

УДК 618.396

А. М. Курманова, Л. С. Дзоз

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
г. Алматы, Казахстан

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНИТЕТА И ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

АННОТАЦИЯ

Изучен субпопуляционный состав лимфоцитов и активационных маркеров эндометрия. Материалом для иммунологического исследования служили биоптаты маточного эндометрия в секреторной фазе, полученные при гистероскопии. Установлено, что у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе на локальном уровне в эндометрии достоверно ($P < 0,05$) сниженным оказалось содержание CD56+лимфоцитов. При этом выравниваются маркеры активации HLA-DR+ и CD95+. Уровни экспрессии достоверно выше, чем в контрольной группе и CD25+, а также выше сравнительно с показателями в 1-й группе. В качестве критерия для выбора вида иммунотерапии используют индекс CD95+/CD16+, при значениях которого менее 0,8 на фоне снижения CD3+, CD4+ назначают индукторы интерферона, при 0,9-1,29 – препараты интерферона, более 1,3 – препараты интерлейкина-2.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, интегральная оценка иммунитета.

Привычное невынашивание беременности, определяемое как две и более клинически обнаруженные потери беременности, случившихся до 20-й недельгестации, имеет место у 2-4 % супружеских пар [1]. Важная роль в патогенезе прерывания беременности отводится иммунным механизмам. Считается, что высокая цитотоксическая активность натуральных киллеров (NK) в области фетоплацентарного комплекса приводит к гибели цитотрофобласта. При спонтанных выкидышах происходит дефицит локальной децидуальной супрессорной активности, опосредуемой естественными супрессорными клетками, продуцирующими трансформирующий фактор роста b_2 (ТФР- b_2) [2]. В периферической крови содержание CD16+CD56+ повышено, а в эндометрии увеличен процент CD16+ и уменьшен процент CD56+, продуцирующих ТФР- b_2 [3]. В то же время в исследовании QuenbyS. (1999) было показано, что у пациенток, страдающих привычным невынашиванием беременности, уровни CD4+, CD14+, CD16+, CD56+ и HLA-DR+ клеток в эндометрии были значительно выше, чем в контроле [4].

Персистенция в эндометрии бактериальных и вирусных инфекций является пусковым механизмом для разнонаправленных иммуно-

патологических реакций и служит основой для формирования различных нарушений репродуктивной функции, в том числе привычного невынашивания беременности. Поэтому комплексная оценка системного и локального иммунитета требует дальнейших исследований в плане понимания механизмов отторжения плода и выработки стратегии лечения.

Цель исследования – изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и эндометрия у пациенток с привычным невынашиванием беременности в анамнезе.

Материал и методы. Обследованы 75 пациенток с привычным невынашиванием беременности в анамнезе в возрасте $28,3 \pm 5,0$ лет. В зависимости от уровня нарушения репродуктивной функции все женщины были разделены на 3 группы:

- 1 группа (98 чел.) – с ненарушенной репродуктивной функцией,
- 2 группа (42 чел.) – с невынашиванием беременности в анамнезе,
- 3 группа (24 чел.) – с бесплодием.

Контрольную группу составили 30 практически здоровых женщин.

У всех женщин, страдающих воспалительными заболеваниями гениталий, имелась та или

иная персистирующая инфекция. Диагноз бруцеллеза основывался на клинко-эпидемиологических данных и подтверждался обнаружением специфических антител в реакциях Райта и Хаддлсона и/или с помощью внутрикожной аллергической пробы Бюрне, а также выявлением антиген-специфических лимфоцитов (АСЛ) бруцеллезной специфичности. Диагноз HBV- и HCV-инфекций верифицировался обнаружением в иммуноферментном анализе (ИФА) маркеров: HBsAg, antiHBcor-IgM или -IgG, HBeAg, antiHCV-total, antiHCV-cor, antiHCV – NS-2-3-4-5 и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) – DNA и/или RNA. Диагноз урогенитального хламидиоза подтверждался обнаружением специфических антител к *Ch. trachomatis* в ИФА и антигенов хламидий в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

