

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ЗНАЧИМОСТЬ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ CD69 ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗА ИСХОДОВ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Л.В. Ванько, М.А. Николаева, Е.В. Инвиева*, Н.К. Тетруашвили

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4; *эл. почта: e_inviyeva@oparina4.ru

Цель данной работы заключалась в фенотипической характеристике Т- и NK-лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих ранний маркер активации CD69, и оценке значимости этого маркера для прогноза исхода беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем (ИПВ) до и после проведения иммуноцитотерапии (ИЦТ). Группу исследования составили 36 пациенток с ИПВ, которые забеременели после предгестационной аллоиммунизации, у 30 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, у 6 — прервалась до 12 недель гестации. В контрольной группе обследовано 11 женщин в 12 недель физиологической беременности. Оценка экспрессии CD69 у женщин с пролонгированной беременностью выявила отсутствие значимых различий с контрольной группой по содержанию и доле активированных лимфоцитов (CD69⁺). У женщин с прервавшейся беременностью после предгестационной ИЦТ обнаружено увеличение количества практически всех анализируемых субпопуляций лимфоцитов, отвечающих на активационный стимул, с яркой тенденцией к увеличению доли активированных Т-, но не NK-лимфоцитов. В 5-6 недель доля активированных лимфоцитов среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺/CD3⁺CD8⁺CD69⁺) у этих женщин была значимо выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью, что подтверждает ведущую роль в реакциях отторжения плода эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов. Таким образом, проведенные исследования показали перспективность оценки экспрессии раннего активационного маркера CD69 как дополнительного лабораторного критерия для персонализированного назначения ИЦТ женщинам с привычным выкидышем.

Ключевые слова: привычный выкидыш; иммуноцитотерапия; экспрессия CD69; Т-лимфоциты; NK-клетки

DOI: 10.18097/PBMC20206606477

ВВЕДЕНИЕ

Оценка способности иммунокомпетентных клеток отвечать на активационный стимул *in vitro* является важным этапом в исследовании механизмов нарушения функций иммунной системы, приводящих к формированию различных патологий, в том числе и симптомокомплекса невынашивания беременности. В качестве раннего маркера активации клеток может использоваться экспрессия CD69 — мембранного гликопротеина, коррелирующая с пролиферацией Т-лимфоцитов, их дифференцировкой и интенсивностью воспалительных процессов [1]. Гликопротеин CD69 своей цитоплазматической частью взаимодействует с белками сигнальных путей Jak3/Stat5, которые регулируют, с одной стороны, экспрессию транскрипционного фактора RORγt, способствуя дифференцировке Т-хелперов в направлении линии Th17-клеток, а с другой — экспрессию FOXP3, направляя дифференцировку Т-хелперов к развитию Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией (Трег) [2]. Эти особенности позволяют считать CD69 естественным модулятором программ Т-клеточной дифференцировки и баланса Th17/Трег-клеток, нарушение которого рассматривается в качестве патогенетического фактора различных воспалительных процессов [2-5]. Ранее считалось, что в отличие от Т-лимфоцитов активация NK-клеток связана не с пролиферацией,

а с эффекторной функцией, но позже была обнаружена связь активации NK-клеток с увеличенной экспрессией CD69 после стимулирующего сигнала и их пролиферацией [6, 7].

С реакцией материнской иммунной системы на отцовские антигены, происходящей на самых ранних её этапах, связывают успех беременности, поскольку нарушения процессов активации, пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов и NK-клеток могут препятствовать формированию толерантности материнской иммунной системы к отцовским антигенам или способствовать её срыву, что и может быть причиной самопроизвольных прерываний беременности в ранние сроки гестации. Дефекты процессов активации, пролиферации и дифференцировки иммунных клеток приводят к несовершенному контролю интенсивности развивающихся воспалительных процессов в ранние сроки беременности, нарушениям взаимоотношений иммунной системы матери и плода, и в конечном итоге к формированию симптомокомплекса идиопатического привычного выкидыша (ИПВ) [8].

Примеры успешного применения такой иммунокорригирующей терапии как аллоиммунизация женщин лимфоцитами супруга (иммуноцитотерапия, ИЦТ) для лечения ИПВ подтверждают участие иммунных механизмов в процессах, приводящих к потере беременности, и возможность

их нормализации, однако механизмы её действия до сих пор остаются неясными [9]. В частности, для понимания роли иммунных (клеточных) механизмов в патогенезе прерывания беременности большое значение имеет выявление изменений экспрессии лимфоцитами маркера ранней активации CD69 при проведении ИЦТ у женщин, беременность которых на фоне проведения ИЦТ закончилась выкидышем в I триместре или была пролонгирована до рождения жизнеспособного ребёнка.

