

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

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 и аллергология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Доктор биологических наук
Николаева М.А.

Доктор медицинских наук
Тетруашвили Н.К.

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФЕНОМЕНЫ, ОТРАЖАЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К АЛЛОАНТИГЕНАМ ПЛОДА В РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ.....	17
1.1. Становление основных направлений исследований толерантности в иммунологии репродукции	17
1.2. Исследование гуморальных реакций и блокирующих факторов сыворотки крови беременных	19
1.2.1. Антитела к антигенам гистосовместимости плода.....	21
1.2.2. Блокирующие свойства ряда белков ранней беременности	23
1.2.2.1. Прогестерон-индуцированный блокирующий фактор	24
1.2.2.2. Преимплантационный фактор	27
1.2.2.3. Миграцию макрофагов ингибирующий фактор	29
1.3. Субпопуляционный состав и активационное состояние иммунокомпетентных клеток при беременности	32
1.3.1. Основные субпопуляции лимфоцитов при беременности	32
1.3.2. FOXP3 ⁺ -T-регуляторные клетки их значимость в формировании толерантности.....	40
1.3.3. Экспрессия CD69 в оценке активационного состояния иммунокомпетентных клеток	48
1.4. Идиопатический привычный выкидыш как акушерская патология, при которой иммунные нарушения считаются ведущими этиопатогенетическими факторами, и его корригирующая иммуноцитотерапия	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
2.1. Отбор для исследования пациенток с ИПВ.....	61
2.2. Характеристика процедуры аллоиммунизации	63
2.3. Характеристика методов иммунологических исследований.....	65
2.3.1. Определение антилейкоцитарных антител методом проточной	

цитометрии	66
2.3.2. Оценка фенотипа лимфоцитов периферической крови	67
2.3.3. Оценка экспрессии раннего активационного антигена CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD45 ⁺ CD56 ⁺ после митогенной стимуляции <i>in vitro</i>	70
2.3.4. Определение блокирующей активности аутологичной женской сыворотки	71
2.3.5. Оценка содержания в периферической крови лимфоцитов с фенотипом CD4 ⁺ CD25 ^{high} и внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и ROR γ t	75
2.3.6. Оценка продукции цитокинов мультиплексным методом с помощью проточной цитометрии	75
2.3.6.1. Определение продукции цитокинов Th1/Th2-направленности лимфоцитами периферической крови после 24-часовой митогенной стимуляции <i>in vitro</i> методом СВА	75
2.3.6.2. Определение продукции цитокинов Th1/Th2/Th17-направленности мультиплексным методом после митогенной стимуляции <i>in vitro</i> клеток цельной периферической крови	76
2.4. Статистические методы анализа	79
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	80
3.1. Клиническая характеристика обследованных пациенток	80
3.2. Характеристика состояния клеточного звена иммунитета женщин с ИПВ	84
3.2.1. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ вне беременности	85
3.2.2. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности	89
3.2.3. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ после аллоиммунизации в первом триместре наступившей беременности	91
3.2.4. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток	

с разными исходами беременности.....	100
3.2.5. Содержание в периферической крови женщин с ИПВ Т-лимфоцитов с фенотипом CD4 ⁺ CD25 ^{high} и внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и ROR γ t	109
3.3. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови женщин с ИПВ	115
3.3.1. Особенности экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови после 72-часовой митогенной стимуляции <i>in vitro</i>	116
3.3.2. Активационная способность лимфоцитов периферической крови и блокирующий эффект аутологичной сыворотки пациенток с ИПВ.....	123
3.3.3. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 после краткосрочной митогенной стимуляции <i>in vitro</i> лимфоцитами периферической крови женщин с ИПВ в течение предгестационной подготовки и в I триместре гестации	133
3.4. Продукция цитокинов <i>in vitro</i> митоген-стимулированными клетками периферической крови женщин с ИПВ	145
3.4.1. Продукция цитокинов <i>in vitro</i> митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови пациенток с ИПВ в процессе предгестационной аллоиммунизации и в первом триместре наступившей беременности	146
3.4.2. Оценка продукции цитокинов <i>in vitro</i> лимфоцитами периферической крови пациенток с ИПВ в течение пролонгированной беременности	157
3.5. Антиотцовские антилейкоцитарные антитела у женщин с ИПВ.....	161
3.5.1. Выбор метода определения антиотцовских антилейкоцитарных антител с помощью проточной цитометрии.....	161
3.5.2. Оценка уровня антиотцовских антилейкоцитарных антител у женщин с ИПВ в процессе предгестационной аллоиммунизации и в первом триместре наступившей беременности	165
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	171
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187

ВЫВОДЫ	191
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	194
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	196
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	199

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

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% супружеских пар повторяющиеся спонтанные потери беременности на ранних сроках связывают с нарушениями иммунных реакций матери на антигены плода отцовского происхождения, то есть с аллоиммунными причинами [1, 2, 3].

Проявления аллоиммунных нарушений, при которых иммунная система матери развивает реакции отторжения тканей 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 беременности, или привычного выкидыша [4, 5, 6, 7].

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 [8, 9, 10]. Открытие субпопуляций Т-хелперов, продуцирующих цитокины, которые опосредуют развитие острого воспаления аутоиммунного и аллергического характера (Th17-клеток) продемонстрировало значительную функциональную гетерогенность Т-хелперных клеток [11, 12, 13]. Предполагается, что неадекватность формирующегося субпопуляционного состава Th-клеток потребностям гестационного процесса может приводить к формированию осложнений беременности [14, 12]. 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 [15, 16, 17, 18, 19, 20]. 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 [21, 22, 18, 23].

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, [24, 25, 26], так и появлением лимфоцитов, обладающих иммуносупрессивной функцией, среди которых обнаруживаются клетки с полным фенотипом Трег [27, 16,28]. 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. [24, 29, 30].

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 [31, 32, 33, 34].

Одной из наиболее изученных гуморальных аллогенных реакций является образование антиотцовских антилейкоцитарных антител (АОАТ). Мнения о роли АОАТ в развитии привычного невынашивания противоречивы [35, 36, 37, 38]. До сих пор не ясно, являются ли антиотцовские антитела фактором, необходимым для нормального протекания беременности, имеет ли уровень АОАТ в сыворотке крови беременных диагностическое значение для прогноза выкидыша на раннем сроке. Одной из возможных причин противоречивых представлений о значимости антиотцовских антител является отсутствие единого метода их определения [39, 40].

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.

Коррекция иммунных нарушений является целью иммуномодулирующей терапии привычного невынашивания аллоиммунного генеза - иммунотерапии. Однако до сих пор критерии эффективности иммунотерапии отсутствуют. Данные о вовлеченности в эффекторные реакции гетерогенных популяций иммунокомпетентных клеток позволяют предполагать, что как количество клеток конкретных фенотипов, так и их активационный статус и функциональное состояние могут отражать формирование специфической толерантности к антигенам плода. Исходя из этого, критериями эффективности иммунотерапии 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 γ 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⁺-клеток, T-регуляторных клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} 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⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺ и CD3⁺CD56⁺CD16⁺ в качестве основы для персонализированного назначения

аллоиммунизации в предгестационной подготовке и оценки содержания субпопуляций $CD56^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD16^+$, $CD200^+$, $CD3^-CD8^+$ 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.

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 γ 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 NK-клетками в 5-6 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и с выкидышем, нормальные показатели субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессии *in vitro* CD69 NK-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.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: в проведении анализа литературы и выборе направления исследований, в анализе клинико-anamnestических данных и составлении электронных баз данных, в разработке протоколов лабораторного исследования, в проведении основного объема иммунологических анализов на всех этапах исследования. Автором лично проведен анализ полученных результатов с применением статистических методов исследования, подготовка

основных публикаций и докладов по выполненной работе на научно-практических мероприятиях.

Апробация работы

Материалы работы были представлены на Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017), Международном симпозиуме по иммунологии репродукции (13th, 14th, 15th 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-ой Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Пермь, 2010), на 5-й Российской конференции по иммунологии репродукции (Иваново, 2012), на 7-ой 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» (2017).

Диссертационная работа обсуждена на заседании межотделенческой апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (18.12.2017, протокол №18).

Внедрение результатов работы

Работа проводилась в рамках:

1. НИР 2008-2010г.- Разработка комплекса высокотехнологичных иммунологических и молекулярно-биологических методов диагностики и лечения репродуктивной патологии. Фрагмент 2 «Разработка комплекса методов для оценки функционального состояния иммунной системы женщин с проблемами репродукции в период подготовки к беременности»;

2. НИР 2011-2014г.- Изучение молекулярно-биологических и клеточно-

иммунологических предикторов формирования патологии гестационного процесса. Фрагмент 2 «Изучение аллоиммунных и аутоиммунных механизмов при привычном невынашивании беременности»;

3. НИР 2015-2017г.г. - Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, митохондриальных факторов в преждевременных родах и невынашивании беременности. Фрагмент 2 «Создание проекта тест-системы прогнозирования и диагностики невынашивания беременности»;

3. Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-366.2012.7-2012-2013г.- Молекулярные и клеточные механизмы иммунорегуляции процесса гестации в норме и при потерях беременности ранних сроков.

4. Грант Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-1694.2014.7 на 2014-2015г.г. «Молекулярные и клеточные механизмы нарушения и коррекции иммунорегуляции процесса гестации при невынашивании беременности».

По теме диссертации опубликовано 47 печатных работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

По теме диссертации получены патенты:

1. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Николаева М.А., Зиганшина М.М., Сидельникова В.М., Кречетова Л.В. Способ определения блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки//Патент РФ на изобретение №2396566, Бюллетень 22, Заявка № 2009116174, приоритет 29.04.2009, зарегистрировано 10 августа 2010.

2. 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. Способ выявления антиотцовских антител после иммунизации женщин с идиопатическим привычным выкидышем лимфоцитами полового партнера//Патент РФ на изобретение №2614729, Бюллетень 10, заявка 2016106740, приоритет 26.02.2016, зарегистрировано в Государственном реестре

изобретений РФ 28.03.17 г.

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую работу 2-го акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России при обследовании и лечении супружеских пар с привычными потерями плода.

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).

ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФЕНОМЕНЫ, ОТРАЖАЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К АЛЛОАНТИГЕНАМ ПЛОДА В РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

1.1. Становление основных направлений исследований толерантности в иммунологии репродукции

Формирование толерантности к собственным антигенам - центральная проблема в иммунологии, поскольку раскрытие ее механизмов связано с пониманием закономерностей сохранения биологического организма как целого при его взаимодействии с окружающей средой. Распознавание «своего» и «чужого» и обеспечение выживаемости биологического индивида является сутью иммунных реакций на протяжении всего жизненного цикла. Именно поэтому феномен внутриутробного развития до сих пор называют «иммунологической загадкой» беременности [41]. Развитие представлений об иммунологических взаимоотношениях материнского организма и развивающегося плода полностью отражает этапы формирования представлений о функциях иммунной системы, о субпопуляционном составе клеток, обеспечивающих ее адекватное функционирование, о взаимодействии иммунокомпетентных клеток с другими клетками организма, способствующем сохранности его целостности. В 1971 г. впервые плод был назван «физиологическим аллогенным трансплантатом» [42]. До настоящего времени данная парадигма актуальна, и взаимоотношения плода (как полуаллогенного трансплантата, так как половина его генома - от матери) с материнским организмом трактуются согласно закономерностям взаимоотношений организма-хозяина и трансплантата, и методы исследования реакций между материнской иммунной системой и клетками формирующегося плода, в большей своей части, соответствуют методам, применяемым в трансплантологии.

Одно из ранних определений толерантности формулировалось как «индуцированная антигеном специфическая перестройка популяционной структуры лимфоидной ткани, приводящая к утрате способности к иммунному ответу на данный антиген» [43]. В связи с этим исследование роли Т-супрессоров в специфическом подавлении иммунного ответа и роли сывороточных супрессивных (блокирующих) факторов были приоритетными направлениями в трансплантационном иммунитете, которым впоследствии большое внимание уделялось в иммунологии репродукции.

Так, например, концепция Г.А. де Вуазена оказала влияние на создание целого направления в исследованиях материнско-фетальных взаимоотношений [44, 45]. Согласно этой концепции создание специфической толерантности в отношении трансплантационных антигенов определялось взаимоотношением клеточной иммунной реакции, направленной на отторжение антигенов, и процессом образования антител, препятствующих отторжению. Именно второй процесс, по мнению автора, и отражал формирование толерантности. Концепция Г.А. де Вуазена объясняла феномен усиления роста опухоли у экспериментальных животных, которых предварительно иммунизировали опухолевыми клетками (или экстрактом опухоли) до трансплантации самой опухоли, по сравнению с интенсивностью роста трансплантированной аллогенной опухоли у контрольных животных, которых не подвергали предварительной иммунизации. Введение неиммунизированным животным сыворотки от иммунизированных животных до трансплантации опухоли также вызывало интенсификацию роста трансплантированной опухоли по сравнению с интактными животными. В результате обобщения данных экспериментов был сделан вывод о связи эффекта усиления роста опухоли с сывороточными, гуморальными факторами, или антителами (*enhancement antibody*).

Подобное действие антител по отношению к клеткам не аллогенной, а аутологичной опухоли считается протективным. Протективный эффект аутологичной сыворотки был зарегистрирован как в эксперименте, так и в лечении онкологических пациентов [43]. Показано, что у пациентов с

прогрессивно растущей опухолью лимфоциты в условиях *in vitro* оказывают цитотоксическое действие на клетки опухоли, а сыворотка этих пациентов, добавленная в культуру, блокирует его. При этом блокирующий эффект сыворотки обусловлен либо циркулирующими антителами, либо присутствием самого антигена в форме толерогена, либо наличием в сыворотке комплекса антиген-антитело, который был даже более толерогенным, чем сам антиген. В результате проведенных экспериментальных работ было сделано предположение о взаимозависимости блокирующего эффекта сыворотки и механизмов возникновения толерантности.

Иными словами, при сформированной иммунологической толерантности цитотоксическая функция иммунных клеток по отношению к трансплантационным антигенам не может проявиться вследствие блокирующего эффекта гуморальных факторов, или блокирующих факторов [45]. Поэтому изучение иммуносупрессивной функции иммунокомпетентных клеток и исследование блокирующего эффекта сыворотки беременных были одними из самых популярных направлений в иммунологии репродукции. Маркеры нарушений толерантности искали среди параметров гуморальных реакций при беременности, в субпопуляционном составе и функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток, а также среди цитокинов, продуцируемых активированными иммунными клетками под влиянием гормонов беременности и других регуляторных факторов, формирующихся в процессе морфогенеза плаценты.

1.2. Исследование гуморальных реакций и блокирующих факторов сыворотки крови беременных

Согласно изложенному выше, в формировании толерантности главная роль принадлежала антителам, блокирующим функцию цитотоксических лимфоцитов в нейтрализации и выведении чужеродного антигена.

Исследованию блокирующих антител было посвящено значительное количество работ [46, 47, 48]. Еще в 1976г. было показано блокирование аутологичной сывороткой материнского клеточно-опосредованного иммунного ответа на плацентарные антигены [49]. Среди растворимых факторов, обуславливающих блокирующий эффект сыворотки, есть неспецифические (различные гидролитические ферменты и антиидиотипические антитела, иммунные комплексы, растворимые формы рецепторов к иммунорегуляторным молекулам, в том числе и к цитокинам), и специфические (антитела к антигенам плода отцовского происхождения, появляющиеся во время беременности), а также стероидиницируемые белки беременности [32, 50, 51, 52, 53].

С одной стороны, разнообразие блокирующих эффектов сыворотки связано с особенностями экспериментальной модели, в которой он регистрируется. Супрессивный эффект сыворотки могут определять факторы, блокирующие реакцию EA-розеткообразования при определении антител к рецепторам отцовских В - лимфоцитов (FcR-блокирующие антитела), блокирующие выявление антител в реакции комплемент-зависимой цитотоксичности, факторы, блокирующие способность дендритных клеток в эксперименте индуцировать антиген-специфическую пролиферацию и цитокиновую секрецию клетками лимфатических узлов [34, 54, 55], факторы, блокирующие реакцию в смешанной культуре лимфоцитов партнеров (MLR-блокирующие антитела) [56, 57]. MLR-блокирующие антитела также блокируют анти-митогенную активность мононуклеаров [56].

