

На правах рукописи

**КРЕЧЕТОВА ЛЮБОВЬ ВАЛЕНТИНОВНА**

**ФОРМИРОВАНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ  
К АЛЛОАНТИГЕНАМ ПЛОДА НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ  
В НОРМЕ И ПРИ ПРИВЫЧНОМ ВЫКИДЫШЕ**

14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные консультанты:**

доктор биологических наук

**Николаева Марина Аркадьевна**

доктор медицинских наук

**Тетрашвили Нана Картлосовна**

**Официальные оппоненты:**

**Малиновская Валентина Васильевна**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория онтогенеза и коррекции системы интерферона, заведующая лабораторией;

**Свитич Оксана Анатольевна**, доктор медицинских наук, член-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», лаборатория молекулярной иммунологии, заведующая лабораторией;

**Левкович Марина Аркадьевна**, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии научно-исследовательского института акушерства и педиатрии, ведущий научный сотрудник.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\*\*» \*\*\*\*\* 2018 г. в \*\*.\*\*. часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrigh.ru>.

Автореферат разослан «\*\*» \*\*\*\*\* 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Нормальное осуществление репродуктивной функции у женщин возможно благодаря гармоничному функционированию иммунологических механизмов. Наиболее ярким проявлением иммунорегуляции репродукции является формирование толерантности к аллоантигенам плода на ранних этапах развития беременности. Полуаллогенный плод, несущий чужеродные антигены отца, не отторгается материнским организмом вследствие сбалансированного взаимоотношения между клетками матери и плода.

По разным данным, у 1-5 % пар повторяющиеся спонтанные потери беременности на ранних сроках связывают с нарушениями иммунных реакций матери на антигены плода отцовского происхождения, то есть с аллоиммунными причинами [Farquharson R.G. et al., 2012; Matthiesen L. et al., 2012; Williams Z., 2012].

Проявления аллоиммунных нарушений, при которых иммунная система матери атакует ткани эмбриона, на клеточном и молекулярном уровнях изучаются активно, однако до сих пор не получены ответы на основные вопросы, касающиеся фундаментальных аспектов иммунологии репродукции: какие иммунные механизмы обеспечивают формирование толерантности и какие изменения молекулярных и клеточных иммунных факторов приводят к нарушениям гестационных процессов.

Формирование толерантности представляет собой сложный, хронологически детерминированный процесс, включающий в себя аллогенную стимуляцию материнской иммунной системы отцовскими антигенами и последующее развитие клеточных и гуморальных реакций, подавляющих отторжение плода. Предполагается, что недостаточная аллогенная стимуляция материнской иммунной системы отцовскими антигенами при совпадении антигенов главного комплекса гистосовместимости – HLA - у партнеров в супружеских парах может быть важной предпосылкой привычного невынашивания [Kishore R. et al., 1996; Ober C. et al., 1998; Agrawal S. et al., 2000; Umaphathy S. et al., 2011].

Одним из основных параметров клеточного иммунитета, определяющих провоспалительную или противовоспалительную направленность иммунных реакций после аллогенной стимуляции, является функциональное состояние Т-хелперов, продуцирующих цитокины Th1 или Th2-типа, соответственно. В ранних исследованиях были получены результаты о превалировании Th2-типа иммунного ответа во время гестации. Однако более поздние исследования

показали, что имплантация и плацентация в первом триместре протекают на фоне провоспалительных реакций, которые предшествуют развитию противовоспалительных реакций, регистрируемых при дальнейшем прогрессировании беременности [Saito S. et al., 2001; Fest S. et al., 2007; Mor G. et al., 2010]. Открытие субпопуляций Т-хелперов, продуцирующих цитокины, которые опосредуют развитие острого воспаления аутоиммунного и аллергического характера (Th17-клеток), продемонстрировало значительную функциональную гетерогенность Т-хелперных клеток [Saito S. et al., 2010; Wang W.J. et al., 2010; Saito S. et al., 2011]. Предполагается, что неадекватность формирующегося субпопуляционного состава Th-клеток потребностям гестационного процесса может приводить к формированию осложнений беременности [Saito S. et al., 2010; Petroff M.G., 2011]. Поэтому изучение соотношений различных субпопуляций Th-клеток и продукции ими цитокинов является перспективным направлением для поиска маркеров нарушений формирования толерантности к антигенам плода.

Дальнейшее развитие представлений о роли иммунокомпетентных клеток в регуляции репродукции связано с открытием минорной субпопуляции Т-хелперных клеток с поверхностным фенотипом  $CD4^+CD25^+$  и конститутивной экспрессией транскрипционного фактора FOXP3 (forkhead box p3). Это субпопуляция естественных регуляторных клеток (Treg, Treg), участвующих в формировании специфической толерантности [Fest S. et al., 2008; Tomura M. et al., 2010; Moldenhauer L.M. et al., 2010, 2011; Leber A. et al., 2011; Martín P. et al., 2011; Toldi G. et al., 2012; Erlebacher A., 2013]. Модельные эксперименты на лабораторных животных однозначно подтверждают влияние Treg на репродуктивную функцию, однако до сих пор динамика этой субпопуляции при беременности у человека остается малоизученной [Saito S. et al., 2005; Arruvito L. et al., 2010; Leber A. et al., 2011; Peterson R., 2012].

Распространенной моделью, используемой для изучения аллогенных реакций *in vitro*, является смешанная культура лимфоцитов донора и реципиента. Аллогенная стимуляция лимфоцитов *in vitro* сопровождается разнонаправленными изменениями: как активацией клеток [Caruso A. et al., 1997; Lindsey W.B. et al., 2007; Saldanha-Araujo F. et al., 2012], так и появлением лимфоцитов, обладающих иммуносупрессивной функцией, среди которых обнаруживаются клетки с полным фенотипом Treg [Montelli T.C. et al., 2003; Valencic E.C. et al., 2007; Moldenhauer L.M. et al., 2010]. Одним из интегральных количественных показателей, характеризующих динамику аллоиммунных реакций и позволяющих оценивать влияние на нее различных растворимых

факторов, является экспрессия активационных маркеров CD69, CD25 и др. [Caruso A. et al., 1997; Takizawa K. et al., 2005; Yan C.H. et al., 2007].

Обнаружение феномена снижения ответа лимфоцитов на активационный стимул под влиянием растворимых факторов аутологичной сыворотки беременных позволило сформулировать концепцию системной гестационной иммуносупрессии, которая сопровождает развитие неосложненной беременности. Интерес к исследованию этого феномена поддерживается до настоящего времени [Шмагель К.В., Черешнев В.А., 2003; Matthiesen L. et al., 1996; Shojaeian J. et al., 2007; Vozorgmehr M. et al., 2012].

Одной из наиболее изученных гуморальных аллогенных реакций является образование антиотцовских антилейкоцитарных антител. Мнения о роли этих антител в развитии привычного невынашивания противоречивы [Mowbray J.F. et al., 1985; Regan L. et al., 1991; Maruyama T. et al., 1993; Nielsen H.S. et al., 2010]. До сих пор не ясно, являются ли антиотцовские антитела фактором, необходимым для нормального протекания беременности, имеет ли уровень этих антител в сыворотке крови беременных значение для прогноза выкидыша на раннем сроке. Одной из возможных причин противоречивых представлений о значимости антиотцовских антител является отсутствие единого метода их определения [Shenton B.K. et al., 1997; Lashley E.E. et al., 2013].

Обобщая вышеизложенное, можно предположить, что аллоиммунные причины невынашивания связаны с таким состоянием иммунной системы женщины, при котором нарушение реакций материнской иммунной системы на антигены плода отцовского происхождения выражается в нарушении формирования субпопуляционного состава Th-клеток и, как следствие, в нарушении как клеточных, так и гуморальных механизмов формирования состояния толерантности.

Поэтому изучение соотношений различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, их активационного состояния, продукции ими цитокинов и гуморальных факторов является перспективным направлением для поиска маркеров нарушений формирования толерантности к антигенам плода.

### **Степень разработанности темы исследования**

Идиопатический привычный выкидыш – акушерская патология, развитие которой с наибольшей вероятностью можно объяснить нарушением формирования толерантности к аллоантигенам плода и, следовательно, поиск маркеров нарушенной толерантности можно вести среди показателей, характеризующих формирование иммунных реакций отторжения при данной патологии. Другим следствием признания иммунного генеза привычной потери

беременности ранних сроков является успешное применение патогенетической, иммунокорректирующей терапии для ее лечения [Beer A.E., 1982]. Первые попытки применения были связаны с пересадкой кожного лоскута партнера женщине с идиопатическим привычным выкидышем, в которых показано пролонгирование беременности до доношенного срока в 90 % случаев [О.В. Надеина с соавт., 1972; Говалло В.И. с соавт., 1985; Despodova T., 1985; Bukovský A. et al., 1988].

Обнаружение трансплантационных антигенов на лимфоцитах периферической крови явилось обоснованием иммунизации женщин лимфоцитами, выделенными из периферической крови партнера [Говалло В.И. с соавт., 1983; Beer A.E., 1986]. Этот вид иммунотерапии (иммуноцитотерапии, или аллоиммунизации) используется в лечении более 30 лет [Carp H.J.A., 2014; Farquharson R.G., 2017]. Однако однозначного мнения об эффективности данной процедуры в мировой практике нет, и в ряде мета-анализов сделан вывод об отсутствии статистически значимого улучшения в исходах беременности женщин с идиопатическим привычным выкидышем после лечения с применением иммуноцитотерапии [Porter T.F. et al., 2006; Duckitt K. et al., 2011; Wong L.F. et al., 2014].

Тем не менее вывод дискуссионный, поскольку в исследованиях применялись различные дозы клеток (от 50 до 400 млн клеток в процедуре), различные пути иммунизации (внутрикожный, подкожный, внутримышечный и внутривенный), в том числе и различные их комбинации, различными были протоколы подготовки клеток для введения, не были однородными выборки пациенток (включались пациентки и с первичным, и с вторичным, и с третичным выкидышем).

Отсутствует единое мнение о влиянии иммуноцитотерапии на иммунную систему женщин с идиопатическим привычным выкидышем. Сначала предполагалось, что иммунизация приводит к снижению ответа материнской иммунной системы на аллоантигены плода, а позже - что к усилению материнского специфического ответа. При этом довольно устойчиво мнение, что успех иммунизации в случае пролонгирования беременности связан с изменением провоспалительного состояния материнской иммунной системы на противовоспалительное, хотя все чаще в последнее десятилетие звучат утверждения о необходимости провоспалительного состояния материнской иммунной системы для успешности процессов имплантации, и плацентации. Данные о вовлеченности в эффекторные реакции гетерогенных популяций иммунокомпетентных клеток позволяют предполагать, что как количество клеток

конкретных фенотипов, так и их функциональное состояние и способность отвечать на активационный стимул могут определять формирование специфической толерантности к антигенам плода [Соловьева А.Е. с соавт., 2005; Yang K.M. et al., 2010; Loewendorf A. et al., 2014; Carbone J. et al., 2016]. Исходя из этого, критериями эффективности иммуноцитотерапии могут стать маркеры формирующегося состояния толерантности, а поиск маркеров, прогнозирующих с наибольшей диагностической значимостью эффективность лечения, является актуальным направлением исследования.

### **Цель исследования**

Выявить ключевые маркеры формирования толерантности при иммунокоррекции привычной потери беременности ранних сроков.

### **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать состояние клеточного звена иммунитета женщин с идиопатическим привычным выкидышем после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности.

2. Оценить состояние активации иммунокомпетентных клеток периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем на фоне аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности.

3. Оценить содержание естественных Трег клеток с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}$  и внутриклеточной экспрессией транскрипционного фактора FOXP3, а также Т-лимфоцитов с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}$  и экспрессией транскрипционного фактора ROR $\gamma$ t в периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности.

4. Оценить уровень продукции цитокинов *in vitro* лимфоцитами периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности.

5. Исследовать супрессивный (блокирующий) эффект аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности.

6. Оптимизировать способ оценки антиотцовских антилейкоцитарных антител и исследовать динамику их уровня в процессе аллоиммунизации женщин с идиопатическим привычным выкидышем.

7. Оценить диагностическую значимость показателей клеточного и гуморального иммунитета у женщин с идиопатическим привычным выкидышем

для прогноза ранних потерь беременности.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что иммуноцитотерапия (аллоиммунизация) приводит к формированию провоспалительной направленности иммунных реакций на ранних сроках беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем.

Впервые показано, что сниженная доля Т-лимфоцитов с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}$  и экспрессией транскрипционного фактора  $ROR\gamma t$ , обеспечивающих развитие воспалительных процессов, на ранних этапах гестационного процесса свидетельствует о высокой вероятности выкидыша на фоне проведения аллоиммунизации.

Впервые обнаружено усиление экспрессии маркера ранней активации лимфоцитов CD69 на поверхности Т-лимфоцитов ( $CD4^+$  и  $CD8^+$ ), но не NK-клеток в периферической крови на ранних этапах гестационного процесса у пациенток с выкидышем, что указывает на важную роль активированных Т - лимфоцитов в распознавании антигенов развивающегося плода и на возможность использования оценки содержания активированных Т-лимфоцитов в качестве прогностического фактора последующего выкидыша.

Впервые с помощью использования маркера ранней активации лимфоцитов CD69 для оценки блокирующей активности аутологичной сыворотки показана динамика неспецифической иммуносупрессии у женщин с пролонгированной беременностью, которая заключается в высокой блокирующей активности в первом и третьем триместрах и низкой – во втором триместре, при этом в первом триместре срок 8-9 недель характеризуется минимальной блокирующей активностью в гестационном периоде в целом.

Впервые показана динамика Th1/Th2-баланса цитокинов, продуцируемых *in vitro* лимфоцитами периферической крови женщин с пролонгированной беременностью, а именно: на ранних стадиях и в конце беременности преобладают воспалительные реакции, сдвиг в сторону противовоспалительной направленности реакций наблюдается в средние сроки гестации.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость диссертационного исследования заключается в подтверждении необходимости провоспалительного состояния женской иммунной системы на ранних этапах беременности. Также полученные данные об отсутствии изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у женщин с идиопатическим привычным выкидышем после предгестационной аллоиммунизации и нормализация содержания NK-клеток,



CD200<sup>+</sup>-клеток, Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> в 12 недель гестации на фоне иммунизации партнерскими лимфоцитами в I триместре позволяют сформулировать дальнейшее направление исследований, связанное с выявлением характера связей показателей, отражающих состояние иммунной системы пациенток с идиопатическим привычным выкидышем при беременности, развивающейся на фоне иммунокоррекции, с уровнем факторов ранней беременности, для более глубокого понимания механизмов, способствующих успешному формированию толерантности иммунной системы к отцовским антигенам плода и пролонгированию беременности.

Практическая значимость состоит в обосновании оценки содержания в периферической крови пациенток с идиопатическим привычным выкидышем вне беременности субпопуляций с киллерной активностью CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> в качестве основы для персонализированного назначения аллоиммунизации в предгестационной подготовке и оценки содержания субпопуляций CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> в 5-6 недель гестации - для персонализированного назначения аллоиммунизации в I триместре беременности, а также в выборе оптимального способа определения антиотцовских антилейкоцитарных антител в сыворотке крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем и в обосновании достаточности двух процедур иммунизации в предгестационной подготовке.