Цель данной работы заключалась в фенотипической характеристике Т- и NK-лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих ранний маркер активации CD69, и оценке значимости экспрессии CD69 для прогноза исхода беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем до и после проведения иммуноцитотерапии.

МЕТОДИКА

В исследование были включены 36 пациенток с ИПВ, которые забеременели после ИЦТ, у 30 из них беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребёнка, у 6 — прервалась до 12 недель гестации. В контрольной группе обследовано 11 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Критерии включения в группу исследования: наличие не менее 2 выкидышей от одного и того же партнёра, произошедших в первом триместре, отсутствие анатомических, генетически обусловленных, аутоиммунных, тяжёлых экстрагенитальных заболеваний. Акушерский анамнез служил основанием для назначения ИЦТ. Критерии включения в контрольную группу: наличие, как минимум, одних родов в анамнезе от данного партнёра, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, физиологическое течение данной беременности. Возраст женщин в обеих группах составил от 20 до 40 лет, отсутствовали гормональные нарушения, сопровождающиеся изменениями менструального цикла, был нормальный кариотип и нормозооспермия у партнера, беременность наступала самопроизвольно.

Кровь для анализа у женщин забирали натошак из локтевой вены в сроке 5-6 недель, в 8-9 недель и в 12 недель гестации.

Процедуру ИЦТ проводили лимфоцитами супругов в предгестационной подготовке и в первом триместре наступившей беременности. Методика проведения ИЦТ утверждена на заседании Учёного совета Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова (протокол №19 от 25 декабря 2012 г.).

Мужчины были обследованы как доноры крови и её компонентов. Забор крови осуществляли из локтевой вены. Концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе составляла от 30 млн до 50 млн в 1 мл раствора. Лимфоциты вводили внутрикожно в ладонную поверхность предплечья женщин дважды

с интервалом в один месяц на 5-10 день менструального цикла. Во время наступившей беременности ИЦТ проводили в сроке 5-6 недель и 8-9 недель гестации. В течение недели производили визуальную оценку местной реакции организма на введение лимфоцитов.

Экспрессию CD69 оценивали после стимуляции цельной крови фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Для оценки поверхностного фенотипа стимулированных лимфоцитов использовали моноклональные антитела (мАт), объединённые набором FastImmune, предназначенные для определения фенотипов CD3/CD4/CD69, CD3/CD8/CD69, CD45/CD56/CD69 ("Becton Dickinson", США). В данных наборах антитела к CD3 и CD45 были мечены PerCP, антитела к CD4, CD8, CD56 были мечены FITC, антитела к CD69 были мечены PE. мАт добавляли непосредственно к цельной крови, лизировали эритроциты раствором OptiLyse ("Beckman Coulter", США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Gallios фирмы ("Beckman Coulter") с использованием программы Kaluza.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 и программы MedCalc12 для Windows 7. Проверку гипотезы о нормальном распределении осуществляли, используя критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Данные представлены средней арифметической величиной и её стандартной ошибкой ($M \pm m$). Для оценки значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической значимости тестов использовали ROC-анализ пакета MedCalc12 для Windows 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены результаты оценки экспрессии CD69 у пациенток с ИПВ до и после предгестационной ИЦТ.

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что до ИЦТ определялось значимо меньшее количество лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию *in vitro*, у женщин с ИПВ, потерявших беременность в I триместре, чем у женщин с пролонгированной беременностью. В этой группе после ИЦТ наблюдалась выраженная тенденция к увеличению содержания субпопуляций лимфоцитов относительно исходных значений, а содержание субпопуляции лимфоцитов с цитотоксической активностью, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro*, было значимо выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью.

С помощью ROC-анализа была оценена диагностическая значимость для прогноза пролонгирования беременности содержания Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией, экспрессирующих CD69 (CD3⁺CD8⁺CD69⁺), которая оказалась выше, чем количество NK-клеток,

Таблица 1. Содержание вне беременности в периферической крови пациенток с ИПВ лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro*

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия		Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
			у женщин с пролонгированной беременностью (n=30)	у женщин с выкидышем (n=6)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	до ИЦТ	7,8±0,8	7,3±1,3
		после ИЦТ	7,4±0,6	7,2±1,2
CD45 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	30,2±3,7	20,6±2,9 ($p_{п-в}=0,03$)
		после ИЦТ	24,9±2,7	42,0±11,7
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	до ИЦТ	6,1±0,7	6,0±1,1
		после ИЦТ	5,7±0,5	5,7±1,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	27,1±4,1	19,1±2,7 ($p_{п-в}=0,05$)
		после ИЦТ	22,0±2,65	38,9±10,6 ($p_{п-в}=0,09$)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	15,4±2,4	12,5±2,1
		после ИЦТ	12,8±1,9	22,2±6,2 ($p_{п-в}=0,10$)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	11,7±2,0	6,6±0,7 ($p_{п-в}=0,01$)
		после ИЦТ	9,2±0,9	16,7±4,5 ($p_{п-в}=0,08$), ($p_{исх}=0,04$)
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	4,5±0,8	2,7±0,3 ($p_{п-в}=0,03$)
		после ИЦТ	4,0±0,7	5,6±1,3 ($p_{исх}=0,04$)