С другой стороны, помимо блокирующих факторов иммуноглобулиновой природы, существует ряд белков с функцией ингибирования клеточно-опосредованного ответа, имеющие значение в развитии беременности - это, белки ранней беременности, и среди них, например, прогестерон-индуцированный блокирующий фактор, преимплантационный фактор, миграцию макрофагов ингибирующий фактор [58, 59].

Показано, что за блокирующий сывороточный эффект ответственны антитела класса иммуноглобулина G изотипа G3 [56]. Свойство антител класса

IgG ингибировать иммунный ответ на соответствующий антиген отмечалось с самых ранних экспериментов по оценке схем иммунизации и гипериммунизации даже в отсутствие специальных толерогенных схем [43]. Установлено, что данные антитела направлены к идиотипическим детерминантам T-клеточного рецептора. Антиидиотипические антитела - один из механизмов, с помощью которого иммунная система осуществляет контроль интенсивности иммунного ответа. Считается, что при беременности функцию блокирующих антител имеют антиидиотипические антитела, направленные к антиген-связывающему участку цитотоксических антител, распознающих отцовские антигены плода [60, 61].

Применительно к исследованию механизмов толерантности в системе «мать-плод» блокирующие антитела играют протективную роль для плода, поскольку способны при воздействии на T-лимфоциты матери подавлять распознавание антигенов отца, не вызывают патологических изменений в плаценте и у плода, не проникают через плаценту и не циркулируют в крови плода [41, 60].

1.2.1. Антитела к антигенам гистосовместимости плода

Изначально предполагалось, что при беременности формирование толерантности к антигенам плода происходит по тем же закономерностям, что и к трансплантационным антигенам, и что беременность протекает без осложнений при минимальных различиях матери и плода по антигенам системы гистосовместимости, но несколько позже в экспериментах с линейными животными было обнаружено, что генетические различия материнского организма и плода даже благоприятствуют нормальному развитию беременности [62]. Было показано, что в случае беременности сингенным плодом плацента имела минимальный объем, по мере усиления различий по генам гистосовместимости ее размер увеличивался, а в случае применения предварительной иммунизации самки антигенами полового партнера даже

превышал нормальный [63]. Также оказалось, что если индукция толерантности к антигенам групп крови (систем Rh, AB0) при несовместимости матери и плода может предупреждать развитие возможных осложнений, то возникновение толерантности при различиях матери и плода по антигенам гистосовместимости может иметь отрицательные последствия [64, 65,66].

Сведения о влиянии совместимости супругов по антигенам системы гистосовместимости на исходы беременности противоречивы. В ряде работ показана связь частоты совпадений по антигенам локусов системы HLA с исходами беременности [4, 38] и даже названы HLA-аллели A*030101, B*5701, Cw*120201, DRB1*030101, и DRB1*150101 как ассоциированные с наследственными гаплотипами, влияющими на исходы беременности в Индии [67]. Но в ряде работ такие утверждения опровергаются [68, 69, 70, 71, 72]. В 2013 году был опубликован систематический обзор с данными мета-анализа работ с высоким уровнем статистической и клинической гетерогенности, что позволило авторам сделать заключение об отсутствии влияния антител к антигенам HLA классов I и II на исходы беременности [40, 73].

Позже было установлено, что экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) эмбрионом обнаруживается уже через 48 часов после оплодотворения [74], но носит особый характер, заключающийся в отсутствии экспрессии классических молекул ГКГ-I класса (HLA-A, HLA-B) и в преимущественной экспрессии неклассических молекул HLA-E, HLA-G, HLA-F, которые имеют ограниченный полиморфизм и не участвуют в презентации антигенов. Именно неклассические молекулы ГКГ-I класса распознаются ингибиторными рецепторами NK-клеток, что приводит к генерации сигналов, блокирующих цитолитическую активность естественных киллерных клеток, и к предотвращению сенсibilизации матери антигенами плода [75, 76].

Тем не менее в сыворотках многорожавших женщин определяются антитела против HLA и других антигенов плода, причем уровень и разнообразие этих антител увеличивается с увеличением числа беременностей [77, 78, 79]. Однако обнаруженная сенсibilизация в норме не приводит к развитию реакций

отторжения, в частности потому, что индуцированные беременностью антитела не проявляют комплемент-зависимой цитотоксичности [80]. Есть работы, в которых показано, что появляющиеся во время беременности антитела к антигенам плода отцовского происхождения (антиотцовские) имеют особую структуру и обозначаются как ассиметричные антитела. Ассиметричные антитела имеют обогащенный маннозой олигосахаридный остаток в одном из Fab-фрагментов иммуноглобулина G (IgG), наличие которого и препятствует активации иммуноэффекторных механизмов: фиксации комплемента, выведению антигена и фагоцитозу [81, 82, 83]. Именно гликозилирование одного из Fab-регионов превращает молекулы IgG в блокирующие антитела при беременности, поскольку в эксперименте *in vitro* четко показано, что плацентарные факторы повышают эффективность синтеза ассиметричных молекул IgG различных изоформ, секретируемых плазматическими клетками [84]. Преимущественный синтез ассиметричных антител в ответ на иммунизацию самок антигенами самца, предназначенного для спаривания, обнаружен в эксперименте на крысиных моделях, при этом вес плодов, плацент и выживаемость потомства были выше в группе иммунизированных животных [85]. Содержание антиотцовских антител (антител к отцовским антигенам плода) было в три раза выше во фракции ассиметричных молекул IgG, выделенных из сыворотки крови, полученной из плацент женщин с физиологическим течением беременности, чем во фракции симметричных молекул [86].

Приведенные данные также свидетельствуют в пользу предположения, что ассиметричные антитела выполняют роль блокирующих факторов и защищают плод во время гестации [82, 83, 87].

1.2.2. Блокирующие свойства ряда белков ранней беременности

Большинство факторов сдерживания реакций, направленных на отторжение плода во время беременности, формируется в процессе морфогенеза плаценты в

соответствии с законами функционирования и регуляции иммунной системы [88].

1.2.2.1. Прогестерон-индуцированный блокирующий фактор

Очень важным в поддержании беременности является медиаторный белок, который обладает иммуномодуляторными свойствами, контролирует действие прогестерона на беременную матку - прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (ПИБФ).

ПИБФ - белок массой 90 кДа. Полноцепочечная mRNA ПИБФ кодируется экзонами 1-18 и присутствует в изолированных клетках плодовых оболочек первого триместра и послеродовой плаценты, дополнительно эти клетки экспрессируют белок в 50 и 34 кДа [89]. Вначале открыт как белок молекулярной массой 34 кДа, с которым связали антиабортивный и иммуномодуляторный (определяющийся изменением цитокиновой продукции активированными мононуклеарными клетками) эффект ПИБФ, но позже показали, что именно смесь этих изоформ действует как медиаторы клеточных взаимодействий, дефицит которых в модельных экспериментах на животных связали с потерей локальной иммуносупрессии [90]. Изоформа молекулярной массой 90 кДа участвует в регуляции клеточного цикла, дефицит этой формы в модельных экспериментах на мышцах линии Valb/c привел к нарушению инвазии трофобласта [90].

ПИБФ можно обнаружить в моче и сыворотке крови иммуноферментным методом [91, 92, 93] Экзогенным стимулом для синтеза ПИБФ является стресс и аллогенный стимул. Показано, что стресс индуцирует аборт у мышей через значительное снижение уровня прогестерона, сопровождаемого снижением и уровня ПИБФ в сыворотке. Эти эффекты устраняются добавлением прогестерона в корм животных. Представленные данные указывают на значимость прогестерон-зависимой иммуномодуляции в формировании толерантности иммунной системы матери к антигенам плода [94]. Переливание крови или пересадка печени (аллогенные стимулы) увеличивают экспрессию рецепторов к

прогестерону [95]. Эндogenous стимулом для увеличения секреции ПИБФ служат события, происходящие сразу после имплантации [96], ПИБФ необходим для нормального протекания беременности, являясь медиатором с антиабортивной активностью. Вследствие процессов иммунного распознавания на самых ранних этапах беременности увеличивается количество прогестероновых рецепторов на активированных лимфоцитах среди клеток плаценты и децидуальных CD56⁺ клеток. В присутствии достаточного количества прогестерона эти клетки синтезируют ПИБФ [90, 97]. В течение нормальной беременности концентрация ПИБФ в сыворотке беременных постепенно увеличивалась до 37 недели гестации с последующим резким снижением к 41 неделе [91]. Низкий уровень сывороточного ПИБФ ассоциирован с потерями беременности в первом триместре или с преждевременными родами до 34 недель гестации [92, 98, 99, 100].

Клетками-продуцентами ПИБФ являются активированные лимфоциты периферической крови и децидуальные лимфоциты, в том числе неклассические CD3⁻CD56⁺CD16⁻perforin [P]bright⁺ NK-клетки [97, 101, 102], обнаружена локализация ПИБФ в синцитиотрофобласте и частично в ворсинах трофобласта [89]. Показано, что процент ПИБФ-позитивных лимфоцитов в периферической крови здоровых беременных был значимо выше, чем у женщин с риском преждевременных родов; у пациенток, у которых образцы крови брали в момент спонтанного аборта или преждевременных родов, процент ПИБФ-позитивных клеток был значимо ниже, чем в контроле; обнаружена обратная корреляция между экспрессией ПИБФ на лимфоцитах и активностью NK-клеток, а также прямая связь количества ПИБФ-позитивных лимфоцитов с исходами беременности [103].

Среди биологических эффектов ПИБФ - снижение цитолитической активности NK-клеток через блокирование экзоцитоза перфорина и ингибирование ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2-опосредованной трансформации NK-клеток в активированные киллерные клетки [97, 101, 102]. Считается установленным, что ПИБФ способствует изменению профиля цитокиновой

продукции активированными лимфоцитами, выражающегося в увеличении продукции противовоспалительных цитокинов (ИЛ-3, ИЛ -4 и ИЛ -10) и в снижении продукции провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2) [97, 104]. В экспериментах *in vitro* обнаружено, что в супернатантах мононуклеарных клеток, активированных митогеном в присутствии ПИБФ, содержание ИФН- γ не отличалось от контроля, но значительно больше была продукция ИЛ-10, ИЛ-3 и ИЛ-4, чем в супернатантах, инкубированных с митогеном в отсутствие ПИБФ [105, 106]. Механизм, посредством которого ПИБФ осуществляет переключение продукции цитокинов с Th1-направленности на Th2, осуществляется двумя путями: через индукцию STAT6 - опосредованного пути передачи сигналов от рецептора к ИЛ-4 (без влияния на взаимодействие ИЛ-13 с его рецептором) и через ингибирование STAT4 –сигнального пути, активируемого взаимодействием ИЛ-12 с его рецептором. Через связывание ИЛ-4 с его рецептором ПИБФ фосфорилирует протеин киназу C (PKC), следствием чего и является активация Jak1 и STAT6 сигнального пути, поддерживающего Th2 тип цитокиновой продукции [104, 107, 108]. В прогестерон-зависимой иммуномодуляции участвуют лимфоциты с $\gamma\delta$ ТКР. Показано, что 97% $\gamma\delta$ ТКР-позитивных клеток беременных экспрессируют рецептор к прогестерону, и связывание специфических антител к $\gamma\delta$ ТКР ингибировало продукцию ПИБФ и ИЛ-10, но увеличивало активность НК-клеток и экспрессию ИЛ-12 [109, 110].

Обнаружено влияние ПИБФ на В-лимфоциты, заключающееся в увеличенной продукции асимметричных антител, которые не обладают эффекторными функциями, но посредством блокирования антигенов плода способствуют развитию механизмов его защиты. Было показано, что пропорция асимметричных IgG была значимо выше в супернатантах культур гибридных клеток, культивируемых в присутствии ПИБФ, по сравнению с уровнем в супернатантах при культивировании в отсутствие ПИБФ, и выявлена положительная связь между содержанием асимметричных антител в сыворотке крови и экспрессией ПИБФ на лимфоцитах [97, 111].

Таким образом, ПИБФ - важный иммуномодуляторный белок,

способствующий формированию иммунологического фона, поддерживающего внутриутробное развитие полуаллогенного плода.

1.2.2.2. Преимплантационный фактор

Преимплантационный фактор (ПИФ) - это низкомолекулярный белок с иммуномодуляторными свойствами, относится к белкам ранней беременности и представляет собой смесь 2-х спиралевидных пептидов размером 9 и 15 аминокислотных остатков, имеющих общую последовательность с 1 по 9 аминокислотный остаток, массой 523 и 551 Да [112, 113]. ПИФ обнаруживается в сыворотке беременных, отсутствует в сыворотке небеременных женщин и в сыворотке мужчин [114]. В настоящее время его определяют с помощью ELISA с флуоресцентной детекцией. Открыт в реакции розеткообразования аутологичных лимфоцитов и тромбоцитов доноров крови группы 0 в присутствии комплемента, антител к CD2 и сыворотки беременных, в так называемой реакции LPBA (lymphocyte/platelet binding autorosette assay) [114, 115, 116, 117, 118]. С помощью моноклональных антител ПИФ точно определяют в среде культивирования эмбриона и его увеличенный уровень коррелирует с развитием эмбриона до стадии бластоцисты [114]. ПИФ определяется в сыворотке женщин сразу после фертилизации [116], уже до имплантации и ассоциирован с успешными исходами беременности [119]. Эндогенный ПИФ, от которого зависит развитие эмбриона, секретируется только жизнеспособным эмбрионом у млекопитающих уже на 2-клеточной стадии [113, 116, 120], и отсутствует у нежизнеспособных (неживых) [121]. Обнаружено, что ПИФ становился негативным минимум за 2 недели до проявления внутриматочной смерти плода даже в то время, когда концентрация ХГЧ (хорионического гормона человека) была высокой [117], в связи с чем высказано предположение, что когда эмбрион становится несовместим с жизнью, ПИФ-подобные соединения отклоняют иммунную привилегированность плода и беременность прекращается, плод отторгается [120]. ПИФ экспрессируется

плацентой и присутствует в материнской циркуляции в течение всей жизнеспособной беременности до родов [122, 123, 124]. Уже на ранних сроках гестации уровень ПИФ в сыворотке беременных коррелирует с исходами беременности [114]. Показано, что синтетический аналог ПИФ в низкой физиологической дозе высокоэффективен в ингибировании НК-клеточной цитотоксичности, ассоциированной с привычным выкидышем (ПВ) иммунного генеза [122]. Иммуногистохимически показано сильное связывание ПИФ в течение ранней беременности как ворсинами, так и вневорсинчатым трофобластом [125]. ПИФ обеспечивает имплантацию и инвазию трофобласта [126]. Высказана гипотеза, по которой ПИФ является инструментом для развития ранней и поздней преэклампсии (ПЭ). Поверхностная, неглубокая имплантация приводит к неполноценной плацентации, оксидативному стрессу, нарушению структуры белков и эндотелиальной дисфункции, и вследствие ослабленного маточно-трофобластного взаимодействия приводит к развитию ранней ПЭ, а в поздние сроки гестации вследствие нарушения регуляции плацентарного кровотока наблюдается развитие поздней ПЭ [126].