### **Методология и методы исследования**

Методология настоящего исследования была направлена на выявление ключевых маркеров формирования толерантности при иммунокоррекции привычной потери беременности ранних сроков. Объектом являлись женщины с привычным выкидышем в анамнезе. Предметом исследований были иммунологические показатели, характеризующие механизмы формирования толерантности к аллоантигенам плода и их особенности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем.

Исследование являлось проспективным. Его дизайн был построен таким образом, чтобы можно было охарактеризовать особенности иммунной системы женщин с идиопатическим привычным выкидышем, выявить иммуномодулирующие эффекты иммуноцитотерапии и предикторы потери беременности в I триместре гестации. Работа проводилась в соответствии с правилами проведения научных клинических исследований согласно ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» и была одобрена Комитетом по этике ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 13 от 06 декабря 2013 г.).

### Включение пациентов в исследование

В соответствии с поставленными задачами было проведено клинико-лабораторное обследование 725 супружеских пар, которые обратились в научно-поликлиническое отделение Центра за период 2007-2016 гг. по поводу привычного выкидыша первого триместра. Критериями включения в основную группу (при условии подписанного информированного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных) были: наличие не менее 2 выкидышей ранних сроков от одного и того же партнера, возраст женщины от 20 до 40 лет, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия партнера, самопроизвольное наступление беременностей, отсутствие анатомических, генетически обусловленных, аутоиммунных, гормональных нарушений, тяжелых экстрагенитальных заболеваний, отсутствие в анамнезе иммуноцитотерапии. В результате в основную группу были включены 196 супружеских пар (27,0 %), у которых генез потерь беременности оставался неясным. Всего из исследования были исключены 65 супружеских пар по причинам, не связанным с условиями исследования, и в итоге, основную группу составила 131 супружеская пара (18,1 %).

Критериями включения в контрольную группу (при условии подписанного информированного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных) были: наличие, как минимум, одних родов в анамнезе от данного партнера, возраст женщины от 20 до 40 лет, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, отсутствие гормональных нарушений, сопровождающихся изменениями менструального цикла, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия у партнера.

### Проведение иммуноцитотерапии (аллоиммунизации)

Методика проведения иммуноцитотерапии утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 25 декабря 2012 г.).

Перед процедурой партнеров обследовали согласно порядку медицинского обследования донора крови и ее компонентов (ред. Приказов Минздравсоцразвития РФ от 16.04.2008 № 175н, МЗ РФ от 02.04.2013 № 183н, Федерального закона Российской Федерации от 20 июля 2012 г. № 125-ФЗ). Для проведения процедуры иммуноцитотерапии использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства.

Иммуноцитотерапию проводили женщинам с идиопатическим привычным выкидышем как в предгестационной подготовке, так и в первом триместре наступившей беременности. Во время предгестационной подготовки пациенткам

дважды, с интервалом в один месяц, на 5-10 день менструального цикла внутривенно вводили 50 млн лимфоцитов партнера в ладонную поверхность предплечья, в 10-12 точек. Во время наступившей беременности иммунизацию проводили дважды с интервалом в один месяц на сроке в 5-6 недель и 8-9 недель.

#### Иммунологические методы исследования

Лимфоциты для иммунологических исследований выделяли из цельной крови партнеров стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077. Сыворотку крови женщин получали после образования в течение 30 минут при комнатной температуре кровяного сгустка, который осаждали центрифугированием при 900g в течение 10 минут. Перед проведением анализа сыворотку инактивировали нагреванием в течение 30 минут при 56 °С.

Фенотипирование лимфоцитов периферической крови осуществляли методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител (mAb), меченных FITC или PE, против антигенов CD3(FITC), CD4(PE), CD5(PE), CD8(PE), CD16(PE), CD19(FITC), CD56(PE), CD200(PE) (Becton Dickinson и eBioscience, США). Оценивали содержание основных субпопуляций иммунокомпетентных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), В-клеток (CD19<sup>+</sup>), В1-клеток (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), NK-клеток (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью mAb к CD45, меченных перидинин-хлорофилл протеином (PerCP), (Dako, Дания). Для оценки позитивно-окрашенных субпопуляций использовали соответствующие FITC или PE-меченные изотипические IgG. Трег клетки с внутриклеточной экспрессией FOXP3 в цельной крови пациенток с ИПВ определяли как субпопуляцию с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>, с использованием набора, содержащего моноклональные антитела к антигенам CD4, меченные PerCP (eBioscience, США), CD25, меченные FITC (Becton Dickinson, США) и CD127, меченные PE (eBioscience, США). Оценивали долю Трег среди CD4<sup>+</sup>-клеток. Моноклональные антитела добавляли непосредственно к цельной крови, затем лизировали с помощью раствора FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США).

Оценку содержания в периферической крови естественных Т-регуляторных клеток с внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup> проводили с помощью набора «FOXP3 staining buffer set» (eBioscience, США). До пермеабиллизации клетки окрашивали антителами к CD4, меченными FITC, и антителами к CD25, меченными PE, для последующей идентификации субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. После пермеабиллизации клетки были окрашены антителами к FOXP3 или RORγt,

мечеными аллофикоцианином (eBioscience, США) и проанализированы методом проточной цитометрии.

Экспрессию раннего активационного антигена CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> определяли методом проточной цитометрии как без стимуляции, так и после стимуляции цельной крови фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 часов в CO<sup>2</sup>-инкубаторе при температуре 37 °С. Для оценки спонтанной экспрессии CD69 использовали мАт против антигена CD3, меченные FITC, и против антигена CD69, меченные PE. Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью мАт к CD45 (Dako, Дания), меченных PerCP. Для оценки поверхностного фенотипа стимулированных лимфоцитов использовали наборы мАт FastImmune, предназначенные для определения фенотипов CD3/CD4/CD69, CD3/CD8/CD69, CD45/CD56/CD69 (Becton Dickinson, США), в которых 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, затем лизировали с помощью раствора OptiLyse (Beckman Coulter, США).

Блокирующую активность женской сыворотки по отношению к аутологичным лимфоцитам определяли разработанным автором способом по ее влиянию на экспрессию раннего маркера активации CD69 лимфоцитами, стимулированными *in vitro* митогеном [Патент РФ № 2396566, 2010]. Блокирующий эффект (БЭ) аутологичной сыворотки определяли вне беременности до и после аллоиммунизации, а также при беременности по ингибированию экспрессии CD69 лимфоцитами, стимулированными ФГА в течение 72 часов. Содержание живых лимфоцитов, экспрессирующих CD69, оценивали методом проточной цитометрии с использованием прямых, меченных FITC, антител. Для оценки жизнеспособности клеток использовали иодид пропидия. Блокирующий эффект аутологичной сыворотки определяли как разницу между процентом ингибирования экспрессии CD69 в присутствии аутологичной сыворотки и АВ-сыворотки.

Продукцию цитокинов оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием проточного цитометра. Определение продукции цитокинов Th1/Th2-направленности лимфоцитами периферической крови проводили после стимуляции лимфоцитов конканавалином А (КонаА) в дозе 10 мкг/мл в течение 24-х часов. Супернатанты хранили до анализа при минус 80 °С. С помощью мультиплексного анализа с использованием системы Cytometric Bead Array и набора «Human Th1/Th2 6-plex» (Becton Dickinson, США) определяли содержание

ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-10. Для определения содержания ИЛ-8 использовали одноплексный набор.

Продукцию цитокинов Th1/Th2/Th17-направленности клетками цельной периферической крови определяли мультиплексным методом после митогенной стимуляции *in vitro*. Использовали набор «Цитокин-стимул-бест» (Вектор-Бест, Россия). К 1 мл цельной крови в стерильном флаконе добавляли смесь митогенов (4 мкг ФГА, 4 мкг Кон А, 2 мкг липополисахарида) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °С на 24 часа. Образцы надосадочной жидкости хранили до анализа при минус 80 °С. Содержание ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-4, ИЛ-10 оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием набора «Human Th1/Th2 11 plex Ready-to-Use Kit» (eBioscience, США), содержание ИЛ-17 оценивали с помощью набора «Human IL-17A Flex set» (Becton Dickinson, США).

Выявление антиотцовских антилейкоцитарных антител проводили методом проточной цитометрии [Патент РФ № 2614729, 2017]. Уровень антиотцовских антилейкоцитарных антител в сыворотке женщины соответствует доле мужских лимфоцитов, покрытых антителами к Fc-фрагменту иммуноглобулина G. Определяли долю покрытых антителами T-лимфоцитов, которые выявляли с помощью mAb к CD3, меченных PE (Beckman Coulter, США).

Проточную цитометрию выполняли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest. и на проточном цитофлуориметре Gallios (Beckman Coulter, США) с использованием программы Kaluza. Обсчет результатов при использовании мультиплексного метода производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0.

Статистическая обработка данных производилась общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007. Используются параметрические критерии (*t*-критерий Стьюдента) и непараметрические критерии (Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка,  $\chi^2$ -критерий Пирсона, U-критерий Манна-Уитни). В случае нормального распределения данные представлены средней арифметической величиной и её стандартной ошибкой ( $M \pm m$ ). В случае отклонения от нормального распределения данные представлены медианой, минимумом и максимумом, а также средней арифметической величиной и стандартным отклонением ( $M \pm \sigma$ ). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для оценки диагностической значимости тестов использовали ROC-анализ пакета MedCalc12 для Windows 7.

## Положения, выносимые на защиту

1. Состояние иммунной системы пациенток с идиопатическим привычным выкидышем вне беременности характеризуется высоким содержанием лимфоцитов с цитотоксической направленностью, низким уровнем Трег клеток, высокой долей  $ROR\gamma t^+$ -клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов, повышенным уровнем сывороточных супрессивных факторов, снижающих способность лимфоцитов отвечать на поликлональный стимул *in vitro*, преобладанием продукции стимулированными лимфоцитами цитокинов Th2-типа. Предгестационная аллоиммунизация не меняет субпопуляционный состав и способность лимфоцитов пациенток отвечать на поликлональный стимул, однако регистрация высокого уровня антиотцовских антилейкоцитарных антител свидетельствует о способности отвечать на специфический стимул – лейкоцитарные антигены партнера. Нормализация состояния клеточного звена иммунной системы пациенток с пролонгированной беременностью наблюдается в 12 недель гестации.

2. Блокирующая активность сывороток женщин с беременностью, пролонгированной до доношенного срока, в отношении аутологичных лимфоцитов, стимулированных митогеном, максимальна в 5-6 недель и минимальна в 8-9 недель гестации. Также в 8-9 недель гестации снижается митоген-индуцированная продукция *in vitro* провоспалительных цитокинов. Следовательно, высокий уровень иммуносупрессии характерен для ранних сроков беременности и связан с необходимостью иммунного контроля реакций на отцовские антигены плода при имплантации и плацентации.

3. Исходный низкий уровень НК-клеток, дальнейшее снижение их уровня после предгестационной аллоиммунизации и низкий их уровень в 5-6 недель гестации у женщин, потерявших данную беременность, в сочетании с низким уровнем блокирующей активности аутологичной сыворотки и с низкой долей  $ROR\gamma t^+$ -клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов периферической крови по сравнению с показателями женщин, доносивших данную беременность на фоне аллоиммунизации, свидетельствуют о дисбалансе иммунных реакций у женщин с выкидышем, препятствующем формированию толерантности к аллоантигенам плода в ранние сроки гестации.

4. Отсутствие различий в уровне специфического ответа на HLA-антигены отца (антиотцовских антилейкоцитарных антител) у пациенток с пролонгированной беременностью и с выкидышем, преимущественная активация *in vitro* у пациенток Т-лимфоцитов свидетельствуют о ненарушенном распознавании антигенов отца иммунной системой пациенток с идиопатическим

привычным выкидышем. При этом отсутствие различий в уровне экспрессии *in vitro* CD69 НК-клетками в 5-6 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и с выкидышем, нормальные показатели субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессии *in vitro* CD69 НК-клетками у пациенток в 12 недель пролонгированной беременности вместе с данными об отсутствии изменений иммунологических параметров после предгестационной аллоиммунизации, проведенной в качестве монотерапии, указывают на значимость взаимосвязи иммунных реакций с гормональными сигналами в ранние сроки гестации и на вероятность их нарушений у пациенток с выкидышем, препятствующих формированию толерантности к аллоантигенам плода.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

О достоверности результатов исследования свидетельствует достаточный объем исследования с применением современных высокочувствительных, объективных и специфических методик, использованием современных автоматических диагностических приборов, обладающих системами автоматизированного сбора, учета и анализа данных, адекватными методами статистической обработки полученных данных.

Диссертационная работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦАГП» Минздрава России (протокол № 18 от 18 декабря 2017 г.).

Материалы работы были представлены на Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017), Международном симпозиуме по иммунологии репродукции (13<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> International Symposium for Immunology of Reproduction "Progress In Reproductive Immunology", Варна, Болгария, 2012, 2015, 2018), на Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2011), на 4-й Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Пермь, 2010), на 5-й Российской конференции по иммунологии репродукции (Иваново, 2012), на 7-й Всероссийской научной конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты» (Ростов-на-Дону, 2015), на Всероссийской конференции «Аллергология и иммунология: Клинические рекомендации в практику врача» (Москва, 2012, 2015, 2016, 2017), на Всероссийской научно-практической конференции «Невынашивание беременности: социальная проблема, медицинские решения» (Москва 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017), на XVI Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017).

Получены патенты РФ на изобретения: «Способ определения блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки» (№ 2396566, 10.08.2010); «Способ

выявления антиотцовских антител после иммунизации женщин с идиопатическим привычным выкидышем лимфоцитами полового партнера» (№ 2614729, 28.03.2017).

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 47 печатных работ, из них 23 статьи в 3 научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, 22 публикации в материалах отечественных и международных конференций и конгрессов, 2 патента.

### **Личный вклад автора**

Основной объем лабораторных исследований, включающих фенотипирование лимфоцитов по поверхностным CD-маркерам, культивирование лимфоцитов с митогенами для последующего фенотипирования и получения супернатантов, пробоподготовка для выявления лимфоцитов с внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов, выполнение тестов по мультиплексному анализу, ведение базы данных по пациентам, обработка и оценка результатов исследования, подготовка материалов для публикации и оформление работы выполнены автором лично.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 247 страницах компьютерного текста, содержит 23 таблицы и 46 рисунков. Библиография содержит 367 источников (34 на русском и 333 на английском языках).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Клиническая характеристика пациенток**

В анамнезе у 131 женщины из включенных в исследование супружеских пар с идиопатическим привычным выкидышем (ИПВ) была потеряна 351 беременность, потери в I триместре наблюдались у 92 (70,2 %) пациенток. Во всех случаях потери беременности носили первичный характер. У 15 супружеских пар были диагностированы противопоказания к проведению иммуноцитотерапии (ИЦТ), поэтому основную группу составили 116 пар. Средний возраст пациенток был  $30,5 \pm 2,4$  лет. Среди пациенток с ИПВ преобладали женщины старше 30 лет и отмечался высокий процент хронических инфекционных и гинекологических заболеваний.

Из 116 супружеских пар, прошедших аллоиммунизацию в предгестационной подготовке, беременность наступила у 90 (77,6 %) женщин.