Таблица 2. Диагностическая значимость для прогноза пролонгирования беременности у пациенток с ИПВ определения вне беременности лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после стимуляции митогеном

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %	AUC, p
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	100,0	66,7	> 8,0	55,6	100,0	0,758 $p=0,032$
CD45 ⁺ 56 ⁺ 69 ⁺	100,0	61,5	> 3,3	50,0	100,0	0,723 $p=0,064$

экспрессирующих CD69 (CD45⁺CD56⁺CD69⁺), показана перспективность его использования в клинике. Он может стать дополнительным критерием для персонализированного назначения предгестационной ИЦТ (табл. 2).

Результаты сравнительного анализа исследованных показателей в 5-6 недель беременности, наступившей после проведенной предгестационной ИЦТ, у женщин с пролонгированной на фоне ИЦТ беременностью и у женщин, потерявших беременность, представлены на рисунке 1.

Как следует из рисунка 1, в 5-6 недель гестации у женщин, потерявших беременность на фоне ИЦТ, определялось значимо большее, чем у женщин с пролонгированной беременностью, количество Т-лимфоцитов, как спонтанно экспрессирующих CD69 (CD45⁺CD69⁺, CD45⁺CD3⁺CD69⁺), так и после стимуляции митогеном (CD45⁺CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺). По количеству НК-клеток, экспрессирующих CD69 (CD45⁺CD56⁺CD69⁺), группы не различались.

Оценка доли активированных лимфоцитов (CD69⁺) среди CD45⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ субпопуляций (рис. 2) выявила у пациенток, потерявших данную беременность, более низкое относительное содержание до предгестационной ИЦТ

Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией, экспрессирующих CD69 (CD3⁺CD8⁺CD69⁺), по сравнению с женщинами с пролонгированной беременностью (рис. 2А). После ИЦТ отмечены тенденции к увеличению доли активированных Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD69⁺, $p=0,09$, CD3⁺CD8⁺CD69⁺, $p=0,1$) (рис. 2Б), а в 5-6 недель гестации определялось значимое увеличение особенно доли Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией (CD3⁺CD8⁺CD69⁺-клеток среди CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, $p=0,036$) (рис. 2В). Различий между группами в доле активированных НК-клеток не определялось.

Для показателей, значимо различающихся между группами пациенток с выкидышем и пролонгированной беременностью, были рассчитаны характеристики диагностической значимости определения их в 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной ИЦТ, для прогноза пролонгирования беременности (табл. 3).

Как следует из представленных в таблице 3 результатов, определение доли экспрессирующих после стимуляции *in vitro* CD69 Т-лимфоцитов в 5-6 недель гестации является наиболее перспективным для персонализированного назначения ИЦТ в I триместре пациенткам с ИПВ, получившим ИЦТ в предгестационной подготовке.

