© Туманова Л.Є., Коломієць О.В., Холод В.В., Величко М.Б., 2022

doi:10.37321/immunology.2022.1-2-05

УДК: 618.1-078.73

ФЕНОТИПІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ВАГІТНИХ ЖІНОК, ЯКІ МАЛИ БЕЗПЛІДДЯ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ В АНАМНЕЗІ

[1] ТУМАНОВА Л.Є., [1] КОЛОМІЄЦЬ О.В., [2]ХОЛОД В.В., [2]ВЕЛИЧКО М.Б.

[1]ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. академіка О.М. Лук’янової НАМН України», м. Київ;

[2]ДУ «Інститут нефрології НАМН України», м. Київ

Вступ. На сьогодні низький стан народжуваності в Україні є медико-соціальною проблемою, однією із важливих складових якої є погіршення стану імунної системи населення, що призводить до порушень фертильності. Вагітні жінки, які мали безпліднісь ендокринного і запального ґенезу в анамнезі, складають значний сегмент в загальній їх кількості з тенденцією до збільшення [1,2].

Наслідки невиявлених та нелікованих інфекцій сечостатевої системи наносять суспільству демографічних і економічних збитків, що оцінюються астрономічними сумами, являються частою причиною безплідності як у жінок, так і у чоловіків. У пацієнток з гострими та хронічними запальними процесами геніталій в анамнезі є високий ризик переривання вагітності. Досить розповсюдженими є інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ): гонорея, хламідіоз, уреаплазмоз, генітальний мікоплазмоз, гарднерельоз, герпес-вірусна інфекція та ін. Саме вони і є причиною безплідності запального ґенезу: гострих та хронічних сальпінгоофоритів, хронічних метритів, ускладнень післяабортного періоду. Хронічні інфекції, що існують тривалий час, здатні викликати соматичні мутації клітин, а також значні порушення імунної системи — пригнічення Т-клітинного імунітету, дефекти формування первинної імунної відповіді, зменшення фагоцитарної активності нейтрофілів і макрофагів [3].

До важливих ендокринних порушень у жінок, які призводять до безплідності, відносяться синдроми гіперпролактинемії (ГП) та полікістозних яєчників (СПКЯ). На СПКЯ, згідно даних світових досліджень, страждають 20% жінок фертильного віку; це більше половини всіх випадків ендокринного безпліддя (50-75%) і близько 22% причин безплідного шлюбу. СПКЯ, як ендокринопатія, асоційована з гіперандрогенією, ановуляторним безпліддям, метаболічними та кардіо-васкулярними порушеннями, впливає на всі вікові періоди життя жінки від пубертату до менопаузи, залишаючись однією з найактуальніших проблем сучасної гінекології.

Частота ГП в популяції по даним різних авторів складає від 0,5 до 1%. Однак, майже у 20% пацієнток з безпліддям спостерігається підвищений рівень пролактину, а серед хворих з аменореєю ГП зустрічається у 25% жінок. У жінок, вагітність яких наступила після лікування ГП, констатований високий відсоток акушерських і перинатальних ускладнень.

Враховуючи те, що втрати вагітності у жінок із безпліддям ендокринного та запального ґенезу в анамнезі вище за середньо популяційні, залишаються недостатньо вивченими питання: етіопатогенезу, діагностики і лікування невиношування вагітності, її профілактики, особливо при поєднанні цих двох факторів. В цьому аспекті важливого значення набуває визначення особливостей імунного статусу у таких вагітних пацієнток [4].

Відомо, що в перші тижні вагітності при імплантації в децидуальній оболонці накопичуються CD3-56+NK-клітини, CD3+ Т-лімфоцити (Т-л) та CD14+ макрофаги (відповідно, 80% та по 10%), які забезпечують імунну відповідь жінки в напрямках розвитку Т-хелперів (Т-х) 1 або 2 типу з продукцією відповідних цитокінів [5, 6].

Значення цитокінової ланки імунітету, в тому числі для нормального перебігу вагітності, безперечно; і на цей час визначено більш ніж 100 таких медіаторів, виявлені їх амінокислотна послідовність і клітини-продуценти [7-9]. Цитокіни відіграють важливу роль в розвитку патології — регулюють розвиток місцевих захисних реакцій в тканинах з участю різних типів клітин крові, ендотелію, сполучної тканини та епітелію.

Цитокіни макрофагів визначають тип імунної відповіді, впливаючи на диференціювання Т-х, ідентифікація субпопуляцій яких виявила, що Т-х 1 продукують IL-2, IFN-γ, IL-3, лейкотрієни, GM-CSF; Т-х 2 – IL-4, IL-10 та ін.; Т-х 3 або Т-регуляторні – IL-10, TGF-β [8].

До важливих прозапальних цитокінів можна віднести фактор некрозу пухлин-α (TNF-α), який грає важливу роль в регуляції проліферації Т- і В-клітин, цитотоксичних лімфоцитів, фагоцитозу, індукує синтез IL-1β, -6, хемоатрактантів,

адгезивних молекул (ICAM-1, VCAM-1), активує синтез фібробластів, колагену та коагуляцію, тобто опосередковано регулює цитокіновий каскад і є причиною запалення і місцевої деструктивної реакції [10].

Особливий інтерес серед чисельних цитокінів, які мають контрольно-регуляторні функції, викликають інтерферони, які здатні чинити пряму антипроліферативну і цитотоксичну дію; антагоністами IFN-γ, спроможними пригнічувати продукцію цього та інших прозапальних медіаторів, є IL-10 та IL-4 [11].

