© Дріянська В.Є., Туманова Л.Є., Коломієць О.В., Холод В.В., Ромащенко О.В., Рябенко О.П., Севастьянова Н.А., 2024

doi: 10.37321/immunology.2024.1-04

УДК: 618.1-078.73

ХАРАКТЕРИСТИКА Т-ЛІМФОЦИТІВ ХЕЛПЕРІВ У ВАГІТНИХ ЖІНОК З БЕЗПЛІДНІСТЮ В АНАМНЕЗІ, ОСОБЛИВОСТІ ЗАЛЕЖНО ВІД ЇЇ ҐЕНЕЗУ

ДРІЯНСЬКА В.Є.[2], ТУМАНОВА Л.Є.[1], КОЛОМІЄЦЬ О.В.[1], ХОЛОД В.В.[2], РОМАЩЕНКО О.В.[2], РЯБЕНКО О.П.[3], СЕВАСТЬЯНОВА Н.А.[2]

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

[2]ДУ «Інститут урології ім. академіка О.Ф.Возіанова НАМН України», м. Київ

[3]Репродуктивна клініка «Надія», м. Київ

Вступ. Сучасний стан народжуваності в Україні є вкрай незадовільним, число безплідних шлюбів складає в середньому 20%, і покращення репродуктивного здоров’я нації – важлива проблема сьогодення. Тому доцільним є виявлення складових імуногенезу вагітності для розробки та використання персоніфікованих підходів для запобігання порушень її перебігу у жінок, особливо з ускладненим анамнезом.

У розпізнаванні та реагуванні на чужорідні антигени в імунній системі беруть участь кілька різних типів клітин, головними з яких є субпопуляції лімфоцитів (л), які продукують медіатори, співвідношення про/протизапальних властивостей яких може грати важливу роль [1-3]. Враховуючи особливості функціональної різноманітності, диференціації та активації лімфоцитів, важливою характеристикою слід вважати їх фенотип з різними кластерами диференціювання (CD), що дає найбільш повну інформацію про лімфоцитарні субпопуляції, що секретують відповідні цитокіни.

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, 2 чи 3 типів [4]. Т-л – ключові клітини адаптивної імунної відповіді, які в процесі розвитку перетворюються в CD3+CD4+ (Т-х) 1, 2 або 3 – Т-регуляторні (Т-рег) з фенотипом CD3+CD4+CD25+FoxP3+, їх активація впливає на фетоплацентарну дисфункцію та, відповідно, перинатальні ускладнення [5]. Т-х1 продукують прозапальні цитокіни: IFN-γ, а також IL-2, TNF-α. Т-х2 секретують IL-4, IL-5, IL-10 та ін., Т-рег IL-10, TGF-β [5].

Цитокіни Т-хелперів 1 і 2 негативно впливають на функціональний стан протилежних клонів: IL-2 пригнічує проліферацію лімфоцитів, індуковану IL-4, і навпаки. Продукти Т-х2 – IL-4 та IL-10 пригнічують активність Т-х по секреції IL-2 та експресію рецепторів до нього на Т- і В-лімфоцитах та природних кілерах. IFN-γ скасовує пригнічення функції цитотоксичних лімфоцитів, що викликане протизапальним IL-4 [6].

CD4+Т-кл – головні регулятори імунної відповіді та толерантності, тому важливі для взаємозв’язку плода і матері, особливу роль грають Т-рег, які обмежують прозапальні та кілерні Т-клітинні реакції [7].

На цей час відомо, що нормальний перебіг вагітності багато в чому визначається співвідношенням імуностимулюючих та імуносупресивних факторів в ендометрії та трофобласті, в регуляції цього балансу важливу роль грає цитокінова мережа. Протягом вагітності важливою є функція Т-рег, цитокіни яких визначаються і в децидуальній тканині, і в клітинах плаценти. Медіатори Т-х2 блокують реакції клітинного імунітету, сприяють розвитку та інвазії трофобласту, а також стимулюють стероїдогенез. Разом з тим, на стан місцевого імунітету може впливати статевий контакт – сперма індукує викид IL-10 та інгібує IFN-γ. TNF-α як ініціатор продукції цитокінів запального каскаду здатний підвищувати також рівень експресії гена протизапального IL-10, який в нормі пригнічує продукцію TNF-α та інших прозапальних цитокінів [8]. Гіперпродукція TNF-α може призводити до зростання кількості апоптотичних клітин трофобласта, так само як і стимулювати екскрецію арахідонової кислоти і продукцію простогландинів міометрієм, що сприятиме ускладненню вагітності [9].

Важливим кластером є CD25, який присутній на активованих CD4+Т-л, але інтенсивність його експресії на Т-рег вище, ніж у інших субпопуляцій [10]. Біологічна функція CD4+CD25+Т-кл – підтримка клонального балансу серед лімфоїдних клітин та запобігання надмірній активації імунної системи, в тому числі через внутрішньоклітинні перфорини та гранзими [11].

Підвищення числа CD4+CD25+-кл може відбуватися при запальних процесах будь-якої етіології (інфекційного та неінфекційного ґенезу, автоімунних захворюваннях та ін.) [12]. Тому актуальним є дослідження рівнів цих регуляторних клітин з експресією протизапального IL-10 у разі нормальної та ускладненої вагітності.

Вагомими причинами порушень фертильності у жінок можна вважати генетичні, ендокринні порушення, хронічні інфекції, проблеми гемостазу та ін., що є загрозою втрати плода на різних термінах вагітності. Хронічні інфекції та ендокринна патологія протягом тривалого часу сприяють порушенню імунного гомеостазу, в тому числі фагоцитарної активності нейтрофілів і макрофагів, змінам Т-клітинної ланки з продукцією відповідних медіаторів, та ін. [13], у зв’язку з чим важливими є визначення особливостей цих складових у жінок з різними причинами проблем вагітності.