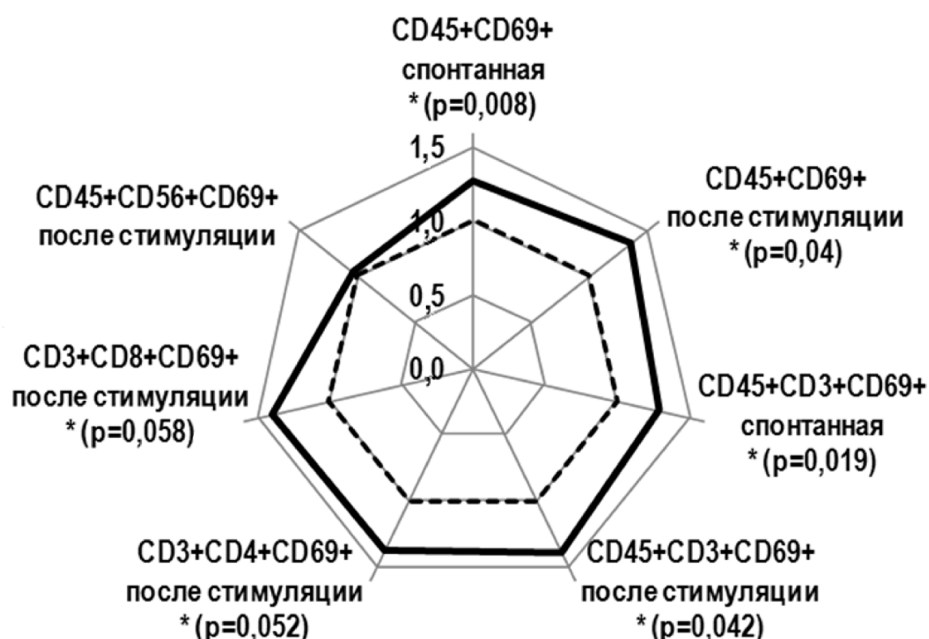


Рисунок 1. Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro*, в 5-6 недель гестации в периферической крови пациенток с ИПВ с пролонгированной беременностью и у женщин, потерявших беременность. По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с выкидышем (n=6) к средним значениям у пациенток с пролонгированной беременностью (n=30). Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

Таблица 3. Диагностическая значимость определения в 5-6 недель беременности субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CD69 после стимуляции митогеном, у пациенток с ИПВ для прогноза пролонгирования беременности на фоне ИЦТ

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %	AUC, p
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	66,7	77,8	≤ 12,3	50,0	87,0	0,741 p=0,062
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ среди CD3 ⁺ CD8 ⁺	100,0	44,4	≤ 30,5	37,5	100,0	0,750 p=0,036
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	100,0	68,4	≤ 16,3	50,0	100,0	0,789 p=0,002
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ среди CD3 ⁺ CD4 ⁺	100,0	68,4	≤ 26,5	50,0	100,0	0,807 p=0,0005

На рисунке 3 представлено сравнение исследованных субпопуляций у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации с уровнем у женщин с физиологическим течением беременности.

Показано, что содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro*, в этот гестационный срок было одинаковым в обеих группах, но содержание лимфоцитов, спонтанно экспрессирующих CD69 *in vitro*, у пациенток с пролонгированной беременностью было ниже (CD45⁺CD69⁺ и CD45⁺CD3⁺CD69⁺). При оценке доли активированных лимфоцитов (CD69⁺) среди стимулированных субпопуляций CD45⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ (рис. 4) также не обнаружено значимых различий между группами.

Таким образом, у пациенток с ИПВ, получавших ИЦТ, в случае пролонгирования беременности ответ Т-лимфоцитов на стимулирующее воздействие в сроке 12 недель не отличается от ответа лимфоцитов беременных контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мембранный белок CD69, являющийся ранним маркером активации, поскольку экспрессия его регистрируется уже через час после активационного стимула, индуцируется на клетках большинства типов гемопоэтических линий, включая Т-, NK-клетки [10]. Достаточно простую, надежную и удобную оценку экспрессии CD69 методом проточной цитофлуориметрии используют для характеристики способности лимфоцитов отвечать на активационный