ПИФ действует главным образом через активацию иммунной системы и создания модуляции в направлении Th2 (Th2/Th1) без иммуносупрессии [124]. Физиологическая роль связана с обеспечением имплантации, рецептивности эндометрия, инвазии трофобласта. Обсуждается прямой, позитивный эффект ПИФ на контроль инвазии трофобластных клеток человека через влияние на баланс матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, а также экспрессию интегрина [125]. В механизмах действия отмечают влияние на адгезию клеток, ремоделирование и апоптоз [127, 113], на увеличение экспрессии трофобластом HLA-G, что способствует формированию толерантности к АГ плода, на снижение уровня оксидативного стресса [126]. ПИФ связывается с макрофагами и регулирует CD3/CD28-индуцированный Т-клеточный ответ, через CD2 рецептор активированных Т-клеток и через ингибирование экспрессии ко-лиганда CD58, ПИФ регулирует взаимодействие АПК и Т-клеток, необходимое для осуществления ответа на ФГА (митоген, что подтверждает способность ПИФ

к системному ответу на различные иммунные стимулы), блокирует ФГА-индуцированную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови, способствует секреции противовоспалительного ИЛ-10, а также снижению секреции ИФН- γ и ИЛ-17, т.е., благоприятствует переключению на секрецию цитокинов Th2-направленности [112]. Как *in vivo*, так и *in vitro*, ПИФ приводит к уменьшению индукции экспрессии NO-синтазы и снижает секрецию NO липополисахарид-активированными макрофагами. ПИФ действует, в первую очередь, индуцируя регуляторный фенотип моноцитов/АПК, которые контролируют процесс Т-клеточной пролиферации [128]. В эксперименте показано, что у неактивированных мононуклеарных клеток периферической крови синтетический аналог ПИФ уменьшал продукцию ИЛ-10 и ИЛ-2, а у митоген-активированных - увеличивал продукцию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-2, ФНО- α , ИФН- γ , ГМКФ, поэтому был сделан вывод о том, что физиологические концентрации синтетического аналога ПИФ проявляют потенциал системного противовоспалительного эффекта на активированные иммунные клетки небеременных [129].

Считается доказанным, что ПИФ играет определяющую роль в развитии материнской толерантности к полуаллогенному или полностью аллогенному эмбриону и в регуляции системного иммунного ответа [128].

1.2.2.3. Миграцию макрофагов ингибирующий фактор

Миграцию макрофагов ингибирующий фактор (МИФ) - белок, продуцируемый активированными Т-лимфоцитами. Эффект ингибирования миграции макрофагов установлен в экспериментах *in vitro* [130]. Считается, что провоспалительные эффекты МИФ определяются его способностью отменять стероид-зависимую супрессию синтеза провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 [131, 132]. Показано, что МИФ освобождается из мононуклеаров в ответе на глюкокортикоиды, любые провоспалительные

стимулы, на митогенные стимулы и инициирует ряд важных внутриклеточных сигнальных событий, приводящих через активацию p44/p42 митоген-активированной протеин-киназы и освобожденную под действием цитоплазматической фосфолипазы А арахидоновую кислоту к про-пролиферативным и провоспалительным эффектам [133]. МИФ рассматривается как «переломный» медиатор септического шока, поскольку блокирует глюкокортикоид-зависимую супрессию цитокинов липополисахарид-активированными моноцитами и ослабляет глюкокортикоидную защиту эндотоксемии, что позволило исследователям представить взаимодействие МИФ с глюкокортикоидными гормонами как уникальную регуляторную систему контроля воспалительного иммунного ответа [131].

Физиологическая роль МИФ определяется также провоспалительными эффектами лимфоцитов и макрофагов, связанными с физиологией эндометрия, поскольку показана экспрессия МИФ в эндометрии в течение всего менструального цикла и в ранней беременности [134, 135, 136].

МИФ вовлечен в регуляцию репродуктивных процессов и обсуждается его роль в поддержании иммунной привилегированности на фето-материнском интерфейсе [137]. Помимо иммунорегуляторной функции, отмечаются его эффекты как ростового и ангиогенного фактора [138]. Обнаружено, что ХГЧ стимулирует экспрессию МИФ в эндометриальных стромальных клетках, действуя через стимулирование транскрипции гена МИФ, поэтому предполагается, что один из механизмов поддержания беременности и развития эмбриона ХГЧ связан с иммуномодуляторными и ангиогенными свойствами МИФ [138].

Показано, что НК-клетки эндометрия беременной матки способны отвечать на МИФ и сами продуцируют МИФ. В эксперименте рекомбинантный МИФ снижает цитолитическую активность НК-клеток в отношении мишеней в виде клеток К-562 дозозависимым способом, нейтрализация эндогенного МИФ поликлональными антителами приводит к резкому увеличению цитолитической активности НК-клеток. Полученные данные позволили говорить о наличии

паракринных и аутокринных эффектов МИФ [139]. Более всего МИФ продуцируется клетками трофобласта, в связи с чем постулируется его значимость в процессах имплантации, плацентации, в поддержании беременности и в родах [134, 140]. Есть данные об увеличении секреции МИФ в амниотической жидкости в родах, особенно в своевременных, по сравнению с содержанием во втором триместре гестации, что позволило предположить участие МИФ в провоспалительных событиях в матке, приводящих к родам [141] и сделать вывод о том, что сывороточный уровень МИФ может быть предиктором преждевременных родов [132].

Показан низкий уровень МИФ в крови и эндометрии пациенток с привычным невынашиванием беременности [142]. Практически одновременно были опубликованы работы с противоположными выводами о значимости МИФ в развитии ПЭ: с одной стороны, сообщается об увеличенном уровне МИФ у беременных с тяжелой ПЭ по сравнению с уровнем у женщин с физиологическим течением беременности [143], с другой - сообщается об увеличении уровня МИФ в циркулирующей крови во время беременности, но не у пациенток с тяжелой ПЭ [144]. В более поздних исследованиях показано, что в 20 недель гестации у беременных с развившейся впоследствии ПЭ (n=48) уровень МИФ был значимо ниже, чем у женщин с физиологически протекающей беременностью (n=79) [145]. Авторами сделан вывод о неблагоприятном влиянии низких уровней МИФ на развитие ранней беременности. Однако у женщин с ПЭ уровень МИФ в сыворотке был выше, чем в контроле, а в плаценте у женщин с ПЭ и с задержкой внутриутробного развития плода уровень МИФ был ниже, чем в контроле [146], что связывают с различной продукцией МИФ фето-плацентарными тканями в случае нормального или нарушенного их развития.

Приведенные данные свидетельствуют о важной роли МИФ в репродукции.

Таким образом, блокирующие свойства сыворотки беременных определяются целым рядом белков как высокомолекулярных иммуноглобулиновой природы, так и низкомолекулярных, обладающих иммуномодуляторными свойствами, которые участвуют в формировании

толерантности материнского организма к антигенам плода отцовского происхождения и влияют на исходы беременности.

1.3. Субпопуляционный состав и активационное состояние иммунокомпетентных клеток при беременности

1.3.1. Основные субпопуляции лимфоцитов при беременности

Толерантность как ограничение иммунного ответа на антиген проявляется не только в специфическом подавлении ответа блокирующими антителами, продуцируемыми В-клетками, но и в специфическом подавлении, осуществляемом Т-клетками, а именно: Т-супрессорами [147]. Важным было формирование представления о том, что цитотоксическая и супрессорная функция присуща разным субпопуляциям лимфоцитов. Поиск лимфоцитов, обладающих способностью подавлять иммунный ответ, привел в дальнейшем к открытию большой фенотипической и функциональной гетерогенности иммунокомпетентных клеток. Использование моноклональных антител к отдельным вариантам поверхностных антигенов, которые на сегодняшний день объединены единой международной классификацией антигенных маркеров (кластеров дифференцировки -CD), и метода проточной цитометрии позволило успешно идентифицировать функционально различные типы лимфоцитов по фенотипу - по типу поверхностных маркеров. Например, В-лимфоциты характеризующиеся специфичными только для них антигенами CD19 и CD20, подразделяются на две субпопуляции В1 (с фенотипом $CD19^+CD5^+$) и В2 (с фенотипом $CD19^+CD5^-$). Для В1-лимфоцитов присуща продукция поликлональных аутоиммунных антител к аутологичным белкам. Количественное содержание В-лимфоцитов - достаточно стойкий показатель, который мало меняется во взрослой жизни (примерно около 10% в периферическом кровотоке),

поэтому изменение их содержания может быть важным критерием нарушений в системе В-клеточного звена иммунитета [60]. Во время беременности В-клетки продуцируют асимметричные антиотцовские аллоантитела, которые способствуют защите плода, ингибируя цитотоксичность клеток с естественной киллерной активностью против трофобластных клеток [18].

Общим панлимфоцитарным антигеном является CD45, наличие которого на мембране позволяет устанавливать принадлежность субпопуляции к иммунокомпетентным клеткам.

Среди зрелых Т-лимфоцитов, характеризующихся общим антигеном CD3, присутствующим в Т-клеточном рецепторном комплексе, выделяют две субпопуляции, различающиеся экспрессией либо CD8, либо CD4, двойные позитивные по CD8 и CD4 Т-лимфоциты встречаются преимущественно на стадии тимической дифференцировки. Эти две основные субпопуляции отличаются распознаванием антигенов в составе молекул МНС (CD8⁺Т-лимфоциты - в составе МНС I класса, а CD4⁺Т-лимфоциты - в составе МНС II класса) и типом функции после специфической антигенной стимуляции.

Лимфоцитами с фенотипом CD3⁺CD8⁺ посредством контактного цитолиза, основанного на специфическом распознавании антигена, осуществляется цитотоксическая функция. Контактный цитолиз CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитами протекает либо по механизму, сходному с механизмом цитолитического действия естественных киллерных клеток врожденного иммунитета, обусловленным участием перфоринов и гранзимов, либо через FAS-рецепторный механизм индукции апоптоза. Также эти клетки, в отличие от натуральных киллеров, участвуют в формировании специфической иммунологической памяти [88]. Есть данные, что лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют весомую роль в регуляции поддержания беременности через особые взаимоотношения с клетками с естественной киллерной активностью (NK-клетками), поскольку существует значимая негативная корреляционная связь между количеством CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов и цитолитической активностью NK-клеток, которая у пациенток с ПВ отсутствует [148]. Показано, что при физиологической беременности

децидуальные $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоциты регулируют инвазию вневорсинчатого трофобласта в матку, проявляя активную цитолитическую активность [149]. Численность цитотоксических лимфоцитов в периферической крови в течение всей беременности остается неизменной, так же, как и экспрессия ими регуляторного белка TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), считающегося негативным регулятором провоспалительного иммунного ответа и индуктором толерантности [150].

Цитотоксической (киллерной) функцией также обладают большие гранулярные лимфоциты, или лимфоциты с естественной киллерной активностью (натуральные киллеры, НК-клетки), которые принадлежат к клеткам врожденной иммунной системы, в отличие от В- и Т-лимфоцитов, принадлежащих к адаптивной иммунной системе. НК-клетки идентифицируют по поверхностной экспрессии основного маркера CD56 и дополнительно по экспрессии либо по отсутствию CD16 ($CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD56^+$, $CD3^-CD16^+$). $CD56^+CD16^+$ -НК-клетки преобладают в периферической крови, но проявляют цитолитическую активность при активации, прежде всего, в тканях и вторичных лимфоидных органах. Значимы две субпопуляции НК-клеток - $CD56^{dim}CD16^+$, (составляют до 90-95% всех НК периферической крови) и $CD56^{bright}CD16^-$, которые составляют приблизительно 5%. Считается, что $CD56^{dim}CD16^+$ -клетки обладают большей цитотоксичностью, чем $CD56^{bright}CD16^-$ -клетки. Обе популяции различаются по их пролиферативному ответу на ИЛ-2, экспрессии рецепторов естественной цитотоксичности (NCRs), хемокиновым рецепторам и молекулам адгезии [151].

НК-клетки распознают свои мишени (трансформированные клетки, вирусные белки) без предварительной сенсibilизации. Трансформированные собственные клетки распознаются через рецепторы естественной цитотоксичности NKp30, NKp44 и NKp46, вирусные белки - через NKp44 и NKp46 [152].

Активность НК-клеток зависит от микроокружения, то есть от профиля цитокинов и медиаторов, высвобождаемых в процессе межклеточных взаимодействий. Активация НК-клеток заканчивается формированием

поверхностной экспрессии иммуноглобулино-подобных активаторных (KAR) или ингибиторных (KIR) рецепторов. Основные различия периферических NK-клеток касаются экспрессии ингибиторных рецепторов: $CD56^{dim}CD16^{+}$ -NK-клетки экспрессируют KIR-рецепторы, а $CD56^{bright}CD16^{-}$ - нет. Ингибиторные рецепторы, которые специфичны к молекулам HLA I класса, в норме предотвращают киллерные реакции на аутологичные клетки [75, 153, 154]. В периферической крови может циркулировать до 20% NK-клеток, в эндометрии их обнаруживают до 40%, а в децидуальной ткани они составляют до 70% лимфоцитов, при этом децидуальные NK-клетки имеют фенотип, отличающийся от периферических формированием при беременности KIR-рецепторов к неклассическим молекулам HLA-C, экспрессирующимся на трофобласте [151, 155, 156].

NK-клетки децидуальной ткани, в отличие от периферических, имеют особое функциональное значение. Источниками их являются клетки костного мозга, прогениторные клетки и пролиферирующие и дифференцирующиеся под влиянием эстрогенов и прогестерона локальные NK-клетки [18]. Показано, что под влиянием трансформирующего фактора роста β (ТФР- β), продуцируемого стромальными клетками, $CD56^{dim}CD16^{+}$ -NK-клетки превращаются в $CD56^{bright}CD16^{-}$ -клетки, которые становятся ткане-специфичными [151]. Дефект миграции $CD34^{+}$ -прогениторных клеток в децидуа и формирование вследствие этого неподходящего микроокружения для межклеточных взаимодействий может способствовать нарушению созревания децидуальных NK-клеток и, следовательно, приводить к ранним осложнениям беременности [75]. Сокультивирование *in vitro* периферических NK-клеток с клетками трофобласта приводит к увеличению экспрессии активационных маркеров на NK-клетках и усиленной продукции ими цитокинов, что отражает процессы взаимодействия трофобластных клеток с периферическими NK-клетками *in vivo*, в результате которых и происходит накопление децидуальных NK-клеток на фето-материнском интерфейсе [157].

Децидуальные NK-клетки (дNK-клетки) способны продуцировать ряд особых цитокинов и хемокинов: (ИФН- γ , ФНО- α , ГМ-КСФ, ИЛ-10, ИЛ-8, СЭФР,

IP-10 (интерфероном- γ -индуцибельный белок -10), SDF (фактор стромальных клеток), - которые вовлечены в процессы неангиогенеза, тканевого ремоделирования, инвазии трофобласта и плацентации. Таким образом, дНК-клетки обладают, скорее, регуляторной функцией, чем цитолитической-провоспалительной [158]. В ограничении киллерной функции дНК-клеток важную роль играют децидуальные макрофаги через TФР- β -зависимые механизмы [159]. Несбалансированная активация дНК-клеток может являться причиной самопроизвольной потери беременности вследствие нарушения их взаимодействия с клетками трофобласта [160, 161].

Отмечается, что уровень и характеристики НК-клеток в периферической крови отражают уровень и характеристики децидуальных НК-клеток [162]. Поэтому можно предполагать, что исследования по оценке фенотипа периферических НК-клеток, экспрессии их поверхностных рецепторов и цитокиновой продукции отражают локальные процессы в децидуальной оболочке при беременности.

На системном уровне показано, что динамика НК с различным фенотипом ($CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD56^+$ и $CD3^-CD16^+$) в периферической крови при физиологической беременности различная. И если уровень $CD3^-CD56^+$ достаточно стабилен в течение всей беременности, то уровень $CD3^-CD16^+$ в конце беременности падает ниже нормативных значений, а уровень $CD3^-CD56^+CD16^+$, резко увеличивающийся в начале беременности снижается до нормативных к родам [41].

Существует субпопуляция НК-клеток, одновременно экспрессирующая маркеры как НК-, так и Т-лимфоцитов, называемая НКТ-клетками, это лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+$, $CD3^+CD16^+$, они не обладают свойствами МНС-рестрикции, клональной экспансии и феноменом иммунологической памяти, которые свойственны классическим $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитам, отсутствие или низкий уровень этих клеток ведет к развитию аутоиммунных реакций, они участвуют в реакциях трансплантационного иммунитета, что позволяет предположить их важную роль в репродуктивных

процессах. Динамика НКТ на системном уровне при беременности характеризуется значительным их возрастанием к концу III триместра, что связывают с необходимостью подавления иммунного ответа на антигены плода, содержание которых в кровотоке матери увеличивается к окончанию гестационного процесса [41].

