням	
		4–6 тиж (n=58)	5–7 тиж (n=54)
CD3 ⁺ DR ⁺	7,42±0,57	10,53±0,73*	13,41±0,70*
CD4 ⁺ DR ⁺	3,93±0,41	4,65±0,27	4,72±0,24
CD8 ⁺ DR ⁺	5,88±0,39	6,81±0,32*	7,23±0,31*
CD3 ⁺ 25 ⁺	22,32±0,92	19,27±0,82*	16,78±0,63***
CD4 ⁺ 25 ⁺	14,09±0,83	12,77±0,61	10,87±0,44***
CD8 ⁺ 25 ⁺	8,36±0,72	5,32±0,30*	4,41±0,31***
CD16/56 ⁺ 25 ⁺	1,36±0,17	0,81±0,09*	0,80±0,10*

вагітних із ЗН такі кореляції були знайдені лише в терміні 4–6 тиж (відповідно $r=0,34$; $P<0,01$ та $r=0,43$; $P<0,01$), в той час як у 5–7 тиж вагітності вони були відсутні, що свідчить про порушення процесу фізіологічної активації субпопуляцій $CD4^+$ - та $CD8^+$ -лімфоцитів, яке розвивається в динаміці ранньої вагітності у жінок із ЗН. Крім того, у жінок контрольної групи виявлено прямі кореляції між рівнем $CD16/56^{+25^+}$ і $CD8^{+25^+}$ -клітин ($r=0,44$; $P<0,01$), а також $CD16/56^{+25^+}$ і $CD3-8^+$ -клітин ($r=0,58$; $P<0,01$), що може говорити про зв'язок експресії $CD25$ з експресією $CD8$ на $CD16/56^+$ -клітинах. У крові вагітних із ЗН, як вказувалося вище, спостерігалось зниження експресії $CD8$ і $CD25$ на $CD16/56^+$ -лімфоцитах, що відображалось у відсутності кореляцій між $CD16/56^{+25^+}$ і $CD8^{+25^+}$ та $CD16/56^{+25^+}$ і $CD3-8^+$ в обидва терміни обстеження.

У 4–6 тиж вагітності у половини обстежених вагітних із ЗН Кона-індуковані лімфоцити виявляли аномальний активаційний ефект (табл. 3). Частота виявлення Кона-індукованої активації суттєво не змінювалася протягом наступного тижня, в обидва терміни обстеження значно перевищуючи контрольні значення. Відповідно, кількість жінок із ЗН, лімфоцити яких у відповідь на індукцію Кона виявляли супресивний ефект, була зниженою в 4–6 тиж порівняно з такою в контрольній групі, і залишалася зниженою у 5–7 тиж вагітності. При цьому в обидва терміни активаційний ефект у жінок із ЗН був значно вищим, ніж у контролі, а супресивний ефект – значно нижчим, однак динаміки цих показників протягом одного тижня не відзначалося.

Зіставляючи отримані нами результати з даними літератури, слід позначити, що підвищення кількості ПК і співвідношення $CD4^+/CD8^+$ є найбільш характерними імунологічними ознаками звичної втрати вагітності, що рееструються у периферичній крові, оскільки саме ці зміни знаходили найчастіше різні дослідницькі групи у різні роки [5,8,10,14,19,25,29]. Відсутність змін кількості ПК в інших дослідженнях можливо пояснити тим фактом, що ПК експресують на своїй поверхні $CD16$ та/або $CD56$ маркери і, зважаючи на особливості експресії та важливості обох маркерів, ПК мають визначатися як $CD3-CD16/56^+$ -лімфоцити [26]. Водночас визначення ПК при ЗН вагітності лише за одним з маркерів ($CD16$ або $CD56$) може призвести до помилкових результатів [14]. Відсутність змін у співвідношенні $CD4^+/CD8^+$ у низці робіт можливо пояснити тим, що в більшості досліджень цей показник співвідношення розраховується як відношення кількості $CD3^+4^+$ - до $CD3^+8^+$ -клітин, водночас наші результати та дані інших авторів [2] свідчать, що співвідношення $CD3^+4^+/CD3^+8^+$ не має суттєвих змін при ЗН вагітності, а підвищення $CD4^+/CD8^+$ підтверджене при обстеженні великої кількості (294) жінок із ЗН вагітності в іншому дослідженні [25], відбувається через нестачу $CD3-8^+$ -клітин. Досі остаточно невідома функціональна роль експресії $CD8$ природними кілерами, можливо, що цей маркер експресують активовані ПК [22]. З цієї точки зору, зниження експресії $CD8$ і $CD25$ і порушення зв'язку між експресією цих маркерів на ПК, знайдене в нашому дослідженні,