Важливим напрямком сучасних досліджень, в тому числі механізмів нормальної та ускладненої вагітності, є визначення особливостей імунного статусу жінки, в тому числі ролі найбільш значущих антигенів, які експресують на мембранах імунокомпетентні клітини. На сьогодні метод проточної цитометрії є сучасною можливістю дослідити кількість цих лімфоцитів і маркерів їх активації, проліферації, міжклітинної кооперації та ін.

Тому проведення комплексних клінічних досліджень у вагітних жінок з вивченням стану імунної системи з урахуванням як числа імунокомпетентних клітин, так і їх функціональної активності, в тому числі і за продукцією цитокінів як факторів міжклітинної взаємодії, є актуальним і важливим.

Мета роботи – визначення особливостей рівнів імунокомпетентних клітин крові на основі CD-фенотипа з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у вагітних жінок із безплідністю різного генезу в анамнезі.

Матеріали і методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра і відповідних тест-систем визначали відносні рівні імунокомпетентних клітин (кл) крові у 436 не вагітних (референтна група n) та у 88 жінок (ж) із безпліддям різного генезу в анамнезі. Відбір пацієнток в 1 групу з ендокринним безпліддям в анамнезі включав вагітних із: синдромом полікістозних яєчників (СПКЯ), гіперпролактинемією (ГП) та їх поєднанням (28 ж). До 2 групи із запальним генезом безпліддя увійшли 46 вагітних із трубно-перитонеальними запальними гінекологічними захворюваннями в анамнезі (позаматкові вагітності, сактосальпінгси, хронічні рецидивуючі сальпінгоофорити, хронічні метрити), у 15% з яких плюс хронічні інфекції сечової системи. До 3 групи увійшли пацієнтки, які мали в анамнезі поєднання гормонального (СПКЯ та ГП) та запального факторів безпліддя перед цією вагітністю (14 ж).

Для визначення фенотипу лімфоцитів периферійну кров інкубували із моноклональними антитілами, міченими FITS, PE та PeCy5 згідно із інструкцією виробника BD bioscience USA, після чого лізували LysingSolution (BD bioscience USA) та аналізували на приладі FacScan за допомогою програми CellQeast BD bioscience USA. Використовували комбінації моноклональних антитіл проти наступних поверхневих маркерів: CD3/CD4/CD5/CD8/CD25/CD56/CD69/CD138a/HLA-DR. Контролі у вигляді неспецифічних мічених антитіл, що рекомендовані виробником, використовували для формування гейтів.

Для визначення внутрішньоклітинних цитокінів зразки крові 100 мкл розводили у 300мкл RPMI1640, що містила 5нг/мл PMA (форболмірістатацетат) 5мкг Брефелдіну А та 1мкг іономіцину, та інкубували 4години у CO2 інкубаторі Revco (USA). Після інкубації еритроцити лізувались LysingSolution (BD bioscience USA) та клітини пермабілізувались PermeabilizingSolution (BD bioscience USA) та розводились у 100мкл PBS, що містив 1% бичачого альбуміну. Клітини фарбувались антитілами проти поверхневих молекул (CD3 та CD4) та антитілами проти внутрішньоклітинних цитокінів (IFN-γ, TNFa, IL4, IL10,) одну годину за t +4о С. Після відмивки зразки аналізувались методом проточної цитометрії на приладі FacScan за допомогою програми CellQeast BD bioscience USA.

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм "SPSS for Windows. Версія 11" та "MedStat". Для статистичної обробки використовувались параметричні критерії статистики – тест Ст'юдента або непараметричні – критерій Уілкоксона. Достовірною вважали різницю при $p<0,05$.

Результати і обговорення. В усіх трьох досліджених групах виявлено достовірне зниження у вагітних порівняно з не вагітними відносного рівня лімфоцитів ($p<0,001$) та підвищення ($p<0,001$) гранулоцитів (рис. 1), в той час як відсоток моноцитів не відрізнявся від норми в 1 і 3 гр. з тенденцією до зниження ($p=0,063$) у жінок з запальними захворюваннями, що сприяли розвитку безплідності (2 гр.). Між собою групи за даними відносного числа лімфоцитів, гранулоцитів та моноцитів не відрізнялись ($p>0,05$), за винятком тенденції до зниження останніх в 2-й гр. порівняно з 1-ю ($p=0,091$) (рис. 1).

Аналіз відносних рівнів клітин імунної системи за даними їх CD-фенотипа, в тому числі мембранних маркерів активації, показав достовірне підвищення у пацієнток 2 гр. відносних рівнів CD3+ та CD3+CD4+-лімфоцитів з високою активацією останніх за даними експресії відповідних маркерів — HLA-DR та CD25, а також з достовірним зниженням кількості CD19+CD5+-лімфоцитів в 2 і 3 групах (табл. 1). Звертає увагу високий рівень CD3+CD56+-клітин у жінок 2 гр. з тенденцією до підвищення в 1 гр., так само як і тенденція до підвищення в 3 гр. активації CD3+- та CD3+CD4+-лімфоцитів за даними експресії, відповідно, HLA-DR та CD25 на їх поверхні (табл. 1).