Субпопуляционный анализ лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии по методике, модифицированной НИИ иммунологии МЗ РФ [4] на приборе «FacsCalibur» (BectonDickenson/США) с помощью моноклональных антител к поверхностным антигенам лимфоцитов (НПО «Сорбент»/Москва, РФ): зрелые Т-лимфоциты – CD3+, Т-хелперы – CD4+, цитотоксические лимфоциты CD8+, натуральные киллеры CD16+, CD56+, В-лимфоциты CD20+, молекулы адгезии CD11b+, маркеры ранней CD25+ и поздней активации CD95+, HLA-DR+.

У 20 женщин с невынашиванием беременности в анамнезе изучали субпопуляционный состав лимфоцитов и активационных маркеров эндометрия. Материалом для иммунологического исследования служили биоптаты маточного эндометрия в секреторной фазе, полученные при гистероскопии. В качестве контроля использовали показатели субпопуляций лимфоцитов эндометрия, полученного при удалении внутриматочного контрацептива у женщин с ненарушенной репродуктивной функцией. Выделение иммунокомпетентных клеток из ткани эндометрия проводили безферментативным способом. Фрагменты эндометрия помещали в контейнер «Medicon» (BectonDickenson/США), добавляли фосфатный буфер и измельчали в гомогенизаторе «Medimachine» (BectonDickenson/США) в течение нескольких минут. Полученную клеточную суспензию центрифугировали

30 мин в градиенте плотности фиколл-верографин ($d=1,078$). Определяли содержание зрелых лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+, маркеры ранней CD25+ и поздней активации CD95+.

Результаты исследования и обсуждение. Данные, характеризующие особенности популяционного состава лимфоцитов периферической крови при различных состояниях репродуктивной функции женщин, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов у женщин с воспалительными заболеваниями гениталий на фоне персистирующих инфекций

Показатель	Контроль, n=30	1 группа, n=43	2 группа, n=32
Лимфоциты	37,0±7,33	45,6±5,6	47,7±9,2
CD3+	54,8±3,19	64,6±6,6	39,9±15,3
CD4+	39,9±3,25	38,4±5,6	29,5±8,3
CD8+	23,9±2,78	23,5±4,8	21,5±6,5
CD16+	10,9±2,64	6,1±2,5	21,5±5,3**
CD56+	16,5±1,03	12,8±4,3	24,73±6,75
CD20+	10,1±3,0	16,4±5,38	15,8±5,8
CD11b+	10,8±2,2	–	17,75±3,8
CD95+	6,8±1,1	8,0±6,9	15,25±4,21*
CD25+	1,3±0,1	4,7±2,2**	12,5±3,17*
HLA-DR+	5,3±0,63	8,9±2,0	15,92±4,10*
CD4+/CD8+	1,7±0,2	1,3±0,6	1,65±0,8

*Различия с контролем достоверны при $P<0,05$.

**Различия между 1 и 2 группой достоверны при $P<0,05$.

Во второй группе больных (с невынашиванием беременности в анамнезе) по средним значениям показателей субпопуляций лимфоцитов достоверных отличий в сравнении с контрольной группой не выявлено. Но индивидуальные значения содержания субпопуляций лимфоцитов колебались в широких пределах. На фоне тенденции к снижению содержания зрелых лимфоцитов и Т-хелперов у 42,8 % пациенток регистрировалось резкое снижение содержания CD3+-клеток и у 28,6 % – снижение CD4+-клеток.

