

УДК 618.2/3:618.177-071.3:616.12+616.155

Л.Є. Туманова¹, О.В. Коломієць¹, О.П. Рябенко²

Особливості CD3+- і CD3+CD4+-клітин периферичної крові на різних термінах вагітності в жінок із безплідністю в анамнезі

¹ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ²Репродуктивна клініка «Надія», м. Київ, Україна

Ukrainian Journal of Perinatology and Pediatrics. 2022. 2(90): 5-11; doi 10.15574/PP.2022.90.5

For citation: Tumanova LE, Kolomiets EV, Ryabenko OP. (2022). Features of CD3+- and CD3+CD4+-peripheral blood cells at different pregnancy stages in women with anamnestic infertility. Ukrainian Journal of Perinatology and Pediatrics. 2(90): 5-11. doi 10.15574/PP.2022.90.5.

Безплідний шлюб є складною соціально-економічною проблемою. Частота безпліддя в Україні становить 17–20%, що спонукає до подальшого вивчення його механізмів, у тому числі імунних, для розробки відповідних методів корекції.

Мета — охарактеризувати фенотипічні особливості Т-клітин та їх субпопуляції Т-хелперів (CD3+CD4+) з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у жінок із безплідністю в анамнезі на різних етапах вагітності.

Матеріали та методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра і відповідних тест-систем визначали відносні рівні імунокомпетентних клітин (кл) крові, у тому числі з внутрішньоклітинною експресією цитокінів CD3+CD4+-кл, у 436 невагітних (референтна група n) та 514 вагітних жінок на першому та другому триместрах із безплідністю в анамнезі. Аналізували особливості показників у вагітних на різних термінах у групах: а — 4–7 тижнів (140 жінок); б — 8–9 тижнів (163 жінок); с — 10–12 тижнів (133 жінок); d — 13–18 тижнів (63 жінок); e — 19–28 тижнів (15 жінок) порівняно з групою n та між собою.

Результати. Перші 12 тижнів вагітності в жінок із безплідністю в анамнезі характеризуються високим рівнем у крові Т-хелперів (CD3+CD4+-кл) та їх активацією за даними експресії маркерів CD25 і HLA-DR, а протягом 18 тижнів — і внутрішньоклітинною секрецією прозапальних цитокінів — IFN-γ+ та TNF-α, висока експресія протизапального IL-4 спостерігалася протягом усіх 27 тижнів спостереження.

Відсоток жінок із високими рівнями в крові CD3+CD4+IFN-γ+- та CD3+CD4+TNF-α+-л найбільший протягом перших 12 тижнів, з 13-го тижня ці показники для TNF-α, а з 20-го — для IFN-γ не відрізняються від невагітних. З початку вагітності достовірно зменшується відносна кількість жінок із низькою експресією IL-4 і IL-10 Т-хелперами; у терміни 13–18 тижнів відсоток таких вагітних суттєво підвищується до показника референтної групи, і такі жінки найбільш вразливі через можливу слабку реакцію протизапальної ланки для стану толерантності.

Висновки. Особливості рівнів клітин імунної системи периферичної крові за даними їх CD-фенотипів та внутрішньоклітинної експресії цитокінів вказують на їхню участь у механізмах вагітності на різних її етапах, а індивідуальний аналіз дає змогу передбачати негативні прогнози та поліпшити перебіг вагітності в жінок із безплідністю в анамнезі.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду пацієнток.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Ключові слова: CD-фенотип імунокомпетентних клітин, внутрішньоклітинні цитокіни, вагітні, безплідність в анамнезі.

Features of CD3+- and CD3+CD4+-peripheral blood cells at different pregnancy stages in women with anamnestic infertility

L.E. Tumanova¹, E.V. Kolomiets¹, O.P. Ryabenko²¹SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after academician O.M. Lukyanova of the NAMS of Ukraine», Kyiv²Reproductive Clinic «Nadiya», Kyiv, Ukraine

Infertile marriage is a complex socio-economic problem; the frequency of infertility in Ukraine is 17–20%, which prompts further study of its mechanisms, including immune ones, in order to develop appropriate methods of correction.

Purpose — to characterize the phenotypic features of T-cells and their subpopulation of T-helpers (CD3+CD4+) with the expression of intracellular cytokines in women with a history of infertility at different stages of pregnancy.

Materials and methods. Relative levels of immunocompetent cells (cl) of blood, including intracellular expression of cytokines CD3+CD4+-cells, in 436 non-pregnant (the reference group n) and 514 pregnant women with infertility at the first trimester and the second trimester of pregnancy were determined using a cellular cytofluorimeter and the corresponding test systems. Characteristics of indicators in pregnant women at the different terms in groups were analyzed: a — 4–7 weeks (140 women); b — 8–9 weeks (163 women); c — 10–12 weeks (133 women); d — 13–18 weeks (63 women); e — 19–28 weeks (15 women) compared to the group n and among themselves.