Среди исходов настоящей беременности прерывание беременности по медицинским показаниям было в 1 случае (1,1 %), самопроизвольное прерывание беременности до 12 нед. - в 10 (11,1 %), самопроизвольное прерывание беременности в сроках 12-22 нед. - в 2 (2,2 %), преждевременные роды - в 8 (8,9 %), своевременные роды – в 69 случаях (76,7 %). Всего роды живым плодом были у 77 пациенток (85,6 %). Среди ранних потерь настоящей беременности (n=10) в четырех случаях был обнаружен аномальный кариотип у плода: 47XX+22, 47XY+16, 47XX+21, 47XY+5.

В контрольной группе было обследовано вне беременности 28 фертильных женщин, имеющих последнего ребенка не старше 2 лет, а также 85 женщин с физиологическим течением беременности, среди которых было 57 первобеременных и 28 повторнобеременных. Средний возраст женщин контрольной группы -  $28,2 \pm 4,2$  лет. В контрольной группе беременных осложнений в анамнезе в виде угрожающего выкидыша или угрозы преждевременных родов не отмечено.

### **Иммунологические параметры пациенток с ИПВ в предгестационной подготовке и в I триместре пролонгированной беременности**

#### Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови

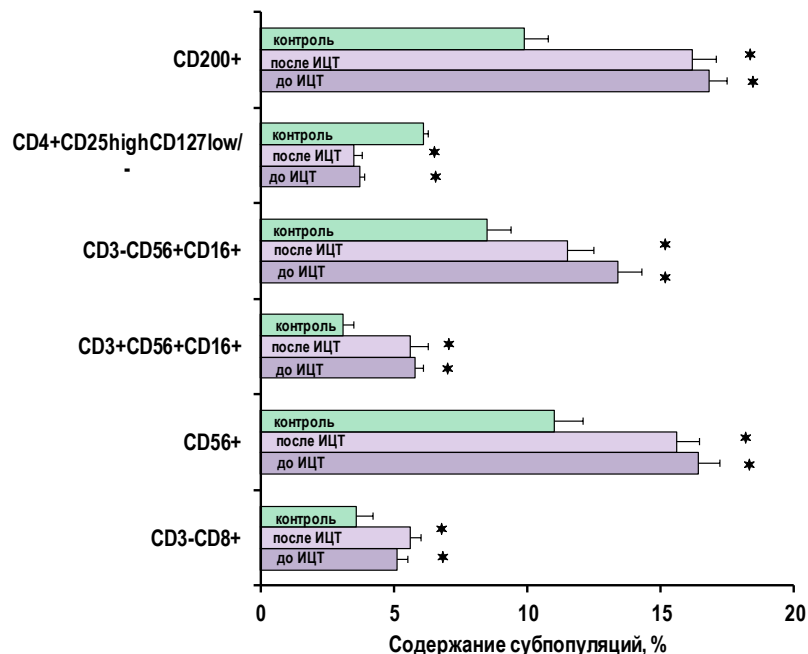
В результате исследования установлено, что особенностью субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ является высокий уровень NK-клеток ( $CD56^+$ ,  $CD3^-CD56,16^+$ ),  $CD3^-CD8^+$ -клеток, NKT-клеток ( $CD3^+CD56,16^+$ ),  $CD200^+$ -лимфоцитов и низкий уровень Трег-клеток ( $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ ). Изменений установленных закономерностей после предгестационной аллоиммунизации не выявлено (рисунок 1).

Изменения выявлены при аллоиммунизации в I триместре, они заключались в увеличении содержания Трег-клеток и снижении содержания  $CD200^+$ -лимфоцитов у женщин с пролонгированной беременностью (рисунок 2).

В целом, в 12 недель гестации субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с пролонгированной беременностью не отличался от состава у женщин в 12 недель физиологической беременности (рисунок 3).

Доля FOXP3<sup>+</sup>Трег-клеток в периферической крови женщин с ИПВ не отличалась от доли у фертильных женщин в период предгестационной подготовки, у женщин с пролонгированной беременностью оставалась на том же уровне в 5-6 недель гестации и в 12 недель и не отличалась от доли у женщин в 12 недель физиологической беременности (рисунок 4А). Доля RORγt<sup>+</sup>-клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов в период предгестационной аллоиммунизации была значимо выше, чем в контроле. У женщин с пролонгированной

беременностью в I триместре гестации доля  $ROR\gamma t^+$ -клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов у пациенток оставалась на уровне, достигнутом после предгестационной иммунизации, при этом не отличалась от доли у женщин в 12 недель физиологической беременности (рисунок 4Б).



\* - показатель, достоверно отличающийся от контрольных значений.

Рисунок 1 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в течение предгестационной аллоиммунизации

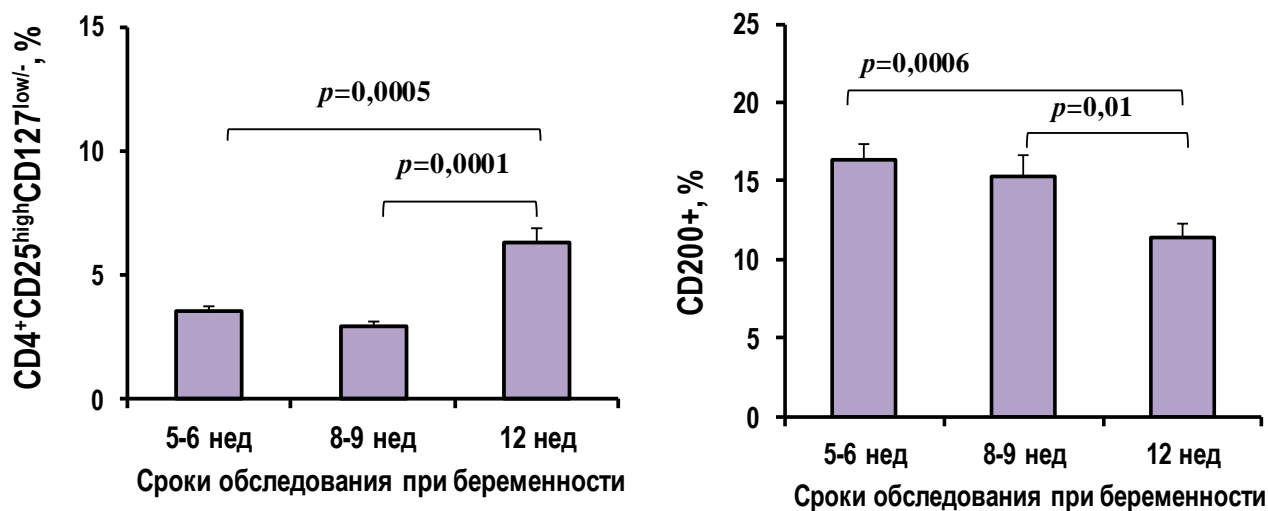
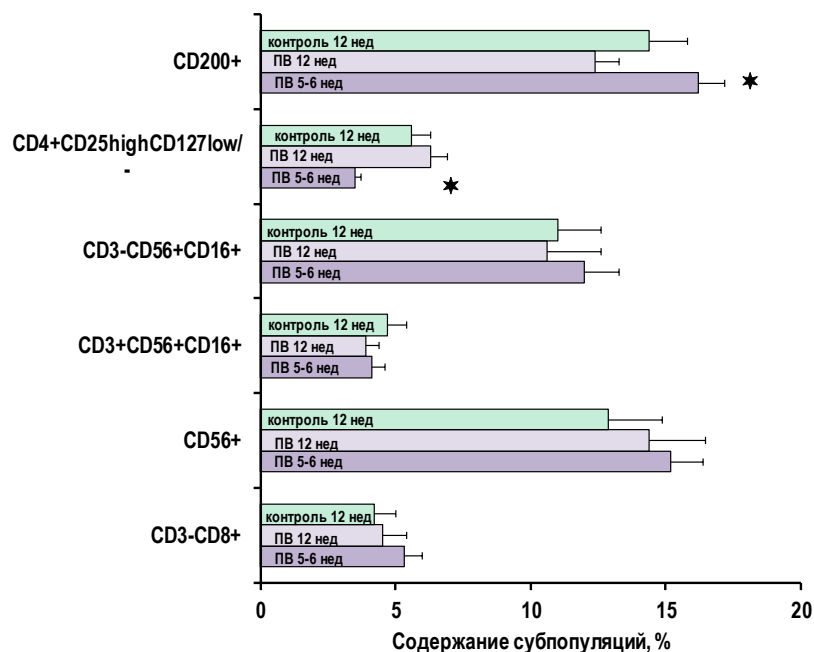


Рисунок 2 - Динамика Т-регуляторных клеток и  $CD200^+$ -лимфоцитов в периферической крови женщин с ИПВ в I триместре гестации



\* - показатель, достоверно отличающийся в 5-6 недель от значений в 12 недель гестации.

Рисунок 3 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в I триместре гестации

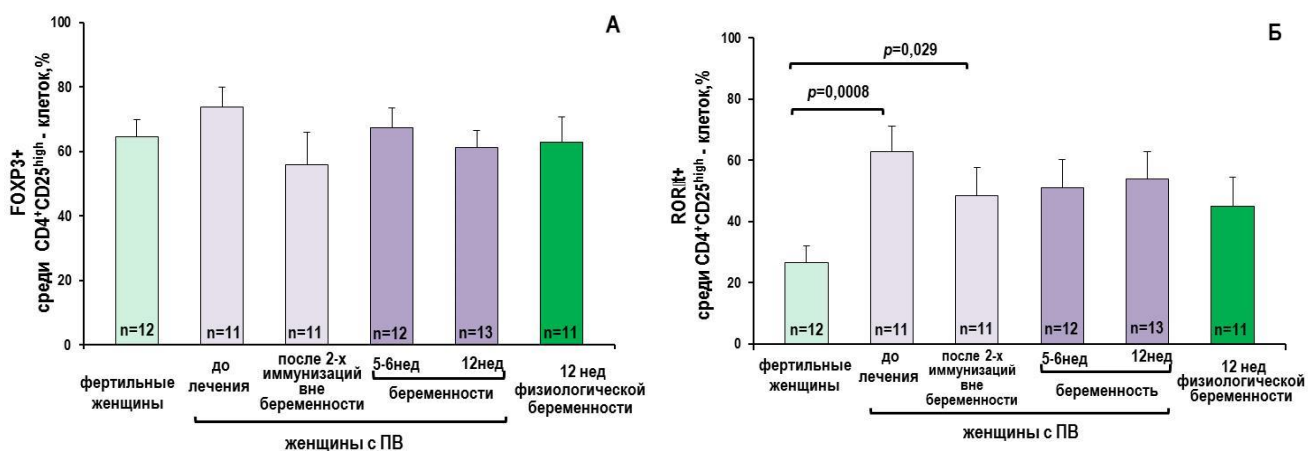


Рисунок 4 - Доля FOXP3<sup>+</sup>T - регуляторных клеток (А) и RORγt<sup>+</sup>-клеток среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-лимфоцитов (Б) у пациенток с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности и в I триместре пролонгированной беременности

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в контрольных группах показал более высокое содержание CD200<sup>+</sup>-лимфоцитов и RORγt<sup>+</sup>-клеток среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-лимфоцитов по сравнению с уровнем вне беременности и указанные закономерности соответствуют выявленным при пролонгированной беременности (Рисунок 5).

На рисунке 6 представлен субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с пролонгированной беременностью от срока в

12 недель до 38 недель гестации (n=27) в сравнении с контрольной группой женщин (n=54) на разных сроках физиологически протекающей беременности (n от 10 до 17 на каждом сроке).

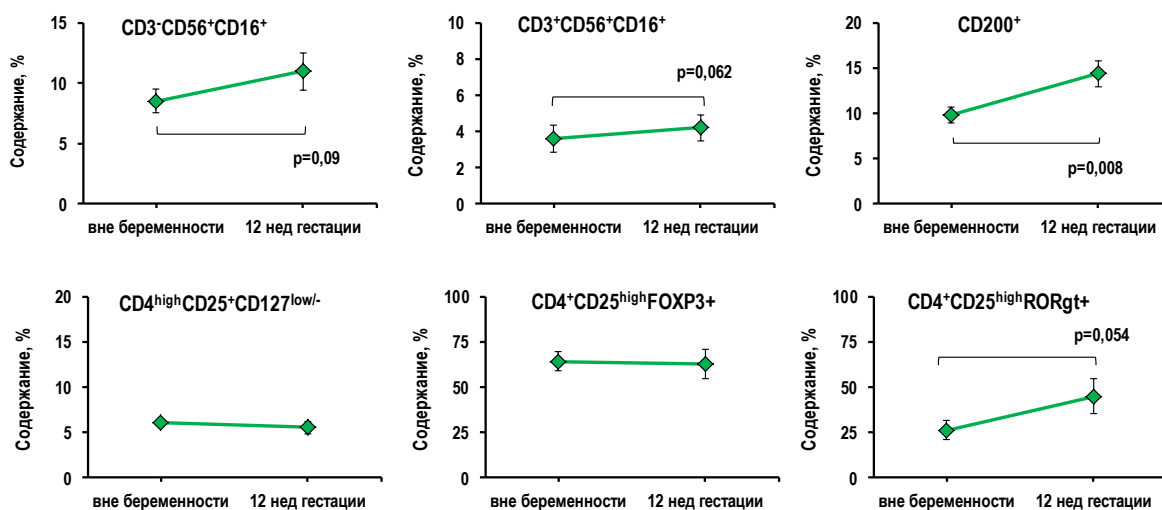


Рисунок 5 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин контрольных групп вне беременности и в 12 недель гестации

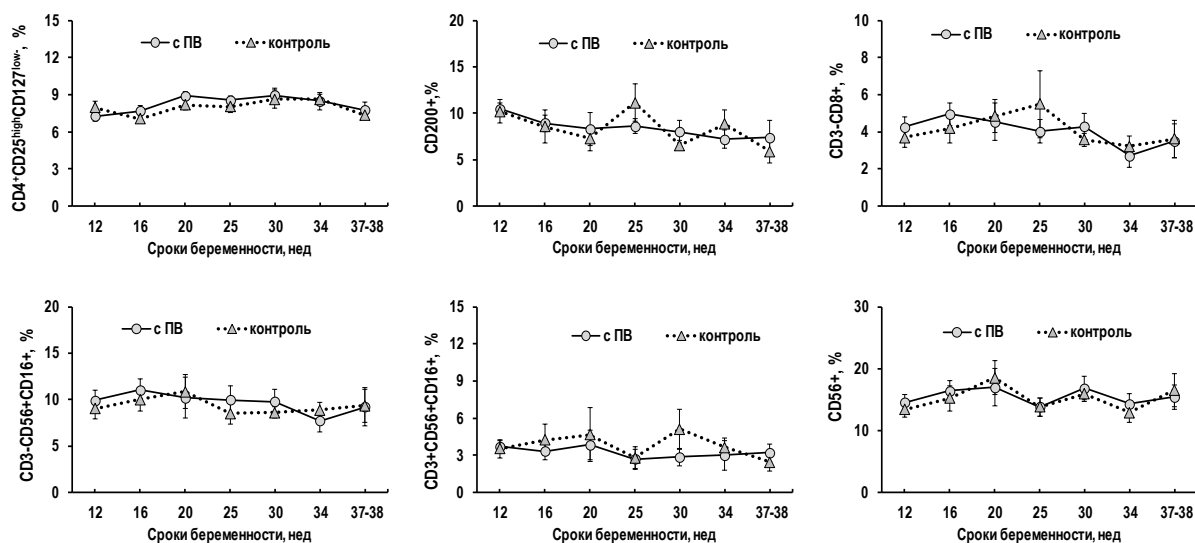


Рисунок 6 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в течение беременности, пролонгированной до доношенного срока

Различий в субпопуляционном составе лимфоцитов у женщин с ИПВ и у женщин контрольной группы не выявлено в течение всего периода обследования.