Мета роботи – визначення відносного рівня Т-хелперів крові з експресією внутрішньоклітинних цитокінів на різних термінах вагітності жінок із безплідністю в анамнезі, особливостей у разі її різного ґенезу.

Матеріали і методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра FACSCan (Becton Dickinson, США) і тест систем Becton Dickinson (США) – моноклональних антитіл (МКА) до диференційованих антигенів лімфоцитів CD3, CD4 і CD25 – визначали відповідний рівень лімфоцитів крові у 436 невагітних (референтна група, n) та 514 вагітних жінок (ж) (із неплідністю в анамнезі).

Для визначення фенотипу лімфоцитів периферійну кров інкубували із моноклональними антитілами, міченими FITS, PE та PeCy5 згідно з інструкцією виробника BD Bioscience USA, після чого лізували Lysing Solution (BD Bioscience USA) та аналізували на приладі FacScan за допомогою програми CellQeast BD Bioscience USA. Контролі у вигляді неспецифічних мічених антитіл, що рекомендовані виробником, використовували для формування гейтів.

Для визначення внутрішньоклітинних цитокінів у цих жінок зразки крові 100 мкл розводили 300мкл RPMI1640, що містила 5нг/мл PMA (форболмірістатацетат) 5мкг Брефелдіну А та 1мкг іономіцину, та інкубували протягом 4 годин у CO2-інкубаторі Revco (USA). Після інкубації еритроцити лізувались Lysing Solution (BD Bioscience USA) та клітини пермабілізувались Permeabilizing Solution (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) протягом однієї години за t +4°C. Після відмивки зразки аналізувались методом проточної цитометрії на приладі FacScan за допомогою програми CellQeast BD Bioscience USA.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської Декларації (в рамках НДР №0121U110850, яка фінансована НАМН України), всі жінки були проінформовані та дали згоду. Протокол дослідження (№ 6 від 22.10.22) ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи (ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України»).

Аналізували особливості показників у невагітних та вагітних жінок на різних строках в групах (гр): a – 4-7 (140 ж), b – 8-9 (163 ж), c – 10-12 (133 ж), d – 13-18 (63 ж), e – 19-27 (15 ж) тижнів (тиж.) порівняно з групою n та між собою. На другому етапі проведено аналіз показників у 78 жінок залежно від різного ґенезу безплідності в анамнезі, які за термінами вагітності відповідали групам a-c. До 1 гр з ендокринною патологією увійшли 18 вагітних із синдром полікістозних яєчників (СПКЯ), гіперпролактинемією (ГП) та їх поєднанням; до 2 гр – 46 жінок із трубно-перитонеальними запальними гінекологічними захворюваннями в анамнезі – позаматкові вагітності, сактосальпінгси, хронічні рецидивуючі сальпінгоофорити, хронічні метрити, у частини з яких діагностували і хронічні інфекції сечової системи (ХІСС). 3 гр вагітних склали 14 пацієнток з поєднанням гормональних (СПКЯ та ГП) та урогенітальних запальних патологій.

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп’ютері за допомогою пакета програм “SPSS for Windows. Версія 11” та “MedStat”. Для статистичної обробки використовували параметричні – (тест Ст’юдента) або непараметричні (критерій Вілкоксона) методи, достовірною різницею вважали $p<0,05$.

Результати і обговорення. Аналіз відносного рівня Т-х крові, які були високими в a-c гр (відповідно, p=0,010, 0,001 та 0,002), показав достовірне підвищення внутрішньоклітинної експресії цитокінів за даними CD3+CD4+IFNγ+-, CD3+CD4+TNFα+- та CD3+CD4+IL4+-клітин у вагітних жінок груп a-d (рис. 1). Тобто, протягом перших 18 тижнів вагітності відбувається зростання внутрішньоклітинної експресії Т-хелперами прозапальних цитокінів – IFN-γ і TNF-α. Відносна кількість Т-л з IL-4 достовірно перевищує рівень референтної групи у обстежених всіх груп (a-e), а CD3+CD4+IL10+-л – у жінок груп a, c і e (рис. 1).

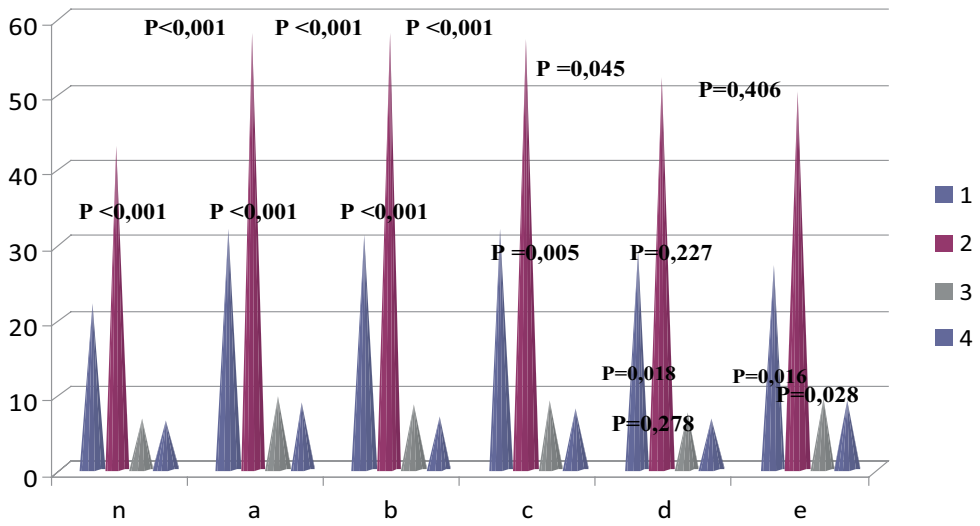


Рис. 1. Середні відносні рівні CD3+CD4+-л з внутрішньоклітинною експресією IFN-γ (1), TNF-α (2), IL-4 (3), IL-10 (4) у невагітних референтної групи (n) та жінок у різні терміни вагітності (a-e)

Можна припустити, що на тлі високої експресії прозапальних IFN-γ та TNF-α відбувається активація Т-х2 та Т-х3 як продуцентів протизапальної складової цитокінової ланки (відповідно, IL-4 та IL-10) зі збереженням балансу для нормального перебігу вагітності. Тому важливим наступним завданням було вивчити особливості співвідношень рівнів клітин крові з експресією про-/протизапальних лімфокінів.