Results. The first 12 weeks of pregnancy in women with a history of infertility are characterized by high blood levels of T-helpers (CD3+CD4+-cl), and their activation according to the expression of markers CD25 and HLA-DR, and for 18 weeks — intracellular secretion of pro-inflammatory cytokines IFN-γ+ and TNF-α, high expression of anti-inflammatory IL-4 was observed throughout the 27 weeks of follow-up. The percentage of women with high levels in the blood of CD3+CD4+IFN-γ+- and CD3+CD4+TNF-α+-L is the highest during the first 12 weeks, from 13th week these indicators for TNF-α, and with 20th — for IFN-γ do not differ from non-pregnant ones. Since the beginning of pregnancy, the relative number of women with low expression of IL-4 and IL-10 T-helpers has significantly decreased; within 13–18 weeks, the percentage of such pregnant women is significantly increased to the reference group, and such women are the most vulnerable due to the possible weak reaction of the anti-inflammatory link to the state of tolerance.

Conclusions. The characteristics of peripheral blood immune system cell levels according to their CD phenotypes and intracellular cytokine expression indicate their participation in pregnancy mechanisms at different stages and individual analysis allows for negative predictions and improvement of pregnancy course in women with a history of infertility.

The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the participating institution. The informed consent of the patient was obtained for conducting the studies.

No conflict of interests was declared by the authors.

Keywords: CD-phenotype of immunocompetent cells, intracellular cytokines, pregnant women, history of infertility.

Безплідний шлюб є складною соціально-економічною проблемою і діагностується в понад 15% подружніх пар. Частота безплідності в Україні становить 17–20%. Україна посідає 211-те місце з 222 за показником фертильності, а в окремих регіонах України частота безплідності наближається до критичного рівня — 20%, що негативно впливає на демографічні показники [8].

Вагомими причинами безплідності в жінок можна вважати генетичні, ендокринні порушення, хронічні інфекції, проблеми гемостазу тощо. Останніми роками значна увага дослідників спрямована на визначення ролі різних складових імунної системи в нормальному перебігу вагітності. Часто це значення антифосфоліпідного синдрому, антитіл до β -хоріонічного гонадотропіну людини, тиреоїдних гормонів, генітальних та екстрагенітальних інфекцій, наявності в жінки загальних із чоловіком HLA [5]. Між тим, важливою ланкою імунної відповіді є цитокінова, про- та протизапальні медіатори забезпечують кооперативну взаємодію імункомпетентних клітин (кл), а також їхній зв'язок з ендокринною та нервовою системами. Порушення гомеостазу, у тому числі завдяки змінам балансу активності CD4⁺-кл — Т-лімфоцитів хелперів (Т-х), до яких належать субпопуляції Т-х1, Т-х2, Т-х17 і Т-регуляторні (Т-рег), впливає на фетоплацентарну дисфункцію та спричиняє перинатальні ускладнення [16].

Т-х1 продукують прозапальні цитокіни — інтерферон гамма (IFN- γ), який є маркером цієї субпопуляції Т-х кл, а також інтерлейкін-2 (IL-2), фактор некрозу пухлини альфа (ФНП- α). Т-х2 секретують інтерлейкін-4 (IL-4) (маркер Т-х2 субпопуляції), інтерлейкін-5, інтерлейкін-10 (IL-10) тощо [6,16].

Цитокіни, що виробляються Т-х1 та Т-х2, 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 кілерних клітинах. IFN- γ блокує індуцію синтезу антитіл IgE і скасовує пригнічення функції цитотоксичних лімфоцитів, викликане протизапальним IL-4 [5,10].

CD4⁺Т-клітини — головні регулятори імунної відповіді та толерантності, тому їхня важливість під час вагітності очевидна для взаємозв'язку плода й матері. Особливу роль грають

регуляторні Т-кл, які обмежують прозапальні та кілерні Т-кл реакції [12,15].

На цей час відомо, що нормальний перебіг вагітності багато в чому визначається співвідношенням імуностимулюючих та імуносупресивних факторів в ендометрії та трофобласті, у регуляції цього балансу важливу роль відіграє цитокінова мережа. Від ранніх термінів 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 трофобласта, а також стимулюють стероїдогенез. На стан місцевого імунітету може впливати статевий контакт — сперма індукує викид IL-10 та інгібує IFN- γ . Фактор некрозу пухлин — TNF- α як ініціатор продукції цитокінів запального каскаду здатний підвищувати також рівень експресії гена протизапального IL-10, який у нормі пригнічує продукцію TNF- α та інших прозапальних цитокінів [7]. Гіперпродукція TNF- α може призводити до зростання кількості апоптотичних клітин трофобласта, так само як і стимулювати екскрецію арахідонової кислоти і продукцію простагландинів міометрієм, що сприятиме ускладненню вагітності [2].

Отже, значущість цитокінів та їхнього балансу не викликає питань для прогнозу перебігу вагітності, і важливу роль відіграють CD3⁺CD4⁺-клітини — Т-х1 і Т-х2, а також Т-рег (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Достовірною верифікацією Т-х клонів CD4⁺ можлива тільки за допомогою комплексного вивчення спектра продукції відповідних цитокінів, особливостей поверхневого фенотипу та факторів транскрипції, однак найважливішими ознаками Т-х1, Т-х2 і Т-рег лімфоцитів є їхня здатність продукувати відповідно IFN- γ , IL-4 та IL-10.

Мета дослідження — охарактеризувати фенотипічні особливості Т-кл і їх субпопуляції Т-х (CD3⁺CD4⁺) з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у жінок із безплідністю в анамнезі на різних етапах вагітності.