Существуют варианты НК-клеток, характеризующиеся экспрессией CD8, традиционно считающегося маркером цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$). Предполагается, что CD8 участвует в регуляции цитолитической активности НК-клеток, поскольку при связывании CD8 с присутствующими в сыворотке растворимыми формами молекул МНС I класса, запускается апоптоз НК-клеток [163].

Подтверждением этого предположения может служить обнаружение при физиологической беременности значимой негативной корреляционной связи между количеством $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов и цитолитической активностью НК-клеток [148]. Также есть данные об ассоциации усиленной экспрессии CD8 на киллерных клетках с увеличением общего числа и цитотоксичности НК-клеток, с уменьшением числа НКТ-клеток с цитотоксической функцией и фенотипом $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD56^+$, и, как следствие, с неблагоприятными исходами в программах ВРТ, включая и неудачи имплантации, и ранние потери наступившей беременности [164, 165].

Исходя из изложенного, анализ различных субпопуляций с цитотоксической функцией в периферической крови при беременности может выявить наиболее значимые из них для пролонгирования беременности в I триместре, связанные с регуляцией формирования толерантности к отцовским антигенам плода.

Лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD4^+$ после антигенной стимуляции формируют несколько адаптивных субпопуляций с хелперной функцией, среди которых обнаружена и субпопуляция естественных регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) [166, 167]. Т-хелперные клетки первыми получают сигнал от антиген-презентирующих клеток, и от активации Т-хелперов зависят все формы

иммунного ответа. Субпопуляции (линии) Т-хелперов различаются экспрессией линейно-специфических транскрипционных факторов, и, следовательно, функцией в инициации и направлении развития иммунного ответа, а также в его регуляции. Основные линии - Th1/Th2/Th17/Tрег (таблица 1.1).

Таблица 1.1 - Основные линии Т-хелперных клеток [168, 169, 170]

Линия	Транскрипционный фактор/активатор транскрипции	Линейно-поляризующие факторы	Функция
Th1	Tbet /STAT4	ИЛ-2, ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- β	Защита против внутриклеточных патогенов и канцерогенеза
Th2	GATA-3 /STAT6	ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13	Участие в аллергических реакциях и защите против внеклеточных патогенов и канцерогенеза
Th17	ROR γ t /STAT3	ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-23, ТФР- β	Защита против бактерий, грибов и вирусов на слизистых оболочках, участие в генезе аутоиммунных заболеваний
Трег клетки с фенотипом CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	FOXP3/STAT5	ТФР- β	Контроль толерантности к собственным антигенам, регуляция ответа на аллоантигены и патогены

Было обнаружено, что линии дифференцировки Т-хелперных клеток Th1/Th2/Th17 и Трег ассоциированы друг с другом, каждая линия способна превращаться в другую под влиянием факторов микроокружения [170].

Условное направление дифференцировки линий Th1 и Th2 рассматривается как про- и противовоспалительное, соответственно. В репродукции не одно десятилетие обсуждалась важность соотношений Т-хелперных клеток с про- и противовоспалительным типом развития иммунного ответа для успешного пролонгирования беременности, и была сформулирована парадигма Th1/Th2-ответа, заключающаяся в необходимости смены провоспалительного типа иммунного реагирования на противовоспалительный уже на ранних сроках гестации. Преобладание в крови Т-хелперных клеток, продуцирующих цитокины Th1 типа, трактовалось как угроза беременности, и прерывание беременности в первом триместре ассоциировалось с нарушением цитокинового баланса Th1/Th2-типа [171]. В настоящее время признано, что важнейшие механизмы имплантации, плацентации, а также подготовки материнского организма к родам протекают на фоне провоспалительных реакций [172, 173], а направленность Th1/Th2 реакций зависит от срока гестации - на самых ранних стадиях беременности преобладают воспалительные реакции, сдвиг в сторону Th2-направленности наблюдается на более поздних сроках [174].

Более того, доминирование как Th1, так и Th2-типа ассоциировано с потерями беременности, и только адекватный баланс между ними с легким отклонением в сторону Th2 поддерживает развитие беременности [175, 18]. И в эксперименте на нокаутных мышях с дефицитом ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9 и ИЛ-13 (цитокинов Th2-типа) показано нормальное течение аллогенной беременности, что явилось доказательством отсутствия необходимости в доминировании Th2-типа иммунного реагирования для успешного пролонгирования беременности. По-видимому, для успешной имплантации необходим контролируемый тип Th1-реагирования, с регуляцией, не допускающей чрезмерного его доминирования [176]. Поэтому Th2-ответ не может быть признан как характерный для беременности [148].

В ранних исследованиях аргументом в пользу необходимости превалирования во время беременности иммунного реагирования Th2-типа служило утверждение о развитии состояния гестационной иммуносупрессии [18,

177]. Однако наличие состояния гестационной иммуносупрессии не могло объяснить, каким образом во время беременности мать, вынашивая ребенка, одновременно остается способной защитить себя и плод от инфекций. Последнее время все большее подтверждение находит представление об активном обоюдном участии материнской иммунной системы и плода в обеспечении развития беременности. В ранние сроки беременности инвазивный трофобласт индуцирует изменения в дифференцировке иммунокомпетентных клеток, которые способствуют поддержанию гестационных процессов на фоне формирования толерантности к аллоантигенам плода, при этом сохраняется способность материнского организма развивать иммунный ответ на поступающие извне антигены [14, 178]. В настоящее время устаревшая парадигма Th1/Th2-ответа заменяется на парадигму эффекторных Th1/Th2/Th17-клеток, которые контролируются Трег-клетками [179, 180, 181]. Согласно последней парадигме, в результате индуцированной беременностью дифференцировки иммунокомпетентных клеток должны появляться материнские регуляторные клетки Трег, которые распознают отцовские антигены плода, супрессируют материнские эффекторные Т-клетки и смягчают материнско-фетальный аллоиммунный конфликт, вызванный отцовскими антигенами [182]. Считается, что регуляция цитокиновой продукции Трег-клетками во время беременности более значима, чем баланс Th1/Th2 [183].

1.3.2. FOXP3⁺-Т-регуляторные клетки их значимость в формировании толерантности

Трег-клетки характеризуются экспрессией линейно-транскрипционного фактора FOXP3, который вовлекается как в их дифференцировку, так и в их супрессорную функцию, и они экспрессируют высокий уровень CD25 и низкий - CD127, поэтому в последнее время в периферической крови их идентифицируют по фенотипу CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}. Трег существуют как в

стадии наивных клеток, так и на стадии клеток памяти, *ex vivo* обладают супрессивной активностью, анергичны и не секретируют ИЛ-2 или ИФН- γ [168, 184].

Уникальность данной субпопуляции клеток определяется тем, что именно Трег с конститутивной экспрессией FOXP3 являются основными в формировании доминантной толерантности к собственным антигенам и в предотвращении аутореактивности к ним. Толерантность к собственным антигенам - активный процесс, имеющий центральную и периферическую компоненту. Центральная толерантность заключается в удалении аутореактивных клонов в течение развития Т-клеток в тимусе, тогда как периферическая толерантность достигается, главным образом, тремя механизмами: клональной делецией, анергией и супрессией. Из этих трех механизмов супрессия присуща только для генерации Трег-клеток, имеющих специфическое предназначение контроля ответа других Т-лимфоцитов. Субпопуляция Трег в периферической крови взрослых включает тимического происхождения натуральные (естественные) Трег, ответственные за поддержание толерантности к собственным антигенам, и индуцированные Трег, которые генерируются на периферии для ограничения чрезмерного иммунного ответа на микробные и тканевые антигены [185].

Высокая супрессивная активность Трег показана в многочисленных модельных экспериментах. В результате доказано, что Трег-клеточно-опосредованная супрессия необходима для предотвращения иммунной патологии на протяжении всей жизни нормальных экспериментальных животных, а экспрессия FOXP3 абсолютно необходима для осуществления супрессорной функции Трег, проявления их пролиферативного потенциала и метаболической приспособленности, для предотвращения дифференцировки предшественников Т-клеток в линейку эффекторных Т-клеток. Одной из основных характеристик Трег является их способность супрессировать или активировать другие Т-клетки контакт-зависимым способом [186].

Для развития антиген-специфических Трег необходима постоянная стимуляция антигеном Т-клеток, продуцирующих цитокины, но направленность

их дифференцировки зависит от цитокинового микроокружения [187]. Например, Трег, полученные как во время беременности, так и вне беременности, *in vitro* супрессируют активность ИФН- γ против отцовских и несвязанных с ними антигенов в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов, но только Трег, полученные во время беременности, супрессируют активность ИЛ-4 против отцовских антигенов и не влияют на его активность в отношении несвязанных антигенов. Это означает, что Трег участвуют в жесткой регуляции Th1 и Th2 ответа против фетальных аллоантигенов, но при этом Th2-ответ способен избегать контроля по отношению к несвязанным антигенам, что позволяет во время беременности контролировать реакции, обусловленные активацией ИФН- γ [188].

Анализ FOXP3-зависимой транскрипционной программы позволил сделать вывод, что около 10% FOXP3-зависимых генов напрямую регулируются FOXP3, причем FOXP3 действует и как транскрипционный активатор и как ингибитор, контролируя дифференцировку Трег, и постоянная экспрессия FOXP3 требуется для наследственного поддержания динамично устанавливаемой транскрипционной и функциональной программы Трег. Таким образом, Трег контролируют Th1, Th2, Th17-типы эффекторного иммунного ответа на собственные антигены и патогены посредством FOXP3-зависимых супрессорных программ [189].

Наибольшую дискуссию вызвало обнаружение сразу несколькими исследовательскими группами совместной дифференцировочной программы для субпопуляций FOXP3⁺-Трег и Th17-клеток [169, 190, 191, 192, 193, 194], несмотря на существование изоформ FOXP3, не способных связывать и репрессировать активность ROR γ t [189]. Дифференцировка Th17-клеток из наивных Трег преимущественно происходит в присутствии ИЛ-2 и линейно-специфических дифференцировочных факторов, и была идентифицирована субпопуляция Трег-памяти, которая коэкспрессировала ROR γ t и секретировала высокий уровень ИЛ-17 *ex vivo* [193]. Было обнаружено, что как FOXP3, так и ROR γ t экспрессируются одновременно в одиночных клетках в раннюю фазу дифференцировки CD4⁺T-

клеток и доказано, что FOXP3 дозозависимым способом уменьшает ROR γ t-опосредованную ИЛ-17А-промоторную активность, а поскольку уменьшенная экспрессия FOXP3, как оказалось, противоположно коррелирует с экспрессией ИЛ-17А и уровень ROR γ t не связан прямой корреляцией с экспрессией ИЛ-17А, то был сделан вывод о том, что ROR γ t присущ для индукции ИЛ-17А, но именно FOXP3 негативно регулирует экспрессию ИЛ-17А в индуцибельных Трег-клетках [190]. Подобная регуляция, как предполагается, осуществляется FOXP3 несколькими механизмами: FOXP3 может специфически ингибировать ROR γ t-опосредованную ИЛ-17А транскрипцию уменьшением связывания ROR γ t с промотором ИЛ-17А; подавлять функцию ROR γ t физическим взаимодействием с ROR γ t, образуя комплекс в области экзона 2 ДНК FOXP3; ингибировать NFAT-сигнальный путь и тем самым подавлять эффекторные функции Th-клеток; подавлять NF-каппа В транскрипционную активность [195, 196]. Вероятнее всего, механизмы транскрипционной репрессорной функции FOXP3 могут варьировать в соответствии с теми транскрипционными факторами, с которыми FOXP3 взаимодействует.

Таким образом, уровень экспрессии ROR γ t - недостаточное условие для того, чтобы линии Т-клеток из тимуса мышей получили способность продуцировать ИЛ-17. Для развития Th17 клеток важен баланс между Th17 линейно-специфическим дифференцировочным фактором ROR γ t, экспрессия которого обязательна для секреции ИЛ-17, и FOXP3 - специфическим транскрипционным фактором Трег. Взаимоотношения между ними трактуют как антагонистичные [193], так как в ряде модельных экспериментах продемонстрирован взаимоисключающий характер дифференцировки в направлении Th17-клеток и Трег-клеток [186]. Однако, если исходить из обнаружения взаимного перекрытия хроматин-связанных сайтов ROR γ t и FOXP3, точнее было бы говорить об их совместном транскрипционном влиянии [197].

Линия Th17 считается мостом между врожденным и адаптивным иммунитетом, обеспечивающим как сильный антимикробный защитный

воспалительный ответ, так и воспаление патологического характера, поскольку одной из ключевых функций ИЛ-17 является участие в инициации трафика нейтрофилов и их дифференцировки из гемопоэтических прогениторных клеток [198]. В связи с этим было высказано предположение, что некоторые FOXP3⁺Трег-клетки, продуцирующие ИЛ-17, наряду с контролем воспаления и аутоиммунитета в то же самое время могут стимулировать противомикробную врожденную иммунную защиту и способны проявлять провоспалительную функцию дополнительно к их хорошо-распознаваемой иммунной супрессивной функции [194].

Линии Трег и Th17-клеток обе требуют для дифференцировки TФР-β. Обработка клеток TФР-β способствует индукции как FOXP3, так и к RORγt, но и приводит исключительно к дифференцировке в направлении Трег клеток. RORγt и FOXP3 коэкспрессируются в наивных CD4⁺T-клетках, и *in vitro* TФР-β-индуцированный FOXP3 ингибирует RORγt функцию, но TФР-β не способен запускать дифференцировку Th17-клеток без провоспалительных цитокинов ИЛ-6 или ИЛ-21, тогда как дифференцировка в направлении Трег идет, главным образом, под влиянием TФР-β в присутствии антигена и в отсутствие провоспалительных ИЛ-6 и ИЛ-1β [170, 187, 199]. Установлено, что TФР-β совместно с провоспалительными цитокинами запускает дифференцировку Трег дозозависимым способом, и в малых концентрациях вместе с ИЛ-6 и ИЛ-21 он обеспечивает экспрессию ИЛ-23, что облегчает дифференцировку в направлении Th17-клеток, а в высоких дозах угнетает экспрессию ИЛ-23, направляя дифференцировку в сторону Трег-клеток [200].

Следовательно, *in vivo* важно равновесие этих двух субпопуляций (Трег и Th17), регулирующее баланс между воспалением и толерантностью как в физиологических условиях, так и при различных патологических состояниях, особенно на слизистых оболочках, поскольку FOXP3⁺IL-17⁺-клетки генерируются на слизистых во время воспаления, и тонкий баланс между RORγt и FOXP3⁺ является ключевым для иммунного гомеостаза [168, 201]. Есть точка зрения, что если Th17-клетки слизистых защищают организм хозяина от инфекции, то Трег-

клетки контролируют иммунный ответ и интенсивность воспаления, запускаемые резидентной микрофлорой [200]. О том, что сама комменсальная микробиота действует как ключевой фактор в уравнивании иммунного ответа на поверхности слизистых и регулирует Th2-тип иммунного ответа через индукцию $ROR\gamma^+$ Трег и линии Th17-клеток, было показано в эксперименте на моделях $ROR\gamma^+$ -дефицитных мышей [202]. $ROR\gamma^+$ -дефицитные мыши экспрессируют высокий уровень IgE, что является отличительным признаком Th2-типа иммунного ответа, и подобный уровень был обнаружен у стерильных мышей. Массивная экспансия Th17-клеток показана и у ИЛ-10-дефицитных мышей. $ROR\gamma^+$ Трег регулируют генерацию Th2-клеток через экспрессию высокого уровня интерферон-регулирующего фактора 4, который наделяет Трег способностью супрессировать Th2-ответ и через регуляцию коактиваторной функции дендритных клеток. Таким образом, комменсальная микробиота участвует в контроле воспаления на территории слизистых, контролируя дифференцировку специализированных Трег клеток, которые предотвращают нарушение воспалительного ответа и на собственные стимулы и на стимулы окружающей среды [203].