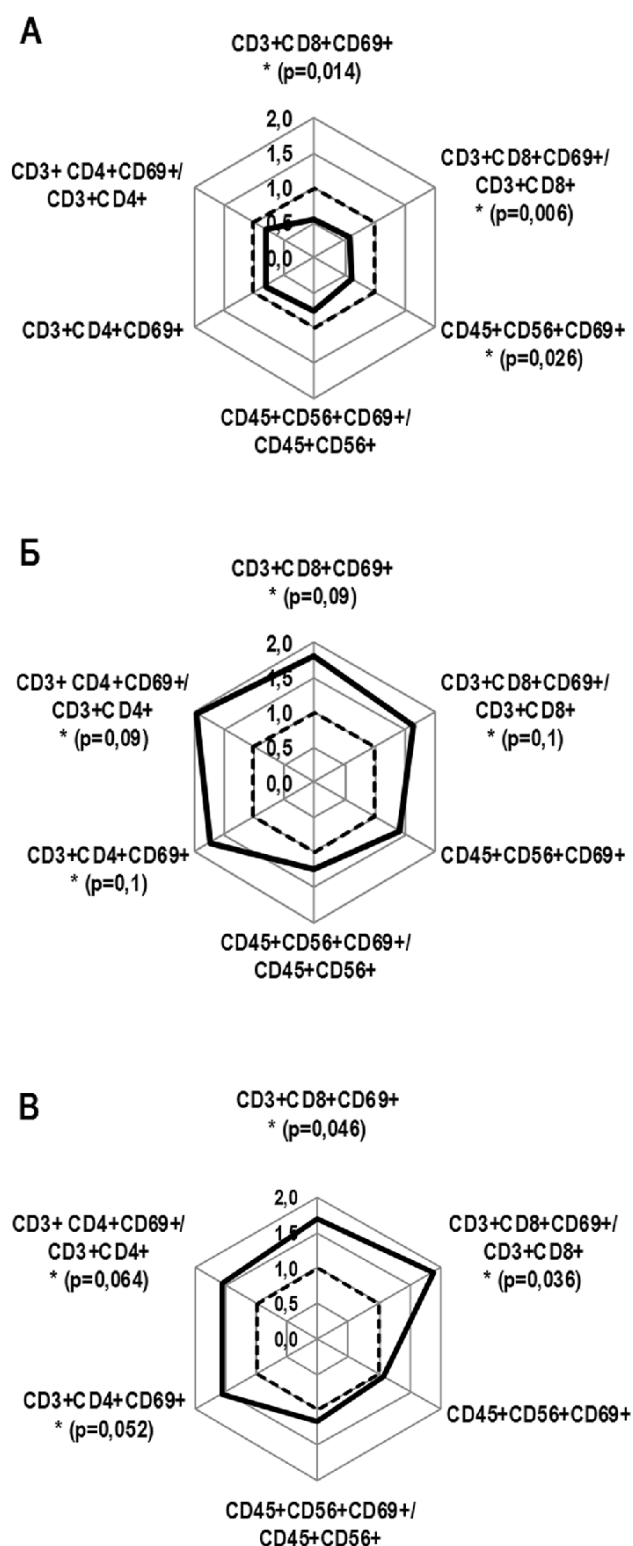


Рисунок 2. Соотношение долей активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ с разными исходами беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации. По осям представлены отношения доли активированных клеток в различных субпопуляциях лимфоцитов у пациенток с выкидышем к доле активированных клеток у пациенток с пролонгированной беременностью: А — до аллоиммунизации, Б — после предгестационной аллоиммунизации, В — в 5-6 недель гестации. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

стимул [11] в диагностике аллергических заболеваний, сепсиса и синдрома системного воспалительного ответа неинфекционной этиологии, при контроле лечения онкологических заболеваний [12-18]. Такое широкое использование оценки экспрессии CD69 показывает значимость данного маркера в изучении патогенеза перечисленных заболеваний.

Опубликованы данные о нарушениях ответа на активационный стимул лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ [19-22]. В представленной нами работе у женщин с прервавшейся на фоне ИЦТ беременностью до назначения иммунотерапии в предгестационной подготовке количество лимфоцитов, отвечающих на активационный стимул *in vitro*, было меньше по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью (табл. 1), при этом доля активированных лимфоцитов среди анализируемых субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток была значимо ниже только в субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 2). После предгестационной ИЦТ у этих женщин обнаружены увеличение количества практически всех анализируемых субпопуляций лимфоцитов, отвечающих на активационный стимул, по сравнению с уровнем до лечения (табл. 1), и яркая тенденция к увеличению доли активированных Т-, но не NK-лимфоцитов (рис. 2). Обнаруженная тенденция в 5-6 недель завершилась значимым увеличением доли активированных лимфоцитов среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью (рис. 2). При этом не выявлено различий в доле активированных лимфоцитов среди субпопуляции с естественной киллерной активностью. Приведенные результаты согласуются с данными иммуногистохимических исследований активационного статуса различных субпопуляций лимфоцитов в децидуальной оболочке abortивного материала, полученного от пациенток с выкидышем в сравнении с материалом, полученным от женщин с медицинским абортom [23]. Отмечено, что в децидуальной оболочке abortивного материала, полученного от пациенток с ИПВ, при увеличении числа активированных лейкоцитов других субпопуляций не зарегистрировано увеличения числа натуральных киллерных клеток. Авторы сделали вывод о вовлечении клеток адаптивного иммунитета в реализацию ИПВ. В более ранней работе [24] также было показано, что в децидуальной оболочке abortивного материала от пациенток с ИПВ в анамнезе больше активированных лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD69⁺, чем с фенотипом CD56⁺CD69⁺.

Увеличение доли активированных CD3⁺CD8⁺CD69⁺-лимфоцитов среди Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией является подтверждением клинических признаков срыва толерантности к аллоантигенам плода у женщин с реализацией повторяющегося выкидыша и ведущей роли эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов в реакциях отторжения плода.