Аналіз показав достовірне підвищення коефіцієнтів CD3+4+IFNγ+/CD3+4+IL4+- та CD3+4+IFNγ+-/CD3+4+IL10+-л у жінок в групі b, а останього показника – і в групі c, в подальшому цей баланс знижується та не відрізняється від норми, а в гр. e, навпаки, достовірно відрізняється в бік превалювання протизапальної складової відношення кількості IFNγ+- до IL-4+- та IL-10+л (рис. 2).

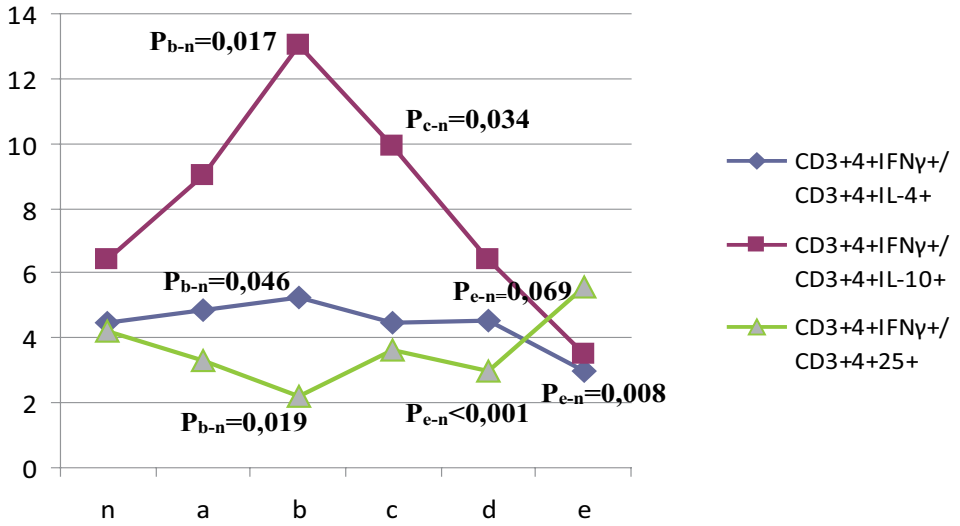


Рис. 2. Середні рівні співвідношень CD3+CD4+IFNγ+- до CD3+CD4+IL4+- та CD3+CD4+IL10+-л, а також Т-л з експресією CD25 у невагітних (n) та жінок у різні терміни вагітності (a-e).

Визначали як відносну кількість важливих для перебігу вагітності CD3+CD4+CD25+-л, що здатні продукувати протизапальні IL-10 та TGF-β, так і співвідношення з ними % Т-кл крові з експресією прозапального IFN-γ. Кількість CD25+-л в групах a-d достовірно підвищена (p<0,05), що свідчить про активацію Т-х на цих термінах вагітності, але співвідношення CD4+IFNγ+-/CD4+CD25+-л не відрізняється від референтної групи; можна вважати, що на перших етапах вагітності (до 20 тиж.) умовне співвідношення числа Т-х1 та Т-х3 не відрізняється від норми, а в період 8-9 тиж. навіть знижується на фоні високого рівня співвідношень внутрішньоклітинної експресії IFNγ з протизапальними IL-4 та IL-10 (рис. 2) з подальшим підвищен-

ням до норми. Після 20 тиж. вагітності показник CD3+CD4+IFNγ+-/CD3+CD4+CD25+-л має тенденцію до підвищення одночасно зі зниженням співвідношення функціональної активності Т-х1 до Т-х2 та Т-х3 за експресією відповідних цитокінів порівняно з n.

Так само динамічно знижувались співвідношення Т-х з експресією TNF-α до IL-4 та IL-10 з достовірним зниженням CD3+CD4+TNFα+-/CD3+CD4+IL4+-л в групі е порівняно як з нормою, так і іншими групами (рис. 3). Коефіцієнт CD3+CD4+TNFα+-/CD3+CD4+IL10+-л в останній групі мав тенденцію до зниження порівняно з референтними даними та достовірно нижче – з групою с (рис. 3).

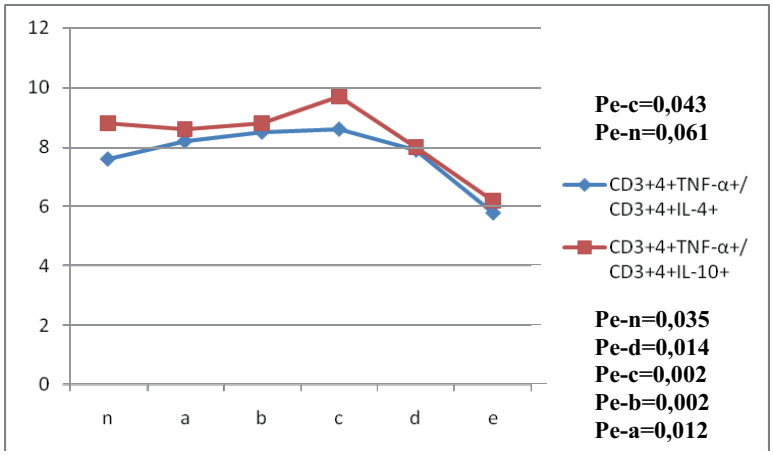


Рис. 3. Середні рівні співвідношень CD3+CD4+TNFα+- до CD3+CD4+IL4+- та CD3+CD4+IL10+-лімфоцитів у невагітних (n) та жінок у різні терміни вагітності (a-e).