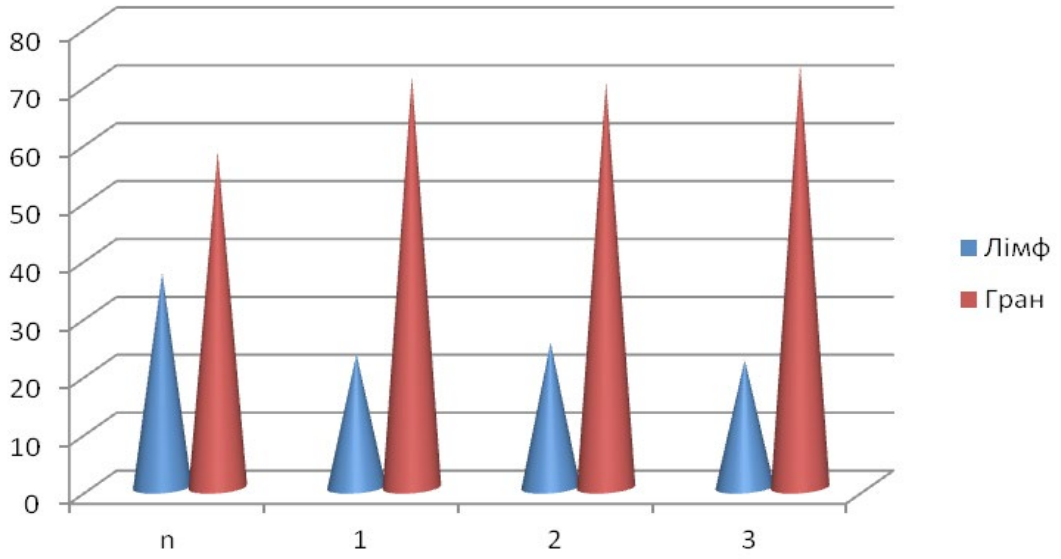


Рис. 1. Відносний рівень лімфоцитів та гранулоцитів у не вагітних (n) та вагітних жінок 1-3 груп.

Таблиця 1

Середні відносні рівні імунокомпетентних клітин (Т-, В-лімфоцитів та субпопуляцій) з експресією маркерів активації у не вагітних референтної групи (n) та у жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі (1-3 гр.)

Показник	Групи пацієнток				P		
	n	1	2	3	1-n	2-n	3-n
CD3+	74,7 [70,2; 79,3]	74,7 [70,2; 79,3]	75,9 [73,1; 78,4]	75,9 [72,2; 82,1]	0,420	0,019	0,090
HLA-DR+	10,5 [7,6; 14,4]	7,8 [4,0; 13,1]	10,9 [8,4; 15,5]	6,3 [3,9; 10,5]	0,179	0,331	0,056
CD56+	1,5 [1,5; 6,2]	7,5 [3,5; 11,9]	4,8 [2,3;10,4]	4,6 [1,5; 11,2]	0,067	0,008	0,359
CD158a+	3,4 [1,2; 5,0]	2,4 [1,8; 5,5]	3,5 [1,2; 4,3]	1,8 [1,3; 4,1]	0,513	0,930	0,731
CD5 -	7,1 [3,8; 12,2]	7,8 [5,2; 16,0]	6,6 [3,0; 10,8]	7,3 [5,8; 8,3]	0,461	0,587	0,760
CD4-CD8-	2,1 [0,5; 4,7]	4,2 [0,8; 6,0]	2,2 [0,3; 3,8]	1,2 [0,9; 3,5]	0,370	0,583	0,722
CD3+CD4+	44,4 [38,4; 49,5]	46,3 [39,1; 55,9]	48,8 [43,0; 51,9]	50,7 [45,5; 51,2]	0,401	0,009	0,129
HLA-DR+	5,7 [0; 8,5]	5,8 [3,5; 7,3]	6,9 [5,7; 9,3]	6,1 [5,5; 7,7]	0,665	0,012	0,490
CD69+	3,0 [1,7; 5,8]	3,1 [2,6; 3,9]	2,9 [2,4; 6,2]	2,1 [1,6; 67,5]	0,825	0,306	0,930
CD25+	8,1 [3,4; 26,5]	19,2 [9,3; 22,0]	22,4 [15,7; 30,7]	27,8 [13,5; 35,1]	0,220	0,002	0,064
CD56+	1,8 [0,9; 3,7]	1,2 [0,4; 3,3]	1,4 [0,9; 2,5]	2,2 [0,7; 5,2]	0,351	0,537	0,890
CD158a+	1,6 [0,7; 3,8]	2,0 [1,6; 4,4]	1,0 [0,3; 3,1]	1,7 [0,4; 3,7]	0,273	0,129	0,569
CD25hi CD127lo	4,9 [2,3; 7,3]	2,5 [2,2; 3,6]	3,8 [2,0; 6,5]	4,0 [2,2; 6,5]	0,122	0,324	0,664
CD19+	9,9 [7,6; 13,0]	9,0 [5,8; 10,0]	9,4 [7,7; 12,3]	10,4 [8,3; 15,4]	0,082	0,455	0,757
CD5+	16,3 [11,0; 22,8]	12,5 [10,8; 18,5]	12,7 [9,4; 17,0]	11,3 [8,3; 13,4]	0,173	0,031	0,044

Аналіз субпопуляцій показав, що у пацієнток 2 гр. достовірно підвищений рівень активації CD3+CD8+-, NK T CD3+CD4+CD56+- та CD3-CD56+-лімфоцитів за даними експресії ними антигенів гістосумісності II класу — HLA-DR, а у останніх клітин – і CD69 (табл. 2). При цьому, відносна кількість CD3-CD56+HLA-DR+-клітин у них перевищує рівень в 1 гр. (p=0,026) (табл. 2), а CD3+CD8+HLA-DR+- (p=0,073) та NK T CD3+CD8+CD56+HLA-DR+-лімфоцитів (p=0,089) мають тенденцію до підвищення відносно 1 гр.