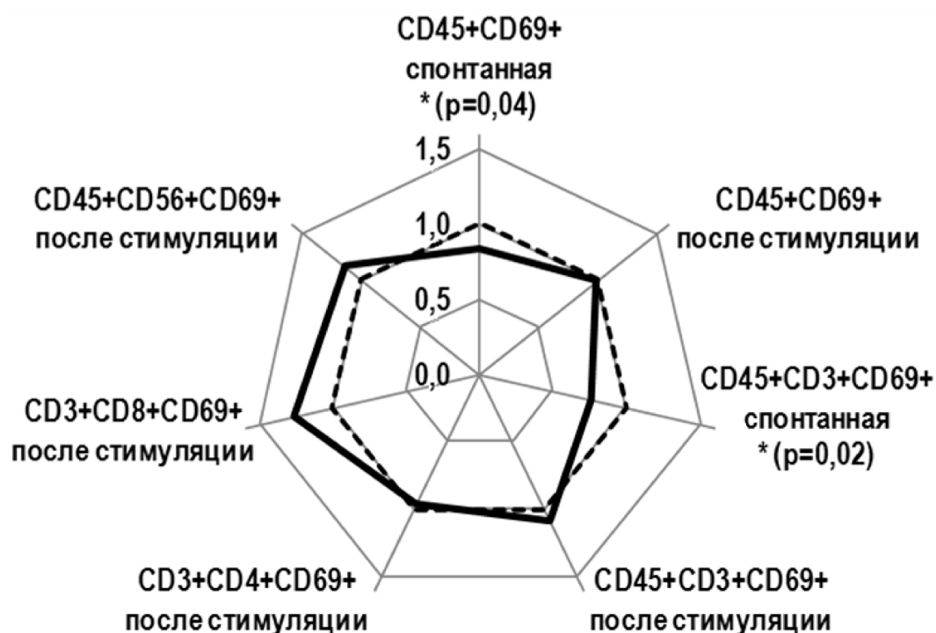


Рисунок 3. Относительное содержание активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ в 12 недель беременности, пролонгированной до доношенного срока. По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с пролонгированной беременностью к средним значениям у женщин с физиологическим течением беременности. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

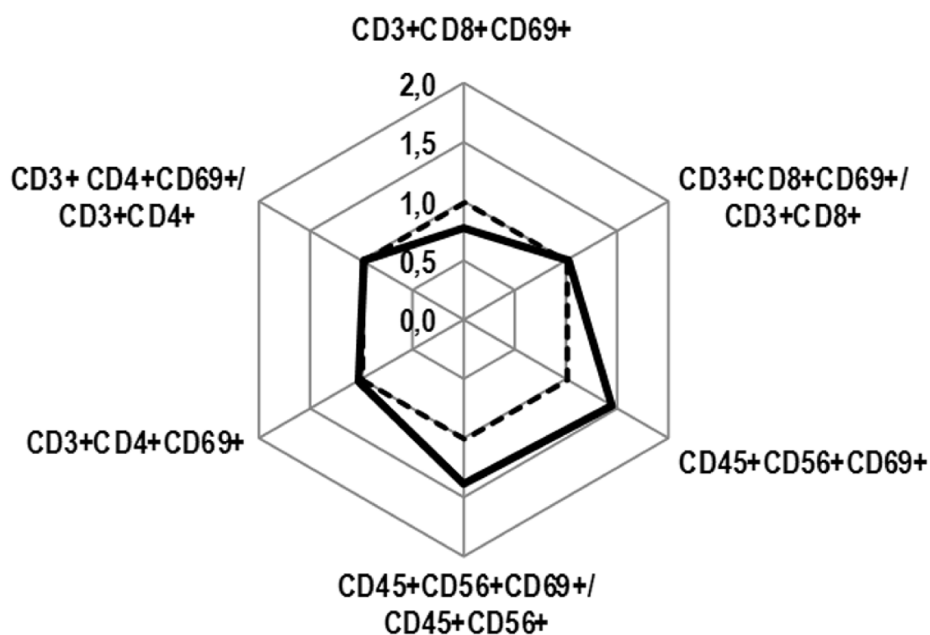


Рисунок 4. Соотношение долей активированных лимфоцитов периферической крови в 12 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и у женщин с физиологическим течением беременности. По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с пролонгированной беременностью к средним значениям у женщин с физиологическим течением беременности. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

Рассчитанные параметры диагностической значимости оценки стимулированной экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови для прогноза пролонгирования беременности у пациенток с ИПВ как вне беременности (табл. 2), так и в 5-6 недель гестации после проведенной предгестационной ИЦТ (табл. 3), показали перспективность таких исследований (оценки экспрессии CD69 лимфоцитами) в клинично-диагностической практике.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, 100% специфичность тестов определения вне беременности активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и означает, что все пациентки, имеющие вероятность выносить следующую беременность, будут иметь положительные тесты. Однако примерно у 35% пациенток, у которых есть вероятность потерять беременность, тест также будет

положительным. В 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной ИЦТ, у 100% пациенток, способных доносить наступившую беременность, будут положительными тесты определения активированных лимфоцитов в субпопуляциях CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ (табл. 3), но примерно у 30% пациенток, у которых есть вероятность потерять беременность, тест определения активированных лимфоцитов в субпопуляции CD3⁺CD4⁺ также будет положительным, а в случае определения активированных лимфоцитов среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов — даже в половине случаев.