Все вместе данные, представленные на рисунках 1-6, позволяют рассматривать изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у женщин с ИПВ в I триместре беременности, пролонгированной на фоне аллоиммунизации, как следствие иммуномодулирующего действия ИЦТ, способствующего нормализации

субпопуляционного состава и успешному формированию толерантности к отцовским антигенам плода.

Экспрессия CD69 и блокирующий эффект (БЭ) аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов

Оценка доли лимфоцитов, экспрессирующих ранний активационный антиген CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, и блокирующего эффекта аутологичной сыворотки женщин с ИПВ вне беременности выявила более низкий уровень экспрессирующих лимфоцитов и более высокий уровень супрессорных факторов (таблица 1). Однако у женщин с пролонгированной беременностью экспрессия CD69 была стабильной и равной контрольным значениям в процессе предгестационной подготовки, а в 1 триместре гестации была ниже, чем у фертильных женщин ( $p=0,0003$ ), но не отличалась от значений до беременности (таблица 2).

Также не выявлено отличий от контроля в период предгестационной подготовки и в 1 триместре пролонгированной беременности в содержании Т-лимфоцитов и НК-клеток, экспрессирующих CD69 после митогенной стимуляции (рисунок 7). При этом доля лимфоцитов, отвечающих экспрессией CD69 на митогенную стимуляцию *in vitro*, у женщин с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации не отличалась от доли у женщин в 12 недель физиологически протекающей беременности (рисунок 8).

Таблица 1 - Экспрессия CD69 митоген-стимулированными лимфоцитами и БЭ аутологичной сыворотки женщин с ИПВ вне беременности

Группы обследованных	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	БЭ, %
Фертильные (n=11)	76,6±1,7	27,5±1,9
Пациентки с ИПВ (n=31)	69,4±2,4 * ( $p=0,010$ )	37,1±4,1 *( $p=0,005$ )

Примечание. n-количество обследованных; БЭ представлен по абсолютной величине; \* - отличия от контроля значимы.

Таблица 2 - Экспрессия CD69 митоген-стимулированными лимфоцитами женщин с пролонгированной беременностью при предгестационной ИЦТ и в I триместре

Группы обследованных	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %
Фертильные женщины (n=11)	76,6 ± 1,7
Женщины с ИПВ до предгестационной ИЦТ(n=17)	70,9 ± 3,4
Женщины с ИПВ после предгестационной ИЦТ(n=17)	70,5 ± 3,2
Женщины с ИПВ в I триместре (n=17)	66,4 ± 2,2 *( $p=0,0003$ )

Примечание. \* - отличия от контроля (фертильные женщины) значимы.

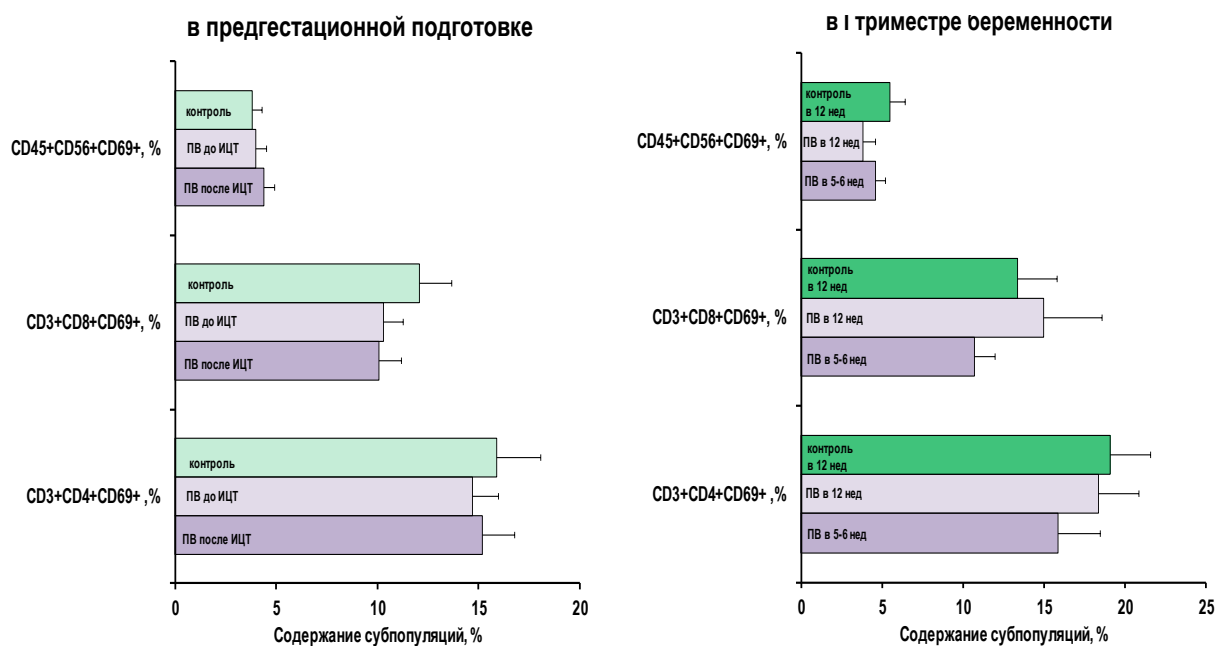


Рисунок 7 - Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, у женщин с пролонгированной беременностью

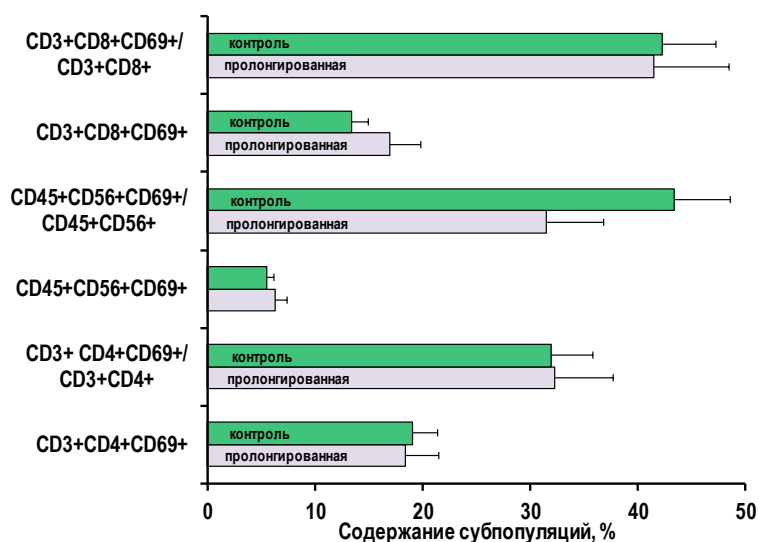


Рисунок 8-Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, у женщин с ИПВ в 12 недель пролонгированной беременности

Представленные данные свидетельствуют о нормальной способности лимфоцитов периферической крови женщин с пролонгированной беременностью отвечать на активационный стимул, что также отражает успешное формирование толерантности к отцовским антигенам плода в I триместре гестации, способствующее вынашиванию настоящей беременности.

БЭ аутологичной сыворотки у женщин с пролонгированной беременностью не отличался от уровня у фертильных женщин и на фоне предгестационной ИЦТ, и, в целом, на фоне ИЦТ в I триместре (таблица 3).

Таблица 3-Блокирующий эффект аутологичной сыворотки женщин с пролонгированной беременностью при предгестационной ИЦТ и в I триместре

Группы обследованных	БЭ, %
Фертильные женщины (n=11)	27,5 ± 1,9
Женщины с ИПВ до предгестационной ИЦТ(n=17)	29,1 ± 5,3
Женщины с ИПВ после предгестационной ИЦТ(n=17)	24,1 ± 3,0
Женщины с ИПВ в I триместре (n=39)	29,9 ± 2,7

Примечание. n-количество обследованных; БЭ представлен по абсолютной величине.

Однако при этом у женщин с пролонгированной беременностью в течение I триместра обнаружена динамика БЭ, которая характеризовалась максимумом в 5-6 недель гестации и минимумом – в 8-9 недель (рисунок 9).

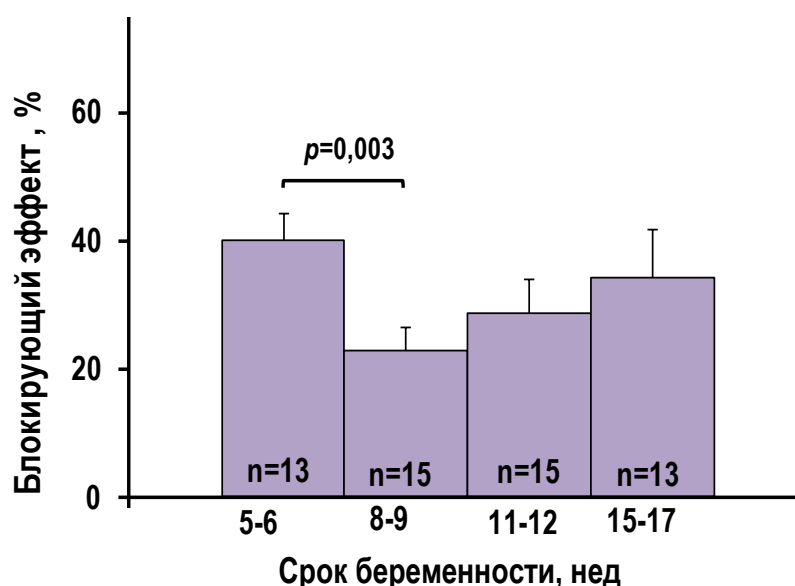
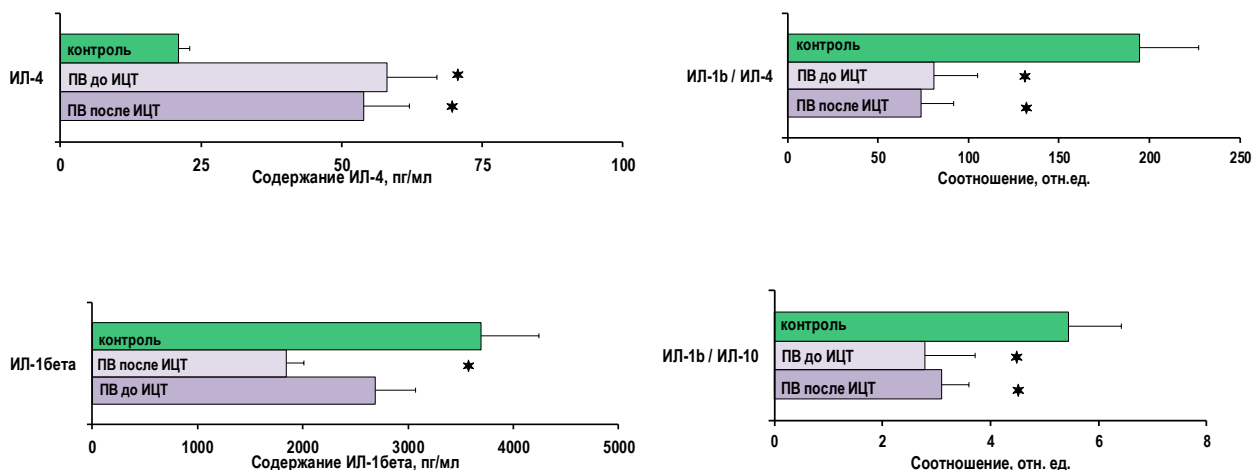


Рисунок 9 – Блокирующий эффект аутологичной сыворотки у женщин с пролонгированной беременностью на фоне аллоиммунизации в I триместре

Представленные на рисунке 9 данные отражают необходимость контроля интенсивности воспалительных реакций в ранние сроки беременности при имплантации, чем обусловлен высокий уровень супрессии в 5-6 недель и обратимое ослабление иммунного контроля в начальные периоды инвазии трофобласта.

Продукция *in vitro* цитокинов клетками периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем

В продукции цитокинов лимфоцитами периферической крови женщин с ИПВ выявлено превалирование цитокинов Th2-направленности как по уровню продукции ИЛ-4, так и по балансу Th1/Th2 в сравнении с контролем (рисунок 10).



\* - показатель, достоверно отличающийся от контроля.

Рисунок 10 - Продукция цитокинов митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови женщин с пролонгированной беременностью

Однако у женщин с пролонгированной беременностью после ИЦТ в предгестационной подготовке выявлена продукция цитокинов Th1-типа, отражающая формирование иммунных реакций провоспалительной направленности, интенсивность которых резко снижалась к 8-9 неделе гестации (рисунки 11 и 12).

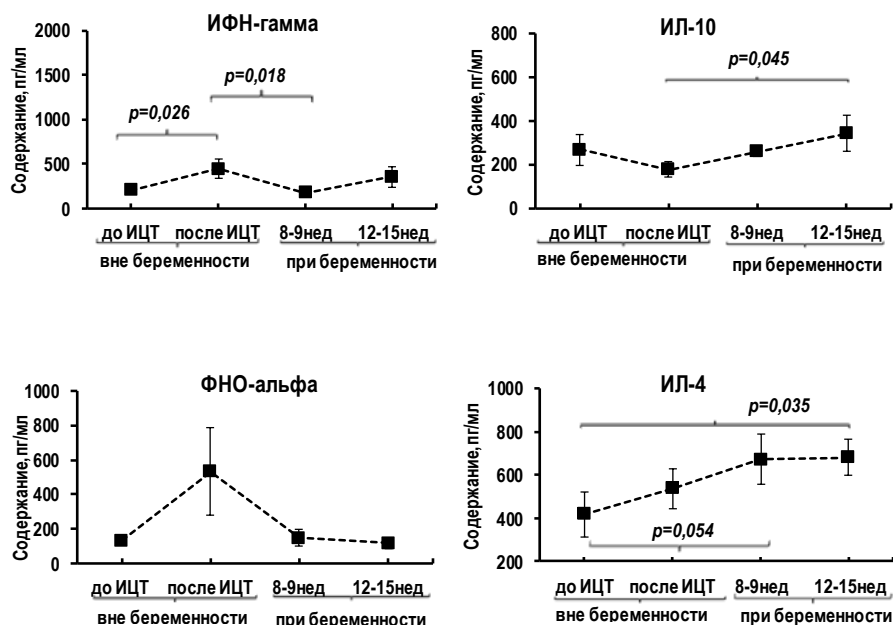


Рисунок 11 - Продукция цитокинов митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин с пролонгированной беременностью



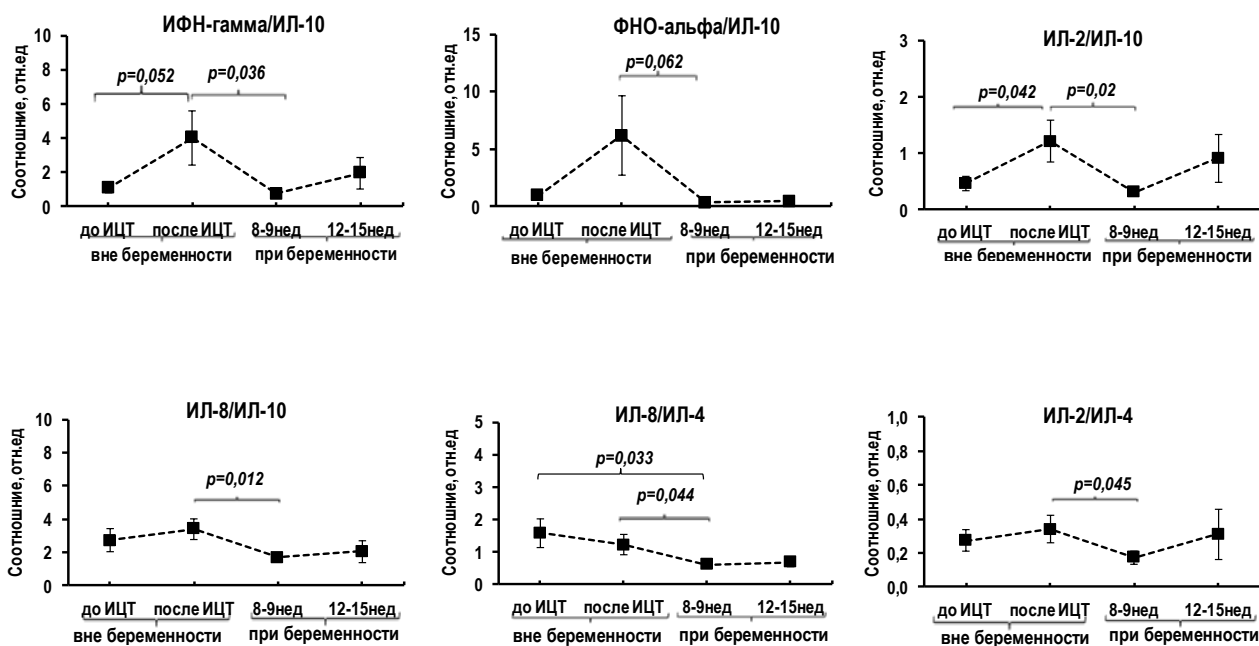


Рисунок 12 - Баланс продукции цитокинов про- и противовоспалительной направленности митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин с пролонгированной беременностью

На рисунках 13 и 14 представлен уровень митоген-стимулированной продукции цитокинов у женщин в 12 недель физиологической беременности по сравнению с уровнем у фертильных женщин вне беременности.