Таблиця 2

Середні відносні рівні імунокомпетентних клітин (Т-цитотоксичних, Т-кілерів та натуральних кілерів) з експресією маркерів активації у не вагітних референтної групи (n) та у жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі (1-3)

Показник	Групи пацієнток				P		
	n	1	2	3	1-n	2-n	3-n
CD3+CD8+	24,5 [20,3; 29,8]	24,1 [18,7; 28,0]	25,3 [21,9; 27,9]	28,0 [21,5; 28,6]	0,578	0,761	0,502
HLA-DR+	17,3 [11,2; 25,7]	13,7 [8,0; 22,7]	21,6 [18,4; 26,3]	18,4 [10,7; 21,4]	0,430	0,032^	0,724
CD56+	13,3 [7,2; 21,4]	18,8 [7,4; 23,0]	17,8 [13,8; 21,3]	15,1 [8,4; 26,0]	0,591	0,035	0,391
CD158a+	4,9 [2,6; 9,9]	5,4 [3,1; 7,6]	4,9 [2,5; 8,6]	3,5 [1,9; 8,5]	0,947	0,625	0,461
CD3-CD56+	11,7 [8,4; 15,7]	10,5 [9,7; 13,2]	11,6 [8,2; 14,5]	9,1 [5,1; 13,2]	0,979	0,748	0,233
HLA-DR+	11,7 [6,5; 18,5]	11,4 [6,4; 12,7]	17,6 [12,6; 28,7]	12,7 [8,2; 14,8]	0,373	0,011*	0,748
CD69+	6,8 [4,3;12,1]	7,3 [4,5; 10,3]	7,3 [5,7; 12,9]	10,4 [6,7; 13,4]	0,951	p<0,001	0,211
CD8+	54,9 [45,8; 63,8]	55,7 [52,7; 70,2]	54,7 [50,2; 62,6]	52,0 [29,9; 71,0]	0,433	0,582	0,892
CD158a+	28,5 [18,5; 41,0]	18,9 [14,9; 30,2]	33,2 [21,4; 54,0]	22,0 [15,2; 36,1]	0,109	0,104	0,511
NKT CD3+CD8+CD56+	3,4 [1,7; 6,1]	6,5 [1,6; 7,8]	5,4 [3,3; 6,2]	3,8 [2,5; 8,6]	0,573	0,055	0,538
HLA-DR+	14,7 [8,5; 26,8]	11,9 [3,1; 13,8]	18,5 [11,4; 30,1]	20,7 [10,6; 27,5]	0,290	0,191^	0,691
CD69+	11,3 [7,0; 18,2]	16,9 [13,1; 18,7]	14,1 [7,3; 24,1]	12,1 [7,3; 19,6]	0,247	0,280	0,419
CD158a+	10,5 [5,8; 21,6]	8,0 [2,9; 10,1]	8,4 [3,2; 15,4]	10,5 [6,8; 26,9]	0,137	0,354	0,654
NKT CD3+CD4+CD56+	0,8 [0,4; 1,5]	0,6 [0,2; 1,6]	0,7 [0,5;1,1]	1,2 [0,4; 2,6]	0,440	0,910	0,518
HLADR+	14,6 [7,2; 25,0]	11,5 [6,6; 23,7]	18,9 [11,3; 31,3]	17,6 [7,1; 16,4]	0,714	0,045	0,535
CD69+	9,5 [3,9; 20,0]	8,6 [3,6; 11,3]	9,4 [5,8; 18,6]	10,5 [6,8; 26,9]	0,525	0,817	0,408
CD158a+	5,2 [0,9; 13,7]	3,1 [1,8; 11,3]	4,3 [0,6; 9,5]	1,1 [0,0; 7,5]	0,531	0,577	0,093

між 2 і 1 гр.: *- достовірна різниця; ^- тенденція до достовірності

Дослідження експресії внутрішньоклітинних цитокінів показало достовірне підвищення у вагітних жінок 2 групи, порівняно з нормою у не вагітних (n), рівнів CD3+CD4+-клітин, що експресують прозапальні цитокіни IFN-γ+ і TNF-α (рис. 2, табл. 3). Не виявлено особливостей відносної кількості таких клітин у вагітних 1 і 3 груп, а також Т-хелперів/індукторів з експресією протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10 (табл. 3).