Тем не менее, высокая специфичность указанных тестов позволяет использовать их — в комплексе с другими лабораторными показателями для персонифицированного назначения ИЦТ пациенткам с ИПВ как вне беременности, так и в I триместре беременности, наступившей после предгестационной ИЦТ. Ранее нами была показана высокая диагностическая значимость определения в периферической крови женщин с ИПВ субпопуляций NK-клеток для персонифицированного назначения ИЦТ, поскольку и до лечения вне беременности и в сроке 5-6 недель гестации у женщин с повторным выкидышем содержание в периферической крови CD56⁺, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁺, CD3⁺CD16⁺ было значимо ниже, чем у пациенток с пролонгированной беременностью [25]. Однако в данном исследовании различия в количестве активированных NK-клеток между группами отсутствуют.

Обнаруженная в данной работе у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации сниженная спонтанная экспрессия CD69 Т-лимфоцитами (CD45⁺CD3⁺CD69⁺), отсутствие различий в стимулированной экспрессии всеми анализируемыми субпопуляциями и в доле активированных NK-клеток (рис. 3, 4), вместе с опубликованными ранее данными об увеличении к этому сроку количества Трег-клеток и CD200⁺-лимфоцитов и отсутствии различий в содержании субпопуляций лимфоцитов с естественной киллерной активностью [26] могут свидетельствовать о нормализации состояния иммунной системы у пациенток данной группы после ИЦТ.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали перспективность использования оценки экспрессии раннего активационного маркера CD69 для прогноза пролонгирования беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем, получающих иммунокорригирующую терапию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках государственного задания АААА-А18-118053190024-2.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено Комитетом по этике НЦ АГиП им. В.И. Кулакова (протокол №13 от 06 декабря 2013 г.). У всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sancho D., Gómez M., Sánchez-Madrid F. (2005) Trends Immunol., **26**(3), 136-140.
2. Martín P., Gómez M., Lawana A., Cruz-Adalia A., Ramírez-Huesca M., Ursa M.A., Yáñez-Mo M., Sánchez-Madrid F. (2010) Mol. Cell. Biol., **30**, 4877-4889.
3. Lu L.F., Rudensk A. (2009) Genes Dev., **23**, 1270-1282.
4. Martín P., Sánchez-Madrid F. (2011) Sci. Signal., **4**, 14. DOI: 10.1126/scisignal.2001825.
5. Miki-Hosokawa T., Hasegawa A., Iwamura C., Shinoda K., Tofukuji S., Watanabe Y., Hosokawa H., Motohashi S., Hashimoto K., Shirai M., Yamashita M., Nakayama T. (2009) J. Immunol., **183**, 8203-8215.
6. Donskoi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. (2011) J. Immunol. Methods, **372**(1), 187-195.
7. Lü H.Z., Zhu A.Y., Chen Y., Tang J., Li B.Q. (2011) Human Immunology, **72**(7), 538-546.
8. Mor G. (2008) Ann. N.Y. Acad. Sci., **1127**(1), 121-128.
9. Carp H.J.A. (ed.) (2014) Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment, 2nd ed. London: CRC Press
10. Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. (1999) Immunopharmacol. Immunotoxicol., **21**(3), 565-582.
11. Lindsey W.B., Lowdell M.W., Marti G.E., Abbasi F., Zenger V., King K.M., Lamb L.S. Jr. (2007) Cytotherapy, **9**(2), 123-132.
12. Petersen C.C., Nelderby L., Roug A.S., Skovbo A., Peterslund N.A., Hokland P., Nielsen B., Hokland M. (2011) Viral Immunol., **24**(2), 165-169.
13. Martín P., Gómez M., Lamana A., Marín A.M., Cortés J.R., Ramírez-Huesca M., Barreiro O., López-Romero P., Gutiérrez-Vázquez C., de la Fuente H., Cruz-Adalia A., Sánchez-Madrid F. (2010) J. Allergy Clin. Immunol., **126**(2), 355-365.
14. Hutnick N.A., Williams N.I., Kraemer W.J., Orsega-Smith E., Dixon R.H., Bleznak A.D., Mastro A.M. (2005) Med. Sci. Sports Exerc., **37**(11), 1827-1835.
15. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marín E., Esplugues E., Borrás M., Martínez A.C., Lauzurica P. (2010) Immunol. Cell Biol., **88**(7), 707-715.
16. Schwulst S.J., Muenzer J.T., Chang K.C., Brahmabhatt T.S., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S. (2008) J. Am. Coll. Surg., **206**(2), 335-342.
17. Hasegawa A., Nakayama T. (2009) Jap. J. Clin. Immunol., **33**(4), 189-195.
18. Labiano S., Meléndez-Rodríguez F., Palazón A., Teijeira Á., Garasa S., Etxeberria I., Aznar M.Á., Sánchez-Paulete A.R., Azpilikueta A., Bolaños E., Molina C., de la Fuente H., Maiso P., Sánchez-Madrid F., de Landázuri M.O., Aragonés J., Melero I. (2017) Oncoimmunology, **6**(4), e1283468. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283468.