Разнонаправленность изменений наблюдалась также с показателями цитотоксических клеток, у 1/4 содержание CD8+-лимфоцитов было сниженным и у 11,9 % – повышенным. Содержание лимфоцитов имело тенденцию к повышению. Наблюдалась выраженная разбалансировка показателей содержания натуральных киллеров. У 30,9 % пациенток уровень CD16+ был повышен, а у 14,2 % – резко сни-

жен. При этом у 20 % пациенток содержание другой популяции натуральных киллеров CD56+ было повышено более чем в 2 раза и у 21 % – резко снижено. Следует отметить, что повышенное содержание CD16+лимфоцитов сопровождалось сниженным содержанием CD3+, CD4+клеток при нормальном уровне CD8+лимфоцитов.

При анализе активационных маркеров установлено достоверное ($P < 0,05$) повышение относительного и абсолютного содержания CD25+лимфоцитов по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы. Отмечалась тенденция к повышению раннего HLA-DR+ и позднего активационного маркера CD95+. При этом адекватное повышение их экспрессии наблюдалось только у 42,8 и 48,5 % женщин соответственно. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы адгезии (CD11b+), не отличалось от контроля, хотя и имело тенденцию к повышению.

В то же время регистрировалось снижение лимфоцитов экспрессирующих рецептор к Fc-IgG (CD56+), т. е. способных к антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

В большинстве случаев прерывание беременности опосредуют неантиген-специфические естественные киллеры и макрофаги. Coulam С.В. и соавт. [5] показали, что у женщин с привычным выкидышем выше содержание в крови CD56+CD16+, продуцирующих эмбриотоксические цитокины. Однако локальная продукция натуральных киллеров отличается от содержания в периферической крови. В эндометрии у пациенток с привычным выкидышем увеличивается содержание только классических CD16+клеток, а содержание CD56+клеток, продуцирующих трансформирующий фактор роста b_2 , уменьшается. Считается, что уменьшение содержания клеток данного фенотипа у женщин с привычными выкидышами может быть связано с изменением профиля экспрессии цитокинов и связанной с этой невозможностью снабжения зародыша соответствующей средой, содержащей факторы роста [6]. Функциональное состояние натуральных киллеров, т. е. экспрессия ими активационных маркеров, остается неизученным.

В связи с этим нами был изучен популяционный состав эндометрия женщин с невынашиванием беременности в анамнезе. Данные, характеризующие особенности популяционного

состава лимфоцитов эндометрия женщин с невынашиванием беременности в анамнезе, представлены в табл. 2. Установлено, что в группе женщин с невынашиванием беременности в анамнезе на локальном уровне в эндометрии достоверно ($P < 0,05$) сниженным оказалось содержание CD56+лимфоцитов, что согласуется с данными литературы.

Таблица 2

Популяционный состав лимфоцитов эндометрия женщин с привычным невынашиванием беременности

Показатель, %	Контроль, n=20	Основная группа, n=20
CD3+	43,3±6,12	37,3±8,43
CD4+	47,1±7,6	36,1±10,6
CD8+	36,3±6,7	48,4±16,5
CD16+	46,3±6,32	28,4±15,4
CD56+	64,4±6,14	44,8±7,4*

*Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

Относительное содержание другой популяции естественных киллеров CD16+ достоверно не отличалось от контроля, хотя имело тенденцию к снижению. Следует отметить тенденцию к снижению содержания CD3+, CD4+клеток по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Содержание цитотоксических CD8+клеток имело тенденцию к повышению, а в индивидуальных показателях был выраженный разброс, у 1/3 пациенток их содержание было в пределах контрольных значений и 1/3 – резко повышенным.

Анализ уровня экспрессии активационных маркеров (табл. 3) показал, что относительное содержание CD25+лимфоцитов было достоверно

Таблица 3

Экспрессия активационных маркеров лимфоцитами эндометрия женщин с невынашиванием беременности

Показатель, %	Контроль, n=20	Основная группа, n=20
CD25+	13,09±1,21	4,33±1,47*
CD95+	7,1±3,24	29,7±9,47*
CD4+CD25+	1,13±0,35	0,53±0,36
CD8+CD25+	1,62±1,12	0,71±0,47
CD16+CD25+	0,71±0,08	0,93±0,34
CD56+CD25+	10,3±3,11	2,03±0,7*
CD4+CD95+	1,31±0,7	2,32±1,38
CD8+CD95+	1,17±0,46	6,68±4,5
CD16+CD95+	2,09±1,4	3,22±2,54
CD56+CD95+	1,18±1,13	3,92±2,63

*Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

но ($P < 0,05$) сниженным по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы.