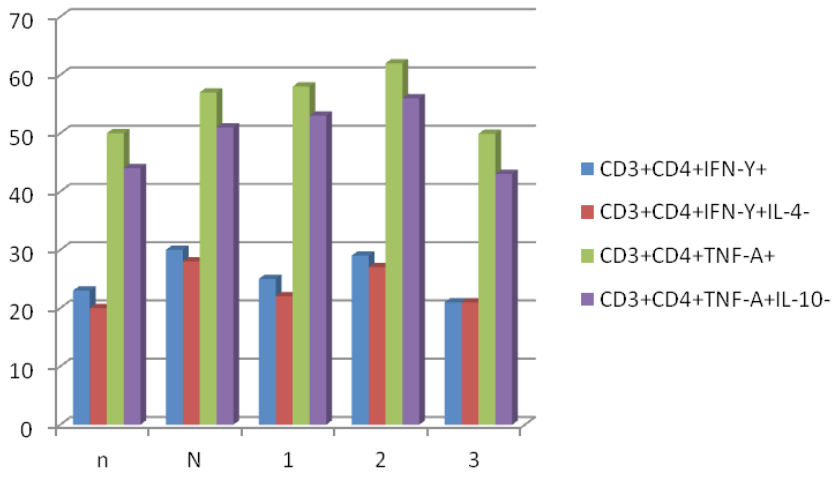


Рис. 2. Середні відносні рівні CD3+CD4+-лімфоцитів з експресією прозапальних внутрішньоклітинних цитокінів у не вагітних референтної групи (n), здорових жінок з тим самим терміном вагітності (N) та у жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі (1-3).

Таблиця 3

Середні відносні рівні Т-лімфоцитів хелперів/індукторів (CD3+ CD4+) з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у не вагітних референтної групи (n) та у жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі (1-3)

Показники CD3+CD4+-	Групи пацієнток				P		
	n	1	2	3	1-n	2-n	3-n
IFN-Y+	23,4 [8,5; 39,6]	25,5 [15,8; 29,5]	28,6 [21,3; 36,1]	18,1 [17,1; 30,7]	0,825	0,029	0,740
IL-4+	5,6 [2,5; 9,3]	6,1 [5,1; 8,4]	7,4 [4,5; 10,6]	12,3 [3,7; 15,1]	0,448	0,125	0,184
IFN-Y+IL-4+	1,8 [0,6; 3,8]	1,9 [1,7; 3,7]	2,4 [1,3; 4,6]	3,4 [0,9; 4,9]	0,599	0,099	0,403
IFN-Y+IL-4-	20,7 [7,9; 28,9]	20,8 [14,2; 27,8]	25,0 [19,2; 32,9]	16,7 [13,1; 27,3]	0,730	0,024	0,730
IL-4+IFN-Y-	3,5 [1,3; 5,9]	4,2 [3,3; 6,6]	3,9 [2,3; 5,3]	4,7 [2,8; 11,7]	0,207	0,321	0,172
TNF-A+	50,1 [21,0; 65,2]	54,0 [43,6; 69,8]	62,3 [48,9; 68,5]	49,9 [35,2; 67,9]	0,131	0,011	0,543
IL-10+	4,7 [0,0; 9,3]	2,4 [0,0; 10,6]	4,4 [1,5; 6,2]	12,1 [0,5; 20,3]	0,825	0,577	0,140
TNF-A+IL-10+	3,0 [0,0; 5,7]	2,4 [0,0; 6,9]	3,2 [0,7; 5,3]	8,3 [0,3; 12,0]	0,857	0,716	0,206
TNF-A+IL-10-	44,7 [18,2; 56,9]	53,9 [46,8; 69,8]	56,3 [45,4; 64,7]	49,6 [32,7; 58,6]	0,053	0,002	0,662
IL-10+ TNF-A-	0,5 [0,0; 3,0]	0,0 [0,0; 3,9]	0,4 [0,0; 1,4]	2,5 [0,1; 9,7]	0,606	0,336	0,175

В той же час, порівняння даних експресії внутрішньоклітинних цитокінів з групою здорових вагітних (280 жінок) в ці терміни 1 триместру (6-10 тижнів) продемонстрували відсутність достовірної різниці з ними середніх рівнів CD3+CD4+IFN-γ+-клітин в 1 і 2 гр. (відповідно, p=0,243 та p=0,889) з тенденцією до зниження в 3 гр. (p=0,056) (можливо, внаслідок невеликої кількості обстежених). Не виявлені також зміни для 1-3 гр за аналізом внутрішньоклітинної експресії іншого прозапального цитокіну TNF-α (p=0,803; 0,787; 0,295), а також протизапального IL-4 (p=0,550; 0,608; 0,183). Інший протизапальний IL-10 достовірно знижений у жінок 2 гр. (p=0,008) порівняно з вагітними без ускладненого анамнезу, тоді як середній рівень CD3+CD4+IL-10+-лімфоцитів в 1 і 3 гр. не відрізнявся (відповідно, p=0,780 і 0,252).

Обговорення і висновки. Проведені дослідження імунної системи вагітних жінок із запальним, ендокринним чи поєднаним (ендокринним і запальним) безпліддям в анамнезі виявили достовірні зміни, в порівнянні з нормою у не вагітних, відносної кількості клітин імунної системи, в тому числі з активаційними маркерами, та їх функціональної активності по продукції прозапальних цитокінів за даними експресії відповідних маркерів (IFN-γ+- та TNF-α+-л) в групі вагітних жінок з безпліддям запального генезу в анамнезі (2 гр.).