Аналіз відносних рівнів клітин імунної системи за даними їх CD-фенотипу у жінок із безпліддям різного ґенезу в анамнезі виявив достовірне підвищення у пацієнток 2 гр. відносних рівнів CD3+- (p=0,019), CD3+CD4+- (p=0,009) та CD3+CD4+CD25+-л (p=0,002) з тенденцією до підвищення середніх рівнів Т-л та Т-х з експресією маркера активації CD25 в 3 гр. – відповідно, p=0,090 та p=0,064. Достовірних змін відносної кількості цих клітин у жінок 1 гр. не виявлено (відповідно, p=0,420; 0,401 та 0,220).

Експресія внутрішньоклітинних прозапальних цитокінів достовірно підвищена у вагітних 2 гр. порівняно з n за даними % CD3+CD4+IFNγ+ – 28,59 (21,29; 36,12) проти 23,36 (8,49; 32,49) (p=0,029) та CD3+CD4+TNFα+-кл – 62,32 (48,88; 68,51) проти 50,06 (20,96; 65,15) (p=0,011). Не виявлено особливостей відносної кількості таких клітин у вагітних 1 і 3 гр., а також Т-х з експресією IL-4 та IL-10 (p>0,05).

Аналіз співвідношень цих клітин виявив достовірні зміни лише в 3 гр. – зниження CD3+CD4+IFNγ+-/CD3+CD4+IL10+- та CD3+CD4+IFNγ+-/CD3+CD4+CD25+-л порівняно з n та іншими групами – відповідно, з 2 та 1 гр. (рис. 4-5).

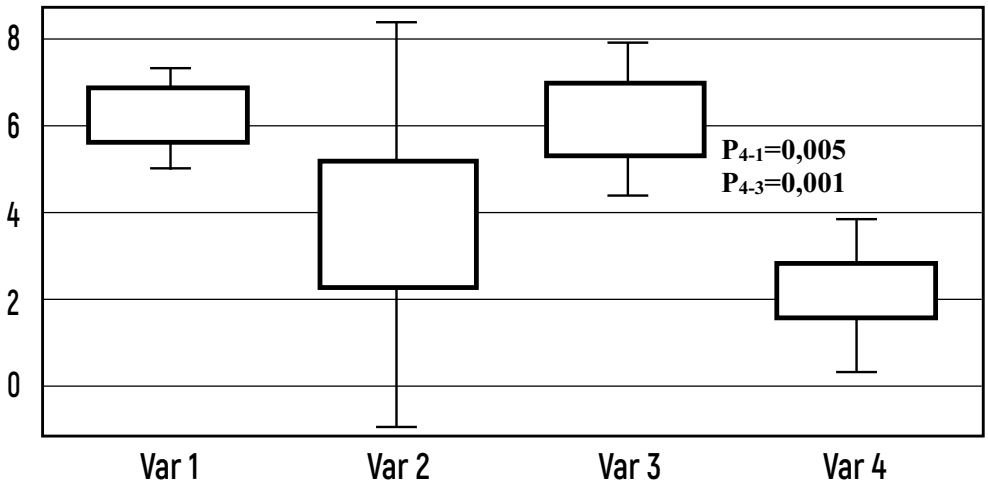


Рис. 4. Середні рівні співвідношень CD3+CD4+IFN-γ+- до CD3+CD4+IL10+-л у невагітних (Var1) та жінок 1-3 груп (Var2-Var4).

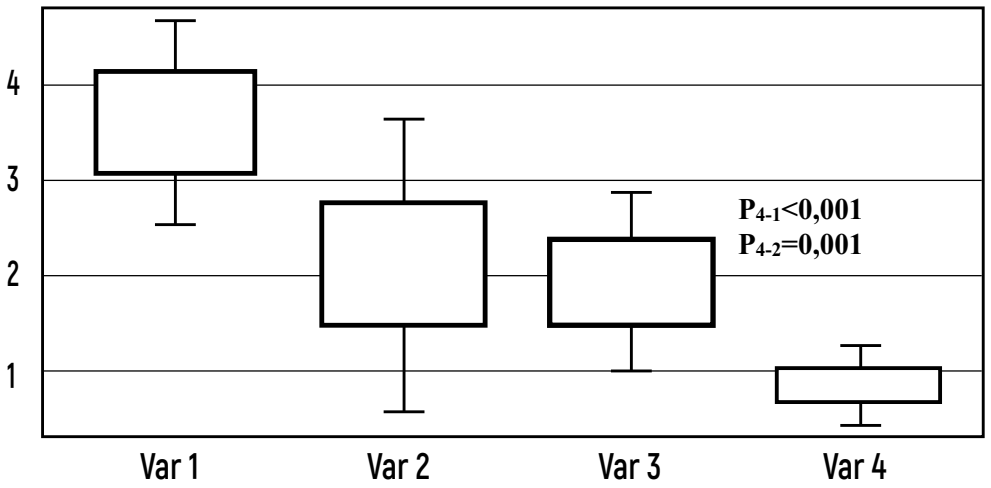


Рис. 5. Середні рівні співвідношень CD3+CD4+IFNγ+- до CD3+CD4+CD25+-л у невагітних (Var1) та жінок 1-3 груп (Var2-Var4).

У жінок 3 гр. також виявлено тенденцію до зниження співвідношення відносного рівня Т-х з TNF-α та IL-10 (p=0,076), тоді як CD3+CD4+TNFα+IL10-/CD3+CD4+IL10+-л – достовірно знижене порівняно з n (рис. 6).

