

ПОКАЗАТЕЛИ АЛЛОГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ИММУННЫХ ФОРМ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ

О. В. Беленкова — МБУЗ Детская городская клиническая больница № 5, г. Кемерово, врач-акушер-гинеколог; **В. Г. Мозес** — ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия Минздрава России, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1, доктор медицинских наук; **А. В. Шабалдин** — ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия Минздрава России, профессор кафедры отоларингологии, доктор медицинских наук; **Г. В. Лисаченко** — ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия Минздрава России, заведующий кафедрой патологической физиологии, профессор, доктор медицинских наук.

INDICATORS OF ALLOGENIC INTERACTIONS OF LYMPHOCYTES IN SPOUSES AS ADDITIONAL DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC CRITERIA OF IMMUNE FORMS OF REPRODUCTIVE FAILURES

O. V. Belenkova — Kemerovo Children Hospital № 5, Obstetrician-gynecologist; **V. G. Mozes** — Kemerovo State Medical Academy, Department of Gynaecology and Obstetrics №1, Professor, Doctor of Medical Science; **A. V. Shabaldin** — Kemerovo State Medical Academy, Department of Otolaryngology, Professor, Doctor of Medical Science; **G. V. Lisachenko** — Kemerovo State Medical Academy, Head of Department of Physiological Pathology, Professor, Doctor of Medical Science.

Дата поступления — 14.09.2013 г.

Дата принятия в печать — 25.11.2013 г.

Беленкова О. В., Мозес В. Г., Шабалдин А. В., Лисаченко Г. В. Показатели аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов как дополнительные диагностические и прогностические критерии иммунных форм репродуктивных потерь // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 4. С. 649–652.

Цель: поиск новых лабораторных подходов для диагностики иммунных форм репродуктивных потерь. **Материал и методы.** Проведено ретроспективное исследование (случай — контроль) 54 супружеских пар с идиопатическими репродуктивными потерями (в анамнезе 3 и более спонтанно прервавшиеся в сроки 4–8 недель беременности) и 47 супружеских пар, имеющих двух и более детей. **Результаты.** Выявлено, что при иммунной форме репродуктивных потерь наличествует повышение клеток уровня А-моноклеаров, экспрессирующих HLDR, что способствует отмене толерантности к аллоантигенам зародыша и иммунному прерыванию беременности. При репродуктивных потерях женская аутосыворотка положительно влияет на активацию Т-лимфоцитов (CD3+/HLADR+), что может приводить к киллингу полуаллогенного зародыша. **Выводы.** Уровень экспрессии CD3 и HLADR на CD45+ смешанных аллогенных моноклеарах супругов может быть диагностически значимым критерием для выявления иммунных причин репродуктивных потерь.

Ключевые слова: идиопатические репродуктивные потери, иммунитет.

Belenkova O. V., Mozes V. G., Shabaldin A. V., Lisachenko G. V. Indicators of allogenic interactions of lymphocytes in spouses as additional diagnostic and prognostic criteria of immune forms of reproductive failures // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2013. Vol. 9, № 4. P. 649–652.

Research objective: to search new laboratory approaches to the diagnostics of immune forms of reproductive failures. **Materials and methods.** Retrospective research a case — control of 54 married couples with idiopathic reproductive failures (in the anamnesis — 3 and more spontaneously interrupted pregnancy in the 4–8th weeks) and 47 married couples having two and more children has been conducted. **Results.** It has been revealed that at the immune form of reproductive failures increase of cells of level А- mononuclear cells, expression of HLDR takes place that promotes tolerance cancellation to allogenic germs and to immune interruption of pregnancy. At reproductive failures female autoserum positively influences activation of T-lymphocyte (CD3 +/HLADR +) that may lead to the death of half- allogenic germ. **Conclusion.** Level of expression of CD3 and HLADR on CD45 + of mixed allogenic mononuclear cells of spouses may serve as a diagnostic significant criterion for revealing immune reasons of reproductive failures.

Key words: idiopathic reproductive failures, immunity.