Это важное заключение иллюстрируется многочисленными исследованиями роли Трег в поддержании толерантности в барьерных тканях, например, оральной толерантности на пищевые аллергены, толерантности на слизистых верхних дыхательных путей, тонкого и толстого кишечника, урогенитального тракта. Как Трег, так и Th17-клетки слизистых оболочек, со своим взаимным регулированием и балансом представляют особый механизм поддержания иммунитета и воспалительного гомеостаза, опосредуя симбиоз организма-хозяина и микробиоты за счет контроля разнообразия и равновесия бактериального сообщества, необходимого для поддержания гомеостаза [204, 205]. Местные и системные эффекты Трег, которые генерируются после активации дендритных клеток слизистой в условиях уникального микроокружения дренирующих лимфатических узлов, предотвращают потенциально опасные реакции гиперчувствительности на вредные антигены, происходящие извне [206, 207,

208.]. Трег-клетки являются центральными в организации пластичности дифференцировки линейки Т-лимфоцитов и в механизмах адаптации специализированных тканей, связанных с достижением баланса между эффективностью защитного иммунного ответа и сохранением барьерной функции, между иммунной активацией и иммунной толерантностью [209, 210, 211]. Репродуктивный тракт также рассматривается как индуктивный для формирования иммунной толерантности, но в отличие от слизистых верхних дыхательных путей и слизистой желудочно-кишечного тракта индукция толерантности в репродуктивном тракте регулируется гормонами (гормонально-зависима) [212, 213]. Распознавание отцовских антигенов плода и формирование специфических Трег в женском репродуктивном тракте начинается через представление их в семенной жидкости [214, 215].

Все изложенное свидетельствует о значимости Трег для сохранности целостности слизистых как барьерных тканей, что является залогом сохранности организма как целого, и об их роли в функционировании механизмов, ограничивающих развитие повреждающего иммунного ответа на территории слизистых. Именно симбиоз клеток слизистых оболочек с различными комменсальными микроорганизмами и развитие плацентарности у млекопитающих является подтверждением физиологической значимости механизмов формирования периферической иммунной толерантности, которая строится на специфическом ограничении ответа на антигены плода при сохранении возможности развития иммунного ответа на другие, например, инфекционные антигены [216].

Во время беременности экспансия Трег, обеспеченная, как показано, хемокинами и гормонами беременности, наблюдается уже с ранних сроков и является необходимым условием успешного ее развития. На численность Трег-клеток у овариэктомизированных мышей влияет только сочетание эстрогена и прогестерона и было показано, что фактор ранней беременности и белки плаценты индуцируют дифференцировку Трег и увеличивают их иммуносупрессивную активность, что является важным в контроле иммунного

ответа при беременности [58, 62, 217]. Специфичный для беременности β 1-гликопротеин, один из белков, секретируемых плацентой, и представленный в материнской микроциркуляции в течение всей беременности, обладает способностью *in vitro* активировать ТФР- β 1 и ТФР- β 2, с чем связывают его противовоспалительные свойства и участие в формировании толерантности к антигенам плода [218].

Адоптивный перенос самкам мышей с генетически детерминированными спонтанными абортами Трег-клеток из тимуса и селезенки от самок с нормальной беременностью позволяет предотвратить потерю беременности у модельных животных, а при переносе Трег от небеременных мышей такого эффекта не получали, что все вместе является подтверждением гипотезы о формировании в результате распознавания материнскими Т-клетками антигенов плода антиген-специфической толерантности [18, 219, 220]. Было показано, что, условно говоря, первая беременность стимулирует накопление материнских Трег памяти, специфичных к аллоантигенам плода, которые после родоразрешения персистируют в ее организме, поддерживая толерантность к ним, что позволяет быстро накапливаться специфичным Трег во время следующей (повторной) беременности [221].

Обнаружена динамика Трег-клеток в течение беременности, заключающаяся в максимальном их содержании в периферической крови во втором триместре и в снижении к родам, а после родов не отличается от нормы вне беременности [22]. При этом у женщин с преждевременными родами содержание Трег было значительно меньше, чем на том же гестационном сроке в периферической крови женщин с нормально протекающей беременностью, такая же закономерность обнаружена и у женщин с ПЭ [19, 222, 223].

У пациенток с привычными потерями беременности ранних сроков в периферической крови и децидуальной оболочке матки обнаружено преимущественное количество Th17-клеток, продуцирующих ИЛ-17 и ИЛ-23, и превалирование Th17-клеток над Трег-клетками [11]. Сниженное содержание Трег ассоциируют с иммунологическими причинами ранних потерь беременности

[224, 225, 226]. Исследования о взаимоотношениях Трег и Th17-клеток при осложнениях беременности немногочисленны.

1.3.3. Экспрессия CD69 в оценке активационного состояния иммунокомпетентных клеток

Поверхностный фенотип лимфоцитов позволяет не только определить их принадлежность к типу субпопуляции, но и оценить их функциональное состояние, например, дифференцировки, активации, пролиферации, апоптоза. Оценка состояния активации является очень важным в исследованиях формирования толерантности при беременности. Нередко в эксперименте для оценки способности лимфоидных клеток отвечать на активационный стимул используют митогены - поликлональные активаторы, которые вызывают в Т- и В-лимфоцитах каскад изменений, сходных с изменениями при действии специфических антигенов, но не вызывают дальнейшей дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Продукция растворимых факторов и цитокинов, стимулированная экспериментальным активационным стимулом *in vitro*, позволяет косвенно судить о преимущественной направленности характера иммунного ответа после активации *in vivo*.

С большим интересом в качестве маркера активации *in vivo* и *in vitro* исследуется экспрессия CD69 - мембранного гликопротеина с молекулярной массой 22,6 кДа, относящегося к семейству С-лектинов, экспрессия которого индуцируется на клетках большинства типов гемопоэтических линий, включая Т-, В-, НК-клетки, конститутивно он экспрессируется у человека на моноцитах, тромбоцитах, клетках Лангерганса [227]. Его экспрессия регистрируется уже через час после активационного стимула, поэтому он считается ранним маркером активации, и его достаточно простую, надежную и удобную оценку методом проточной цитофлуорометрии предлагают использовать для характеристики функционального состояния лимфоцитов после активационного стимула вместо

трудоемкого метода по включению в синтезируемую ДНК радиоактивно меченного H^3 -тимидина [25, 24, 228, 229, 230, 231]. Устойчивое нарастание экспрессии CD69 отмечается в течение 72-х часов, что позволило рекомендовать оценку экспрессии CD69 для характеристики пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации [232, 233, 234, 235, 236], но для характеристики пролиферативной активности лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов - нет, поскольку динамика экспрессии CD69 и скорость поглощения H^3 -тимидина в сроке более 72-х часов уже не коррелировали [237].

Обнаружено снижение экспрессии CD69 после активации *in vivo* с увеличением возраста экспериментальных животных [238, 239].

Оценку экспрессии методом проточной цитофлуориметрии раннего активационного маркера Т-лимфоцитов CD69 покоящимися лимфоцитами и лимфоцитами, стимулированными *in vitro* митогенами, используют в диагностике различных воспалительных, инфекционных, аутоиммунных, онкологических, гинекологических заболеваний, а также в диагностике эозинофилии, инсулинозависимого диабета, рассеянного склероза [240, 241, 242, 243, 244, 245, 246], сепсиса и синдрома системного воспалительного ответа неинфекционной этиологии [247], при хроническом воспалении и иммунодефицитных состояниях [248, 249], при контроле лечения онкологических и воспалительных заболеваний [250, 251, 252, 253], в прогнозировании исходов трансплантации органов [254, 255, 256].

Такое широкое использование оценки экспрессии CD69 демонстрирует важность этой молекулы в контроле иммунной функции в целом, и данное утверждение подкрепляется многочисленными публикациями последнего десятилетия. Было показано, что инкубация НК-клеток с линией К-562 вызывала увеличение экспрессии CD69 на поверхности этих клеток и строго коррелировала с их размером и цитотоксичностью *in vitro* [257, 258]. И хотя считалось, что в отличие от других лимфоцитов активация НК-клеток не связана с пролиферацией, но с переходом в состояние выполнения цитотоксической функции [88], была обнаружена связь активации НК-клеток с их пролиферацией и увеличенной при

этом экспрессией CD69 в течение 48 и 72 часов после активационного сигнала [259]. Трег-клетки также отвечают на активацию митогенами в РБТЛ увеличением экспрессии CD69 с последующим изменением их функционального состояния [233].

В одной из ранних гипотез, сформированных по результатам экспериментов с использованием линий CD69-дефицитных мышей, CD69 предлагалось рассматривать как регуляторную молекулу развития воспалительных процессов. Экспрессия CD69 индуцируется активационным сигналом через T-клеточный рецептор (ТКР), и неполная активация может приводить к анергии T-эффекторных клеток, а также через нарушение продукции ТФР-β и к дисфункции Трег. В случае полноценной активации индуцированная экспрессия CD69 коррелирует с пролиферацией T-лимфоцитов, их дифференцировкой, высокой продукцией ТФР-β, снижением интенсивности воспалительных процессов и формированием толерогенных дендритных клеток [248].

В более поздних исследованиях с использованием таких же экспериментальных моделей и моноклональных антител к CD69 было показано, что экспрессия CD69 индуцирует приток ионов кальция в клетку, что, в свою очередь, активирует сигнальные пути ERK для индукции генов ИЛ-2 и ИФН-γ и T-клеточной пролиферации, а своей цитоплазматической частью CD69 взаимодействует с белками сигнальных путей Jak3/Stat5, которые регулируют функцию RORγt, транскрипционного фактора Th17-клеток, направляя дифференцировку T-хелперов в направлении линии Th17-клеток [260, 261]. Есть данные, что STAT5 играет ключевую роль в индукции экспрессии FOXP3, поскольку, с одной стороны, STAT5-связанные сайты нашли в промоторном регионе интрона FOXP3-гена и, с другой, у STAT5-дефицитных мышей FOXP3⁺Трег-клетки отсутствовали [189]. Следовательно, CD69 могут напрямую участвовать в балансе Th17/Трег-клеток. С нарушением этого баланса связывают развитие острых форм контактных дерматитов, аутоиммунного миокардита, астмы у мышей с генетическим отсутствием CD69 [17, 241, 252, 262].

Все вышеизложенное позволило сделать вывод о том, что CD69 является

естественным модулятором программ Т-клеточной дифференцировки при иммунных воспалительных процессах. Этим определяется интерес к исследованию экспрессии CD69 на лимфоцитах периферической крови беременных, поскольку адекватный уровень воспалительных процессов и в ранние сроки беременности при имплантации, и в процессах инвазии трофобласта, и в подготовке организма к родам признается необходимым для нормальной беременности [173]. Кроме того, неадекватное распознавание фетальных антигенов рассматривается как одна из важнейших иммунных причин прерывания беременности в ранние сроки гестации [263, 264], есть данные о нарушениях активационного статуса лимфоцитов периферической крови женщин с ПВ, и у беременных при ПЭ [265, 266, 267, 268], в том числе и в ответе на митогенную стимуляцию *in vitro* [269], показана роль IL-2/STAT5 сигнального пути в поддержании экспансии Трег-клеток при успешной беременности [270], обнаружено, что ПИФ ингибирует цитотоксичность циркулирующих НК-клеток беременных и снижает экспрессию CD69 [122].

Все вышеизложенное определяет актуальность исследований активационного статуса лимфоцитов в процессах формирования толерантности при беременности.

1.4. Идиопатический привычный выкидыш как акушерская патология, при которой иммунные нарушения считаются ведущими этиопатогенетическими факторами, и его корригирующая иммуноцитотерапия

Сбалансированные взаимоотношения между иммунной системой матери и фетальными клетками способствуют нормальному развитию плода вследствие специфической морфологической перестройки материнского организма и адекватных функциональных изменений в иммунной системе беременной, которые индуцируют толерантность к антигенам плода [41, 60]. Неосложненная

беременность, завершившаяся рождением здорового ребенка на доношенном сроке, отражает адекватное формирование толерантности к антигенам плода во время беременности. Клиническим проявлением дисбаланса иммунных реакций считается самопроизвольное прерывание беременности, прежде всего, в ранние сроки беременности (до 7 недель) и в первом триместре гестации.

Привычный выкидыш, согласно определению ВОЗ, устанавливается в случае произошедших подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности на сроке гестации до 22 недель (код N96 по МКБ-10). При исключении среди причин, приводящих к такому осложнению, генетических, анатомических, эндокринных, инфекционно-воспалительных, тромбофилических, аутоиммунных нарушений диагноз формулируется, как ПВ неясной этиологии, или идиопатический привычный выкидыш (ИПВ). По данным различных авторов, в 5% - 20% случаев причины прерываний не могут быть установлены современными диагностическими ресурсами [74, 271].

Поскольку до настоящего времени беременность рассматривается с точки зрения гистосовместимости материнского организма и плода, то причины отторжения могут быть связаны с процессами распознавания материнской иммунной системой сигналов, исходящих от развивающегося плода, то есть, с аллоиммунными причинами. И, следовательно, механизмы отторжения плода могут быть аналогичны реакциям острого отторжения чужеродного трансплантата, то есть, аллоиммунным реакциям адаптивного иммунитета [18]. Поэтому поиски маркеров формирования толерантности к антигенам плода отцовского происхождения и маркеров прогнозирования самопроизвольного выкидыша вели среди показателей, характеризующих эффективность реакций адаптивного иммунитета в трансплантационной иммунологии [3].

ИПВ - 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 [272].

Наиболее дискуссионным видом иммунокорректирующей терапии является иммунизация пациенток с ИПВ аллогенными лимфоцитами партнера (иммуноцитотерапия, ИЦТ).

История исследований эффективности и механизма действия клеточной иммунотерапии насчитывает более 30-ти лет. Первые попытки применения были связаны с пересадкой кожного лоскута партнера женщине с ПВ, продемонстрировавшие перспективность метода повышения чувствительности иммунной системы женщин с данной акушерской патологией к антигенам партнера, поскольку есть данные о том, что даже в 90% случаев беременность была пролонгирована до доношенного срока [273, 274, 275, 276].

Обнаружение трансплантационных антигенов на лимфоцитах периферической крови явилось обоснованием следующего методического шага в иммунотерапии женщин с ПВ, а именно: иммунизации женщин лимфоцитами, выделенными из периферической крови партнера, сначала, как предполагалось, для снижения ответа материнской иммунной системы на аллоантигены плода, а позже высказано предположение, что для усиления материнского специфического ответа [277, 278, 279].

Положение о слабом иммунном материнском ответе на аллоантигены отца в случае совпадений супругов по локусам системы HLA способствовало проведению исследований, связанных с оценкой эффективности иммунизации женщин лимфоцитами доноров и даже смесью лимфоцитов нескольких доноров, а также фрагментами мембран трофобластных клеток [284].

Одна из самых интересных работ по оценке эффективности введения аллогенных клеток для лечения привычного невынашивания выполнена в США в 2004г. [46, 280]. В работе оценивали количество рождений живых детей после иммунизации женщин клетками партнеров, доноров, аутологичными клетками и в группе плацебо - после введения физиологического раствора. Оказалось, что

наибольший клинический эффект наблюдался в группе женщин, иммунизированных лимфоцитами партнеров (90%).

Существующая в настоящее время практика ИЦТ ориентирована на введение лимфоцитов полового партнера, что имеет ряд преимуществ, связанных, во-первых, с показанной эффективностью введения лимфоцитов партнера [46], во-вторых с отсутствием необходимости карантинизации крови, как в случае использования клеток доноров, что требует хранения образцов в течение не менее чем 6 месяцев в связи с высоким риском инфицирования женщин вирусами гепатита и иммунодефицита человека [281], и, в-третьих, с упрощением соблюдения формальных требований к проведению лечения (с получением информированного согласия и процедурой обследования партнера в качестве донора) и с отсутствием необходимости формирования системы отбора, обследования и поддержания группы доноров.

Обобщение результатов оценки эффективности большого числа проведенных клинических исследований за период с 1986 по 2010 гг. представлено в мета-анализах 2006, 2011 и 2014гг. [282, 283, 284]. Вывод сделан однозначный, а именно: статистически значимого улучшения в исходах беременности женщин с ПВ после лечения с применением ИЦТ и группой плацебо не обнаружено. Кроме того, приводится ссылка на решение в США проводить клинические исследования клеточной иммунотерапии только в рамках научных программ.