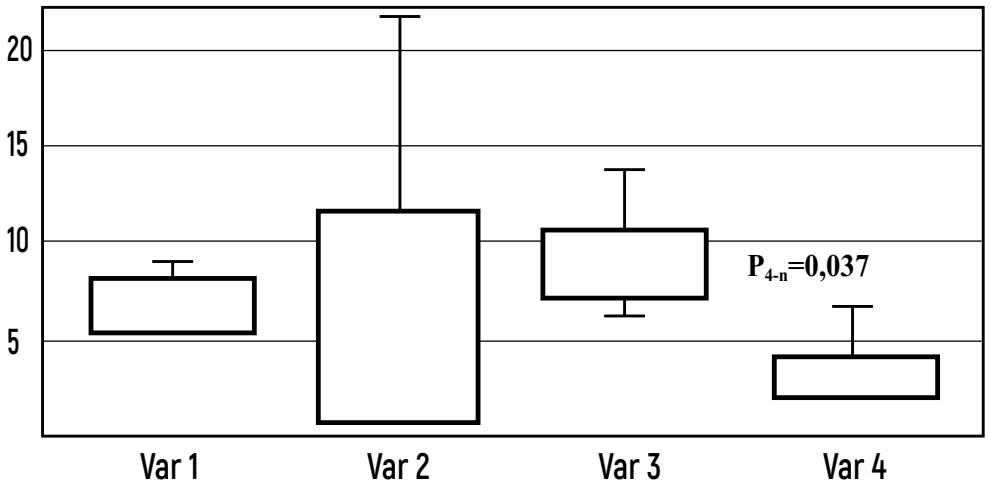


Рис. 6. Середні рівні співвідношень CD3+CD4+TNF-α+IL10- до CD3+CD4+IL10+-л у невагітних референтної групи – n (Var1) та жінок 1-3 груп (Var2-Var4).

Отже, у разі більш складної патології в анамнезі баланс функціональної активності Т-х за даними внутрішньоклітинної експресії цитокінів відрізняється від інших вагітних у такі терміни та груп 1-2, при цьому не можна виключати зниження резервних можливостей клітин у таких жінок на тлі тривалої активації в анамнезі.

Проведені дослідження показали, що перший триместр вагітності у жінок із безплідністю в анамнезі характеризується, порівняно з невагітними, високим рівнем в крові Т-х (CD3+CD4+-кл), а протягом перших 18 тижнів – високою внутрішньоклітинною експресією прозапальних цитокінів за даними CD3+CD4+IFNγ+- та CD3+CD4+TNFα+-л, з підвищенням відсотку CD3+CD4+IL4+-л протягом всіх 27 тижнів спостереження, а CD3+CD4+IL10+-кл – перші 7 тиж. та після 20 тиж., коли показники експресії протизапальних цитокінів, на відміну від IFN-γ і TNF-α, достовірно перевищували норму. Це узгоджується з теорією Т-х2-концепції вагітності, яка має лабораторні та клінічні підтвердження щодо здатності розчинних факторів клітин трофобласту змінювати Т-х1/Т-х2-баланс у бік переважання Т-х2-механізмів, які підтримують стан толерантності до антигенів батька [14].

Виявлено достовірне підвищення в крові середніх показників Т-л (CD3+) з відповідними маркерами – CD4+IFNγ+/CD4+IL4+- та CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-л у жінок першого три-

местру вагітності, в подальшому (13-18 тиж.) цей баланс знижується до норми, а з 19 тиж. достовірно превалюють протизапальні складові – знижені коефіцієнти IFNγ+-/IL4+- та IFNγ+-/IL10+-кл. Так само в цей період – кінця 2 триместру та на початку 3 достовірно знижений показник CD4+TNFα+-/CD4+IL4+-л з тенденцією до зниження CD4+TNFα+-/CD4+IL10+-л. Можна вважати, що протягом перших 12 тиж. вагітності має місце превалювання прозапальних реакцій з певними ризиками для перебігу вагітності у жінок з ускладненим анамнезом у минулому.

Наші результати узгоджуються з публікаціями про те, що загроза переривання вагітності супроводжується активацією Т-х1 у першому триместрі з подальшим зниженням їх функції у другому на тлі підвищення продукції протизапальних цитокінів Т-х2 [15]. А посилення продукції про- та зниження протизапального IL-10 і, відповідно, підвищення коефіцієнту Т-х1/Т-х3, у навколоплідних водах жінок з передчасними пологами порушує баланс у між- та внутрішньоклітинній цитокіновій мережі, що негативно впливає на систему «мати-плацента-плод» [15].

Таким чином, на перших етапах вагітності (до 13 тиж.) умовне співвідношення числа Т-х1 до Т-х2 та Т-х3 крові підвищено, надалі не відрізняється від норми, а з 20 тиж. відбувається девіація в інший бік, що можна трактувати як позитивну динаміку співвідношення продукції про/протизапальних цитокінів цими клітинами порівняно з більш ранніми строками вагітності.

Аналіз вищенаведених показників залежно від ґенезу безплідності виявив підвищену експресію внутрішньоклітинних прозапальних цитокінів у вагітних жінок з хронічними запальними захворюваннями сечостатевої системи (2 гр.) порівняно зі здоровими невагітними за даними рівнів CD4+IFNγ+- та CD4+TNFα+-л, без змін % цих клітин крові у вагітних 1 і 3 груп, так само як експресії протизапальних IL-4 та IL-10.

Але аналіз співвідношень Т-х, що ескпресують різні цитокіни, виявив достовірні зміни в 3 гр., тобто у разі комплексної патології (ендокринна + хронічні інфекції) в анамнезі – зниження CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-кл та CD4+IFNγ+-/CD4+CD25+-кл порівняно з нормою та іншими групами, що опосередковано свідчить про зниження балансу Т-х1 та Т-х3, можливо, обумовленого тривалою активацією зі зниженням функціональної активності перших по секреції IFN-γ+ та виявленою тенденцією до підвищення активації других за даними експресії маркера CD25.

Це узгоджується з тим, що цитокіновий профіль значною мірою визначає імунну відповідь, а механізми, задіяні в хронізації інфекції (ще й на тлі гормональних порушень), пов’язані з Th1/Th2, Th3 клітинним дисбалансом [6, 11, 12].