Матеріали та методи дослідження

За допомогою клітинного цитофлуориметра і відповідних тест-систем визначали відносні рівні імункомпетентних клітин крові у 436 невагітних (референтна група n) та 514 вагітних жінок із безплідністю в анамнезі на першому та другому триместрах вагітності. Аналізували особливості показників у вагітних на різних термінах у групах: а — 4–7 тижнів (140 жінок);

b — 8–9 тижнів (163 жінки), c — 10–12 тижнів (133 жінки); d — 13–18 тижнів (63 жінки); e — 19–28 тижнів (15 жінок) тижнів порівняно з групою n та між собою.

Для визначення фенотипу лімфоцитів периферичну кров інкубували з моноклональними антитілами, міченими FITS, PE та PeCy5 відповідно до інструкції виробника «BD bioscience USA», після чого лізували «LysingSolution» (BD bioscience USA) та аналізували на приладі «FacScan» за допомогою програми «CellQuest BD bioscience USA». Використовували комбінації моноклональних антитіл проти таких поверхневих маркерів: CD3/CD4/CD5/CD8/CD25/CD56/CD69/CD138a/HLA-DR. Контролі у вигляді неспецифічних мічених антитіл, рекомендовані виробником, використовували для формування гейтів. Абсолютну кількість лімфоцитів визначали за допомогою «TruCount tubes» (BD bioscience USA). Лімфоцит містив як мінімум 15 000 клітин.

Для визначення внутрішньоклітинних цитокінів зразки крові 100 мкл розводили 300 мкл RPMI1640, що містила 5 нг/мл PMA (форбол-мірістатацетат) 5 мкг Брефелдіну А та 1 мкг іономіцину та інкубували 4 години у CO₂ інкубаторі Revco (USA). Після інкубації еритроцити лізували «LysingSolution» (BD bioscience USA), клітини пермабілізували «PermeabilizingSolution» (BD bioscience USA) та розводили у 100 мкл PBS, що містив 1% бичачого альбуміну. Клітини фарбували антитілами проти поверхневих молекул (CD3 та CD4) та антитілами проти внутрішньоклітинних цитокінів (IFN- γ , TNF α , IL4, IL10,) одну годину за температури +4°C. Після відмивки зразки аналізували методом проточної цитометрії на приладі «FacScan» за допомогою програми «CellQuest BD bioscience USA».

Отримані дані обробили статистично на персональному комп'ютері за допомогою пакету програм «SPSS for Windows. Версія 11» та «MedStat». Для статистичної обробки використовували параметричні критерії статистики — тест Стюдента або непараметричні — критерій Уїлкоксона. Порівняння різниці долі для двох груп розраховували з використанням кутового перетворення Фішера (з поправкою Єтса). Достовірною вважали різницю при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Відмічалася достовірне зниження відносного рівня лімфоцитів (Лімф) (у всіх групах $p < 0,001$) та підвищення — гранулоцитів (Гран)

у вагітних (у всіх групах $p < 0,001$) порівняно з невагітними, а також груп b, d і e відносно a ($p < 0,05$) (Лімф), а в групі e спостерігалася тільки тенденція до вищого рівня гранулоцитів ($p = 0,081$), (рис. 1). Достовірної різниці між групами a і c не виявлено — відповідно, $p = 0,668$ (Лімф) та $p = 0,140$ (Гран).

Відносний рівень моноцитів крові на перших 7 тижнях вагітності показав тенденцію до підвищення ($p = 0,093$), тоді як з 8 до 19-го тижня спостерігалася достовірне зниження цього рівня (відповідно $p = 0,034$, $p = 0,018$ та $p < 0,001$ у групах b, c, d), у групі e різниця була недостовірною ($p = 0,651$).

Аналіз показав достовірне підвищення рівня Т-кл (CD3+) у вагітних усіх груп до 19-го тижня вагітності (a-d) із високою кількістю CD3+CD56+-кл (Т-лімфоцитів із маркерами NK); у групі e відмічалася тенденція до зниження середніх показників CD3+-кл порівняно з першими тижнями вагітності (a), (табл.).

Середній відсоток Т-х (CD3+CD4+-кл) та їх активація за даними експресії на них маркерів CD25 і HLA-DR також були підвищеними в перші 18 тижнів (a-d), (табл.). У групі e середній рівень Т-х із маркерами активації на поверхні — CD25 ($p = 0,018$) та HLA-DR ($p < 0,001$) — був достовірно нижчим, ніж у групі a, останній показник не відрізнявся від норми ($p = 0,197$), (табл.). Експресія на цих клітинах маркера NK (CD56+-кл) достовірно була підвищеною ($p = 0,040$), так само як тенденція до підвищення CD158a ($p = 0,080$), тільки в групі d, тобто в термін від 13 до 18-го тижня вагітності.

Слід звернути увагу на достовірне зниження відносного рівня CD3+CD4+CD25hi CD127lo-клітин на 8–9-му тижні вагітності порівняно як

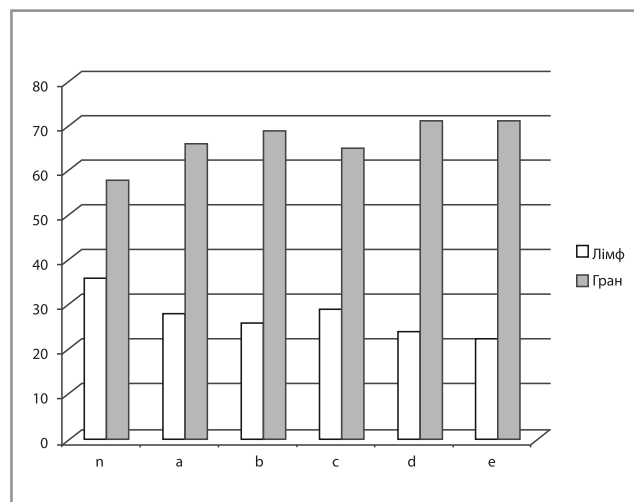


Рис. 1. Відносний рівень лімфоцитів (Лімф) та гранулоцитів (Гран) у невагітних (n) та вагітних жінок груп a–e