Введение. Неоднократно показано, что нарушение иммунного распознавания аллогенных антигенов оплодотворенного яйца материнским иммунокомпетентным микроокружением приводит к репродуктивным потерям [1]. На основании этих данных для диагностики иммунных причин репродуктивных потерь используются тесты смешанной культуры лимфоцитов и определение блокирующей активности женской

сыворотки, недостатком которых является использование радиоизотопных компонентов и сложность культуральных работ [2]. Функциональные особенности иммунокомпетентных клеток можно оценить по экспрессии поверхностных антигенов (CD, HLA) с помощью проточной цитометрии. Важной молекулой лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток является HLADR, которая участвует в презентации антигенов Т-лимфоцитам и является маркером активации иммунокомпетентных клеток. Обсуждается вопрос о том, что блокирующий эффект женской аутосыворотки осуществляется антителами, направленными

Ответственный автор — Мозес Вадим Гельевич
Адрес: 650099, г. Кемерово, ул. Весенняя, 13, кв. 22.
Тел.: +79045732443.
E-mail: Vadimmoses@mail.ru

к определенным эпитомам аллогенных HLA [3]. Эта поверхностная структура мононуклеаров может быть ключевой при цитометрическом исследовании иммунных взаимодействий аллогенных лимфоцитов супругов.

Цель: поиск новых лабораторных подходов для диагностики иммунных форм репродуктивных потерь на основе исследования аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов и влияния на этот процесс женской аутосыыворотки.

Материал и методы. Для выполнения поставленной цели проведено ретроспективное исследование «случай — контроль». Обследованы 54 супружеские пары с идиопатическими репродуктивными потерями (в анамнезе 3 и более спонтанно прервавшиеся в сроки 4–8 недель беременности) и 47 супружеских пар, имеющих двух и более детей. Исследование выполнено в соответствии со стандартами Good Clinical Practice и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГБОУ ВПО «КемГМА» Минздрава России, у всех участников исследования получено письменное информированное согласие.

Для изучения аллогенных взаимодействий лимфоцитов (полученных на градиенте плотности, равном 1,077) супругов и влияния на этот процесс женской аутосыыворотки проводили цитометрическую оценку (Epics XL-MCL, Beckman Coulter, USA) экспрессии HLADR, CD3 на смешанных мононуклеарах супругов, предварительно сепарированных от дэбриса по общему маркеру лейкоцитов — CD45. Исследования особенностей иммунного ответа в смешанных аллогенных мононуклеарах проводили как со стандартными ростовыми факторами (20%-ная эмбриональная телячья сыворотка — ЭТС), так и при добавлении женской аутосыыворотки (20% — вместо ЭТС). Инкубацию смешанных лимфоцитов проводили в концентрации 2000 клеток/мкл в полной среде RPMI (Нерез и глутамин) с добавлением до 20% ЭТС или женской аутосыыворотки при температуре 37°C. В аналогичных условиях выполняли инкубацию монокультур мононуклеаров супругов. Экспрессия HLADR в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) и в монокультурах отдельно женщины и мужчины, предварительно сепарированных по экспрессии CD45 из смешанных аллогенных мононуклеаров, а также эффект женской аутосыыворотки на СКЛ супругов показаны на рис. 1.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.1, лицензионное соглашение BXXR006B092218FAN11. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR), которую высчитывали по модифицированной формуле для малых выборок. Для OR рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95%-ном уровне значимости. Если OR был равен 1, то считали, что ассоциация отсутствует. Если OR был меньше 1, считали ассоциацию отрицательной; если OR был больше 2, то ассоциацию считали положительной [4]. Проверка статистической значимости различий между носительными частотами двух или большего числа событий осуществлялась при помощи критерия Пирсона χ^2 . Если сумма частот была небольшой, то использовался точный критерий Фишера. При проверке нулевых гипотез критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости

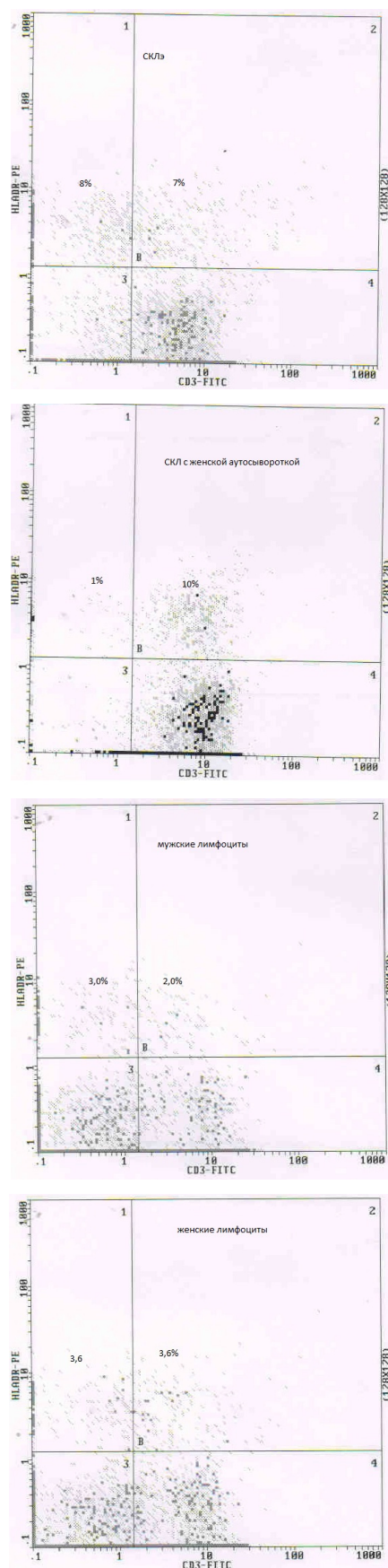


Рис. 1. Экспрессия HLADR на лимфоцитах в СКЛ с эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (СКЛэ), в СКЛ с женской аутосыывороткой и в контрольных спонтанных культурах лимфоцитов мужчины (мужа) и женщины (жены)

(р) статистического критерия этой величины принималась нулевая гипотеза.

Результаты. Проведенное исследование показало (рис. 2), что экспрессия в смешанных аллогенных мононуклеарах супругов маркерного фенотипа CD45+/CD3+/HLADR+ (активированные Т-лимфоциты) была сопоставима в реакциях с ЭТС и с женской аутоывороткой в семейных парах как с репродуктивными потерями, так и имеющих детей (р>0,05). В то же время экспрессия фенотипа маркерного для В-лимфоцитов и макрофагов (CD45+/CD3-/HLADR+) была различима в сравниваемых группах. Так, в группе семей, имеющих детей, экспрессия фенотипа CD45+/CD3-/HLADR+ достоверно снижалась при добавлении в реакционную смесь аллогенных мононуклеаров супругов женской аутоыворотки (2,21±0,76% против 9,57±2,22% с ЭТС, р<0,05). В группе же семей с репродуктивными потерями экспрессия этого фенотипа была сопоставима между смешанной реакцией аллогенных мононуклеаров с добавлением ЭТС и с внесением в нее женской аутоыворотки (р>0,05). Рассматривая экспрессию этих двух фенотипов (CD45+/CD3+/HLADR+ и CD45+/CD3-/HLADR+) на смешанных аллогенных мононуклеарах с позиции значимости данного феномена в диагностике причин репродуктивных потерь, определяли величину OR. Показана прогностическая значимость этой величины для фенотипа В-лимфоцитов и макрофагов: CD45+/CD3-/HLADR+ (OR=0,19; р<0,05).

На следующем этапе работы проведено исследование активности женской аутоыворотки в клеточных реакциях смешанных аллогенных мононуклеаров (рис. 3).

При исследовании процента активации или подавления женской аутоывороткой экспрессии клеток с фенотипами CD45+/CD3+/HLADR+ (активированные Т-лимфоциты) и CD45+/CD3-/HLADR+ (А-мононуклеары) в смешанных аллогенных мононуклеарах (по отношению к экспрессии этих фенотипов в реакции с ЭТС) выявили следующую закономерность. В группе семей с репродуктивными потерями под воздействием женской аутоыворотки число клеток, экспрессирующих фенотип CD45+/CD3+/HLADR+ (активированные Т-лимфоциты), увеличивалось на 87%, что составило общую активность женской аутоыворотки, равную 187%. В группе сравнения (имеющих детей), напротив, под воздействием женской аутоыворотки число клеток, экспрессирующих фенотип CD45+/CD3+/HLADR+ (активированные Т-лимфоциты), снижалось на 21% и в целом составило 79%. Получена достоверно значимая разница между активностью женской аутоыворотки в отношении клеток CD45+/CD3+/HLADR+ в семьях с репродуктивными потерями и в семьях, имеющих детей (187±19,3% против 79±11,5% соответственно, р<0,05). При исследовании данного феномена на клетках с фенотипом CD45+/CD3-/HLADR+ достоверных различий между основной группой и группой сравнения не получено (р>0,05). Рассматривая данный феномен с позиции поиска новых диагностических критериев иммунных форм репродуктивных потерь, выявили, что для уровня активности женской сыворотки в отношении клеток с фенотипом CD45+/CD3+/HLADR+ получен достоверно значимый результат по показателю отношения шансов (OR=3,7; р<0,05).