Достовірно зниженим у жінок цієї групи є і показник CD4+TNFα+IL10-/CD4+IL10+-л; звертає увагу, що коефіцієнт CD4+TNFα+/CD4+IL-10+-л має лише тенденцію до зниження (p=0,076). Це можна пояснити тим, що ті ж самі клітини секретують обидва цитокіна, і для уявлення про співвідношення про/протизапальних реакцій доцільно звертати увагу на клітини, що експресують тільки TNF-α – ...TNFα+IL-10- до ...IL-10+-л.

Можливо, відсутність у пацієнток 1 та 3 гр., виявлених на першому етапі у вагітних жінок з ускладненим анамнезом підвищення відносного рівня Т-х з експресією прозапальних IFN-γ та TNF-α пояснюється невеликою кількістю обстежених цих груп порівняно з 1 триместром всіх вагітних (436), але не можна виключати вплив тривалих гормональних порушень на стан функціональної активності хелперної ланки імунітету, що узгоджується з публікаціями щодо порушень імунітету у таких пацієнток [16, 17]. Останнє припущення підтверджують дані достовірного зниження показників CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-л та CD4+TNFα+IL10-/CD4+IL10+-л в 3 гр., на відміну від вагітних на тих самих строках (4-12 тиж.).

Результати проведених досліджень узгоджуються з рядом інших публікацій [18-19] і надають важливу інформацію про зміни функціональної активності Т-х периферичної крові для визначення предикторів перебігу вагітності у жінок із безплідністю в анамнезі, в тому числі залежно від її можливих причин.

Висновки:

У вагітних жінок з безплідністю в анамнезі протягом першого триместру вагітності виявлено достовірне підвищення в крові відносного рівня Т-хелперів (CD3+CD4+) з підвищенням їх активації за даними CD25+-л.

Виявлено достовірне підвищення середніх рівнів Т-хелперів крові з внутрішньоклітинною секрецією прозапальних цитокінів – IFN-γ+- та TNF-α+-л протягом перших 18 тижнів вагітності, з одночасним – протизапального IL-4 протягом всього терміну спостереження (27 тиж.).

Показано підвищення співвідношень відносного рівня клітин-продуцентів про/протизапальних лімфокінів (Т-х1 до Т-х2, Т-х3) за даними CD3+CD4+IFNγ+/CD3+CD4+IL4+- та CD3+CD4+IFNγ+-/CD3+CD4+IL10+-л у жінок протягом 1 триместру, в подальшому ці показники знижуються та не відрізняються від групи невагітних, а з 20 тиж. – достовірно знижені (відповідно, p<0,001 та p=0,008).

Аналіз залежно від ґенезу безплідності в анамнезі (ендокринного/запального) проде-

монстрував у жінок із хронічними запальними урогінекологічними захворюваннями (2 гр.) більш високий відносний рівень CD3+CD4+T-х (p=0,009), серед яких CD4+IFNγ+- (p=0,029) і CD4+TNFα+-л (p=0,011).

У жінок 3 гр. достовірно знижено середнє співвідношення CD3+CD4+IFNγ+-/CD3+CD4+IL10+-кл порівняно з нормою – p=0,005 (на відміну від показників цього триместру у всіх обстежених вагітних), та іншими групами (1-2), що свідчить про порушення балансу функціональної активності Т-х1 та Т-х3 у разі змішаної патології в анамнезі.

Інформація про внесок кожного учасника:

Вікторія Дріянська: аналіз результатів імунологічних досліджень, написання частини статті; ORCID ID: 0000-0002-2586-5532

Лариса Туманова: концепція дослідження і її мета, узагальнення клінічних результатів; ORCID ID: 0000-0002-4202-943X

Олена Коломієць: відбір пацієнток для обстеження, формування бази вагітних та інтерпретація клінічних даних; ORCID ID: 0000-0003-4511-1663

Валерія Холод: статистичний аналіз отриманих результатів, написання частини статті;

Оксана Ромащенко: аналіз частини клінічних даних, редакція і корекція статті; ORCID ID: 0000-0002-0544-8758

Наталія Севастьянова: формування бази даних імунологічних досліджень та аналіз отриманих даних.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Yu L., Zhang Y., Xiong J., Liu J., Zha Y., Kang Q., Zhi P., Wang Q., Wang H., Zeng W., Huang Y.* Activated γδ T Cells With Higher CD107a Expression and Inflammatory Potential During Early Pregnancy in Patients With Recurrent Spontaneous Abortion. Front Immunol. 2021; 12:724662. doi: 10.3389/fimmu.2021.724662.
2. *Li D., Zheng L., Zhao D., Xu Y., Wang Y.* The Role of Immune Cells in Recurrent Spontaneous Abortion. Reprod Sci.2021; 8:1–13. doi: 10.1007/s43032-021-00599-y.
3. *Terzieva A., Dimitrova V., Djerov L., Dimitrova P., Zapryanova S., Hristova I. et al.* Early Pregnancy Human Decidua Is Enriched With Activated, Fully Differentiated and Pro-Inflammatory Gamma/Delta T Cells With Diverse TCR Repertoires. Int J Mol Sci. 2019; 20(3):687. doi: 10.3390/ijms20030687.
4. *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.
5. *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.
6. *Xiaoliang Zhu and Jinfang Zhu.* CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21:8011; doi:10.3390/ijms21218011.
7. *Hellberg Sandra, Raffetseder Johanna, Rundquist Olof, Magnusson Rasmus.* Progesterone Dampens Immune Responses in In Vitro Activated CD4+ T Cells and Affects Genes Associated With Autoimmune Diseases That Improve During Pregnancy. Front. Immunol. 2021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672168.
8. *Piccinni M.P., 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;13:9. doi: 10.1186/s12948-015-0015-y.
9. *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.
10. *Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A.* CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J. Immunol. 2001; 167(3):1245-53. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.
11. *Saraiva Margarida, Vieira Paulo, O’Garra Anne.* Biology and therapeutic potential of interleukin-10. J Exp Med. 2020; 217(1). doi.org/10.1084/jem.20190418.
12. *Chatila T.A.* Role of regulatory T cells in human diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 2005; 116(5):949-59. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.08.047.
13. *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.
14. *Liu F., Guo J., Tian T., Wang H., Dong F., Huang H., Dong M.* Placental trophoblasts

shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. APMIS. 2011; 119:597-604.