Таблиця

Середні відносні рівні Т-лімфоцитів (CD3+- та Т-хелперів / індукторів (CD3+ CD4+) з експресією маркерів активації та внутрішньоклітинних цитокінів у невагітних жінок (n) та пацієток на різних термінах вагітності (а-е)

Показник	Група пацієток					
	n (436)	a (140)	b (163)	c (133)	d (63)	e (15)
CD3+	72,5 [67,4; 77,3]	75,4* [71,2; 79,2]	75,9* [71,5; 79,3]	75,4* [71,1; 79,9]	75,1* [71,3; 80,0]	74,8 [71,6; 78,8]
..HLA-DR+	10,5 [7,6; 14,4]	10,2 [7,9; 14,5]	10,9 [7,8; 14,2]	11,3 [8,6; 15,7]	11,3 [8,1; 13,9]	7,9 [6,5; 12,3]
...CD56+	1,5 [1,5; 6,2]	4,5* [1,8; 9,7]	4,6* [1,8; 7,9]	4,8* [1,5; 9,1]	4,3* [1,5; 8,4]	1,5* [1,5; 1,5]
...CD158a+	3,4 [1,2; 5,0]	3,1 [1,3; 4,9]	3,2 [1,5; 5,1]	3,1 [1,3; 5,4]	2,8 [1,2; 3,1]	3,9 [1,8; 4,6]
...CD5 -	7,1 [3,8; 12,2]	7,7 [4,1; 12,2]	8,7* [4,8; 14,7]	7,6 [4,3; 14,2]	6,7 [4,0; 10,4]	7,9 [6,4; 11,3]
..CD4-CD8-	2,1 [0,5; 4,7]	1,7 [0; 3,6]	2,5 [0,6; 4,5]	1,9 [0,1; 4,3]	2,9 [0,1; 4,8]	3,4 [2,3; 5,3]
CD3+CD4+	44,4 [38,4; 49,5]	46,7* [40,6; 50,7]	46,5* [41,8; 50,8]	46,6* [41,5; 51,4]	45,1 [41,0; 49,4]	44,9 [41,4; 48,4]
..HLA-DR+	5,7 [0; 8,5]	6,8* [5,4; 8,8]	6,7* [5,4; 8,9]	6,8* [5,0; 9,2]	6,3* [4,8; 9,1]	3,5 [2,0; 5,2]
...CD69+	3,0 [1,7; 5,8]	2,9 [1,9; 5,7]	2,8 [1,8; 4,8]	3,4 [2,1; 5,4]	3,7 [1,8; 7,1]	3,4 [2,3; 5,3]
...CD25+	8,1 [3,4; 26,5]	18,5* [5,6; 27,5]	21,3* [9,9; 26,5]	17,8* [4,5; 26,5]	20,1* [4,3; 32,1]	6,8 [5,4; 7,0]
...CD56+	1,8 [0,9; 3,7]	1,9 [0,9; 3,6]	1,8 [0,9; 3,4]	2,1 [0,9; 4,3]	2,2* [1,4; 4,9]	2,2 [1,4; 2,7]
...CD158a+	1,6 [0,7; 3,8]	1,6 [0,7; 3,1]	1,9 [0,7; 3,6]	1,7 [0,6; 3,3]	1,0* [0,5; 3,1]	2,3 [0,9; 3,3]
...CD25hi CD127lo	4,9 [2,3; 7,3]	4,3 [2,6; 6,5]	3,1* [2,0; 5,7]	3,9 [2,4; 6,9]	5,2 [2,8; 6,9]	2,9 [2,0; 5,3]
...IFN-Y+	23,4 [8,5; 39,6]	27,6* [21,2; 39,6]	30,3* [22,1; 38,0]	31,0* [22,5; 40,7]	27,2* [18,5; 38,3]	30,2 [18,8; 34,1]
...IL-4+	5,6 [2,5; 9,3]	7,5* [5,2; 10,1]	6,9* [5,1; 11,1]	7,6* [5,6; 11,3]	7,3* [5,1; 10,0]	9,2* [7,4; 11,4]
...IFN-Y+IL-4+	1,8 [0,6; 3,8]	2,8* [1,6; 4,5]	2,6* [1,6; 4,1]	3,2* [1,9; 4,7]	3,0* [1,5; 4,8]	3,4 [2,0; 5,6]
...IFN-Y+IL-4-	20,7 [7,9; 28,9]	25,3* [18,3; 34,9]	27,5* [19,7; 34,6]	26,8* [18,9; 36,1]	23,4* [16,3; 33,2]	25,8 [15,4; 29,7]
...IL-4+IFN-Y-	3,5 [1,3; 5,9]	4,2* [2,9; 6,1]	4,1* [2,9; 6,4]	4,5* [2,8; 6,4]	4,0 [2,2; 5,8]	5,7*# [5,3; 6,3]
...TNF-A+	50,1 [21,0; 65,2]	58,7* [45,6; 70,2]	62,3* [50,8; 70,8]	59,8* [41,1; 69,5]	55,0* [42,7; 67,3]	56,4 [39,8; 63,8]
...IL-10+	4,7 [0,0; 9,3]	6,2* [3,0; 10,6]	5,1 [0,4; 10,3]	6,3* [2,4; 10,5]	5,8 [1,2; 9,6]	8,5* [5,3; 14,8]
...TNF-A+IL-10+	3,0 [0,0; 5,7]	3,9* [1,6; 8,2]	3,8^ [0,3; 6,7]	3,9* [1,5; 7,4]	3,4 [0,9; 6,4]	3,9 [1,9; 8,8]
...TNF-A+IL-10-	44,7 [18,2; 56,9]	53,6* [39,9; 64,6]	54,4* [44,2; 65,7]	53,4* [38,7; 61,7]	51,1* [37,5; 58,6]	45,4 [37,9; 55,3]
...IL-10+ TNF-A-	0,5 [0,0; 3,0]	1,2* [0,2; 3,1]	0,5 [0,0; 3,3]	1,0* [0,2; 3,2]	1,0 [0,1; 2,3]	3,2*^ [2,1; 4,1]