Обсуждение. Проведенное исследование позволяет предположить, что физиологическое вына-

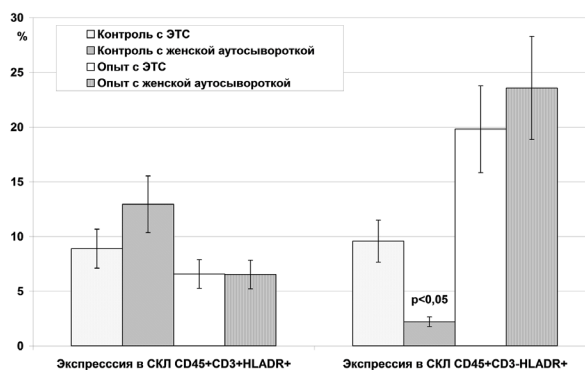


Рис. 2. Экспрессия маркеров CD45, CD3 и HLADR на смешанных аллогенных мононуклеарах в семейных парах с репродуктивными потерями (опыт) и в семейных парах, имеющих детей (контроль)

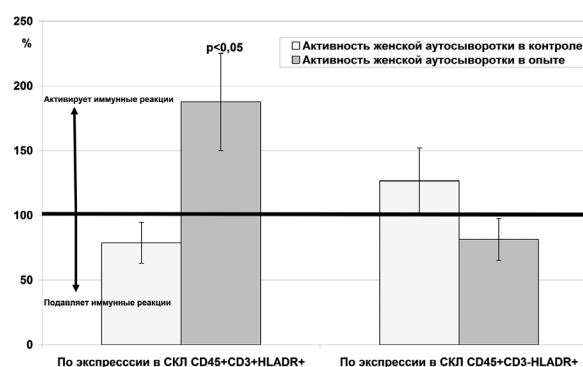


Рис. 3. Влияние женской аутоыворотки на клеточные реакции (экспрессия маркеров CD45, CD3, HLADR) в смешанных аллогенных мононуклеарах супругов в семейных парах с репродуктивными потерями (опыт) и в семейных парах, имеющих детей (контроль)

шивание беременности связано с подавлением факторами женской аутоыворотки иммунных реакций, в которых принимают участие антиген-представляющие клетки (А-клетки): В-лимфоцита, макрофаги, дендритные клетки. Супрессия по данной субпопуляции мононуклеаров биологически целесообразна, так как снижение экспрессии HLADR на А-клетках увеличивает толерантность иммунного материнского микроокружения в отношении полуаллогенного зародыша [5]. С другой стороны, избирательное уменьшения пула мононуклеаров, экспрессирующих HLADR, но не экспрессирующих CD3 по отношению к субпопуляции CD3+/HLADR+, указывает на дифференцированное воздействие антител к HLADR и/или на их эпигенетическую разницу в рамках одной молекулы HLADR. Возможно, именно этот феномен вносит элемент «сумбурности» в значимость определения у женщин преобладающих антиHLADR антител для диагностики иммунных форм репродуктивных потерь.

Проведенное исследование показало, что уровень экспрессии CD3 и HLADR на CD45+ смешанных аллогенных мононуклеарах супругов может быть диагностически значимым критерием для выявления иммунных причин репродуктивных потерь. Важным прогностическим критерием для этой формы репродуктивной патологии является и активность факторов, находящихся в женской аутоыворотке, в отношении экспрессии HLADR на клетках CD3+ и CD3-.

Выводы:

1. При иммунной форме репродуктивных потерь наблюдается повышение клеток уровня А-моноклеаров, экспрессирующих HLDR, что способствует отмене толерантности к аллоантигенам зародыша и иммунному прерыванию беременности.

2. При репродуктивных потерях женская аутосыворотка положительно влияет на активацию Т-лимфоцитов (CD3+/HLADR+), что может приводить к киллингу полуаллогенного зародыша.

3. Уровень экспрессии CD3 и HLADR на CD45+ смешанных аллогенных моноклеарах супругов может быть диагностически значимым критерием для выявления иммунных причин репродуктивных потерь.

Конфликт интересов. Финансирование исследования осуществлялось за счет гранта губернатора Кемеровской области 2011 г. для поддержки молодых ученых — докторов наук.