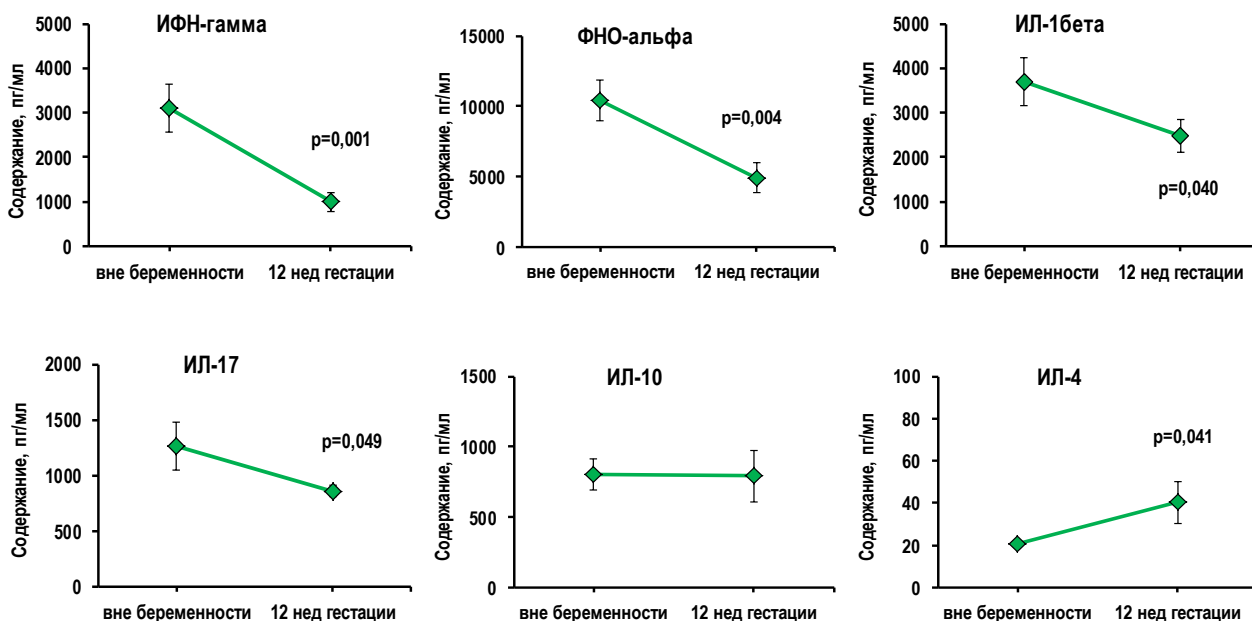


Рисунок 13-Продукция цитокинов про- и противовоспалительной направленности митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин контрольных групп

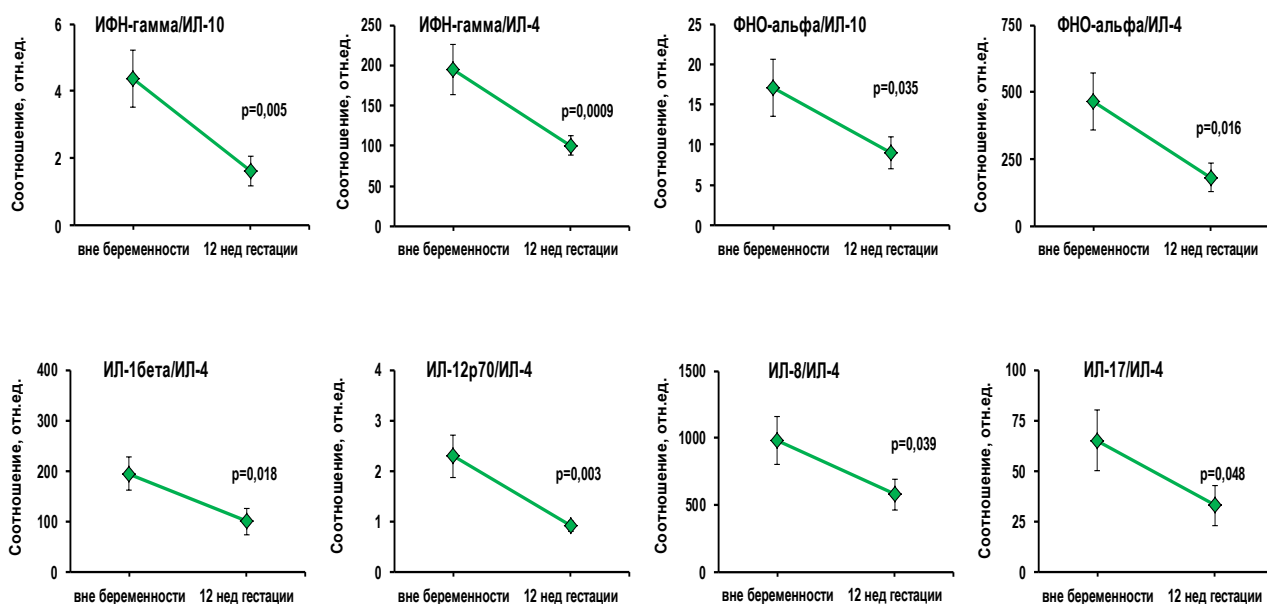
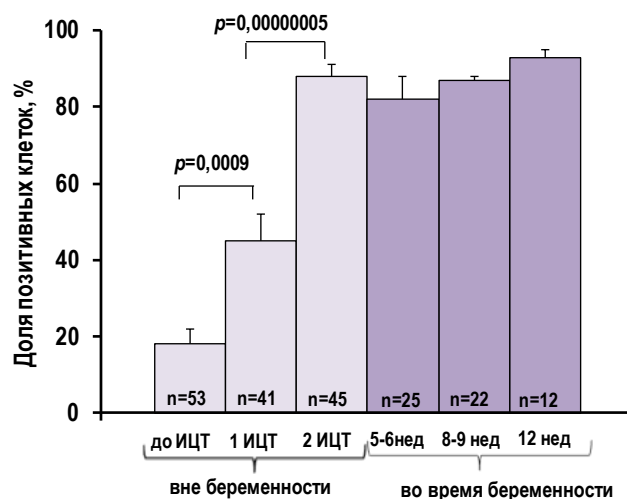


Рисунок 14 -Баланс продукции цитокинов про- и противовоспалительной направленности митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин контрольных групп

Как следует из представленных данных, в 12 недель гестации у женщин с физиологическим течением беременности уровень продукции *in vitro* цитокинов провоспалительного профиля значимо ниже, чем у фертильных женщин вне беременности. Указанный результат согласуется с предположением о наличии контроля иммунных реакций при имплантации и плацентации. Следовательно, данные о снижении митоген-индуцированной продукции *in vitro* провоспалительных цитокинов к концу I триместра гестации у женщин с пролонгированной беременностью свидетельствуют об успешном формировании толерантности на отцовские антигены плода у женщин с ИПВ на фоне аллоиммунизации.

#### Оценка уровня антиотцовских антилейкоцитарных антител (АОАТ) у женщин с идиопатическим привычным выкидышем

Одним из показателей, отражающих активацию лимфоцитов и развитие специфического ответа лимфоцитов женщины на аллоантигены партнера после ИЦТ, является уровень АОАТ в женской сыворотке. Уровень АОАТ до предгестационной аллоиммунизации у пациенток с ИПВ был низким, без отличий с уровнем у фертильных женщин (соответственно,  $16,6 \pm 3,5$ ,  $n=53$  и  $24,2 \pm 6,7$ ,  $n=20$ ). Результаты оценки АОАТ у женщин с ИПВ во время предгестационной подготовки и во время беременности представлены на Рисунке 15.



«до ИЦТ» - до предгестационной аллоиммунизации; «1ИЦТ» – после первой процедуры; «2ИЦТ» - после второй процедуры; n - количество обследованных женщин

Рисунок 15 - Уровень АОАТ у женщин с ИПВ после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре беременности

Как следует из данных рисунка 15, проведение аллоиммунизации приводит к значимому повышению уровня АОАТ по сравнению с исходным. Уровень АОАТ, достигнутый после предгестационной аллоиммунизации, сохраняется стабильным у забеременевших женщин на протяжении всего первого триместра. В контрольной группе женщин с физиологическим течением первой беременности (n=28) в течение первого триместра гестации АОАТ не были выявлены. Следовательно, наличие АОАТ не является обязательным для пролонгирования беременности. Подтверждения данного заключения получены при анализе уровня АОАТ у 45 женщин с привычным выкидышем на сроках 5-6, 8-9, 12, 16, 20, 25, 30, 34 недели пролонгированной беременности и у 85 женщин с физиологическим течением гестационного периода. Данные о частоте выявления АОАТ представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Выявление АОАТ в течение беременности

Группы женщин	Доля пациенток (%) с выявленными АОАТ в сроки беременности							
	5-6 нед.	8-9 нед.	12 нед.	16 нед.	20 нед.	25 нед.	30 нед.	34 нед.
Контрольная	0,0	0,0	5,9	7,1	6,7	3,3	7,7	5,9
С ИПВ	83,0	92,0	96,2	95,5	90,0	90,0	84,2	90,0

Как следует из данных таблицы 4, в группах женщин с пролонгированной беременностью частота выявления АОАТ варьировала от 83 % до 96,2 % с 5-6 недель до 34 недель беременности и достоверно превышала значения в

контрольной группе, в которой АОАТ выявлялись не более чем в 7,7 % случаев.

### Иммунологические параметры пациенток с разными исходами беременности

Были проанализированы иммунологические показатели у женщин с ИПВ с разными исходами данной беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации. На фоне аллоиммунизации в I триместре у 30 пациенток беременность была пролонгирована до доношенного срока, у 6 – прервалась в I триместре.

#### Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови

Проведена оценка динамики субпопуляционного состава лимфоцитов от аллоиммунизации вне беременности и до срока 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью и до срока в 5-6 недель гестации у пациенток с выкидышем. Различий в динамике Трег-клеток с фенотипом  $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$  не обнаружено (рисунок 16).

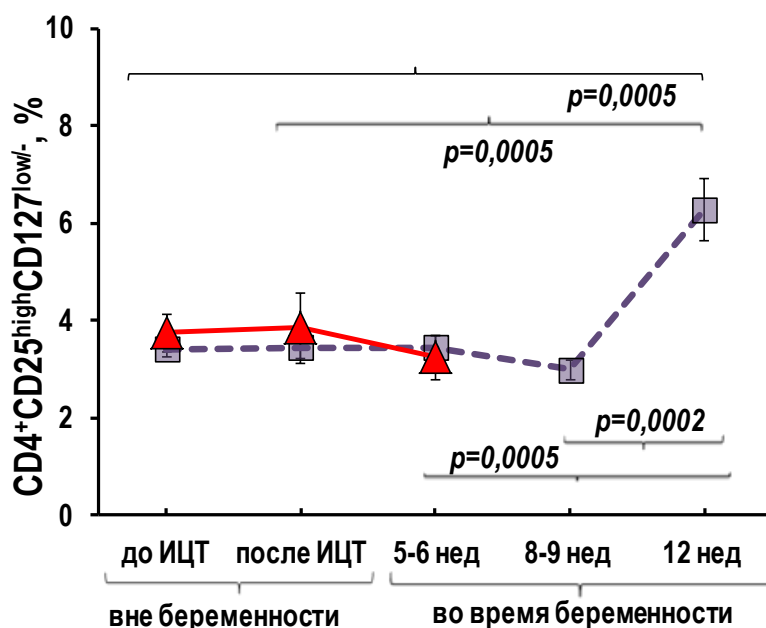


Рисунок 16 - Содержание Т-регуляторных клеток у женщин с ИПВ с разными исходами беременности

При этом доля  $FOXP3^+$ Трег-клеток различалась между группами только после предгестационной аллоиммунизации и была минимальной у женщин с выкидышем, однако в 5-6 недель гестации различия вновь отсутствовали (рисунок 17А).

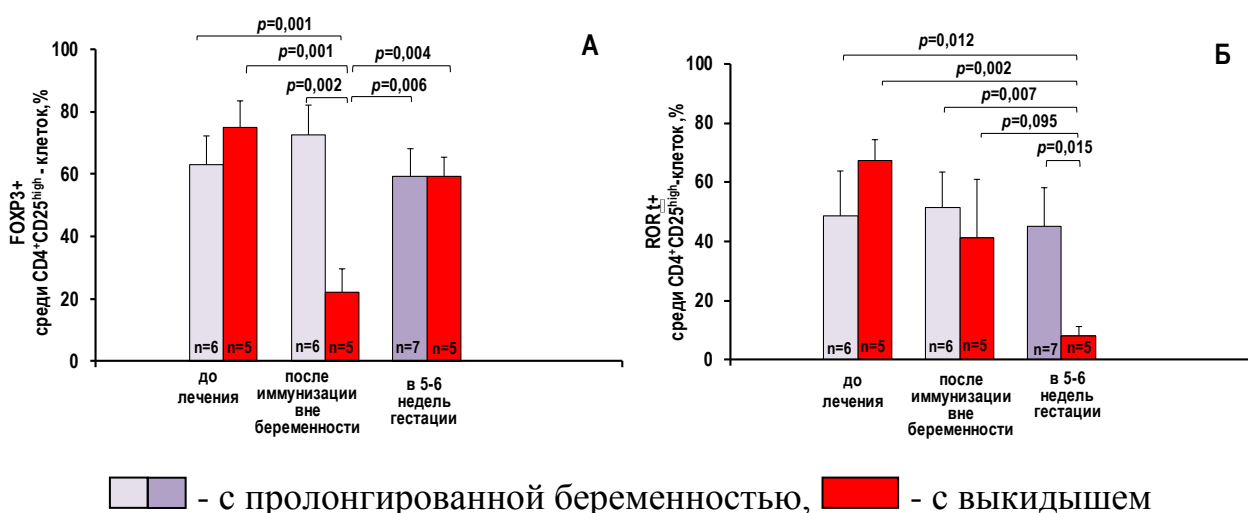


Рисунок 17 - Доля FOXP3<sup>+</sup>Tрег (А) и RORγt<sup>+</sup>-клеток среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-лимфоцитов (Б) у женщин с идиопатическим привычным выкидышем с разными исходами данной беременности

Доля RORγt<sup>+</sup>-клеток среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-лимфоцитов у пациенток с выкидышем в предгестационной подготовке не отличалась от содержания у пациенток с пролонгированной беременностью, но в 5-6 недель гестации была значимо меньше, чем у пациенток с пролонгированной беременностью, а также значимо меньше, чем вне беременности.