Попередні наші дослідження показали, що здорові жінки з таким самим терміном вагітності (6-10 тижнів), як і пацієнтки 2 групи, також мають підвищені рівні Т-лімфоцитів (CD3+) та Т-кілерів (CD3+56+), а також Т-хелперів/індукторів (CD3+CD4+) з експресією ними активаційних маркерів HLA-DR і CD25. Так само особливості у жінок 2 гр. — підвищена активація Т-цитотоксичних (CD3+CD8+) і кілерів (CD3-CD56+) за даними експресії ними маркерів активації HLA-DR обома типами клітин та CD69 останніми — характерні і для вагітних жінок без ускладненого анамнезу. Можна вважати, що виявлені фенотипічні особливості імунокомпетентних клітин пацієнток із запальним характером безпліддя в анамнезі не відрізняються від здорових вагітних в ці терміни часу, хоча і відрізняються від не вагітних жінок. Достовірних відхилень від показників вагітних 1 і 3 гр. за вищеназваними показниками також не виявлено. Таким чином, у вагітних всіх груп з ускладненим анамнезом показники відповідають таким у здорових вагітних на тих самих строках, але активація Т-кілерів і Т-хелперів/індукторів, Т-цитотоксичних і клітин-кілерів більш висока у жінок із запальними гінекологічними процесами в анамнезі, так само як і внутрішньоклітинна секреція прозапальних цитокінів IFN-γ, TNF-α.

В цьому аспекті не можна не звертати увагу на результати інших авторів, що в динаміці вагітності, ускладненої загрозою переривання, змінюється характер цитокінового профілю у вигляді активації Т-х 1 типу за продукцією IL-2 та IFN-γ у першому триместрі з подальшим пригніченням їх функції в другому з підвищенням продукції протизапальних цитокінів [12, 13].

З іншого боку, за нашими попередніми дослідженнями, кількість вагітних з високими рівнями в крові Т-хелперів з внутрішньоклітинною експресією IFN-γ та TNF-α найбільша протягом перших 12 тижнів, з 13 тижня цей показник для TNF-α, а з 20 — IFN-γ не відрізняються від не вагітних. В даному аналізі, у жінок з ендокринними проблемами безпліддя в анамнезі (1 та 3 гр.) число лімфоцитів з маркерами IFN-γ+ та TNF-α+ не відрізняється на перших тижнях вагітності від норми у не вагітних. Можемо вважати це особливістю таких пацієнток, яка потребує більш активного спостереження, в тому числі для нормального розвитку в подальшому протизапальної складової цитокінової ланки для попередження відторгнення плода.

Достовірне зниження продукції IL-10, за даними рівнів CD3+CD4+IL-10+-лімфоцитів, порівняно з вагітними без ускладненого анамнезу, у жінок із запальними процесами як причиною безпліддя в анамнезі можна пояснити тривалою активацією Т-х на тлі хронічної сечостатевої інфекції зі зниженням резервних можливостей лімфоцитів по продукції протизапального IL-10. Вважаємо цей факт прогностично небезпечним для зберігання нормального для перебігу вагітності про-/протизапального цитокінового балансу, на що вказують і інші дослідники [7, 12-14].

Таким чином, обстежені нами жінки з ускладненим анамнезом на перших тижнях вагітності (6-10) не мали суттєвих порушень імунної системи порівняно із вагітними в такі самі терміни без аналогічних особливостей. Але у разі порівняння груп залежно від причини безпліддя в минулому, жінки із запальними процесами геніталій відрізнялись від 1 і 3 групи більш високими рівнями та активацією Т-клітин та їх субпопуляцій, в тому числі за секрецією прозапальних цитокінів з достовірним зниженням протизапального IL-10, що свідчить про доцільність більш уважного спостереження і обстеження цієї групи вагітних для профілактики можливих загроз.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Руденко А.В., Ромащенко О.В., Романенко А.М. та ін.* Роль інфекційних факторів у формуванні порушень репродуктивного здоров`я сім`ї. ПАГ. 2003;2:83–86.
2. *Wira C.R., Rodriguez-Garcia M., Patel M.V.* The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. Nat Rev Immunol. 2015;15(4):217-30. doi: 10.1038/nri3819.
3. *Руденко А.В., Пасєчніков С.П., Ромащенко О.В., Самчук П.О., Яковенко Л.Ф.* Аналіз показників імунітету у жінок репродуктивного віку із гострим неускладненим пієлонефритом у поєднанні із запальними захворюваннями органів малого таза залежно від періоду менструального циклу. Здоровье женщины. 2018;2 (128):31-38. doi 10.15574/HW.2018.128.31.
4. *Левкович М.А., Нефедова Д.Д., Цатурян Л.Д., Бердичевская Е.М.* Иммунологические аспекты проблемы невынашивания беременности. Соврем. пробл. науки и образования. 2016;3:186. http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24850.