19. Carbone J., Sarmiento E., Gallego A., Lanio N., Navarro J., García S., Fernandez-Cruz E. (2016) J. Reproduct. Immunol., **113**, 50-53.
20. Loewendorf A.I., Nguyen T.A., Yesayan M.N., Kahn D.A. (2014) PloS ONE, **9**(5), e96723. DOI: 10.1371/journal.pone.0096723.
21. Yang K.M., Trevallas E., Cho H.J., Kim N.Y., Beaman K., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. (2010) Am. J. Reproduct. Immunol., **63**(5), 370-378.
22. Kuon R.J., Schaumann J., Goeggel T., Strowitzki T., Sadeghi M., Opelz G., Daniel V., Toth B. (2015) J. Reproduct. Immunol., **112**, 82-87.
23. Quack K.C., Vassiliadou N., Pudney J., Anderson D.J., Hill J.A. (2001) Human Reproduction, **16**(5), 949-955.
24. Vassiliadou N., Searle R.F., Bulmer J.N. (1999) Human Reproduction, **14**(5), 1194-1200.
25. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Николаева М.А., Хачатрян Н.А., Агаджанова А.А., Ванько Л.В., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. (2017) Акушерство и гинекология, **7**, 52-60. [Krechetova L.V., Tetruashvili N.K., Vtorushina V.V., Nikolaeva M.A., Khachatryan N.A., Agadzhanova A.A., Vanko L.V., Ivanets T.Yu., Sukhikh G.T. (2017) Akusherstvo i Ginekologiya, **7**, 52-60.]
26. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Голубева Е.Л., Хачатрян Н.А. (2015) Акушерство и гинекология, **6**, 59-66. [Krechetova L.V., Tetruashvili N.K., Vtorushina V.V., Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Golubeva E.L., Khachatryan N.A. (2015) Akusherstvo i Ginekologiya, **6**, 59-66.]

Поступила в редакцию: 22. 04. 2020.
После доработки: 31. 07. 2020.
Принята к печати: 15. 09. 2020.

SIGNIFICANCE OF EVALUATION OF CD69 EXPRESSION BY PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FOR PREDICTING PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

L.V. Krechetova, L.V. Vanko, V.V. Vtorushina, M.A. Nikolaeva, E.V. Inviyaeva, N.K. Tetruashvili*

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: e_inviyaeva@oparina4.ru

The aim of this work was to characterize phenotypically peripheral blood T- and NK lymphocytes expressing an early marker of activation, CD69, and assess the significance of CD69 expression for predicting pregnancy outcome in women with idiopathic recurrent pregnancy loss (IRP) before and after immunocytotherapy (ICT). The study group consisted of 36 patients with IRP who became pregnant after pre-gestational allimmunization, in 30 patients the pregnancy was prolonged to the full term and ended with the birth of a viable baby, in 6 — it was terminated before 12 weeks of gestation. In the control group, 15 fertile women outside pregnancy and 11 women at 12 weeks of physiological pregnancy were examined. Assessment of the CD69 expression in women with prolonged pregnancy revealed the absence of significant differences with the control group in the content and proportion of activated lymphocytes (CD69⁺). In women with aborted pregnancy after pre-gestational ICT, an increase in the number of almost all analyzed lymphocyte subpopulations responding to the activation stimulus, with a clear tendency to increase the proportion of activated T- but not NK-lymphocytes was found. At 5-6 weeks, the proportion of activated lymphocytes among a subpopulation of cytotoxic T-lymphocytes (CD3⁺CD8⁺/CD3⁺CD8⁺CD69⁺) in these women was significantly higher than in women with prolonged pregnancy, which confirms the leading role of effector cytotoxic T-lymphocytes in rejection reactions. Thus, the studies showed the promise of evaluating the expression of the early activation marker CD69 as an additional laboratory criterion for the personable appointment of immunocytotherapy to women with a common recurrent pregnancy loss.

Key words: recurrent pregnancy loss; immunocytotherapy; expression of CD69; T-lymphocytes; NK-cells

Funding. The work was performed as part of the state assignment AAAA-A18-118053190024-2.

Received: 22.04.2020, revised: 31.07.2020, accepted: 15.09.2020.