Обнаружено, что до предгестационной аллоиммунизации пациентки обеих групп не отличались по содержанию CD200<sup>+</sup>, а содержание клеток с естественной киллерной активностью у пациенток с выкидышем было ниже. В 5-6 недель гестации у пациенток с выкидышем содержание указанных клеток стало ниже и по сравнению с исходными значениями (рисунок 18).

Для показателей, измеренных до наступления беременности и значимо различающихся между группами женщин с разными исходами беременности, рассчитаны характеристики диагностической значимости для прогноза ранней потери беременности (таблица 5).

В таблице 6 представлены характеристики диагностической значимости определения субпопуляций с киллерной активностью и CD200<sup>+</sup>-клеток для прогноза выкидыша у женщин с ИПВ в 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации.

Полученные данные позволяют формировать персонифицированный подход к выбору вида предгестационной иммунотерапии, определяемый особенностями клеточного звена иммунитета пациенток с ИПВ.

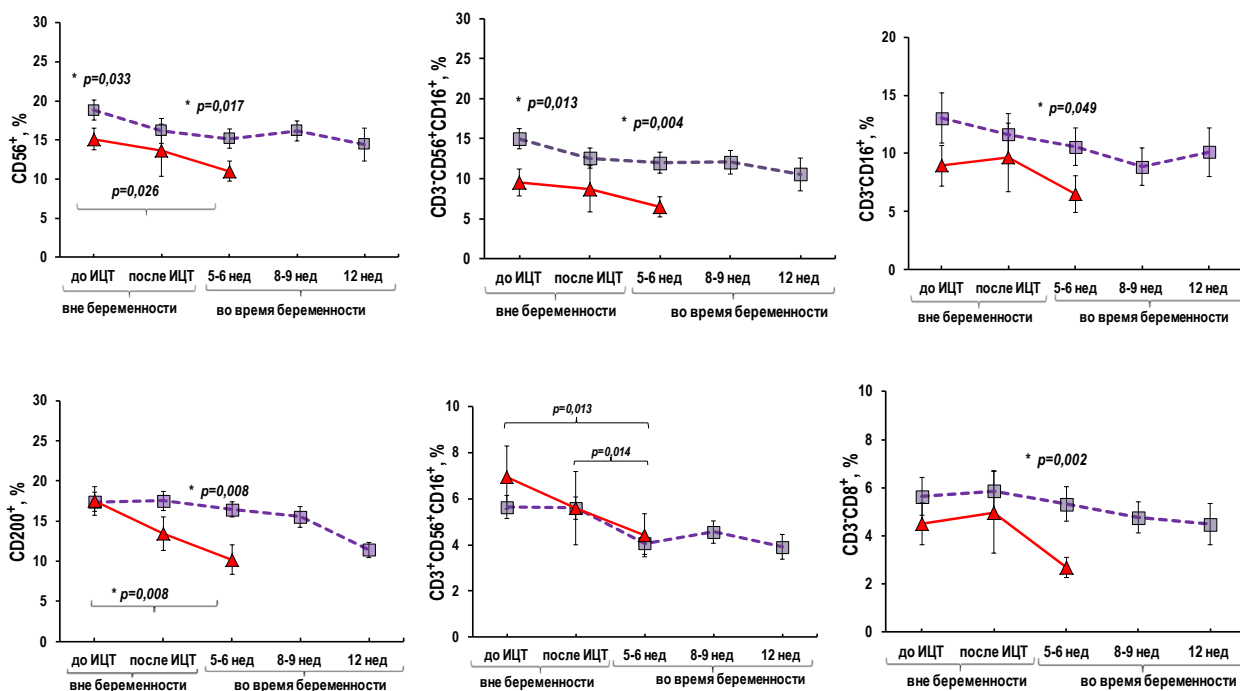


Рисунок 18 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ с разными исходами беременности

Таблица 5 - Диагностическая значимость определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ вне беременности для прогноза выкидыша

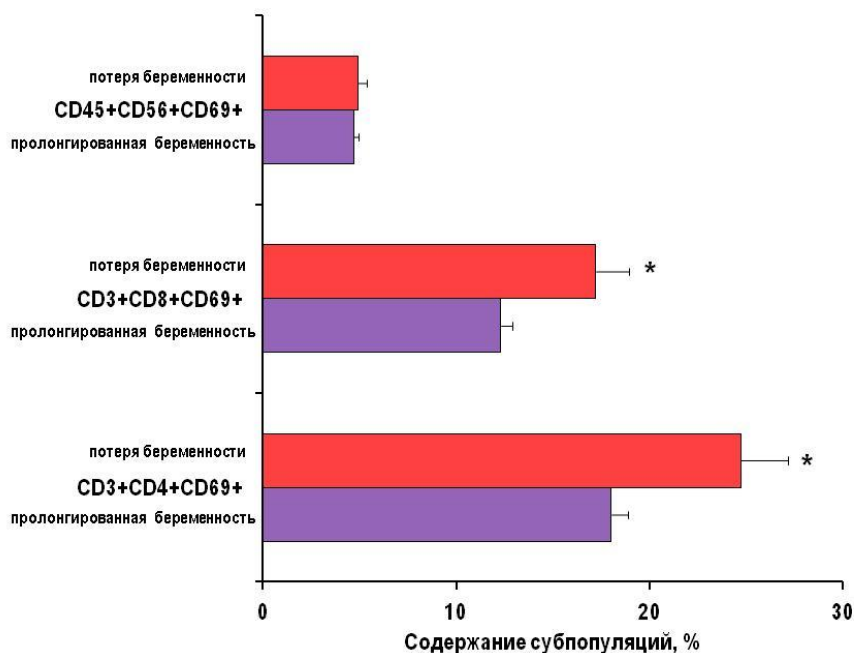
Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение показателя, %	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %
CD56 <sup>+</sup>	70,8	66,7	≤ 14,6	12,7	97,1
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	66,7	83,3	≤ 12,2	13,8	98,4
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	95,8	33,3	≤ 8,9	33,6	95,7

Таблица 6 - Диагностическая значимость определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в 5-6 недель беременности для прогноза потери в первом триместре

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение показателя, %	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %
CD56 <sup>+</sup>	100	77,3	≤ 10,3	100	91,7
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	90,5	60	≤ 5,8	60	90,5
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	100	100	≤ 3,1	100	100
CD200 <sup>+</sup>	95,5	66,7	≤ 8,9	66,7	98,8
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	72,2	83,3	≤ 3,4	50	92,8

## Экспрессия CD69 и блокирующий эффект (БЭ) аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов

В 5-6 недель гестации у пациенток с ИПВ, потерявших данную беременность, различий в содержании лимфоцитов с киллерной активностью, экспрессирующих CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, с группой женщин, доносивших данную беременность, не выявлено, но значимо выше было содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, как с хелперной, так и с цитотоксической функцией (рисунок 19).

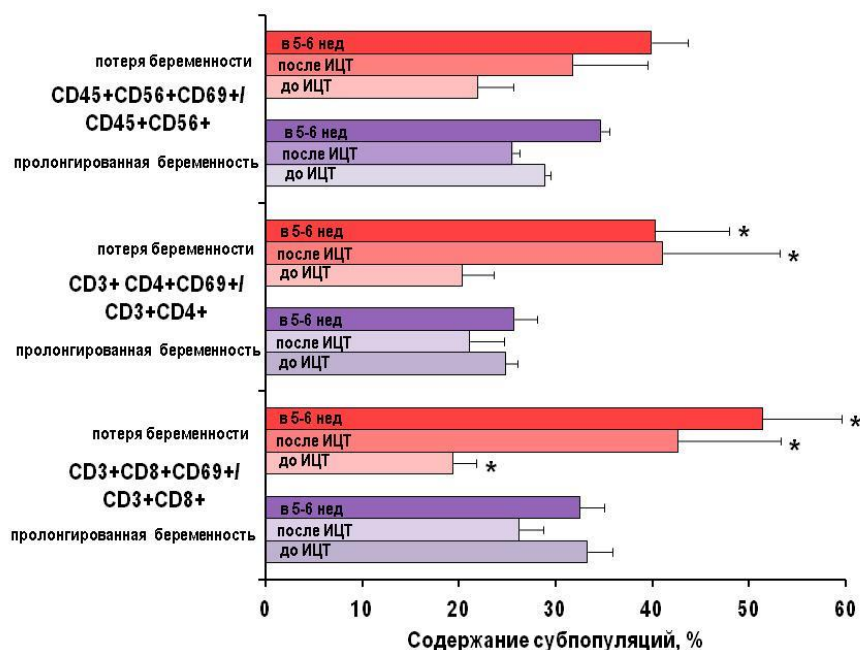


\* - различия между группами значимы при  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 19 - Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, у женщин с ИПВ с разными исходами беременности

При этом доля лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> среди Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией до предгестационной аллоиммунизации была ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью, но выросла после ИЦТ, как и доля CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, и в 5-6 недель гестации доли обеих субпопуляций были выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью, при отсутствии различий в динамике доли экспрессирующих CD69 лимфоцитов с киллерной активностью (рисунок 20).

Для показателей, значимо различающихся у групп пациенток с выкидышем и пролонгированной беременностью, рассчитаны характеристики диагностической значимости для прогноза потери беременности как до предгестационной аллоиммунизации (таблица 7), так и в 5-6 недель беременности (таблица 8).



\* - отличия от исходных значений значимы при  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 20 - Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции, у женщин с ИПВ с разными исходами беременности

Таблица 7 - Диагностическая значимость определения доли активированных субпопуляций лимфоцитов после митогенной стимуляции *in vitro* для прогноза выкидыша у пациенток с ИПВ вне беременности

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение показателя, %	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	100	66,7	>8	55,6	100,0
CD3 <sup>+</sup> CD <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> среди CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	100	66,7	> 24	55,6	100,0
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	100	61,5	> 3,3	50,0	100,0

Таблица 8 - Диагностическая значимость определения доли активированных субпопуляций лимфоцитов после митогенной стимуляции *in vitro* для прогноза выкидыша у пациенток с ИПВ в 5-6 недель беременности

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение показателя, %	Ценность негативного прогноза, %	Ценность позитивного прогноза, %
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	66,7	77,8	≤ 12,3	50,0	87,5
CD3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> 69 <sup>+</sup> среди CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	100,0	44,4	≤ 30,5	37,5	100,0
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	100,0	68,4	≤ 16,3	50,0	100,0
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> среди CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	100,0	68,4	≤ 26,5	50,0	100,0



Таким образом, проведенные исследования показали важность исследования экспрессии раннего активационного маркера CD69 для понимания клеточных механизмов пролонгирования или прерывания беременности. Высокая специфичность указанных тестов позволяет выявлять пациенток с угрозой выкидыша, что может иметь значение для персонафицированного назначения терапии таким пациенткам.

Выше было показано, что у женщин с пролонгированной беременностью выявлена динамика блокирующего эффекта аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов в течение I триместра с минимумом в 8-9 недель гестации (Рисунок 11). Обнаружено, что у женщин, потерявших данную беременность, блокирующий эффект аутологичной сыворотки в 8-9 недель был существенно ниже, чем у пациенток с пролонгированной беременностью (соответственно,  $(22,8 \pm 3,6) \%$  и  $(11,7 \pm 4,5) \%$ ,  $p=0,005$ ).

Рассчитана диагностическая значимость оценки блокирующего эффекта аутологичной сыворотки женщин с ИПВ в 8-9 недель беременности: при снижении его значений ниже критериального, равного  $23,2 \%$ , с чувствительностью  $100 \%$  и специфичностью  $46 \%$  можно прогнозировать самопроизвольную потерю беременности у женщин с ИПВ после проведенной предгестационной аллоиммунизации.

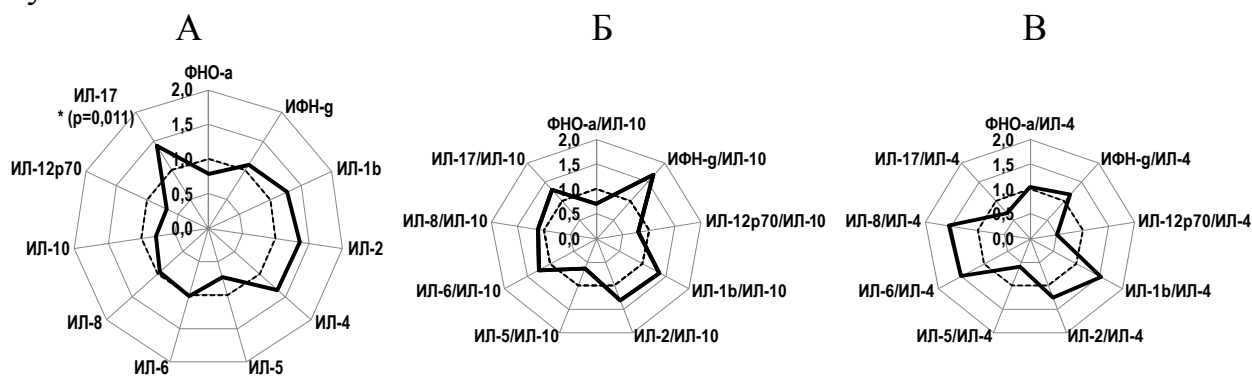
Также выявлено, что в 8-9 недель гестации у женщин с выкидышем была выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью, доля клеток, экспрессирующих CD69 через 72 часа после митогенного стимула ( $(82,8 \pm 1,7) \%$  и  $(66,4 \pm 2,2) \%$ , соответственно,  $p=0,0003$ ). Проведенный расчет диагностической значимости определения доли CD69<sup>+</sup>-клеток в 8-9 недель гестации у женщин с ИПВ показал, что при превышении доли CD69<sup>+</sup>-клеток критериального значения в  $82,1 \%$  с чувствительностью  $80,0 \%$  и специфичностью  $93,3 \%$  можно прогнозировать развитие самопроизвольного выкидыша.

Таким образом, оценка блокирующей активности сыворотки периферической крови в сроке 8-9 недель гестации представляется перспективной для использования в качестве одного из показателей угрозы выкидыша у женщин с ИПВ, получающих ИЦТ в предгестационной подготовке и в I триместре гестации.