5. *Чернишов В.П., Судома І.О., Донской Б.В., Гончарова Л.О.* (). Множинні імунні акцентуації при невдачах імплантації у циклах екстракорпорального запліднення та ефективність застосування внутрішньовенного імуноглобуліну. Журн. НАМН України. 2013;19:212-218.
6. *Piccinni MP, Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, Romagnani S, Le Bouteiller P.* T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. Clin Mol Allergy. 2015:13:19. doi: 10.1186/s12948-015-0015-y.
7. *Веропотвелян П.Н., Веропотвелян Н.П., Гужевская И.В.* Цитокины в системе мать-плацента-плод при физиологическом и патологическом течении беременности. Здоровье женщины. 2013;1(77):126-129.
8. *Salvany-Celades Maria, Zwan Anita, Benner Marilen et al.* Three types of functional regulatory t cells control t cell responses at the human maternal-fetal interface. Cell Reports. 2019;27:2537–2547. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.109.
9. *Wang Wenjuan, Sung Nayoung, Gilman-Sachs Alice and Kwak-Kim Joanne* T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. Front. Immunol. 2020. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02025.
10. *Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж.* Влияние цитокинов на клетки очага воспаления. Проблемы и перспективы современной науки. 2009;2(1): 21-24. https://cyberleninka.ru/article/n/rol-tsitokinov-v-vospalitelnom-protsesse-soobschenie-2/viewer.
11. *Щербаков В.И., Рябиченко Т.И. Скосырева Г.А. Трунов А.Н.* Спектр противовоспалительных цитокинов у беременных с плацентарной недостаточностью и задержкой роста плода. Rossiiskii Vestnik Akushera-Ginekologa . 2019; 19(3):11-16.
12. *Барковский Д.Е.* Изменения Т-хелпер ассоциированных цитокинов при угрозе невынашивания беременности. Запорожский медицинский журнал. 2019;3. DOI: https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019; 3:169191.
13. *Крукиер И.И., Левкович М.А., Михельсон А.Ф. и соавт.* Влияние дисбаланса цитокинов околоплодных вод и сыворотки крови женщины на развитие преждевременных родов. Доктор Ру. 2019;4(159):19–22. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-159-4-19-22.
14. *Lissauer D., Eldershaw S., Inman Ch. et al.* Progesterone promotes maternal–fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. Eur.J.Immunol. 2015;45:2858–2872. https://doi.org/10.1002/eji.201445404.

РЕЗЮМЕ

ФЕНОТИПІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ВАГІТНИХ ЖІНОК, ЯКІ МАЛИ БЕЗПЛІДДЯ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ В АНАМНЕЗІ

[1] Туманова Л.Є., [1] Коломієць О.В., [2] Холод В.В., [2] Величко М.Б.

[1]ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. академіка О.М. Лук’янової НАМН України», м. Київ;

[2]ДУ «Інститут нефрології НАМН України», м. Київ

Вступ. Комплексні клініко-лабораторні дослідження вагітних жінок з вивченням стану їх імунної системи — CD-фенотипу, в тому числі експресією внутрішньоклітинних цитокінів, є актуальними і важливими для розробки тактики спостереження і терапії, особливо у випадках безплідності в анамнезі.

Мета роботи – визначення особливостей рівнів імунокомпетентних клітин крові на основі CD-фенотипа з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у вагітних жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі.

Матеріали і методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра FACSCan (Becton Dickinson, США) і тест-систем Becton Dickinson (США) визначали особливості імунітету з використанням моноклональних антитіл (МКА) до диференційованих антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, маркерів активації (HLA-DR, CD25, CD69), а також внутрішньоклітинну експресію цитокінів (IFN-γ, TNF-α, IL-4 і IL-10) CD3+CD4+-клітинами, у 436 не вагітних (референтна група n), 280 здорових вагітних без ускладненого анамнезу (група N) та 88 вагітних жінок із безпліддям різного генезу в анамнезі.

Результати. Проведені дослідження імунної системи вагітних жінок із ендокринним (1 гр.), перитонеальним (2 гр.) чи поєднаним (ендокринним і трубнозапальним труб-перитонеальним) (3 гр.) характером безпліддя в анамнезі виявили достовірне підвищення у жінок з хронічними інфекціями (2 гр.), порівняно з нормою у не вагітних, відносних рівнів CD3+ та CD3+CD4+-лімфоцитів з високою експресію у них маркерів активації HLA-DR та CD25, так само як і активації CD3+CD8+-, NK T CD3+CD4+CD56+- та CD3-CD56+-лімфоцитів за експресією ними антигенів гістосумісності II класу. Показано також підвищення в порівнянні з здоровими не вагітними, на відміну від інших двох груп, функціональної активності Т-хелперів по продукції прозапальних цитокінів за даними експресії у них відповідних маркерів (IFN-γ+ та TNF-α+) в групі вагітних жінок з безпліддям запального генезу в анамнезі; експресія протизапальних IL-4 та IL-10 не відрізнялась він норми в усіх 3-х групах.

Фенотипічні особливості імунокомпетентних клітин пацієнток із запальним безпліддям в анамнезі, так само як і інших двох груп, не відріз-

няються від здорових вагітних в ці терміни часу (6-10 тижнів), за винятком зниження рівнів у них CD3+CD4+IL-10+-лімфоцитів, що може бути прогностично небезпечним для зберігання нормального про-/протизапального цитокінового балансу.

Висновки. У обстежених всіх груп з ускладненим анамнезом в 1 триместрі досліджені показники не відрізняються від здорових вагітних на тих самих строках, але у жінок із трубно-перитонеальними запальними гінекологічними захворюваннями в анамнезі більш висока, порівняно з не вагітними, активація Т-кілерів, Т-цитотоксичних, натуральних кілерів і Т-хелперів/індукторів, в тому числі за внутрішньоклітинною секрецією прозапальних цитокінів IFN-γ і TNF-α, з достовірним зниженням — протизапального IL-10 при порівнянні з двома іншими групами.

Ключові слова: CD-фенотип, внутрішньоклітинні цитокіни, вагітні, неплідність в анамнезі.

SUMMARY

PHENOTYPIC FEATURES OF IMMUNE CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH HISTORY OF INFERTILITY

[1] Tumanova L., [1]Kolomiiets E., [2]Kholod V., [2]Velichko M.