Примітки: * — різниця достовірна з групою n; ^ — тенденція до достовірної різниці з групою n; # — різниця достовірна з групою a; & — тенденція до достовірної різниці з групою a.

із референтною групою n ($p < 0,001$), так і з групою а ($p = 0,001$), (табл.).

Спостерігалось достовірне підвищення рівня Т-х із внутрішньоклітинною секрецією IFN-γ+, атакою IFN-γ+, такі IL-4 — CD3+CD4+IFN-γ+ та CD3+CD4+IFN-γ+IL-4+, так само як і без IL-4 — IFN-γ+IL-4- лімфоцитів — у жінок груп а-d (табл.).

Середній рівень Т-х з експресією іншого прозапального цитокіну TNF-α — CD3+CD4+TNF-α +-, так само як і CD3+CD4+TNF-α+IL-10-кл, був достовірно підвищеним у тих самих групах а-d (табл.).

Відносна кількість Т-лімфоцитів із внутрішньоклітинною секрецією протизапального

IL-4 — CD3+CD4+IL-4+ і CD3+CD4+IL-4+IFN-γ- достовірно перевищувала рівень референтної групи в жінок усіх груп (а-е), (табл.).

Експресія іншого протизапального IL-10 — CD3+CD4+IL-10+-кл і ...IL-10+TNF-α- — у групах а, с і d, а останній — і в групі е перевищувала рівень у невагітних жінок (табл.).

Важливо, що з 20-го тижня середні рівні CD3+CD4+IL-4+IFN-γ- перевищували не тільки рівень референтної групи, але й показники перших тижнів вагітності ($p = 0,039$), а для експресії іншого протизапального ...IL-10+TNF-α- спостерігалась тенденція до вищого рівня ($p = 0,076$). Іншої достовірної різниці під час

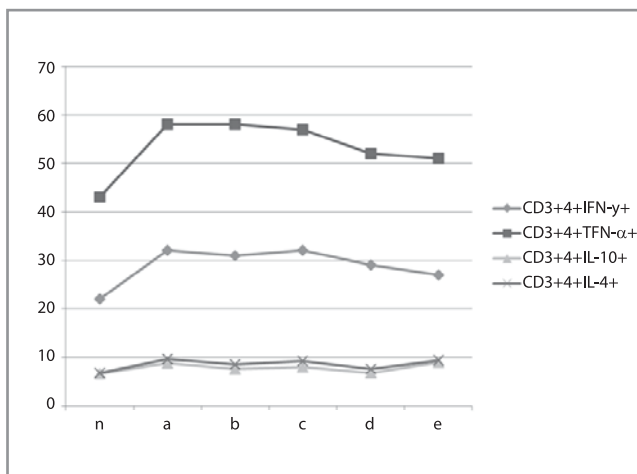


Рис. 2. Середні відносні рівні CD3+CD4+-клітин з експресією внутрішньоклітинних цитокінів у невагітних жінок (n) та пацієток на різних термінах вагітності (а-е)

порівняння середніх показників груп між собою не виявлено.

Аналіз динаміки змін середніх показників показав синхронне зростання протягом перших 18 тижнів вагітності внутрішньоклітинної експресії CD3+CD4+-лімфоцитами прозапальних цитокінів — IFN-γ і TNF-α (рис. 2). Середні показники протизапальних змінювалися не так суттєво, хоча у всіх групах відмічалася достовірне підвищення від норми CD3+CD4+IL-4+-л (рис. 2).

Індивідуальний аналіз показав, що відсоток жінок із високим рівнем Т-х з прозапальними медіаторами (вище за 2 квартилі референтних значень) був високим на початку вагітності в групах а і b; надалі їхня кількість зменшувалася і не відрізнялася від відсотка серед невагітних — у групах с-е для TNF-α+ і тільки в групі е для IFN-γ+-кл (рис. 3).

З урахуванням різноспрямованих даних літератури щодо можливого як позитивного, так і негативного впливу на вагітність IL-4 та IL-10 [2,7,11], нами проведено індивідуальний аналіз відсотка жінок не тільки з низьким, але і з високим рівнем Т-х з експресією цих протизапальних медіаторів (нижчими за 1, та вищими за 2 квартилі референтних значень).