#### Продукция цитокинов *in vitro* митоген-стимулированными клетками периферической крови

Результаты анализа продукции цитокинов митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови в 5-6 недель беременности у пациенток с ИПВ с доношенной беременностью и с выкидышем представлены на

рисунке 21.



По осям представлены отношения средних значений показателей в 5 - 6 недель гестации у пациенток с выкидышем (n=7) к средним значениям у пациенток с доношенной беременностью (n=10). А - содержание цитокинов; Б - отношение содержания провоспалительных цитокинов к ИЛ-10, В - отношение содержания провоспалительных цитокинов к ИЛ-4. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. \* - показатель, достоверно различающийся при сравнении групп.

Рисунок 21 - Продукция цитокинов *in vitro* клетками цельной крови пациенток с ИПВ в 5-6 недель при доношенной беременности и при выкидыше

Согласно представленным данным, у пациенток с выкидышем продукция клетками периферической крови *in vitro* ИЛ-17 оказалась значимо выше (p=0,011) при отсутствии различий в соотношении про- и противовоспалительных цитокинов. В те же сроки у пациенток было значимо ниже содержание ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клеток среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-лимфоцитов, чем у пациенток с пролонгированной беременностью при одинаковом содержании FOXP3<sup>+</sup>Трег (рисунок 17). Полученный результат согласуется с данными о снижении уровня в периферической крови женщин с выкидышем после предгестационной аллоиммунизации FOXP3<sup>+</sup>Трег, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, и низком содержании в сроке 5-6 недель CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лимфоцитов (активированных Th-17-клеток), стимуляция которых в культуре *in vitro* и приводит к продукции высокого уровня ИЛ-17. Следовательно, можно предположить, что после предгестационной аллоиммунизации у женщин с выкидышем формируется провоспалительный тип продукции цитокинов, но не в направлении Th1-ответа, а в направлении Th17-ответа, а низкий уровень клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о дисбалансе иммунного ответа и нарушении процессов формирования толерантности к отцовским

антигенам у пациенток с ИПВ, потерявших беременность на фоне аллоиммунизации.

#### Антиотцовские антилейкоцитарные антитела

У женщин с выкидышем и у женщин с пролонгированной беременностью была сходная динамика и не отличающиеся уровни АОАТ после предгестационной аллоиммунизации и в 5-6 недель гестации (Таблица 9).

Таблица 9 - Доля позитивных мужских лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>, покрытых АОАТ, после их инкубации с сывороткой женщин с разными исходами беременности (M±m)

Группы женщин с ИПВ	Уровень АОАТ, %	
	После ИЦТ вне беременности	в 5-6 нед. беременности
с выкидышем (n=6)	96,5 ± 1,9	76,8 ± 15,6
с пролонгированной беременностью (n=19)	95,1 ± 0,9	82,1 ± 7,2

Полученный результат может являться подтверждением высказанного в литературе предположения об отсутствии связи АОАТ с ранними потерями беременности [Ober C. et al., 1998; Nielsen H.S., с соавт., 2010].

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о высокой эффективности проведения иммунизации партнерскими лимфоцитами женщин с ИПВ: у 85,6 % пролеченных женщин с установленным идиопатическим привычным выкидышем беременность была пролонгирована и завершилась рождением живого ребенка.

При успешном пролонгировании беременности на фоне использования в лечении процедуры иммунизации лимфоцитами партнера в 12 недель гестации: субпопуляционный состав лимфоцитов и их активационное состояние у женщин с привычным выкидышем в анамнезе и у женщин с физиологическим течением беременности не различается; динамика блокирующей активности аутологичной сыворотки у женщин с пролонгированной беременностью максимальна в ранние и поздние сроки гестации, а динамика в I триместре отражает завершение процессов имплантации и подготовку к процессам плацентации; динамика баланса Th1/Th2-цитокиновой продукции характеризуется преимущественно провоспалительной направленностью в I и III триместрах, противовоспалительной – во II триместре.

Полученные в работе результаты свидетельствуют об успешном формировании толерантности к аллоантигенам плода у женщин с

идиопатическим привычным выкидышем, в лечении которых использовали процедуру иммунизации лимфоцитами партнеров, и позволяют формировать персонифицированный подход к назначению данного вида иммуномодулирующей терапии, определяемый особенностями клеточного звена иммунитета женщин с данной акушерской патологией.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлена зависимость исходов беременности, протекающей на фоне иммунокоррекции с использованием иммуноцитотерапии, от состояния клеточного звена иммунитета женщин с идиопатическим привычным выкидышем. Вне беременности в периферической крови женщин с привычным выкидышем уровень CD200<sup>+</sup>- лимфоцитов, NK и NKT- клеток был выше, чем у фертильных женщин. После предгестационной аллоиммунизации изменений в субпопуляционном составе не обнаружено. В 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови не отличался от состава у женщин с физиологическим течением беременности. При этом в 5-6 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью содержание CD200<sup>+</sup>-лимфоцитов, NK-, NKT-клеток и лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> было выше, чем у женщин, потерявших данную беременность.

2. Не обнаружено отличий в способности лимфоцитов отвечать на стимулирующее воздействие *in vitro* у женщин с идиопатическим привычным выкидышем и у фертильных как до предгестационной аллоиммунизации, так и после нее. Показана преимущественная экспрессия CD69 *in vitro* Т-лимфоцитами (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) как у женщин с пролонгированной беременностью, так и у женщин с выкидышем при отсутствии различий в доле экспрессирующих CD69 NK-клеток (CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) в 5-6 недель гестации. При этом превышение у пациенток с выкидышем доли CD69<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов по сравнению со значениями у женщин с пролонгированной беременностью свидетельствует о нарушении формирования толерантности у данной группы пациенток. В 12 недель гестации доля лимфоцитов, способных экспрессировать CD69 в ответ на митогенный стимул (Т- и NK-клеток), у женщин с пролонгированной беременностью не отличалась от значений у женщин с физиологическим течением беременности.

3. Воспалительные реакции на ранних стадиях беременности, контролируемые Т-регуляторными клетками, являются фактором, необходимым для пролонгирования беременности. В период предгестационной иммуноцитотерапии доля FOXP3<sup>+</sup>Трег у женщин с идиопатическим привычным

выкидышем и у фертильных не отличалась; а доля  $ROR\gamma t^+$ -клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов была значимо выше. В 5-6 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью доля  $ROR\gamma t^+$ -клеток среди  $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов, обеспечивающих развитие воспалительных процессов, выше, чем у женщин, потерявших беременность, а доля  $FOXP3^+Treg$ , обеспечивающих подавление воспалительных реакций, была одинаковой в обеих группах. В 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью содержание Т-регуляторных клеток с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ , доля  $FOXP3^+Treg$  и доля  $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -лимфоцитов не отличались от контрольных значений, что свидетельствует об успешном формировании толерантности к аллоантигенам плода на фоне иммуцитотерапии.

4. Провоспалительный характер направленности продукции цитокинов на фоне предгестационной аллоиммунизации и на ранних сроках гестации у женщин с пролонгированной беременностью сменялся резким его снижением в 8-9 недель гестации. На этом сроке беременности уровень митоген-индуцированной продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , а также баланс продукции ИФН- $\gamma$ /ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10 снижались по сравнению с уровнем перед беременностью. При этом уровень ИЛ-17 в группе с доношенной беременностью был значимо ниже, чем в группе с выкидышем.

5. Феномен иммуносупрессии сопровождает развитие беременности. Блокирующий эффект аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов периферической крови у пациенток с пролонгированной беременностью не отличался от эффекта у фертильных женщин, как до предгестационной аллоиммунизации, так и по ее окончании; в 5-6 недель гестации уровень блокирующего эффекта увеличился по сравнению с уровнем до беременности, а в 8-9 недель – снизился, но при этом был выше, чем у женщин с выкидышем.

6. Оптимизирован способ определения антиотцовских антилейкоцитарных антител в сыворотке крови женщин с помощью проточной цитометрии. Вне беременности у фертильных женщин, также как и в I триместре у женщин с физиологическим течением первой беременности, антиотцовские антитела отсутствуют. У всех женщин с идиопатическим привычным выкидышем после предгестационной аллоиммунизации уровень антиотцовских антилейкоцитарных антител увеличивался до 98 % и не отличался в группах женщин с пролонгированной и с прервавшейся беременностью. Следовательно, формирование антиотцовских антилейкоцитарных антител в предгестационной аллоиммунизации и их высокий уровень в первом триместре не являются

факторами, определяющими исходы беременности.

7. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и способности их к активации в условиях *in vitro* позволяет прогнозировать раннюю потерю беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем. Вне беременности наибольшей диагностической значимостью обладают тесты определения доли митоген-активированных  $CD3^+CD8^+CD69^+$  и  $CD45^+CD56^+CD69^+$ -клеток среди общей популяции лимфоцитов и доли активированных  $CD3^+CD8^+CD69^+$ -клеток среди  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов (чувствительность тестов 66,7 %, 61,5 % и 66,7 %, специфичность 100 %, 100 % и 100 %, соответственно). В 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации, лучшими параметрами диагностической значимости обладает тест определения содержания  $CD3^+CD16^+$  (специфичность 100 %, чувствительность 100 %).

8. У 85,6 % пролеченных женщин с установленным идиопатическим привычным выкидышем беременность была пролонгирована и завершилась рождением живого ребенка на фоне лечения с использованием иммуноцитотерапии. Высокая эффективность иммунокоррекции подтверждает успешное формирование толерантности у женщин с пролонгированной беременностью и указывает на зависимость реализации репродуктивной функции от состояния иммунной системы женщины при данном виде акушерской патологии.

### **ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ**

Результаты исследования, а именно: данные об уровне НК- и НКТ-лимфоцитов в периферической крови женщин с привычным выкидышем вне беременности, об уровне НК-, НКТ-и  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов в 5-6 недель гестации как показателей для персонализированного назначения иммуноцитотерапии (аллоиммунизации партнерскими лимфоцитами), а также данные о появлении после введения лимфоцитов полового партнера антиотцовских антилейкоцитарных антител в качестве показателей эффективности иммунизации внедрены в практическую деятельность 2-го отделения патологии беременности (отделения терапии и профилактики невынашивания беременности) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Для женщин с установленным диагнозом идиопатического привычного

выкидыша при отсутствии двух и более выношенных беременностей от одного партнера показано проведение предгестационной подготовки [Сидельникова В.М., 2013]. Перед назначением процедур в предгестационной подготовке необходимо исследование иммунного статуса с оценкой содержания в периферической крови лимфоцитов с фенотипом NK- и NKT-клеток, CD200<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, В1-клеток, Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/+</sup>. В случае отклонения уровня указанных субпопуляций от нормативного предполагается иммунный генез идиопатического привычного выкидыша и женщинам показано проведение иммуноцитотерапии (аллоиммунизации лимфоцитами полового партнера). При содержании в периферической крови женщин CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов менее 14,6 %, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> - менее 12,2 %, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> - менее 8,9 % от иммуноцитотерапии следует воздержаться.

Рекомендуется оценивать последствия аллоиммунизации после 2-х процедур по появлению в периферической крови женщин антиотцовских антилейкоцитарных антител. Уровень АОАТ на CD3<sup>+</sup>-клетках выше 50 % указывает на эффективность процедуры.

Во время беременности в качестве лечебных процедур женщинам с идиопатическим привычным выкидышем показано проведение иммуноцитотерапии в I триместре гестации [Сидельникова В.М., 2013]. При установлении маточной беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации, в 5-6 недель женщинам рекомендуется исследование иммунного статуса. При содержании в периферической крови CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов менее 10,3 %, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> - менее 5,8 %, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> - менее 3,1 %, CD200<sup>+</sup>- менее 8,9 %, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> - менее 3,4 % от проведения аллоиммунизации в I триместре следует воздержаться.

После двух процедур аллоиммунизации в I триместре рекомендуется повторное исследование иммунного статуса женщин. Соответствие субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови нормативным значениям свидетельствует об эффективности проводимой терапии и является благоприятным прогностическим маркером пролонгирования беременности.

Перспективы дальнейших исследований связаны, как с выявлением характера связей показателей, отражающих состояние иммунной системы пациенток с идиопатическим привычным выкидышем при беременности, развивающейся на фоне иммунокоррекции, с уровнем факторов ранней беременности, для более глубокого понимания механизмов, способствующих успешному формированию толерантности иммунной системы к отцовским

антигенам плода и пролонгированию беременности, так и с поиском маркеров осложнения течения второго триместра гестации и предикции преждевременных родов у пациенток с идиопатическим привычным выкидышем, получивших в качестве лечебных мероприятий две процедуры аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре гестации.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кречетова, Л.В. Реакция лимфоцитов женщины с привычным невынашиванием беременности в культуре *in vitro* с лимфоцитами партнера до и после иммуноцитотерапии / Л.В. Кречетова, О.С. Елистратова, Е.Л. Голубева, Н.К. Тетруашвили, Я.Л. Шяхгюлян // Материалы республиканской научной конференции "Иммунология репродукции" 11-14 апреля 2005 г., Иваново / Российский иммунологический журнал. – 2005. - Т. 9. - № S2. - С. 241.

2. **Петросян, Л.А. Подготовка к беременности женщин с привычным невынашиванием ранних сроков с использованием различных доз аллогенных лимфоцитов / Л.А. Петросян, Е.Л. Голубева, Н.К. Матвеева, Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина // Акушерство и гинекология. - 2009. - №6. - С. 17-20.**

3. Зиганшина, М.М. Ангиогенные факторы раннего гестационного периода при замершей беременности / М.М. Зиганшина, Л.В. Кречетова, Л.В. Ванько, Е.В. Мусиенко, Л.А. Подрез, Г.Т. Сухих // Материалы 4-й Всероссийской конференции «Иммунология репродукции», 5-8 декабря 2010 г., Пермь / Российский иммунологический журнал. - 2010. - Т. 4(13). - № 4. - С. 414.

4. Кречетова, Л.В. Оценка иммуносупрессивных свойств аутологичной женской сыворотки / Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина, Е.Л. Голубева, М.А. Николаева, Г.Т. Сухих // Материалы 4-й Всероссийской конференции «Иммунология репродукции», 5-8 декабря 2010 г., Пермь / Российский иммунологический журнал. - 2010. - Т. 4(13). - № 4. - С. 414-415.

5. Степанова, Е.О. Сравнение двух способов фенотипирования лимфоцитов периферической крови у пациенток с привычным невынашиванием беременности / Е.О. Степанова, М.А. Николаева, З.С. Ходжаев, Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина, А.А. Бабаян, Л.В. Ванько // Российский аллергологический журнал. - 2012. - № 1. - С. 296-297.

6. Зиганшина, М.М. Мониторинг содержания факторов, регулирующих ангиогенез, при потерях беременности ранних сроков / М.М. Зиганшина, Л.В. Кречетова // Российский аллергологический журнал. - 2012. - № 1. - С. 132.

7. **Кречетова, Л.В. Оптимизация выявления антиотцовских**



**антилейкоцитарных антител в сыворотке крови женщин с привычным невынашиванием после введения аллогенных лимфоцитов / Л.В. Кречетова, М.А. Николаева, Л.В. Ванько, М.М. Зиганшина, Е.Л. Голубева, Е.О. Степанова, Г.Т. Сухих//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. –Т.153, №5. – С.684-688.**

**8. Зиганшина, М.М. Динамика цитокинового профиля в ранние сроки физиологической беременности и при привычном невынашивании в анамнезе /, Л.В. Кречетова, Л.В. Ванько, М.А. Николаева, З.С. Ходжаева, Г.Т. Сухих //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.154, №9. – С.371-374.**

9. Кречетова, Л.В. Иммуномодулирующие эффекты аллоиммунной терапии привычного невынашивания беременности / Л.В. Кречетова // Материалы 5-й Российской конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты», 29 мая-1 июня 2012 г., Иваново / Российский иммунологический журнал. - 2012. - Т. 6(14). - № 2(1). - С. 6-8.