Тем не менее, вывод не воспринимается как безусловный по нескольким причинам. Даже в тех исследованиях, которые рассмотрены в мета-анализах, 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 одновременно для одной пациентки. Также выборки пациенток не были однородными, включались пациентки и с первичным, и с вторичным, и с третичным выкидышем, в качестве исходов оценивалось только количество детей, рожденных живыми. И, наконец, протоколы подготовки клеток для введения тоже были разными.

Например, резко отличались данные, полученные в исследовании Ober C. [285], в котором сообщено о негативном влиянии цитотерапии на исходы наступившей беременности, и в исследовании Pandey M.K. et al [46] сообщившем о резкоположительном ее влиянии [46, 285]. Оказалось, что в этих двух группах лимфоциты для введения готовили методически различно. Если в группе Ober C. клетки до процедуры хранили в течение ночи при 4°C, то в группе Pandey M.K. лимфоциты перед процедурой нагревали до 37°C. Это различие очень существенно для реализации изменений, индуцируемых иммунизацией [286]. Серия исследований, проведенных для выяснения влияния на лимфоциты разных условий культивирования, показала что лимфоциты, хранящиеся при разных температурах, имеют разный уровень экспрессии CD200 [287]. Согласно современным представлениям, толерогенность CD200 обусловлена взаимодействием с рецепторами дендритных клеток, в результате которого в последних индуцируется секреция индоламиндиоксигеназы, и они приобретают способность стимулировать генерацию T-регуляторных клеток и, соответственно, индуцировать формирование периферической толерантности, с чем связывают эффективность ИЦТ в лечении ПВ в настоящее время.

При низкой температуре экспрессия CD200 значительно ниже, а при нагревании - значительно выше по сравнению со свежесыведенными лимфоцитами. И автором показано, что количество CD200-позитивных клеток среди введенных лимфоцитов было существенно выше в группе женщин, беременность которых закончилась родами, по сравнению с количеством у женщин, беременность которых закончилась выкидышем [288].

Таким образом, отсутствие общепринятых протоколов подготовки клеток для иммунизации и процедуры проведения иммунизации существенно затрудняют и оценку эффективности ИЦТ и не способствует развитию представлений о механизмах ее действия [3, 74].

Еще одной из причин продолжения исследований эффективности клеточной иммунотерапии в лечении ПВ является использование различных маркеров для оценки ее иммуномодулирующего действия, что связано с необходимостью

подтверждения различных гипотез нарушения формирования толерантности в случае иммунного генеза ИПВ.

Как уже упоминалось (параграф 1.1), в ранние периоды развития трансплантологии формирование толерантности связывали с феноменом антиген-специфической иммуносупрессии. В рамках данной гипотезы, во время беременности материнская иммунная система находится в состоянии иммуносупрессии, и полуаллогенный плод растет в организме матери благодаря, в частности, протективной защите блокирующих антител, препятствующих осуществлению цитотоксической функции иммунокомпетентными клетками матери в отношении чужеродных антигенов плода, поэтому идиопатические ранние потери беременности связывали с недостаточным образованием в организме матери блокирующих антител, особенно в случае совпадения супругов по антигенам системы гистосовместимости. С этой точки зрения механизм иммунокоррекции ранних выкидышей при проведении ИЦТ заключался в снижении активности материнской иммунной системы, то есть в увеличении состояния ее супрессии и в появлении блокирующих антител в женской сыворотке. Более чем 20-летний опыт переливания крови донора реципиенту до пересадки органа подтвердил развитие состояния иммуносупрессии у реципиентов, что показано через изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, их активационного состояния, снижения активности НК-клеток, изменения антиген-презентирующей функции фагоцитов и сроков выживания трансплантата [289].

Немало работ было посвящено количественной оценке блокирующих антител в смешанной культуре лимфоцитов партнеров в парах с ПВ до и после проведения лечения пациенток с ПВ с помощью введения аллогенных лимфоцитов, как до беременности, так и в период ранней беременности [46, 47, 54, 290, 291]. Однако одними из главных препятствий в понимании динамики выработки блокирующих антител и в оценке значимости их для исходов беременности, помимо гетерогенности выборок пациентов, явились гетерогенность схем определения блокирующих антител и применение различных

уравнений для расчета блокирующего эффекта [74, 3, 292].

Сообщения о появлении антиотцовских антилейкоцитарных антител у пациенток с ПВ также разрозненны и противоречивы. У женщин с физиологическим течением беременности, в целом, регистрируется низкий уровень антител, но они могут быть обнаружены, начиная с 28 недели гестации [55]. Есть данные о том, что в первом триместре беременности антитела зарегистрированы у 5% женщин с нормально протекающей беременностью и у 10% женщин с ПВ [37]. Установлено, что АОАТ определяются у многорожавших женщин [293]. Неоднозначны мнения и о появлении АОАТ у пациенток с ПВ после проведения ИЦТ [40, 72]. В мета-анализе 2013 года в 17 отобранных исследованиях обнаружен высокий уровень статистической и клинической гетерогенности и не найдено значимого влияния антител к HLA I и II классов на исходы беременности [40]. Возможно, что не только изменение структуры АОАТ во время беременности может быть причиной неоднозначности их определения (в связи с появлением во время беременности ассиметричных антител), но также и разнообразие методов, используемых для их выявления - иммуноферментного, модификаций цитотоксического теста, методов проточной цитометрии и с отсутствием доказательств, являются ли АОАТ антиHLA-антителами [7, 37, 55, 82, 294].

Также иммунотерапия рассматривалась как способ снижения провоспалительного состояния женской иммунной системы, способствующего отторжению плода, на противовоспалительное, то есть, как способ изменения баланса иммунных реакций Th1/Th2 в сторону Th2-реакций. Значительное количество работ было посвящено анализу соотношения Т-клеток, продуцирующих цитокины Th1 и Th2-типа, у пациенток с ПВ, а также анализу субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и особенно оценке количества и функционального состояния НК-клеток для характеристики типа иммунного реагирования у пациенток ПВ, в том числе на фоне иммунизации партнерскими лимфоцитами.

Так, сообщается, что у пациенток с ПВ вне беременности выше количество

NK-клеток в периферической крови, выше их цитотоксичность, выше количество $\text{TNF-}\alpha^+$ Th1-клеток и выше соотношение $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-10}$ Th1/Th2-продуцирующих клеток, что трактуется как провоспалительное состояние иммунной системы [148, 295], что нарушен баланс между NK-клетками и Т-лимфоцитами [148, 296]. Показано, что у женщин с ПВ отклонение баланса между сигналами для активирующих и ингибиторных рецепторов NK-клеток в направлении состояния активации вносит вклад в механизм развития ранних потерь беременности [297]. ПВ признается заболеванием, связанным с воспалением и коагулопатическими нарушениями [298]. Системный и локальный воспалительный ответ во время беременности может быть индуцирован и инфекционными агентами через активацию Toll-подобных рецепторов, и самими фетальными клетками в качестве дегрифа, и агонистами гонадотропин-рилизинг гормона, что сопровождается и активацией NK- и Т-клеток, и нарушениями кровоснабжения плаценты и, следовательно, осложнениями течения беременности [299].

Показано, что в супернатантах культур мононуклеарных клеток женщин с ПВ, сокультивируемых с партнерскими мононуклеарными клетками, выше уровень ФНО- α , чем в контрольных пробах. После проведения иммунотерапии партнерскими лимфоцитами в таких же образцах оказался значимо ниже уровень ФНО- α и ИФН- γ в случае культур пациенток с благополучной завершившейся беременностью, что авторами рассматривалось как благоприятное влияние иммунотерапии на баланс иммунных реакций [300, 301]. С другой стороны, не обнаружено различий в соотношении концентраций цитокинов Th1/Th2 типа у пациентов с ПВ с доношенной и прервавшейся после иммунизации партнерскими лимфоцитами беременностью и не обнаружено корреляции с пролонгированием беременности и составом цитокинов периферической крови [302].

Долгое время критерием назначения иммунотерапии признавалось высокое содержание NK-клеток в периферической крови женщин с ПВ и, соответственно, одним из критериев эффективности иммунизации признавалось их снижение [162, 303, 304]. Однако было показано, что число и активность маточных NK-клеток у женщин со спонтанным абортом в случае плода с нормальным кариотипом даже

выше, чем у женщин со спонтанным абортom в случае плода с аномальным кариотипом [305]. В систематическом обзоре 2011 года приведен анализ 783 публикаций с целью прояснить, действительно ли высокий уровень и активность НК-клеток может предсказывать вероятность потери следующей беременности у пациенток с ПВ после иммунотерапии или раннюю потерю беременности у пациенток с бесплодием в программах ВРТ. [306]. К сожалению, однозначного вывода в результате анализа сделать оказалось невозможным и была высказана рекомендация о необходимости дальнейших исследований.

Оценка изменений субпопуляционного состава лимфоцитов и их активационного статуса у пациенток с ПВ до и после аллоиммунизации также проводилась неоднократно, но до настоящего времени нет однозначного мнения об изменениях в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови женщин с ПВ после аллоиммунизации [307, 308, 309].

С открытием значимости для формирования антиген-специфической толерантности Трег-клеток высказано мнение, что иммунотерапия ПВ должна иметь целью не супрессию материнской иммунной системы, а, скорее, увеличение толерантности, что обусловлено данными об увеличении числа периферических Трег во время беременности и об отсутствии такой динамики у женщин с ПВ [2]. Поэтому актуальны исследования Трег и их взаимоотношений с клетками Th17-линии у женщин с ПВ на фоне клеточной иммунотерапии вне и во время беременности [310]. Показано как отсутствие изменений в содержании Т-регуляторных клеток [308], так и повышение их содержания при аллоиммунизации [311]. Кроме того, есть данные о том, что аллоиммунизация приводит к снижению соотношения Th17/Трег в периферической крови женщин с ПВ, включая снижение соотношения ROR γ t к FOXP3 в сторону увеличения FOXP3, что благоприятно, как считается, для поддержания развития гестационных процессов [312, 313].

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что и на настоящий момент исследование как субпопуляционного состава клеток периферической крови, так и их активационного состояния, выражающегося не только в экспрессии

поверхностных активационных молекул, но и в секреции цитокинов различных типов, в том числе и после стимуляции *in vitro*, является актуальным и для понимания механизмов формирования толерантности к антигенам плода отцовского происхождения, и для оценки возможности использования их в клинической практике как маркеров течения беременности и прогнозирования ее исходов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Отбор для исследования пациенток с ИПВ

Работа проведена в соответствии с правилами проведения научных клинических исследований согласно ГОСТ Р52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» и одобрена Комитетом по этике ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (протокол №13 от 6.12.2013 г.).

В соответствии с поставленными задачами в процессе работы было проведено клиничко-лабораторное обследование 725 супружеских пар, которые обратились в научно - поликлиническое отделение Центра за период 2007-2016 годы по поводу ПВ первого триместра. Обследование проводилось по схеме, разработанной и принятой в отделении профилактики и терапии невынашивания беременности Центра для пар с ПВ, которое включало:

- подробный сбор анамнеза (количество, характер, сроки прерывания предыдущих беременностей; становление менструальной функции; наследственность, условия жизни, наличие профессиональных вредностей, учет соматических, аутоиммунных заболеваний),

- объективный осмотр (расчет массо-ростового индекса, определение типа телосложения, характера оволосения),

- гинекологический осмотр (определение состояния слизистых наружных половых органов, влагалища, шейки матки, положения, величины матки, состояния придатков)

- кариотипирование супругов,

- HLA-типирование,

- исследование полиморфизмов генов ферментов фолатного цикла и тромбофилий,

- исключение анатомических причин ПВ (УЗИ органов малого таза в I и во II фазы цикла, гистероскопия по показаниям, соногистерография,

гистеросальпингография),

- диагностика антифосфолипидного синдрома (проба на волчаночный антикоагулянт), антитела к β 2-гликопротеину-1, аннексину, протромбину, фосфатидилсерину и кардиолипину,

- гормональное обследование,

- гемостазиологическое обследование,

- бактериологическое обследование и количественная ПЦР диагностика, («фемофлор 16»), микроскопия вагинального отделяемого,

- исследование спермограммы партнера.

По результатам проведенного обследования было установлено, что причиной ПВ были в 26 (3,6%) случаях сбалансированные хромосомные перестройки родителей, в 46 (6,3%) случаях - тромбофилии высокого риска, в 104 (14,4%) случаях - анатомические факторы (пороки развития матки, внутриматочные синехии, субмукозные узлы миомы матки, полипы эндометрия). Гормональные нарушения (гиперпролактинемия, синдром поликистозных яичников, недостаточность лютеиновой фазы, сахарный диабет, гипотиреоз) наблюдались в 145 (20,0%) случаях, антифосфолипидный синдром лабораторно диагностирован в 143 (19,7%) случаях, из них в 28 (3,8%) - вторичный АФС на фоне системных заболеваний соединительной ткани. У 34 пациенток (4,7%) диагностирована тяжелая экстрагенитальная патология (хронические заболевания печени, почек, артериальная гипертензия), в 46 наблюдениях (6,3%) диагностированы воспалительные заболевания органов малого таза - сальпингит, сактосальпингс, оофорит, tuboовариальное образование, потребовавшие как консервативного, так и хирургического лечения, в 22 случаях (3,1%) наблюдались отклонения в показателях спермограммы у партнеров (тератозооспермия, олигозооспермия, астенозооспермия и их сочетания).

После исключения вышеуказанных причин в группу исследования отобраны 196 супружеские пары с ПВ, у которых генез потерь беременности оставался неясным и, по-видимому, был обусловлен аллоиммунными причинами. Таким образом, супружеские пары с аллоиммунным генезом ПВ составили 27,0%

от всех пар с привычными потерями беременностей.

Критериями включения в основную группу исследования явились: подписание формы информированного согласия на участие в исследовании, наличие не менее 2 выкидышей ранних сроков от одного и того же партнера, возраст женщины от 20 до 40 лет, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия у партнера, самопроизвольное наступление беременностей, отсутствие анатомических, генетически обусловленных, аутоиммунных, гормональных, гемостазиологических нарушений, тяжелых экстрагенитальных заболеваний.

В связи с наличием ультразвуковых признаков хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (хронический эндометрит) и выявленными изменениями во влагалищном биоценозе (хронический цервицит, вульвовагинит, хламидийная инфекция, выраженный дисбиоз влагалища) 40 (57,1%) супружеским парам с ПВ была проведена противовоспалительная терапия. Препаратами выбора для лечения хронических воспалительных заболеваний органов малого таза были препараты с антианаэробной активностью (метронидазол, орнидазол) и при наличии показаний - антибактериальные препараты широкого спектра действия (фторхинолоны).

После проведения противовоспалительной терапии взяты контрольные анализы, при нормальных показателях через 2-3 месяца после проведенной терапии пары направляли на процедуру аллоиммунизации. Всего 65 пациенток выбыли из исследований по различным причинам, не связанным с критериями включения/исключения, и таким образом, основную группу составила 131 женщина с ИПВ.

2.2. Характеристика процедуры аллоиммунизации

В предгестационной подготовке и в первом триместре наступившей беременности пациенткам с ИПВ была проведена ИЦТ. Методика проведения

ИЦТ утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №19 от 25 декабря 2012г.).

Процедура ИЦТ - иммунизация женщин с ИПВ в анамнезе аллогенными клетками партнеров. До проведения настоящего исследования пациентки подобную процедуру для лечения ПВ не получали.

Партнеры были обследованы согласно порядку медицинского обследования донора крови и ее компонентов. Порядок обследования регламентируется приказами Министерства Здравоохранения Российской Федерации №364 от 14.09.2001 г. (в ред. Приказа Минздравсоцразвития РФ от 16.04.2008 №175н) об утверждении порядка медицинского обследования доноров крови и ее компонентов; приказом МЗ РФ от 2 апреля 2013 г. № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и/ или ее компонентов» и Федерального закона Российской Федерации от 20 июля 2012 г. № 125-ФЗ "О донорстве крови и ее компонентов «Общий порядок медицинского обследования». Согласно приказам в конце процедуры взятия крови отбираются образцы крови для проведения исследования на наличие суммарных антител к возбудителю сифилиса, вирусного гепатита С, ВИЧ1/2 и поверхностного антигена вируса гепатита В, а также для определения активности аланинаминотрансферазы. Срок действия анализов донора крови составляет 21 день.