15. *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.
16. *Хміль М.С., Хміль-Досвальд А.С., Хміль С.В.* Синдром полікістозних яєчників як чинник ендокринного безпліддя. Вісник медичних і біологічних досліджень/Bulletin of Medical and Biological Research. 2019; 2:77-83. DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2019.2.10607.
17. *Гафійчук Р.Г.* Функція імунної системи при синдромі виснажених яєчників у жінок із безпліддям. Буковинський медичний вісник.2011; 15(3):7-11.
18. *Бендас В.В.* Неплідність та деякі імунологічні фактори, що її спричиняють. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2017; 98(1):36-38. www.kiai.com.ua.
19. *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.

РЕЗЮМЕ

ХАРАКТЕРИСТИКА Т-ЛІМФОЦИТІВ ХЕЛПЕРІВ У ВАГІТНИХ ЖІНОК З БЕЗПЛІДНІСТЮ В АНАМНЕЗІ, ОСОБЛИВОСТІ ЗАЛЕЖНО ВІД ЇЇ ҐЕНЕЗУ

ДРІЯНСЬКА В.Є.[2], ТУМАНОВА Л.Є.[1], КОЛОМІЄЦЬ О.В.[1], ХОЛОД В.В.[2], РОМАЩЕНКО О.В.[2], РЯБЕНКО О.П.[3], СЕВАСТЬЯНОВА Н.А.[2]

[1]ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. академіка О.М. Лук’янової НАМН України», м. Київ
[2]ДУ «Інститут урології ім. акад. О.Ф.Возіанова НАМН України», м. Київ
[3]Репродуктивна клініка «Надія», м. Київ

Вступ. Дослідження імуногенезу вагітності у жінок з ускладненим анамнезом є важливою складовою їх персоніфікованого спостереження для підвищення народжуваності при її низькому рівні в Україні.

Мета роботи – визначення відносного рівня Т-хелперів крові з експресією внутрішньоклітинних цитокінів на різних термінах вагітності жінок із безплідністю в анамнезі, особливостей у разі її різного ґенезу.

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 (л) CD3, CD4, CD25, а також внутрішньоклітинну експресію цитокінів (IFN-γ, TNF-α, IL-4 і IL-10) CD3+CD4+-клітинами, у 436 невагітних (референтна група n), 514 жінок (ж) у першому та другому триместрах вагітності із безплідністю в анамнезі, особливості залежно від її ґенезу у 78 пацієнток.

Результати та їх обговорення. У вагітних жінок із безплідністю в анамнезі на тлі високого середнього рівня в крові Т-х (CD3+CD4+-кл), порівняно з нормою (n), протягом першого (1-го) триместру виявлено достовірне підвищення (з початку, і до 19-20 тижнів) клітин з внутрішньоклітинною експресією прозапальних цитокінів (IFN-γ+ та TNF-α), а також протизапального IL-4 протягом всіх 27 тижнів спостереження. Співвідношення відносного рівня CD3+CD4+IFNγ+-л до Т-х з експресією IL-4 та IL-10 підвищені у жінок протягом 1-го триместра, в подальшому ці показники знижуються до норми та стають нижче від неї з 20 тиж.

Дослідження відносного рівня Т-х вагітних жінок із ендокринним (1 гр.), запальним трубно-перитонеальним (2 гр.) чи поєднаним (ендокринним і трубно-перитонеальним) (3 гр.) характером безплідності в анамнезі виявили у жінок з хронічними інфекціями (2 гр.), достовірне підвищення порівняно з n відносних рівнів CD3+- та CD3+CD4+-л з високою експресією IFN-γ і TNF-α в цій групі порівняно з n та іншими двома групами; середні показники IL-4 та IL-10 не відрізнялись він норми в усіх 3 групах. У жінок з комбінованою патологією в анамнезі достовірно знижене співвідношення CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-л порівняно як з n, так і з 2 гр.

Висновки. Зміни рівня CD3+CD4+-л крові та внутрішньоклітинної експресії ними цитокінів підтверджують участь Т-х1, -2, -3 в механізмах вагітності на різних її етапах. У жінок із хронічними запальними захворюваннями в анамнезі більш висока, порівняно з невагітними, кількість клітин з внутрішньоклітинною секрецією прозапальних цитокінів IFN-γ і TNF-α, з достовірним зниженням CD4+IFN-γ+-/CD4+IL10+-кл в 3 гр., що свідчить про порушення балансу активності Т-х1 та Т-х3 у разі змішаної патології (ендокринної + трубно-перитонеальної) в анамнезі цих жінок.

Ключові слова: CD3+CD4+-лімфоцити, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 та їх співвідношення, вагітні з безплідністю в анамнезі.

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF T-HELPERS IN PREGNANT WOMEN WITH A HISTORY OF INFERTILITY, SPECIAL FEATURES DEPENDING ON ITS GENESIS

DRIIANSKA V.E.[2], TUMANOVA L.E.[1], KOLOMIIETS E.V.[1], KHOLOD V.V.[2], ROMASCHENKO O.V.[2], RYABENKO O.P.[3], SEVASTYANOVA N.A.[2]

[1]GU “Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician E.M. Lukianova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine,” Kyiv
[2]GU “Institute of Urology named after Acad. O.F. Vozianov National Academy of Sciences of Ukraine”, Kyiv
[3]Reproductive Clinic “Nadia”, Kyiv

Introduction. Research on the immunogenesis of pregnancy in women with complicated anamnesis is an important component of their personalized

monitoring to increase the birth rate at its low level in Ukraine.