10. Кречетова, Л.В. Иммуносупрессивные свойства аутологичной сыворотки женщин с привычным невынашиванием беременности после иммуноцитотерапии и при последующей беременности / Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина, З.С. Ходжаева // Материалы 5-й Российской конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты», 29 мая-1 июня 2012 г., Иваново / Российский иммунологический журнал. - 2012. - Т. 6(14). - № 2(1). - С. 87-88.

11. Krechetova, L.V. Influence of autologous serum on mitogen-induced CD69 expression in mononuclear cells of peripheral blood of women with RSA / L.V. Krechetova, M.M. Ziganshina, E.L. Golubeva, Z.S. Khodzhaeva, L.V. Vanko, G.T. Sukhikh // Abstracts of the 13-th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. – 2012. – V. 67. - № S1. – P. 56.

12. Krechetova, L.V. Revealing of anti-paternal antibodies at leukocyte immunization of patients with recurrent abortions. A comparative study of two approaches / L.V. Krechetova, M.A. Nikolaeva, M.M. Ziganshina, E.L. Golubeva, E.O. Stepanova, L.V. Vanko, G.T. Sukhikh // Abstracts of the 13-th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. – 2012. – V. 67. - № S1. – P. 55-56.

13. Khodzhaeva, Z.S. The study of angiogenic factors in women with recurrent pregnancy loss / Z.S. Khodzhaeva, E.V. Musienko, M.M. Ziganshina, L.V. Krechetova, M.A. Nikolaeva, L.A. Podrez, L.V. Vanjko, G.T. Sukhikh // Abstracts of the XXIII

European Congress of Perinatal Medicine, 13-16 June 2012, Paris / The Journal of Maternal - Fetal & Neonatal Medicine. – 2012. - V. 25. - № S2. - P. 243.

14. Stepanova, E.O. Effect of allogenic leukocytes immunization on the level of HLA panel-reactive antibodies in female serum / E.O. Stepanova, M.A. Nikolaeva, Z.S. Khodzhaeva, L.V. Krechetova, E.L. Golubeva, G.T. Sukhikh // Abstracts of the 13-th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. – 2012. – V. 67. - № S1. - P. 44-45.

15. Степанова, Е.О. Роль регуляторных клеток в формировании иммунной толерантности при беременности / Е.О. Степанова, М.А. Николаева, А.А. Бабаян, В.Ю. Смольникова, Л.В. Ванько, Л.В. Кречетова // **Акушерство и гинекология. - 2013. - №2. - С. 24-28.**

16. Кречетова, Л.В. Митоген-стимулированная экспрессия CD69 мононуклеарными клетками периферической крови женщин с привычным невынашиванием беременности / Л.В. Кречетова, М.А. Николаева, Л.В. Ванько, Е.Л. Голубева, М.М. Зиганшина, Н.К. Тетрашвили, В.В. Вторушина // **Материалы XII-го Международного конгресса «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» 11-13 марта 2013г., Москва / Российский аллергологический журнал. - 2013. - №2. - С. 161-162.**

17. Кречетова, Л.В. Блокирующий эффект аутологичной сыворотки женщин с привычным невынашиванием беременности / Л.В. Кречетова, М.А. Николаева, Л.В. Ванько, Е.Л. Голубева, М.М. Зиганшина, Н.К. Тетрашвили, В.В. Вторушина Г.Т. Сухих // **Акушерство и гинекология. – 2013. – №3. – С.38-42.**

18. Хачатрян, Н.А. Лимфоцитотерапия в коррекции аллоиммунных нарушений при привычном выкидыше / Н.А. Хачатрян, Л.В. Кречетова, Н.К. Тетрашвили // **Акушерство и гинекология. - 2014. - №1. - С.9-14.**

19. Хачатрян, Н.А. Аллоиммунные механизмы привычного выкидыша / Н.А. Хачатрян, Л.В. Кречетова, Н.К. Тетрашвили // **Акушерство и гинекология. - 2014. - №5. - С. 3-8.**

20. Кречетова, Л.В. Продукция цитокинов in vitro мононуклеарными клетками периферической крови при проведении аллоиммунизации у пациенток с привычным выкидышем // **Кречетова Л.В., М.А. Николаева, Л.В. Ванько, М.М. Зиганшина, В.В. Вторушина, Н.А. Хачатрян, Н.К. Тетрашвили, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. – 2014. – №5. – С.51-56.**

21. Кречетова, Л.В. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, Н.А. Хачатрян, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, Е.О. Степанова, М.А. Николаева, Г.Т. Сухих //Акушерство и гинекология. – 2014. – №10. – С.27-33.

22. Кречетова, Л.В. Диагностическая значимость оценки фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, Н.К. Тетруашвили, Н.А. Хачатрян, В.В. Вторушина, Е.О. Степанова, М.А. Николаева, Сухих Г.Т // Акушерство и гинекология. - 2015. - №1. - С. 25-31.

23. Кречетова, Л.В. Динамика выработки антилейкоцитарных антител к отцовским антигенам при иммунизации аллогенными клетками женщин с привычным выкидышем // Л.В. Кречетова, Н.А. Хачатрян, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, Е.О. Степанова, Е.Л. Голубева, М.А. Николаева, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. – 2015. – №3. – С.16-20.

24. Кречетова, Л.В. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем при предгестационной иммуноцитотерапии // Л.В. Кречетова, Е.О. Степанова, М.А. Николаева, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, Н.А. Хачатрян, Н.К. Тетруашвили, Г.Т. Сухих //Акушерство и гинекология. – 2015. – №4. – С.37-43.

25. Кречетова, Л.В. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии // Л.В. Кречетова, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, Е.О. Степанова, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, Н.А. Хачатрян // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 6. – С.59-66.

26. Тетруашвили, Н.К. Клинико-иммунологическое обоснование кратности проведения иммуноцитотерапии у супружеских пар с привычным выкидышем / Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, М.М. Зиганшина, Е.О. Степанова, В.А. Сарибегова, М.А. Николаева //Акушерство и гинекология. – 2015. – №10. – С.62-67.

27. Степанова, Е.О. Выявление антилейкоцитарных антител в сыворотке крови с помощью лимфоцитов и латексных микросфер, несущих HLA-антигены, при аллоиммунизации женщин с привычным выкидышем / Е.О. Степанова, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, В.В. Вторушина, Л.В. Ванько, З.С. Ходжаева, Л.В. Кречетова / Бюллетень экспериментальной

28. Krechetova, L.V. The subpopulation analysis of peripheral blood lymphocytes for women with recurrent pregnancy loss after paternal lymphocyte immunotherapy / L.V. Krechetova, V.V. Vtorushina, M.A. Nikolaeva, E.O. Stepanova, E.L. Golubeva, N.K. Tetrushvili, G.T. Sukhikh // Abstracts of the 14-th International Symposium for Immunology of Reproduction «Progress in Reproductive Immunology», 22-24 May 2015, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. - 2015. - V. 73. - № S1. – P. 6.

29. Stepanova, E.O. Efficacy of pre-pregnancy alloimmunization in treatment of recurrent pregnancy loss: time-to-pregnancy in relation to phenotype of allogeneous lymphocytes and to Th1/ Th2 balance in peripheral blood autogenous lymphocytes / E.O. Stepanova, M.A. Nikolaeva, E.L. Golubeva, L.V. Vanko, L.V. Krechetova, N.K. Tetrushvili, G.T. Sukhikh. // Abstracts of the 14-th International Symposium for Immunology of Reproduction «Progress in Reproductive Immunology», 22-24 May 2015, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. - 2015. - V. 73. - № S1. – P. 30-31.

30. Menzhinskaya, I.V. Prevalence of antiphospholipid antibodies other than antibodies to cardiolipin and  $\beta$ 2-glycoprotein-I in women with recurrent pregnancy loss and their diagnostic value / I.V. Menzhinskaya, L.V. Vanko, L.V. Krechetova, M.M. Kashentseva, G.T. Sukhikh // Abstracts of the 14-th International Symposium for Immunology of Reproduction «Progress in Reproductive Immunology», 22-24 May 2015, Varna / American Journal of Reproductive Immunology. - 2015. - V. 73. - № S1. – P. 27-28.

31. Вторушина, В.В. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови при предгестационной аллоиммунизации женщин с привычным выкидышем / В.В. Вторушина, Л.В. Кречетова, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили // Материалы 7-ой Всероссийской научной конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты» 16-17 апреля 2015 г., Ростов-на-Дону / Российский иммунологический журнал. - 2015. – Т. 9(18). - № 1(1). - С. 37-39.

32. Кречетова, Л.В. Антиотцовские антилейкоцитарные антитела как маркеры эффективности аллогенной иммунизации женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Е.О. Степанова, Е.Л. Голубева, В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили // Материалы 7-ой Всероссийской научной конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты» 16-17 апреля 2015 г., Ростов-на-Дону / Российский иммунологический журнал. - 2015. – Т. 9(18). - № 1(1). - С. 115-117.

33. Тетруашвили, Н.К. Обоснование кратности проведения иммуноцитотерапии у женщин с идиопатическим привычным выкидышем / Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Л.В. Ванько, Е.Л. Голубева, М.М. Зиганшина, Е.О. Степанова, Н.А. Хачатрян, М.А. Николаева // Материалы Всероссийской конференции «Аллергология и иммунология: клинические рекомендации в практику врача», 25-26 февраля 2016 г., Москва / Российский аллергологический журнал. - 2016. - №1. - С. 84-87.

34. Кречетова, Л.В. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови при аллоиммунизации женщин в первом триместре беременности / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, Л.В. Ванько, В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили, Г.Т. Сухих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2016. – Т. 161. - №4. - С. 519-522.

35. Сарибегова, В.А. Иммуноцитотерапия при привычном выкидыше аллоиммунного генеза / В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, А.А. Агаджанова // Акушерство и гинекология -2016. - № 10. – С. 12-17.

36. Кречетова, Л.В. Методика проведения лимфоцитоиммунотерапии в прегравидарной подготовке женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, А.А. Агаджанова, Н.К. Тетруашвили // Материалы XIV-го Международного конгресса «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» 22-24 марта 2017 г., Москва / Российский аллергологический журнал. - 2017. - №1. - С. 29-31.

37. Кречетова, Л.В. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в предгестационной подготовке женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, В.А. Сарибегова, Н.А. Хачатрян, А.А. Агаджанова, Н.К. Тетруашвили // Акушерство и гинекология. - 2017. - № 6. - С. 55-63.

38. Сарибегова, В.А. Иммунотерапия при привычном выкидыше, обусловленном аллоиммунными причинами / В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, А.А. Агаджанова // Гинекология. - 2017. - Т. 19. - №1. - С. 51-54.

39. Кречетова, Л.В. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности на фоне иммуноцитотерапии // Л.В. Кречетова, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Н.А. Хачатрян, А.А. Агаджанова, Л.В. Ванько, Т.Ю. Иванец, Г.Т. Сухих //

**Акушерство и гинекология. – 2017. – №7. – С.52-60.**

**40. Сарибегова, В.А. Течение и исходы беременностей у женщин с идиопатическим привычным выкидышем при использовании иммуноцитотерапии / В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, А.А. Агаджанова, В.В. Вторушина // Акушерство и гинекология. - 2017. - №8. - С. 68-73.**

41. Вторушина, В.В. Продукция *in vitro* цитокинов Th1/Th2-типа клетками цельной периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем при проведении иммуноцитотерапии / В.В. Вторушина, Л.В. Кречетова, Н.К. Тетруашвили /Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 5-8 июня 2017г. // Медицинская иммунология.– 2017.– Т.19, специальный выпуск.– С.179.

42. Степанова, Е.О. Наступление беременности после предгестационной аллоиммунизации у женщин с привычным выкидышем и цитокиновый профиль клеток периферической крови / Е.О. Степанова, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова // Материалы XVI Всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 5-8 июня 2017 г., С.-Петербург / Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 5.–С. 195-196.

43. Сарибегова, В.А. Влияние иммуноцитотерапии на течение и исходы беременностей у женщин с привычным выкидышем в зависимости от сроков наступления беременности / В.А. Сарибегова, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, А.А. Агаджанова, Л.В. Кречетова // Материалы Национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства», 15-17 июня 2017 г., Москва / Журнал акушерства и женских болезней. - 2017. - Т. 66. - С. 36-37.

**44. Тетруашвили, Н.К. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с привычным выкидышем аллоиммунного генеза в течение беременности / Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, В.А. Сарибегова, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, Н.А. Хачатрян, А.А. Агаджанова // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. - 2017. - №4. - С. 28-36.**

**45. Кречетова, Л.В. Динамика выработки антилейкоцитарных антител в течение беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне иммуноцитотерапии / Л.В. Кречетова, Н.К. Тетруашвили, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, В.А. Сарибегова, А.А. Агаджанова,**

### **Изобретения**

46. Патент 2396566 Российская Федерация, МПК G01N 33/ 53 (2006.01). Способ определения блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки / Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Николаева М.А., Зиганшина М.М., Сидельникова В.М., Кречетова Л.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное Государственное учреждение Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии, ГОУВПО ММА им. И.М. Сеченова. –№ 2009116174/ 15; заявл. 29.04.2009; опубл. 10.08.2010; Бюлл.№ 22 – 10 с.

47. Патент 2614729 Российская Федерация, МПК G01N 33/ 53 (2006.01). Способ выявления антиотцовских антител после иммунизации женщин с идиопатическим привычным выкидышем лимфоцитами полового партнера / Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Николаева М.А., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Голубева Е.Л., Ванько Л.В., Хачатрян Н.А., Сарибегова В.А., Сухих Г.Т.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2016106740; заявл. 26.02.2016; опубл. 28.03.2017; Бюлл.№ 10 – 11 с.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АОАТ	- антиотцовские антилейкоцитарные антитела
БЭ	- блокирующий эффект аутологичной сыворотки
ИЛ	- интерлейкин
ИПВ	- идиопатический привычный выкидыш
ИФН	- интерферон
ИЦТ	- иммунотерапия, иммунизация женщин с ИПВ в анамнезе аллогенными клетками партнеров, аллоиммунизация
КонА	- конканавалин А
мАт	- моноклональные антитела
Трег	- Т-лимфоциты с естественной регуляторной активностью
ФГА	- фитогемагглютинин
ФНО	- фактор некроза опухоли
FITC	- флюоресцеинизотиоцианат

FOXP3	- транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку клеток и экспрессию цитокинов, участвующих в супрессии иммунного ответа.
HLA	- человеческие лейкоцитарные антигены (англ. human leukocyte antigens)
NK	- натуральные (естественные) киллеры
NKT	- субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих маркеры NK- и T-клеток
PE	- фикоэритрин
PerCP	- перидинин-хлорофилл протеин
ROR $\gamma$ t	- транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку T-лимфоцитов в направлении Th17
Th1, Th2, Th17	- T-хелперы 1, T-хелперы 2, T-хелперы 17