Для проведения процедуры использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства. Кровь партнера могла быть использована для получения лимфоцитов только при нормативных результатах вышеуказанных исследований.

В процедурном кабинете осуществляли забор крови из локтевой вены в стерильную пробирку объемом 50 мл, в качестве антикоагулянта использовали 200 мкл раствора гепарина (исходный раствор 5000МЕ/мл).

В специальном помещении, оснащенном ламинарным шкафом и необходимым лабораторным оборудованием, осуществляли выделение лимфоцитарной взвеси.

После тщательного перемешивания кровь инкубировали при 37°С в течение 1-1,5 часов.

После разделения крови на 2 слоя (верхний - плазма с мононуклеарными клетками, нижний – эритроциты), верхний слой переносили в центрифужную стерильную пробирку объемом 14 мл и центрифугировали в течение 7 минут при 1500 об/мин.

После удаления супернатанта, в пробирку вносили 10 мл стерильной дистиллированной воды, осадок тщательно ресуспендировали в течение 10-15 секунд, добавляли избыток физиологического раствора и центрифугировали в течение 7 минут при 1500 об/мин. После центрифугирования супернатант удаляли, осадок тщательно перемешивали в 2 мл стерильного физиологического раствора.

Путем визуального подсчета в камере Горяева в полученной взвеси определяли количество клеток. Окончательная концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе доводилась до 50 млн в 1 мл раствора.

Во время предгестационной подготовки женщинам с ИПВ вводили 50 млн лимфоцитов партнера в ладонную поверхность предплечья дважды с интервалом в один месяц на 5-10 день менструального цикла внутривенно 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 согласно протоколу ведения беременности у пациенток с ПВ [314].

Все манипуляции осуществляли с учетом правил асептики и антисептики.

В течение недели производили визуальную оценку местной реакции организма на введение лимфоцитов партнеров.

2.3. Характеристика методов иммунологических исследований

Женщинам в супружеских парах с ИПВ проводили расширенное иммунологическое обследование для оценки влияния процедуры аллоиммунизации на состояние их иммунной системы.

Кровь у женщин для анализа забирали натошак из локтевой вены до

назначения лечения и после каждого введения клеток на 18-22 день менструального цикла (через две недели после каждой процедуры иммунизации) во время предгестационной подготовки. Во время наступившей беременности кровь для анализа забирали на сроке 5-6 недель (до иммунизации), в 8-9 недель (до иммунизации) и в 11-12 недель гестации.

2.3.1. Определение антилейкоцитарных антител методом проточной цитометрии

Лимфоциты из цельной крови партнера выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [315]. Количество мужских лимфоцитов в пробах составляло не более 1×10^6 кл/мл. 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°C.

Мужские лимфоциты инкубировали с женской сывороткой в течение 30 минут при 37°C. Центрифугирование при отмывках осуществляли при 900g в течение 10 минут. Уровень АОАТ в сыворотке женщины соответствует доле мужских лимфоцитов, покрытых антителами к Fc-фрагменту иммуноглобулина G. В качестве контроля неспецифического связывания использовали инактивированную пулированную АВ-сыворотку (Sigma, США). Меченые флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) вторичные антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулина G человека, использованные в работе, были той же фирмы. Определяли долю покрытых антителами Т-лимфоцитов, которые выявляли с помощью моноклональных антител (mAb) к CD3, меченных фикоэритрином (PE) (Beckman Coulter, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Beckton Dickinson, США). На рисунке 2.1

представлены стандартные цитограммы, получаемые на приборе, у пациенток при мониторинге АОАТ до и после аллоиммунизации.

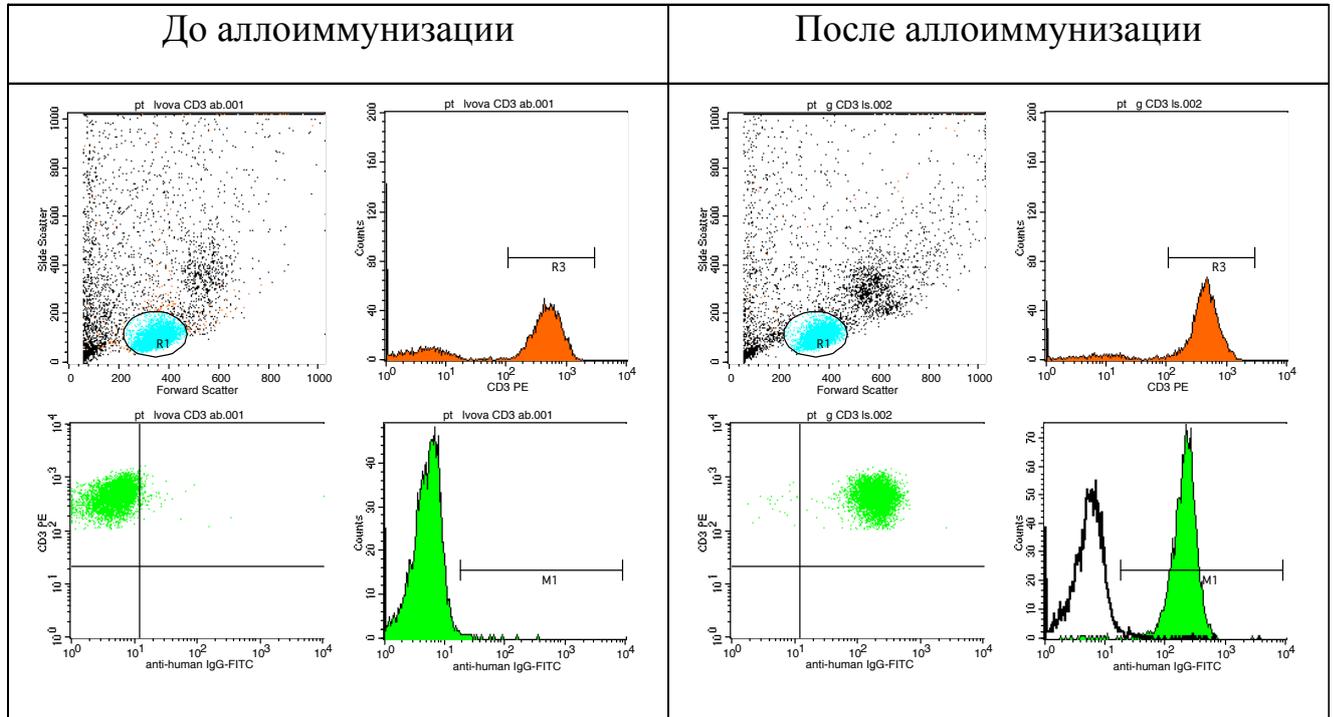


Рисунок 2.1 - Цитограммы связывания анти-IgG человека CD3⁺-лимфоцитов в негативных по АОАТ образцах (до аллоиммунизации) и позитивных образцах (после аллоиммунизации)

2.3.2. Оценка фенотипа лимфоцитов периферической крови

Поверхностный фенотип клеток периферической крови определяли с помощью стандартного набора мАт, 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⁺, CD4⁺, CD8⁺), В-клеток (CD19⁺), В1-клеток (CD19⁺CD5⁺), NK-клеток (CD56⁺, CD16⁺), а также содержание Трег (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}). Лимфоцитарный гейт, позволяющий

исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью мАт к CD45, меченных перидинин-хлорофилл протеином (Per-CP), (Dako, Дания). Для оценки позитивно-окрашенных субпопуляций использовали соответствующие FITC или PE-меченные изотипические IgG. Для оценки процентного содержания Трег использовали набор, содержащий моноклональные антитела к антигенам CD4, меченные Per-CP (eBioscience, США), CD25, меченные FITC (Becton Dickinson, США) и CD127, меченные PE (eBioscience, США). Оценивали долю Трег среди CD4⁺-клеток.

Трег клетки с внутриклеточной экспрессией FOXP3 в цельной крови пациенток с ПВ определяли как субпопуляцию с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}, так как было показано, что практически все CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺-клетки слабо экспрессируют или не экспрессируют рецептор к α -цепи ИЛ-7 (CD127) [316]. Данный методический подход способствует выявлению минорной субпопуляции регуляторных клеток непосредственно в цельной крови наряду с основными субпопуляциями, позволяя избегать потери, связанные с процедурой пермеабиллизации клеток, используемой для идентификации субпопуляций с экспрессией конкретных транскрипционных факторов.

Моноклональные антитела добавляли непосредственно к цельной крови, затем лизировали с помощью раствора FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Анализ проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest. Примеры анализируемых цитогрaмм представлены на рисунках 2.2 и 2.3.

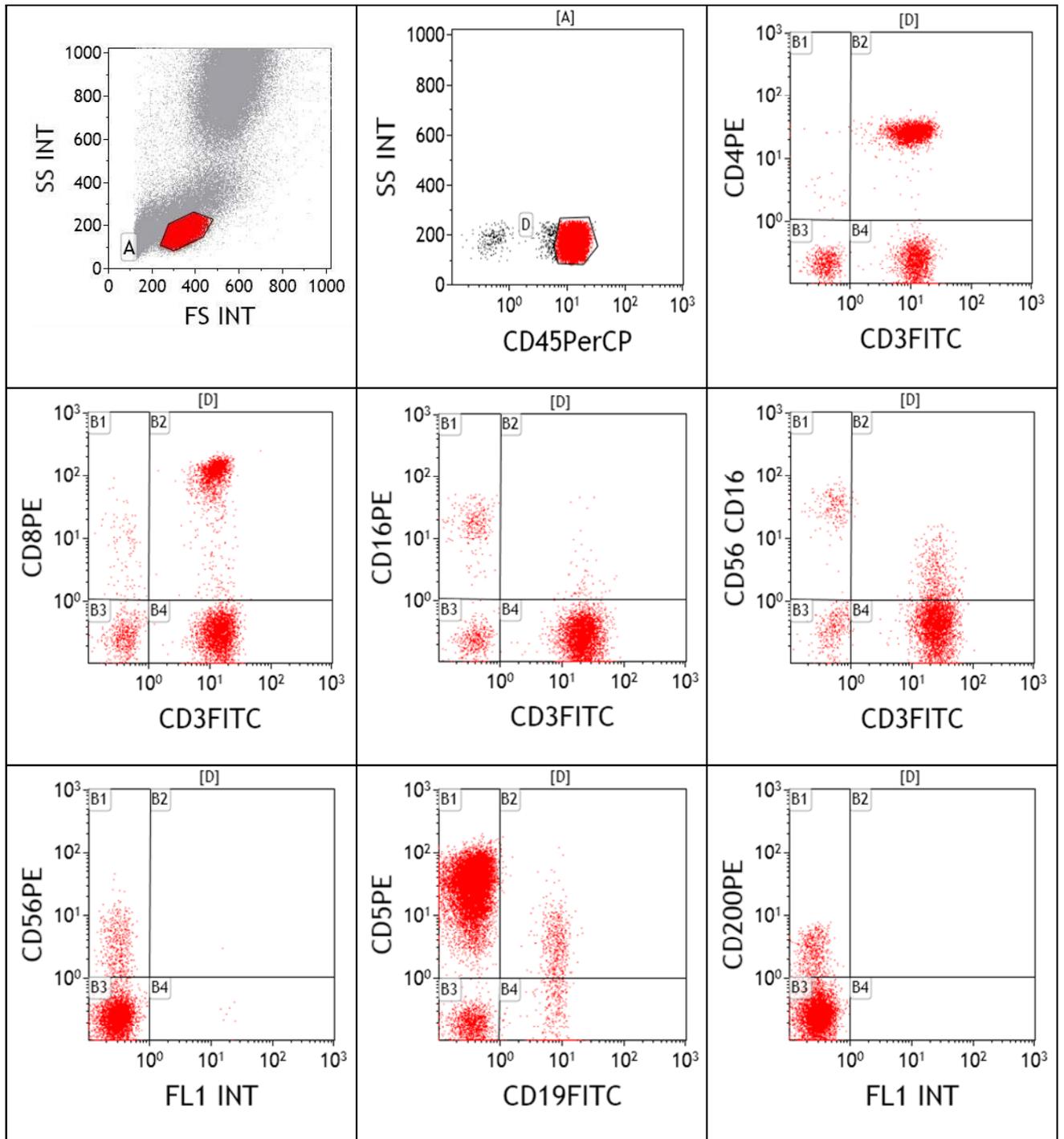


Рисунок 2.2 - Стандартные цитограммы определения субпопуляций лимфоцитов в периферической крови обследуемых женщин

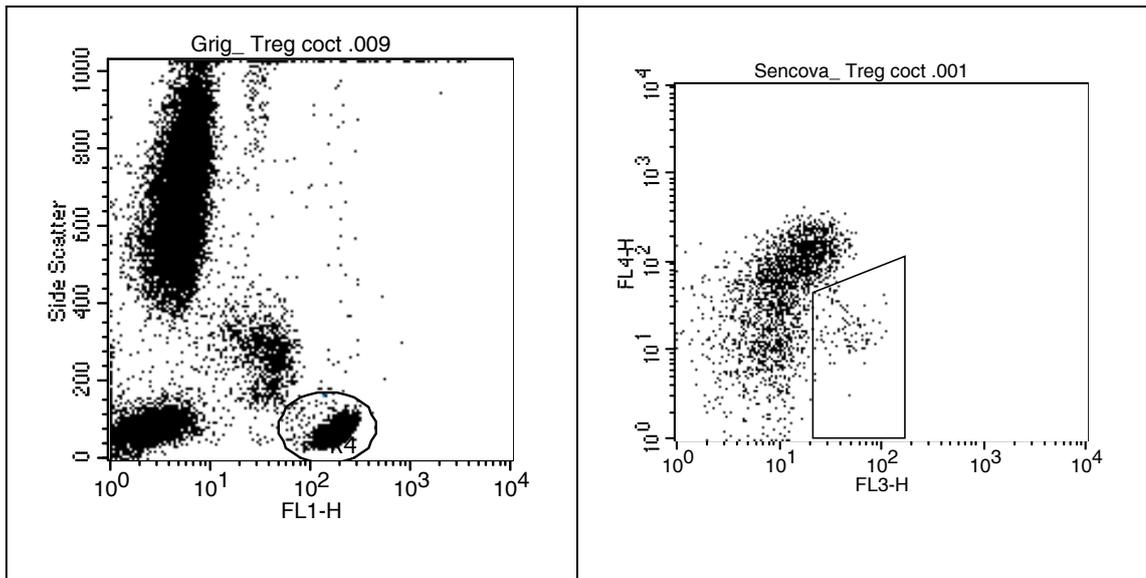


Рисунок 2.3 - Цитограммы определения Трег клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$

2.3.3. Оценка экспрессии раннего активационного антигена CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD45^+CD56^+$ после митогенной стимуляции *in vitro*

Определяли спонтанную экспрессию CD69 лимфоцитами периферической крови, а также после стимуляции цельной крови фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 часов в CO₂-инкубаторе при температуре 37°.

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 (Дакко, Дания), меченных PerCP.

Для оценки поверхностного фенотипа стимулированных лимфоцитов использовали стандартные наборы мАт FastImmune, предназначенные для определения фенотипов CD3/CD4/CD69, CD3/CD8/CD69, CD45/CD56/CD69, фирмы Becton Dickinson (США). В данных наборах антитела к CD3 и CD45 были

мечены PerCP, антитела к CD4, CD8, CD56 были мечены FITC, антитела к CD69 были мечены PE. МАТ добавляли непосредственно к цельной крови, затем лизировали с помощью раствора OptiLyse фирмы Beckman Coulter (США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Gallios фирмы Beckman Coulter (США) с использованием программы Kaluza. Примеры анализируемых цитогрмм представлены на рисунке 2.4.