The purpose of the study was to determine the relative levels of T-helpers (T-h) in blood, the expression of intracellular cytokines in different periods of pregnancy of women with a history of infertility, the features in the case of its 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 (l) antigens CD3, CD4, CD25 and intracellular cytokine expression (IFNγ, TNFα IL4, IL10) of CD3+CD4+-l, in 436 non-pregnant (reference group n) and 514 women (w) in the first and second trimesters of pregnancy with a history of infertility, features depending on its genesis in 78 patients.

Results and discussion. In pregnant women with a history of infertility against the background of a high average level in the blood of T-h (CD3+CD4+-l) compared to the norm (n) during the first (1st) trimester, a significant increase was found (initially and up to 19-20 weeks) of cells with intracellular expression of pro-inflammatory cytokines (IFNγ+ and TNFα), as well as anti-inflammatory IL-4 during all 27 weeks of observation. The ratio of the relative level of CD3+CD4+IFNγ+-l to T-h with the expression of IL4 and IL10 is increased in women during the 1st trimester, later these indicators decrease to the norm (n) and become below it from the 20th week.

A study of the relative level of T in pregnant women with endocrine (1 gr.), inflammatory tube-peritoneal (2 gr.) or combined (endocrine and tube-peritoneal) (3 gr.) character of infertility in the anamnesis found in women with chronic infections (2 gr.) a significant increase compared to n relative levels of CD3+- and CD3+CD4+-l with high expression of IFNγ and TNFα in this group compared to n and the other two groups; average indicators of IL4 and IL10 did not differ from the norm in all 3 groups. In women with a history of combined pathology, the ratio of CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-l was significantly reduced compared to both n and 2 gr.

Conclusions. Changes in the level of CD3+CD4+-l in blood and their intracellular expression of cytokines confirm the participation of T-x1, -2, -3 in the mechanisms of pregnancy at its various stages. Women with a history of chronic inflammatory diseases have a higher number of cells with intracellular secretion of pro-inflammatory cytokines IFNγ and TNFα, with a significant decrease in CD4+IFNγ+-/CD4+IL10+-l in 3 gr., which indicates a violation of the balance of T-x1 and T-x3 activity in the case of mixed pathology (endocrine + tube-peritoneal) in the anamnesis of these women.

Key words: CD3+CD4+ lymphocytes, IFNγ, TNFα, IL4, IL10 and their ratio in pregnant women with a history of infertility.

Conflict of interest statement. The authors declare no competing interest.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

- **Дріянська Вікторія Євгенівна**

  Д.мед.н., професорка, головна наукова співробітниця лабораторії імунології ДУ «Інститут урології ім. академіка О.Ф.Возіанова НАМН України»
  Адреса: Київ-50, вул. Дегтярівська, 17-В
  Тел.: +38 0675069622
  E-mail: victoriadriyanskaya@gmail.com

- **Туманова Лариса Євгенівна**

  Д.мед.н., професорка, 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.: +38 067-209-22-44
  E-mail: laritu@ukr.net

- **Коломієць Олена Володимирівна**

  Д.мед.н., головна наукова співробітниця 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.: +38 067-776-82-42
  E-mail: doct_helen@ukr.net

- **Driianska Viktoriia**

  Doctor of Medical Sciences, Professor, Senior Researcher laboratories of immunology SI “Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv-50, str. Degtyarivska 17 B
  Tel.: +38 0675069622
  E-mail: victoriadriyanskaya@gmail.com

- **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. Lukianova of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv-50, str. P. Maiborody, 8
  Tel.: +38 067-209-22-44
  E-mail: laritu@ukr.net

- **Kolomiiets Olena**

  Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Department of prevention and treatment of pus-inflammatory diseases in obstetrics, SI “Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology named after acad. O.M. Lukianova of NAMS of Ukraine”, Kyiv.
  Address: Kyiv-50, str. Pl. Maiborody, 8
  Tel.: +38 067-776-82-42
  E-mail: doct_helen@ukr.net

- **Холод Валерія Володимирівна**

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

- **Ромащенко Оксана Василівна**

  Д.мед.н., професорка, головна наукова співробітниця ДУ «Інститут урології ім. акад. О.Ф. Возіанова НАМН України»
  Адреса: Київ-53, вул. В.Винниченка, 9а
  Тел.: 044 486 9984
  E-mail: zakon@i.ua

- **Рябенко Олена Павлівна**

  К.мед.н., завідувачка жіночої консультації репродуктивної клініки «Надія», м. Київ Адреса: Київ, вул. Максима Кривоноса, 19а
  Тел.: 0675224209
  E-mail: info@ivf.com.ua

- **Севастьянова Наталія Анатоліївна**

  К.мед.н., провідна наукова співробітниця, ДУ «Інститут урології ім. акад. О.Ф.Возіанова НАМН України»
  Адреса: Київ-53, вул. В.Винниченка, 9а
  Тел. 044 486 9984
  E-mail: utiainew@gmail.com

- **Kholod Valeriia**

  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

- **Romaschenko Oksana**

  Doctor of Medical Sciences, Professor, chief researcher SI “Institute of Urology named after Acad. O.F. Vozianov of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv, str. Vynnychenko 9a
  Tel.: 044 486 9984
  E-mail: zakon@i.ua

- **Riabenko Olena**

  MD, PhD, Head of the Female Consultation of the Reproductive Clinic “Nadia”, Kyiv
  Address: Kyiv, str. Maksyma Kryvonosa, 19a
  Tel.: 0675224209
  E-mail: info@ivf.com.ua

- **Sevastyanova Natalia**

  MD, PhD, Leading Researcher, SI “Institute of Urology named after Acad. O.F. Vozianov of NAMS of Ukraine”
  Address: Kyiv-53, str. Vynnychenko 9a
  Tel.: 044 486 9984
  E-mail: utiainew@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 05.02.2024 р.