[1]GU "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician E.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv;

[2]GU "Institute of Nephrology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

Introduction. Comprehensive clinical and laboratory studies in pregnant women to study the state of their immune system – CD phenotype, including the expression of intracellular cytokines, are relevant and important for the development of surveillance and therapy tactics, especially in cases of history of infertility.

The purpose of the study was to determine the characteristics of the levels of immunocompetent blood cells based on the CD phenotype with the expression of intracellular cytokines in pregnant women with a history of infertility of different genesis.

Materials and methods. Using a FACSCan cell cytofluorimeter (Becton Dickinson, USA) and Becton Dickinson Systems Test (USA) was determined using monoclonal antibodies (MKAbs) to differentiated lymphocyte antigens CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, activation markers (HLA-DR, CD25, CD69) and intracellular cytokine expression (IFN-γ, TNF-α IL-4, IL-10) of CD3+CD4+-cells, in 436 non-pregnant (reference group n), 280 healthy pregnant women without complicated history (group N) and 88 pregnant women with a history of infertility of different origins.

Results. Conducted studies of the immune system of pregnant women with endocrine (1 gr.), tubular-peritoneal (2 gr.) and combined (endocrine and tubular-peritoneal) (3 gr) infertility in the history revealed a reliable hanging in women with chronic infections (2 gr.), compared to the norm at the non-pregnant, showed statistically higher level CD3+- and CD3+CD4- lymphocytes with a high expression of markers of activation – HLA-DR and CD25, also as well as activations of CD3+CD8+-, NK T CD3+CD4+CD56+- and CD3-CD56+-lymphocytes an expression of antigens hystocompatibility II. It also showed an increase in the functional activity of T-helpers in terms of the production of pro-inflammatory cytokines in comparison with healthy non-pregnant women and with the other two groups, according to the expression data of their respective markers (IFN-γ + and TNF-α +) in the group of pregnant women with tubular-peritoneal infertility in history; expression of anti-inflammatory IL-4 and IL-10 did not differ from the norm in all 3 groups.

The phenotypic features of immunocompetent cells in patients with a history of inflammatory infertility, as well as in the other two groups, do not differ from healthy pregnant women at these gestation periods (6-10 weeks), except for a decrease in their levels of CD3+CD4+IL-10+ -lymphocytes, which can be prognostically dangerous for maintaining a normal pro-/anti-inflammatory cytokine balance.

Conclusions. In all examined groups with a complicated anamnesis in the 1st trimester, the studied parameters do not differ from healthy pregnant women at the same terms, but in women with a history of tubular-peritoneal inflammatory gynecological diseases, there is a higher activation of T-killers, T-cytotoxic, killer cells and T-helper/inducers, including those with high intracellular secretion of pro-inflammatory cytokines IFN-γ and TNF-α, with a significant decrease in anti-inflammatory IL-10 compared with the other two groups.

Key words: CD-phenotype, intracellular cytokines, pregnant women, history of infertility.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

• **Туманова Лариса Євгеніївна**

доктор медичних наук, професор, завідувачка відділенням профілактики та лікування гнійно-запальних захворювань в акушерстві, ДУ « Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України»
Адреса: Київ-50, вул. П. Майбороди, 8
Тел.: 067-209-22-44
E-mail: laritu@ukr.net

• **Tumanova Larysa**

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the department of prevention and treatment of pus-inflammatory diseases in obstetrics, SI "Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology named after academician O.M. Lukyanova of NAMS of Ukraine"
Address: Kyiv-50, str. P. Majborody, 8
Tel.: 067-209-22-44
E-mail: laritu@ukr.net

- **Коломієць Олена Володимирівна**

  кандидат медичних наук, старший науковий співробітник відділення профілактики та лікування гнійно-запальних захворювань в акушерстві, ДУ « Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. акад. О.М. Лук’янової НАМН України»
  Адреса: Київ-50, вул. Платона Майбороди, 8
  Тел.: 067-776-82-42
  E-mail: doct_helen@ukr.net

- **Холод Валерія Володимирівна**

  кандидат медичних наук, с.н.с. лабораторії імунології ДУ «Інститут нефрології НАМН» України,
  Адреса: Київ-50, вул. Дегтярівська 17-В
  Тел.: 0675069621
  E-mail: nauca@inephrology.kiev.ua

- **Величко Марина Борисівна**

  кандидат медичних наук, с.н.с. ДУ «Інститут нефрології НАМН України», вчений секретар
  Адреса: Київ-50, вул. Дегтярівська 17-В
  Тел.: 044 2259377
  E-mail: nauca@inephrology.kiev.ua

- **Kolomiiets Olena**

  MD, PhD, Senior Researcher, Department of prevention and treatment of pus-inflammatory diseases in obstetrics, SI “Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology named after academician O.M. Lukyanova of NAMS of Ukraine”, Kyiv.
  Address: Kyiv-50, str. Platona Majborody, 8
  Tel.: 067-776-82-42
  E-mail: doct_helen@ukr.net

- **Kholod Valeria**

  MD, PhD, Senior Researcher, laboratory of immunology, SI “Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv-50, str. Degtyarivska 17 B
  Tel.: 0675069621
  E-mail: nauca@inephrology.kiev.ua

- **Velichko Marina**

  MD, PhD, Senior Researcher SI “Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv-50, str. Degtyarivska 17 B
  Tel.: 044 2259377
  E-mail: nauca@inephrology.kiev.ua

Стаття надійшла до редакції 01.04.2022 р.