Не виявлено достовірної різниці відносної кількості пацієток із високими показниками CD3+CD4+IL-4+- і CD3+CD4+IL-10+-кл як порівняно з референтною групою n, так і в динаміці вагітності ($p>0,05$), тільки тенденція до вищого їх числа в групах b і c для IL-4+-л (відповідно, $p=0,062$ і $0,097$), (рис. 4). Водночас із початку вагітності достовірно зменшувався відсоток жінок із низькою експресією IL-4 і IL-10 клітинами CD3+CD4+ (групи а-с);

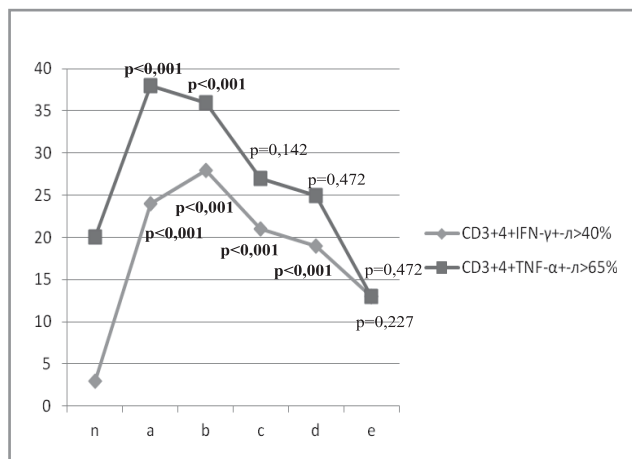


Рис. 3. Відносна кількість жінок (%) із високою експресією прозапальних цитокінів IFN-γ та TNF-α CD3+CD4+-клітинами у невагітних (n) та в пацієток на різних термінах вагітності (а-е), (р — порівняно з n)

у період 13–18 тижнів кількість таких вагітних збільшувалася і не відрізнялася від референтної групи n, надалі знову знижувалася і частка жінок, у яких рівень CD3+CD4+IL-10+-кл був нижчим за 3%, знову достовірно нижче, ніж у невагітних (рис. 4).

Проведені дослідження підтвердили зростання в крові вагітних жінок із безплідністю в анамнезі відносної кількості Т-лімфоцитів, у тому числі з експресією маркерів NK (CD56+), а також субпопуляції CD3+CD4+-кл з їх високою активацією за даними зростання експресії відповідних маркерів — CD25 і HLA-DR. Тобто у перші два триместри зростає потенціал Т-кілерів та Т-х, спрямований на антигени плода, і важливим є функціональна активність Т-х1, Т-х2 і Т-рег протягом різних термінів вагітності.

Аналіз внутрішньоклітинних цитокінів, що секретуються Т-х, показав підвищення протягом перших 18 тижнів вагітності середніх від-

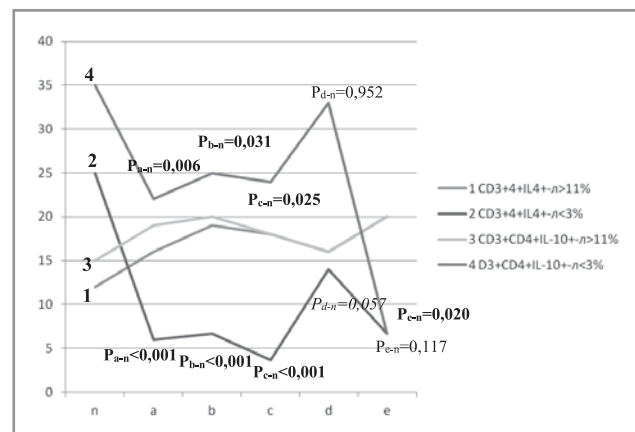


Рис. 4. Відносна кількість жінок (%) у групах із високою (1, 3) та низькою (2, 4) експресією протизапальних цитокінів CD3+CD4+-клітинами у невагітних (n) та пацієток на різних термінах вагітності (а-е), (р — порівняно з n)

носних рівнів як клітин із прозапальними IFN- γ і TNF- α , так і протизапального IL-4, який залишався високим і надалі в останній групі спостереження (до 28-го тижня). Середні показники іншого протизапального IL-10 змінилися тільки в групах а, с, d, тобто в періодах 4–7 тижнів, 10–12 тижнів та 19–28 тижнів достовірно були підвищені рівні як CD3+CD4+IL-10+, так і CD3+CD4+IL-10+TNF- α -клітин.

Слід зазначити, що, за даними інших дослідників, прогестерон у різних дозах може знижувати продукцію не тільки IFN- γ і TNF- α , але й IL-10 і таким чином викликати девіацію про-/протизапального балансу [13]; можливо, цим пояснюється відсутність чіткої динаміки цього протизапального цитокіну.