Таблиця 3. Кона-індукована функція лімфоцитів крові вагітних жінок зі звичним невиношуванням нез'ясованої етіології ($M \pm m$)

Показник	Здорові вагітні (контроль; n=22)	Вагітні зі звичним невиношуванням	
		4–6 тиж (n=58)	5–7 тиж (n=54)
Частота виявлення активації		5 %	50 %* 50 %*
Активация	8,00 %	60,94 % \pm 3,51 %*	56,72 % \pm 3,22 %*
Частота виявлення супресії	95 %	53 %*	47 %*
Супресія	57,75 % \pm 2,91 %	41,59 % \pm 4,33 %*	42,88 % \pm 3,24 %*

свідчить про суттєву нестачу активації ПК при звичній втраті вагітності. Дослідженнями останніх років продемонстровано, що система вродженого імунітету, зокрема комплемент, макрофаги, γ/δ -Т-клітини та ПК, беруть важливу участь у модуляції імунної відповіді матері на плід при вагітності, а порушення такої модуляції може бути одним з факторів розвитку переривання вагітності [21, 23], про що свідчать також отримані в нашій роботі результати вивчення фенотипу ПК при ЗН вагітності.

Нажаль, у науковій літературі є лише поодинокі повідомлення про стан активації лімфоцитів при втраті вагітності нез'ясованого генезу: було показано підвищення експресії HLA-DR на CD3⁺- та CD8⁺-клітинах [2, 3, 32]. За нашими результатами в крові вагітних із ЗН відбувається накопичення CD8⁺-лімфоцитів, що несуть маркер пізньої, довготривалої активації HLA-DR, при нестачі експресії на них CD25, що може свідчити про несвоєчасність елімінації Т-цитотоксичних лімфоцитів, які в змозі розвивати пошкоджувальні ефекторні реакції на плід і плаценту. Вважається, що обмеження тривалості та висоти імунної відповіді, індукованої хронічними антигенами (на разі антигенами плодового походження) досягається через підвищення експресії Fas, яке відбувається слідом за антигенною активацією і "запускає" Fas-опосередкований апоптоз [11, 15] – один з механізмів підтримки лімфоцитарного гомеостазу [15, 28]. З цієї точки зору, наша знахідка про порушення експресії CD25 і HLA-DR на CD8⁺-лімфоцитах може свідчити про неадекватність розпізнавання плодових антигенів при ЗН вагітності, внаслідок чого формується дефект в активації Т-цитотоксичних лімфоцитів, нестача експресії Fas на них і, відповідно, порушення механізмів обмеження ефекторних реакцій на плід.

Останнім часом увага дослідників значною мірою прикута до вивчення CD4⁺25⁺-лімфоцитів, оскільки показано, що саме

клітини з цим фенотипом є так званими "професійними" супресорами, або Т-регуляторними (T_R) клітинами, які мають тимічне походження, але за певних умов генеруються при антигенній стимуляції, характеризуються анергічністю, однак при активації здатні супресувати проліферацію і продукцію інтерлейкіна-2 наївними CD4⁺-лімфоцитами і CD4⁺-клітинами пам'яті через контактзалежні, цитокіннезалежні механізми [27]. Було показано, що при фізіологічній вагітності відбувається підвищення кількості CD4⁺25⁺-T_R-клітин, що вважається підтвердженням їх ролі в супресії материнської відповіді на плід [18]. Наші результати про динамічне зменшення числа CD4⁺25⁺-клітин, яке супроводжувалося зниженням CD4⁺45RA⁻ на фоні підвищення CD4⁺45RA⁺-лімфоцитів, у жінок із ЗН вагітності свідчать про порушення імунорегуляторних механізмів при ЗН вагітності, що полягають у недостатній генерації T_R-лімфоцитів і хелперних клітин пам'яті.

Зниження супресорної активності при звичному невиношуванні та погрожуючому викидні була продемонстрована раніше і підтверджена в нашому теперішньому дослідженні. Висока частота виявлення аномального стимулювального ефекту КонА-індукованих клітин, зниження КонА-індукованої супресорної активності свідчать про наявність дефекту супресорної функції лімфоцитів при ЗН вагітності нез'ясованої етіології. Нині неможливо з певністю сказати, що порушення функції КонА-індукованих супресорів свідчить про функціональний дефект T_R-клітин, оскільки феномен КонА-індукованої супресії недостатньо вивчений, а умови індукції T_R-клітин *in vitro* доволі різняться [30, 31]. Враховуючи те, що T_R-клітини здатні виявляти свою супресорну дію під впливом стимуляторів Т-клітинного рецептора, до яких належить і КонА, а також на те, що супернатанти КонА-індукованих лімфоцитів не виявляють аналогічної клітинам дії, тобто для виявлення ефекту необхідний контакт клітин, з

певним сумнівом можна передбачити, що КонА-індукована активність лімфоцитів є відображенням функціональної активності T_R -клітин. Однак це питання потребує подальшого вивчення, перш за все, з боку спеціалістів з теоретичної імунології.