Следует отметить, что снижение ранней активации наблюдалось преимущественно в популяции CD56+лимфоцитов, что проявлялось достоверным ($P < 0,05$) снижением пула CD56+CD25+клеток. Изучение экспрессии рецепторов к ИЛ-2 (CD25) у отдельных субпопуляций лимфоцитов выявило тенденцию к снижению у CD4+, CD8+лимфоцитов, к повышению – у CD16+клеток.

В то же время выявлено достоверное ($P < 0,05$) повышение клеток, готовых к апоптозу (CD95+). При этом повышенная экспрессия рецептора CD95+ была обнаружена у CD4+, CD8+клеток и натуральных киллеров, как CD16+, так и CD56+клеток.

У здоровых фертильных женщин тканевую интегральность эндометрия и защита от патогенных микроорганизмов обеспечиваются в основном популяцией активированных Т-клеток, продуцирующих ИНФ- γ . При этом естественные киллеры с фенотипом CD56+CD16+обладают слабой ЕК-подобной цитотоксической активностью.

Полученные результаты свидетельствуют, что на локальном уровне в эндометрии у женщин с привычным невынашиванием беременности постоянная стимуляция патогенными микроорганизмами приводит к снижению содержания CD56+лимфоцитов, снижению экспрессии ранних активационных маркеров и повышенной готовности клеток к апоптозу. При этом наблюдаются разнонаправленные изменения в содержании цитотоксических CD8+лимфоцитов.

Таким образом, при привычном невынашивании беременности инфекционного генеза наблюдается картина разнонаправленных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. Это указывает на различные иммунологические механизмы формирования невынашивания беременности: повышение активности цитотоксических лимфоцитов CD8+ и недостаточная или чрезмерная активность естественных киллеров. На локальном уровне в эндометрии у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе постоянная стимуляция патогенными микроорганизмами приводит к снижению содержания CD56+лимфоцитов, снижению экспрессии ранних активационных маркеров и повышенной готовности клеток к апоптозу.

При осложненном урогенитальном хламидиозе носят дискретный характер: повышение уровня CD16+ лимфоцитов ассоциируется с достоверно более высоким относительным и абсолютным количеством CD25+клеток и нормальным содержанием CD3+, CD4+ и CD8+, повышенным уровнем В-лимфоцитов. При нормальном/сниженном содержании CD16+ наблюдается снижение CD3+ и CD4+лимфоцитов. Исходное абсолютное содержание CD16+клеток может служить критерием выбора метода иммунокоррекции: при высоком ($>400 \times 10^6/л$) – целесообразно применение ИИБЖ, при низком ($400 \times 10^6/л$) – предпочтительны препараты рекомбинантных цитокинов – α -2b-ИНФ или ИЛ-2.