З 20-го тижня вагітності середні рівні CD3+CD4+IL-4+IFN- γ -кл достовірно перевищували не тільки рівень референтної групи, але й показники перших 4–7 тижнів вагітності, а для експресії іншого протизапального за даними CD3+CD4+IL-10+TNF- α -кл спостерігалася тенденція до вищого рівня ($p=0,076$). Вважаємо це позитивним станом для прогнозування позитивного перебігу, спираючись на ряд публікацій. Так, за даними деяких дослідників, у динаміці вагітності, ускладненої загрозою переривання в першому триместрі, змінюється характер цитокінового профілю у вигляді активації T-x1 в першому триместрі з подальшим пригніченням їхньої функції у другому триместрі на тлі підвищення продукції протизапальних цитокінів T-x2 [1,3]. До того ж, посилення продукції прозапальних цитокінів T-x1 та зниження протизапального IL-10 у навколоплідних водах жінок із передчасними пологам порушує баланс у між- та внутрішньоклітинній цитокіновій мережі й, очевидно, позначається на багатьох процесах, що відбуваються у всій системі «мати—плацента—плід» [3].

Проведений нами індивідуальний аналіз виявив, що кількість вагітних із високими рівнями в крові T-x із внутрішньоклітинною експресією IFN- γ та TNF- α була найбільшою протягом перших 12 тижнів, з 13-го тижня цей показник для TNF- α , а з 20-го — для IFN- γ не відрізнявся від невагітних.

Відповідно до високої частки вагітних із підвищеною секрецією прозапальних, кількість пацієнток із низькою секрецією протизапальних цитокінів IL-4 і IL-10 достовірно зменшувалася протягом тих самих 12 тижнів, що дало змогу утримувати задовільний ба-

ланс, із різким підвищенням їхньої кількості в період 13–18 тижнів (до норми) на тлі значної частки вагітних із високою експресією IFN- γ , що є небезпечним для таких жінок, із подальшим поверненням до низького їх відсотка для IL-10+-клітин із 19-го тижня. Можливо, період 13–18 тижнів вагітності з найбільшою кількістю жінок із найнижчими показниками — <3% клітин з експресією протизапальних цитокінів T-x2 (IL-4) і T-reg (IL-10) (хоча середні показники в цій групі не привертають особливої уваги) є небезпечним для пацієнток і потребує особливого спостереження.

З іншого боку, можна сподіватися на внутрішню регуляцію цих механізмів відповідно T-x2-концепції вагітності, яка підтверджена як у численних лабораторних дослідженнях, так і в акушерській практиці. Показано, що культуральна рідина клітин трофобласта пригнічувала секрецію *in vitro* IL-2, IFN- γ та TNF- α лімфоцитами, виділеними з периферичної крові, тоді як продукція IL-4 та IL-10 не відрізнялася від контрольних значень, що вказує на здатність розчинних факторів клітин трофобласта змінювати T-x1/T-x2 баланс у бік переважання T-x2-механізмів, які підтримують стан толерантності до чужих антигенів [9,14].

Отримані результати свідчать про актуальність і важливість отриманих даних для уявлення про комплекс змін функціональної активності T-x та визначення прогностичних маркерів перебігу вагітності та предикторів її ускладнень у жінок із безплідністю в анамнезі.

Висновки

На тлі зниження відносного рівня лімфоцитів протягом перших двох триместрів вагітності відбулося достовірне підвищення рівня T-кл (CD3+) і експресії маркерів NK (CD56+) у крові жінок із безплідністю в анамнезі.

Перші 12 тижнів вагітності характеризувалися високим відсотком CD3+CD4+-кл із підвищенням їх активації за даними зростання експресії рецептора до IL-2 (CD25+) і антигенів гістосумісності II класу — HLA-DR.

Спостерігалася достовірне синхронне підвищення середніх рівнів T-x із внутрішньоклітинною секрецією прозапальних цитокінів — CD3+CD4+IFN- γ + та CD3+CD4+TNF- α + протягом перших 18 тижнів вагітності з одночасним зростанням лімфоцитів із протизапальним цитокіном — CD3+CD4+IL-4+-кл протягом усіх 27 тижнів спостереження.

Індивідуальний аналіз показав, що кількість вагітних із високими рівнями в крові CD3+CD4+IFN- γ - та CD3+CD4+TNF- γ -л була найбільшою протягом перших 12 тижнів, із 13-го тижня відсоток жінок із високою експресією TNF- γ , а з 20-го — IFN- γ не відрізнявся від невагітних.

З початку вагітності достовірно зменшувався відсоток жінок із низькою експресією IL-4 і IL-10 клітинами CD3+CD4+ (групи а-с); у

період 13–18 тижнів відносна кількість таких вагітних суттєво підвищувалася і не відрізнялася від референтної групи, надалі знову знижувалася й частка жінок, у яких рівень CD3+CD4+IL-10+-кл був меншим за 3%, знову достовірно нижче, ніж у невагітних, а це можна вважати прогнозопозитивною ознакою.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References/Література