ВИСНОВКИ

Отримані нами результати дозволяють заключити, що перебіг ранньої вагітності (4–7 тиж) у жінок із ЗН нез'ясованого генезу характеризується наявністю низки імунологічних порушень: зниження в крові рівню В-лімфоцитів, підвищення кількості ПК, підвищення співвідношення $CD4^+/CD8^+$, зниження експресії $CD8$ і $CD25$ та порушення зв'язку між експресією цих маркерів ПК, зниження експресії $CD25$ і підвищенням HLA-DR Т-клітинами, підвищення кількості наївних хелперних лімфоцитів і порушення зв'язку між експресією хелперами $CD45RA$ і $CD25$, зниження експресії $CD25$ і підвищення HLA-DR, а також порушення зв'язку між експресією цих маркерів цитотоксичними лімфоцитами, значне підвищення частоти виявлення КонА-індукованої активації та активаційного ефекту КонА-індукованих лімфоцитів, значне зниження частоти виявлення КонА-індукованої супресії та супресивного ефекту КонА-індукованих лімфоцитів.

Аналіз отриманих результатів і зіставлення з даними, наведеними в літературі, дає змогу зробити висновок, що при звичній втраті вагітності нез'ясованого генезу відбувається неадекватне розпізнавання вагітності, внаслідок чого формується порушення фізіологічної активації вродженого імунітету, зокрема природних кілерів, дефект механізмів обмеження ефекторної клітинної відповіді на плід, зокрема нестача елімінації активованих Т-цитотоксичних лімфоцитів, кількісний і якісний дефіцит клітин, що відповідають за здійснення супресорних механізмів, та недостатність генерації хелперних клітин пам'яті.

T.V. Radysh, V.P. Chernyshov

IMMUNOPATHOPHYSIOLOGIC FEATURES OF EARLY PREGNANCY IN WOMEN WITH A HISTORY OF UNEXPLAINABLE PREGNANCY LOSS

The lymphocyte subsets, activation marker expression and activity of ConA-treated lymphocytes have been studied in 58 patients with a history of unexplainable pregnancy loss (UPL) and 22 normal pregnant women (control) in 4-7 weeks of pregnancy. The increase of $CD16/56^+$ cell level and $CD4^+/CD8^+$ ratio and decrease of $CD19^+$ cell level have been found in peripheral blood of UPL patients in comparison with control. The expression of HLA-DR was upregulated on $CD3^+$ and $CD8^+$ cells and the expression of $CD25$ was downregulated on $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, and $CD16/56^+$ cells in UPL women. According to correlation analysis results, low expression of $CD25$ was related to a low expression of $CD8$ on NK, high expression of $CD45RA$ on $CD4^+$ helper cells, high expression of HLA-DR on $CD8^+$ cytotoxic cells. High frequency of ConA-induced activation, low frequency of ConA-induced suppression and low suppressive activity of ConA-induced lymphocyte were found in UPL patients compared to control. Conclusion: women with UPL have disorders in feto-maternal recognition in early pregnancy that led to a development of the inadequate immune response to fetus realized as a defect of NK activation, deficiency of T-cytotoxic cell limitation and memory helper cell generation, downregulation of T_R cells and suppressor function.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Осипов В.П., Лук'янова Е.М., Антипкин Ю.Г. и др. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. – К.: Планета людей, 2002. – 200 с.
- Рудакова Н.В. Порівняльна характеристика ефективності різних методів терапії невиношування вагітності нез'ясованої етіології: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2003. – 23 с.
- Стукалова О.М. Диференційований підхід до діагностики та комплексної терапії невиношування вагітності. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2002. – 21 с.
- Aoki K., Kajiura S., Matsumoto Y. et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage // *Lancet*. – 1995. – **345**, № 8961. – P.1340–1342.
- Beer A.E., Kwak J.Y., Ruiz J.E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 1996. – **35**, № 4. – P.376–382.
- Clark D.A., Coulam C.B., Daya S., Chaouat G. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analysis of immune mechanisms and treatment // *Hum. Reprod. Update*. – 2001. – **7**. – P. 501–511.