Библиографический список

1. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos / B. Hodes-Wertz, B. J. Grifo, S. Ghadir [et al.] // *Fertil Steril.* 2012. Sep. 98 (3). P. 675–680.

2. In vitro testing of immunosuppressive effects of mesenchymal stromal cells on lymphocytes stimulated with alloantigens / D. Lysak, T. Vlas, M. Holubova, M. Miklikova //

Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 2013. Sep 27. P. 314–315.

3. Optimal detection of serum antipaternal antileukocytic antibodies after injection of allogenic lymphocytes in women with habitual abortions / L. V. Krechetova, M. A. Nikolaeva, L. V. Van'ko, M. M. Ziganshina [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. № 153 (5). P. 726–729.

4. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

5. Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure / S. Nardi Fda, R. Slowik, P. F. Wolk, J. S. da Silva [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012. № 68 (6). P. 507–514.

Translit

1. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos / B. Hodes-Wertz, B. J. Grifo, S. Ghadir [et al.] // *Fertil Steril.* 2012. Sep. 98 (3). P. 675–680.

2. In vitro testing of immunosuppressive effects of mesenchymal stromal cells on lymphocytes stimulated with alloantigens / D. Lysak, T. Vlas, M. Holubova, M. Miklikova // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013. Sep 27. P. 314–315. 3. Optimal detection of serum antipaternal antileukocytic antibodies after injection of allogenic lymphocytes in women with habitual abortions / L. V. Krechetova, M. A. Nikolaeva, L. V. Van'ko, M. M. Ziganshina [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. № 153 (5). R. 726–729.

4. Lakin G. F. Biometrija. M.: Vysshaja shkola, 1990. 352 s.

5. Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure / S. Nardi Fda, R. Slowik, P. F. Wolk, J. S. da Silva [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012. № 68 (6). P. 507–514.

УДК 618.3–06:618.39–021.3] –073.43 (045)

Обзор

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ДИАГНОСТИКА САМОПРОИЗВОЛЬНОГО ВЫКИДЫША В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ (ОБЗОР)

М. Л. Чехонацкая — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, заведующая кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии, профессор, доктор медицинских наук; **Л. К. Василевич** — заведующая гинекологическим отделением клинической больницы им. С. Р. Миротворцева; **Е. А. Колесникова** — врач ультразвуковой диагностики МУЗ «Городская клиническая больница № 8», Саратов; **Н. О. Петросян** — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, аспирант кафедры лучевой диагностики и лучевой терапии.

ULTRASOUND DIAGNOSTICS OF MISCARRIAGE IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY (REVIEW)

M. L. Chekhonatskaya — *Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Radiologic Diagnostics and Therapy, Professor, Doctor of Medical Science*; **L. K. Vasilevich** — *Clinical Hospital n.a. S. R. Mirovtortsev, Head of Gynaecological Ward*; **E. A. Kolesnikova** — *Saratov Clinical Hospital № 8, Ultrasound Physician*; **N. O. Petrosyan** — *Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Radiologic Diagnostics and Therapy, Post-graduate.*

Дата поступления — 6.03.13 г.

Дата принятия в печать — 25.11.2013 г.

Чехонацкая М. Л., Василевич Л. К., Колесникова Е. А., Петросян Н. О. Ультразвуковая диагностика самопроизвольного выкидыша в первом триместре беременности (обзор) // *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2013. Т. 9, № 4. С. 652–656.

На основании анализа данных отечественной и зарубежной литературы рассмотрены современные аспекты ультразвуковой диагностики самопроизвольного выкидыша в I триместре беременности. Акцентируется внимание на оценке экстраэмбриональных структур и провизорных органов. Освещены возможности доплерометрии в оценке течения беременности в I триместре.

Ключевые слова: самопроизвольный выкидыш, ультразвуковая диагностика, эмбрион.

Chekhonatskaya M. L., Vasilevich L. K., Kolesnikova E. A., Petrosyan N. O. Ultrasound diagnostics of miscarriage in the first trimester of pregnancy (review) // *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2013. Vol. 9, № 4. P. 652–656.

On the basis of the analysis of Russian and foreign literature the modern aspects of ultrasonic diagnostics of miscarriage in the first trimester of pregnancy have been examined. The attention is focused on the assessment of the extraembryonic structures and provisional organs. The features of Doppler imaging in the assessment of the course of pregnancy in the first trimester have been highlighted.

Key words: miscarriage, ultrasound diagnostics, embryo.