1. Arslan E, Colakoglu M, Celik C, Gezgin K, Acar A, Capar M, Akoz M, Akyurek C. (2004). Serum TNF-alpha, IL-6, lupus anticoagulant and anticardiolipin antibody in women with and without a past history of recurrent miscarriage. Arch Gynec Obstet. 4 (270): 227–229.
2. Barkovskiy DE. (2019). Izmeneniya T-helper-assotsirovannykh tsitokinov pri ugroze nevyinashivaniya beremennosti. Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal. 3: 169–191. [Барковский ДЕ. (2019). Изменения Т-хелпер-ассоциированных цитокинов при угрозе невынашивания беременности. Запорожский медицинский журнал. 3: 169–191]. doi: 10.14739/2310-1210.2019.
3. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. (2010). Immune Cells in the Placental Bed. Int J Dev Biol. 54: 281–294. doi: 10.1387/ijdb.082763jb.
4. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S. (2004). Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines pregnancy/early abortion: reexamining the Th1/Th2 paradigm. Int. Arch. Allergy Immunol. 13: 93–119.
5. Chernobay LV, Tischenko AN, Lazurenko VV i dr. (2016). Rol narusheniya tsitokinovogo profilya v snizhenii fertilnosti. Mlzhnarodniy medichnyi zhurnal. 2: 38–43. [Чернобай ЛВ, Тищенко АН, Лазуренко ВВ і др. (2016). Роль нарушения цитокинового профиля в снижении фертильности. Міжнародний медичний журнал. 2: 38–43]. URL: <http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/114004/08-Chernobai.pdf?sequence=1>.
6. Hellberg S, Raffetseeder J, Rundquist O, Magnusson R. (2021). Progesterone Dampens Immune Responses in In Vitro Activated CD4+T Cells and Affects Genes Associated With Autoimmune Diseases That Improve During Pregnancy. Front. Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2021.672168.
7. Krukier II, Levkovich MA, Mihelson AF i dr. (2019). Vliyanie disbalansa tsitokinov okolooplodnykh vod i syvorotki krovi zhenshiny na razvitiye prezhevremennykh rodov. Doktor Ru. 4 (159): 19–22. [Крукиер ИИ, Левкович МА, Михельсон АФ і др. (2019). Влияние дисбаланса цитокинов околоплодных вод и сыворотки крови женщины на развитие преждевременных родов. Доктор Ру. 4 (159): 19–22]. doi: 10.31550/1727-2378-2019-159-4-19-22.
8. Levkovich MA, Nefedova DD, Tsaturyan LD, Berdichevskaya YeM. (2016). Immunologicheskiye aspekty problemy nevyinashivaniya beremennosti. Sovrem. probl. nauki i obrazovaniya. 3: 186. [Левкович МА, Нефедова ДД, Цатурян ЛД, Бердичевская ЕМ. (2016). Иммунологические аспекты проблемы невынашивания беременности. Соврем. пробл. науки и образования. 3: 186].
9. Lissauer D, Eldershaw S, Inman Ch et al. (2015). Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. Eur J Immunol. 45: 2858–2872. doi: 10.1002/eji.201445404.
10. Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H, Dong M. (2011). Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. APMIS. 119: 597–604.
11. Makarkov AI, Buyanova SN, Ivanova OG, Linnik AP. (2012). Osobennosti T-kletchnoy immunoregulyatsii pri nevyinashivani beremennosti: evolyutsiya paradigmy. Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa. 5: 10–16. [Макарьков АИ, Буянова СН, Иванова ОГ, Линник АП. (2012). Особенности Т-клеточной иммунорегуляции при невынашивании беременности: эволюция парадигмы. Российский вестник акушера-гинеколога. 5: 10–16]. URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/rossijskij-vestnik-akushera-ginekologa/2013/2/downloads/ru/031726-612201321>.
12. Moskalev AV, Gumilevskiy BYu, Apchel AV, Tsyigan VN. (2019). T-limfotsity — «tsenzornyye» kletki immunoyn sistemy. Vestnik rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii. 2 (21): 191–197. [Москалев АВ, Гумилевский БЮ, Апчел АВ, Цыган ВН. (2019). Т-лимфоциты — «цензорные» клетки иммунной системы. Вестник российской военно-медицинской академии. 2 (21): 191–197]. doi: 10.17816/brmma25943.
13. Sallusto F. (2016). Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. Annu Rev Immunol. 34: 317–334. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056.
14. Veropotvelyan PN, Veropotvelyan NP, Guzhevskaya IV. (2013). Tsitokiny v sisteme mat-platsenta-plod pri fiziologicheskoy i patologicheskoy techenii beremennosti. Zdorove zhenschiny. 1 (77): 126–129. [Веропотвелян ПН, Веропотвелян НР, Гужевская ИВ. (2013). Цитокины в системе мать—плацента—плод при физиологическом и патологическом течении беременности. Здоровье женщины. 1 (77): 126–129].
15. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. (2020). T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. Front. Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
16. Yuzko OM, Yuzko TA, Rudenko NH. (2013). Stan ta perspektyvy vykorystannia dopomizhnykh reproduktyvnykh tekhnolohii pry likuvanni bezpliddia v Ukraini. Helth of women. 8: 26–30. [Юзько ОМ, Юзько ТА, Руденко НГ. (2013). Стан та перспективи використання допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні. Здоровье женщины. 8: 26–30]. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdzh_2013_8_8.

Відомості про авторів:

Туманова Лариса Євгенівна — д.мед.н., проф., керівник відділення лікування та профілактики гнійно-запальних захворювань в акушерстві ДУ «ІПАГ імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. П. Майбороди, 8. <https://orcid.org/0000-0002-4202-943X>.

Коломієць Олена Володимирівна — к.мед.н., ст.н.с. відділення профілактики та лікування гнійно-запальних захворювань в акушерстві ДУ «ІПАГ імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. П. Майбороди, 8; тел.: +38(044)483-22-31. <https://orcid.org/0000-0003-4511-1663>.

Рябенко Олена Павлівна — к.мед.н., зав. жіночої консультації Репродуктивної клініки «Надія». Адреса: м. Київ, вул. М. Кривоноса, 19а.

Стаття надійшла до редакції 27.01.2022 р.; прийнята до друку 28.04.2022 р.