Разработка интегрального показателя, включающего уровень CD16+ и CD95+, создаст предпосылки для подбора наиболее эффективных методов иммунокорректирующей терапии для каждого отдельного пациента [И.В.Волчек и соавт., 2002]. В связи с этим нами был предложен индекс CD95+/CD16+, позволяющий повысить эффективность лечения посредством дифференцированного назначения иммуномодулятора, воздействующего на конкретный уровень иммунной системы. По мере прогрессирования инфекции снижаются уровни иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов CD3+, CD4+. Уровень CD16+лимфоцитов меняется от повышенного, отражающего активацию иммунной системы, до сниженного с увеличением доли апоптирующих лимфоцитов (CD95+), отражающего её истощение. Применение индекса CD95+/CD16+ позволяет учесть степень нарушения иммунной системы. Так, низкое его значение (менее 0,8) соответствует повышенному уровню CD16+ лимфоцитов и низкому содержанию апоптирующих клеток. В этом случае целесообразно применение индукторов интерферона. Индекс 0,9-1,29 соответствует нормальному содержанию CD16+ лимфоцитов и повышенному уровню апоптоза, что свидетельствует об истощении иммунокомпетентных клеток. И в этих условиях назначение препаратов интерферона преследует 2 задачи: во-первых, заместительная терапия в условиях дефицита эндогенного интерферона; во-вторых, экзогенные интерфероны усиливают синтез и секрецию эндогенных интерферонов всех классов, функциональную активность иммунокомпетентных клеток – Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов/макрофагов. При значении индекса

более 1,3, имеющего место при рецидивирующих инфекциях, в иммунной системе преобладают процессы апоптоза. В этих условиях для полноценной работы иммунной системы необходимо увеличить содержание иммунокомпетентных клеток не только качественно, но и количественно. Поэтому целесообразно назначение препаратов интерлейкина-2, который воздействует как на структурную (клеточную), так и на функциональную (регуляторную) составляющие иммунной системы. ИЛ-2 способствует дифференцировке НК-клеток в лимфокин-акти-

вированные киллерные клетки (ЛКК-клетки), отличающиеся высокой цитологической активностью и широким спектром действия.

Выводы

В качестве критерия для выбора вида иммунотерапии используют индекс CD95+/CD16+, при значениях которого менее 0,8 на фоне снижения CD3+, CD4+ – назначают индукторы интерферона. При значении индекса, равном 0,9-1,29 назначают препараты интерферона, при значении индекса более 1,3 – препараты интерлейкина-2.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Clark G.F., Oehninger S., Patankar M.S. et al. A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence hypothesis // Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 11. N 33. – P. 467-473.
- 2 Clark D.A., Lea R.G., Podor T. et al. Cytokines determining the success or failure of pregnancy // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1991. – Vol. 656. – P. 524-536.
- 3 Coulam C.B., Clark D.A., Beer A.E. et al. Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion. Clinical Guidelines Recommendation committee for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion // AJRI. – 1997. – 38 (2). – P. 57-74.
- 4 Quenby S., Bates M., Doig T. et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage // Hum. Reprod. Vol. 14. – № 9. – P. 2386-2391.
- 5 Yamamoto T., Tekahashi Y., Kase N., Mori H. Decidual NK cells in patients with recurrent abortion // AJRI. – 1998. – 40. – P. 274.

ТҮЙІН

Бақылау топқа қарағанда CD16+ лимфоциттердің саны жоғарынауқастарда жандандырушы маркерлердің HLA-DR+ және CD95+ экспрессиясы көтеріңкі болды, ал салыстырма топқа қарағанда CD25+ экспрессиясы – көтеріңкі. CD3+, CD4+ лимфоциттер саны төмен және CD95+/CD16+ индексі 0,8-ден кем болғанда интерферон индукторды, индексі 0,9-1,29-ға тең болғанда интерферон препараттарды, индексі 1,3-тен артық кезде -интерлейкин-2 препараттарды қолданған жөн.

Түйінді сөздер: түсік тастағандарлық, иммунитетті интеграл аңықтау.

SUMMARY

It was found that in patients with high CD16+ lymphocytes level the activation markers HLA-DR+ and CD95+ expression levels are reliably higher than in the control group, and CD25+ expression levels are also higher compared to 1st group. CD95+/CD16+ index will be used, if its values are less than 0.8 on the background of CD3+, CD4+ decrease, interferon inducers will be prescribed, if the index value is 0.9 to 1.29 – interferon preparations, if the index value is more than 1.3 – interleukin-2 preparations.

Key words: noncarrying of pregnancy, integral evaluation of immunity.