7. Coulam C.B. Understanding the immunobiology of pregnancy and applying it to treatment of recurrent pregnancy loss // *Early Pregnancy*. – 2000. – **4**. – P.19–29.
8. Coulam C.B., Goodman C., Roussev R.G. et al. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 1995. – **33**. – P.40–46.
9. Cramer D.W., Wise L.A. The epidemiology of recurrent pregnancy loss // *Semin. Reprod. Med.* – 2000. – **18**, № 4. – P.331–339.
10. Emmer P.M., Nelen W.L., Steegers E.A. et al. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56(pos)CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Hum. Reprod.* – 2000. – **15**, № 5. – P.1163–1169.
11. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege // *Science*. – 1995. – **270**. – P.1189–1192.
12. Hill J.A., Choi B.C. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure // *J. Reprod. Fertil. Suppl.* – 2000. – **55**. – P.91–97.
13. Kotlan B., Fulop V., Padanyi A. et al. High anti-paternal cytotoxic T-lymphocyte precursor frequencies in women with unexplained recurrent spontaneous abortions // *Hum. Reprod.* – 2001. – **16**, № 6. – P.1278–1285.
14. Kwak J.Y., Beaman K.D., Gilman-Sachs A. et al. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 1995. – **34**, № 2. – P.93–99.
15. Lenardo M., Chan F.K.M., Hornung F. Mature lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment // *Ann. Rev. Immunol.* – 1999. – **17**. – P.221–253.
16. Li D., Zhu Y., Wang M. Immuno-epidemiological investigation of recurrent spontaneous abortion // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 1998. – **78**, № 2. – P.94–97.
17. Lopez B.H.H., Vallejo B.J., Malvaez G.B. et al. Use of a diagnostic prospective algorithm for patients with recurrent Miscarriage // *Ginecol. Obstet. Mex.* – 1995. – **63**. – P.96–101.
18. Mahmoud F., Abul H., Omu A. et al. Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2001. – **52**, № 4. – P.232–236.
19. Makrydimas G., Plachouras N., Higuera M.T. et al. Maternal peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal and pathological pregnancies // *Fetal Diagn. Ther.* – 1994. – **9**, № 6. – P.371–378.
20. Masuko-Hongo K., Hayashi K., Yonamine K. et al. Disappearance of clonally expanded T cells after allogeneic leukocyte immunotherapy in peripheral blood of patients with habitual abortion // *Hum. Immunol.* – 2001. – **62**, № 10. – P.1111–1121.
21. Meeusen E.N., Bischof R.J., Lee C.S. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 2001. – **46**, № 2. – P.169–179.
22. Miller J.S., Oelkers S., Verfaillie C. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells // *Blood*. – 1992. – **80**. – P.2221–2227.
23. Mincheva-Nilsson L. Pregnancy and gamma/delta T cells: Taking on the hard questions // *Reprod. Biology and Endocrinology*. – 2003. – **1**. – P.120–131.
24. Morikawa M., Yamada H., Kato E.H. et al. NK cell activity and subsets in women with a history of spontaneous abortion. Cause, number of abortions, and subsequent pregnancy outcome // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2001. – **52**, № 3. – P.163–167.
25. Psarra K., Kapsimali V., Tarassi K. et al. TCRgamma-delta + T lymphocytes in unexplained recurrent spontaneous abortions // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 2001. – **45**, № 1. – P.6–11.
26. Seaman W.E. Natural killer cells and natural killer T cells // *Arthritis Rheum.* – 2000. – **43**. – P.1204–1217.
27. Shevach E.M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – № 2. – P.389–400.
28. Siegel R.M., Fleisher T.A. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1999. – **103**. – P.729–738.
29. Szpakowski A., Malinowski A., Zeman K. et al. The influence of paternal lymphocytes immunization on percentage of peripheral blood CD16+/CD56+ cells in women with primary recurrent spontaneous abortion // *Ginekol. Pol.* – 2001. – **72**, № 12. – P.1063–1068.
30. Taams L.S., Vukmanovic-Stejić M., Smith J. et al. Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – **32**. – P.1621–1630.
31. Verhasselt V., Vosters O., Beuneu C. et al. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – **34**. – P.762–772.
32. Wilczynski J., Sulowska Z., Malinowski A. et al. CD3-/HLA-DR+, CD3+/HLA-DR+ cell levels and PHA stimulation of lymphocytes obtained from women with recurrent spontaneous abortions and subjected to partner's lymphocyte immunization // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. – 1997. – **45**, № 4. – P.289–294.
33. Yamada H., Kato E.H., Kobashi G. et al. NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 2001. – **46**, № 2. – P.132–136.