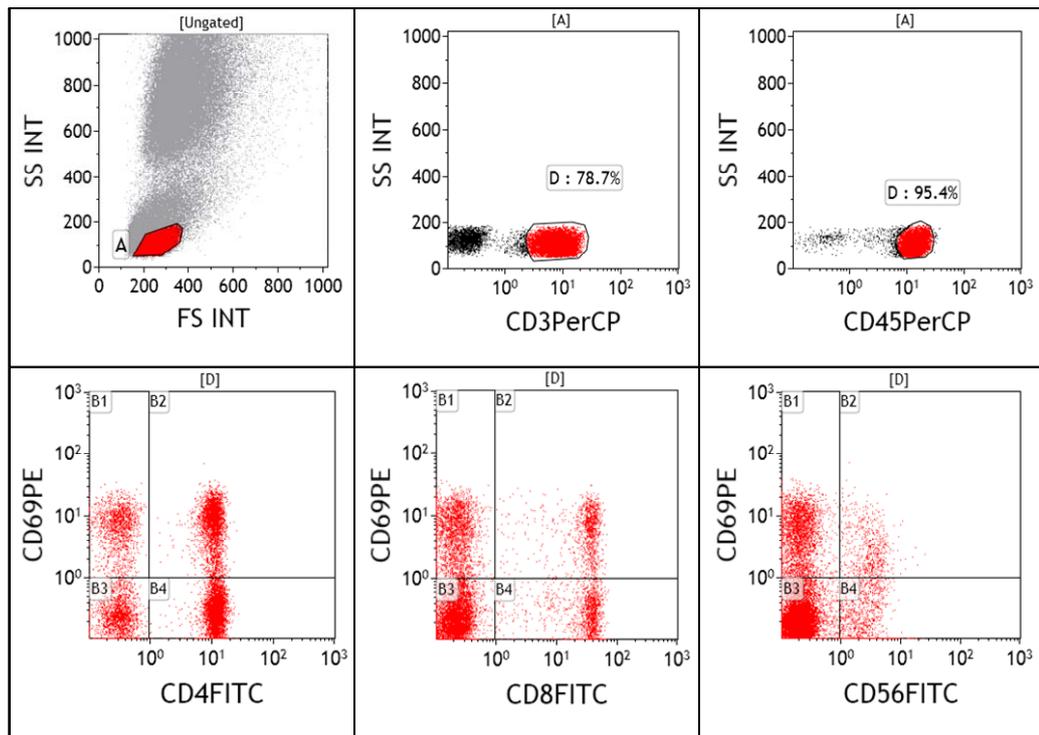


Рисунок 2.4 - Стандартные цитогрмм определения субпопуляций активированных лимфоцитов в периферической крови пациентов (анализ с помощью наборов FastImmune)

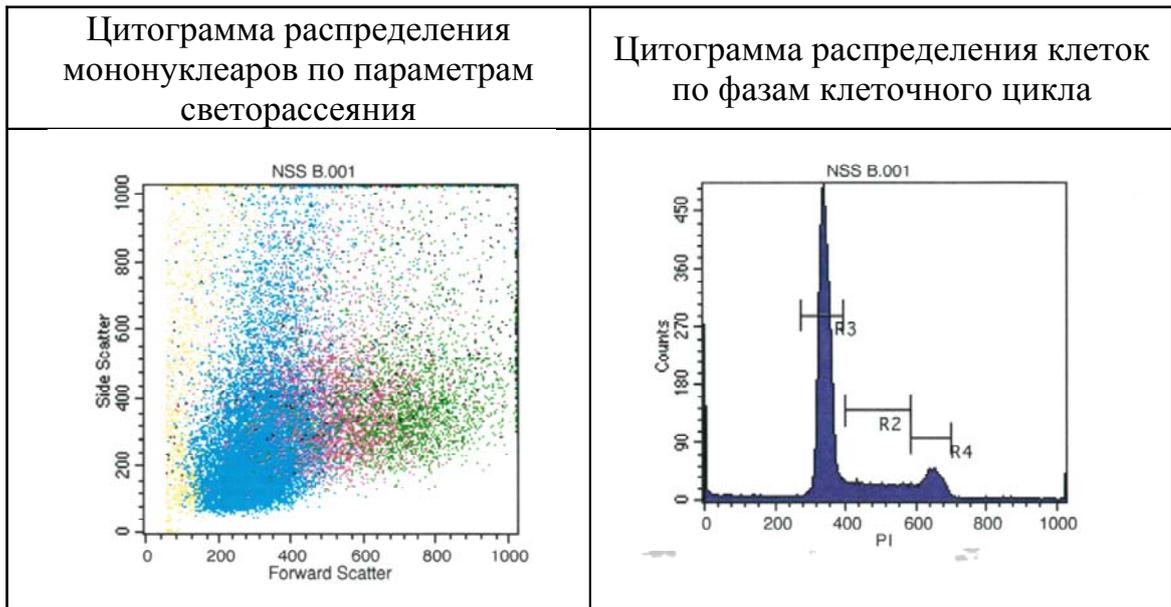
2.3.4. Определение блокирующей активности аутологичной женской сыворотки

В работе использовали разработанный автором способ оценки блокирующего эффекта сыворотки по ее влиянию на экспрессию раннего маркера

активации CD69 аутологичными лимфоцитами, стимулированными *in vitro* митогеном [317].

Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [315]. Сыворотку крови получали стандартным способом и для проведения анализа инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 минут.

Блокирующий эффект аутологичной сыворотки (БЭ) определяли по ингибированию экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови при стимуляции митогеном ФГА *in vitro* в течение 72 часов. Лимфоциты инкубировали в 96-луночных планшетах при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Каждая лунка содержала по 0,25×10⁶ лимфоцитов в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора ФГА с концентрацией 100 мкг/мл. Характер реакции женских лимфоцитов исследовали на фоне ФГА при добавлении 50 мкл женской сыворотки или 50 мкл инактивированной пулированной АВ-сыворотки и без указанных добавок. Суммарный объем инкубационной смеси в каждой лунке составил 250 мкл. Содержание живых лимфоцитов, экспрессирующих CD69, оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием прямых меченных FITC антител на цитофлуориметре FACScan (Becton-Dickinson, США). Для оценки жизнеспособности клеток использовали иодид пропидия (рисунок 2.5).



Интенсивность флуоресценции йодистого пропидия

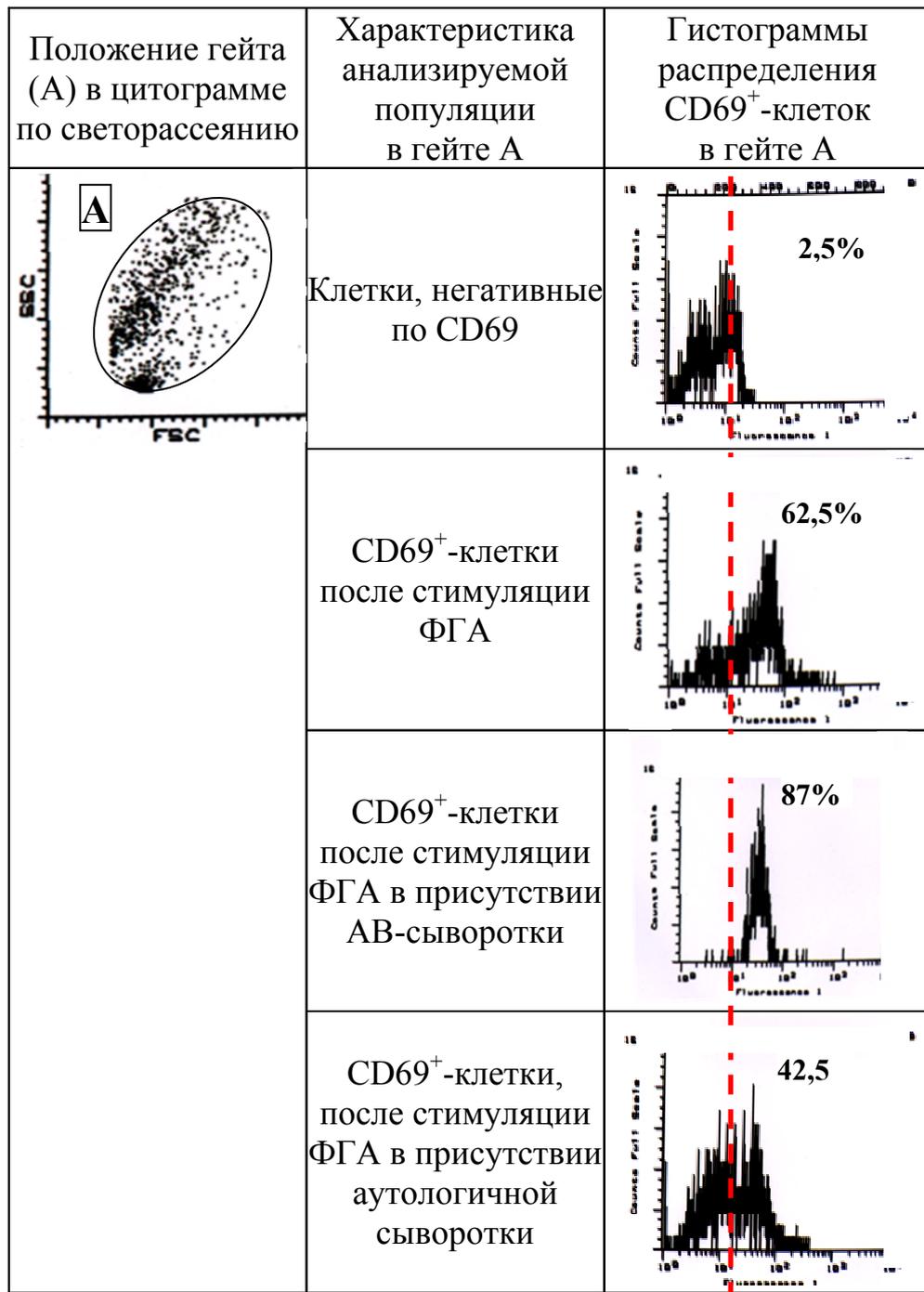
R2 –область клеток в фазах G0 и G1 клеточного цикла,

R3 –область клеток в фазе S клеточного цикла,

R4 - область клеток в фазах G2 и M клеточного цикла.

Рисунок 2.5 - Цитограммы распределения митоген-стимулированных лимфоцитов периферической крови через 72 часа культивирования по параметрам светорассеяния (слева) и фазам клеточного цикла (справа)

Оценивали содержание CD69⁺-клеток после инкубации лимфоцитов в пулированной АВ- или аутологичной сыворотке и в бессывороточной среде. Рассчитывали процент ингибирования экспрессии CD69 как отношение содержания CD69⁺-клеток в образцах с АВ-сывороткой и аутологичной сывороткой к этому показателю в среде без указанных сывороток. Блокирующий эффект аутологичной сыворотки определяли как разницу между процентом ингибирования экспрессии CD69 в присутствии аутологичной сыворотки и АВ-сыворотки. Последовательность анализа цитограмм для расчета блокирующего эффекта аутологичной сыворотки представлена примером на рисунке 2.6.



Пунктирной линией показано положение маркера отсечки для определения доли лимфоцитов, экспрессирующих CD69 в различных условиях культивирования.

Рисунок 2.6 - Цитограммы, анализируемые для расчета блокирующего эффекта аутологичной сыворотки по экспрессии CD69 митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови

2.3.5. Оценка содержания в периферической крови лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} и внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и ROR γ t

Оценку содержания лимфоцитов с внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и ROR γ t проводили с помощью стандартного набора буферов «FOXP3 Staining Buffer Set» (eBioscience, США). Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [315]. До пермеабилзации клетки окрашивали антителами к CD4, мечеными FITC, и антителами к CD25, мечеными PE, для последующей идентификации субпопуляции CD4⁺CD25^{high}. После пермеабилзации клетки были окрашены антителами к FOXP3 или ROR γ t, мечеными аллофикоцианином (APC). Используемые антитела были фирмы eBioscience (США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Gallios фирмы Beckman Coulter (США) с использованием программы Kaluza, по схеме, представленной на рисунке 2.7. В гейте А копили от 1 млн до 1,5млн клеток.

2.3.6. Оценка продукции цитокинов мультиплексным методом с помощью проточной цитометрии

2.3.6.1. Определение продукции цитокинов Th1/Th2-направленности лимфоцитами периферической крови после 24-часовой митогенной стимуляции *in vitro* методом СВА

Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [315]. Продукцию цитокинов в культуральной среде оценивали после стимуляции лимфоцитов

конканавалином А (КонА) в дозе 10 мкг/мл в течение 24-х часов. Культивирование проводили в 24-луночной планшете в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24-х часов. В лунке содержалось не менее 5×10⁶ лимфоцитов. По окончании инкубации собирали супернатанты, центрифугировали в течение 3-х минут при 10000g, аликвотировали и хранили до анализа при -80°C. Содержание цитокинов оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием аналитической системы Cytometric Bead Array (CBA), стандартного набора «Human Th1/Th2 6 – plex» (Becton Dickinson, США) и проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Определяли содержание цитокинов провоспалительной (ИФН-γ, ФНО - α, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8) и противовоспалительной (ИЛ-4, ИЛ-10) направленности. Для определения ИЛ-8 использовали одноплексный набор. Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0. Примеры анализируемых цитогамм представлены на рисунке 2.8.

2.3.6.2. Определение продукции цитокинов Th1/Th2/Th17-направленности мультиплексным методом после митогенной стимуляции *in vitro* клеток цельной периферической крови

Для получения супернатантов после 24-часовой митогенной стимуляции клеток цельной крови использовали набор «Цитокин-стимул-бест» фирмы Вектор-Бест (Россия). В соответствии с рекомендацией производителя стимулирование 1 мл цельной крови осуществлялось в стерильном флаконе в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24-х часов. Смесь митогенов для стимулирования 1 мл цельной крови содержала 4 мкг ФГА, 4 мкг Кон А, 2 мкг липополисахарида. По окончании инкубации препараты крови центрифугировали в течение 10 минут при 3000g, отбирали супернатант, вновь центрифугировали в течение 3-х минут при 10000g, отобранную надосадочную жидкость аликвотировали и образцы хранили до анализа при -80°C.

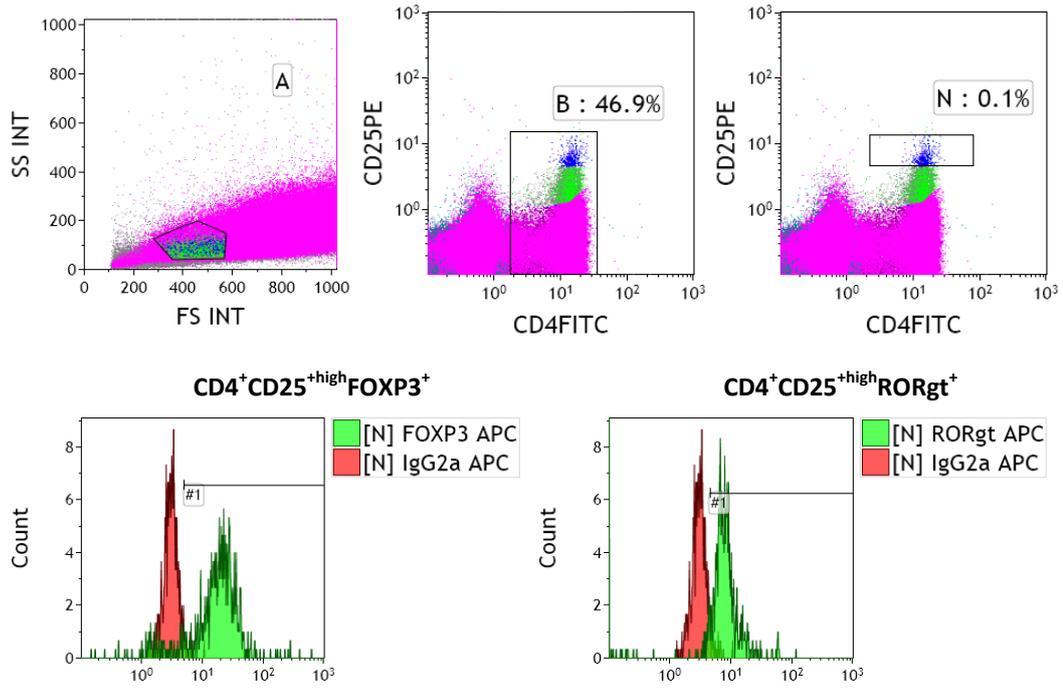


Рисунок 2.7 - Стратегия гейтирования при анализе содержания лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} и внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 или RORγt

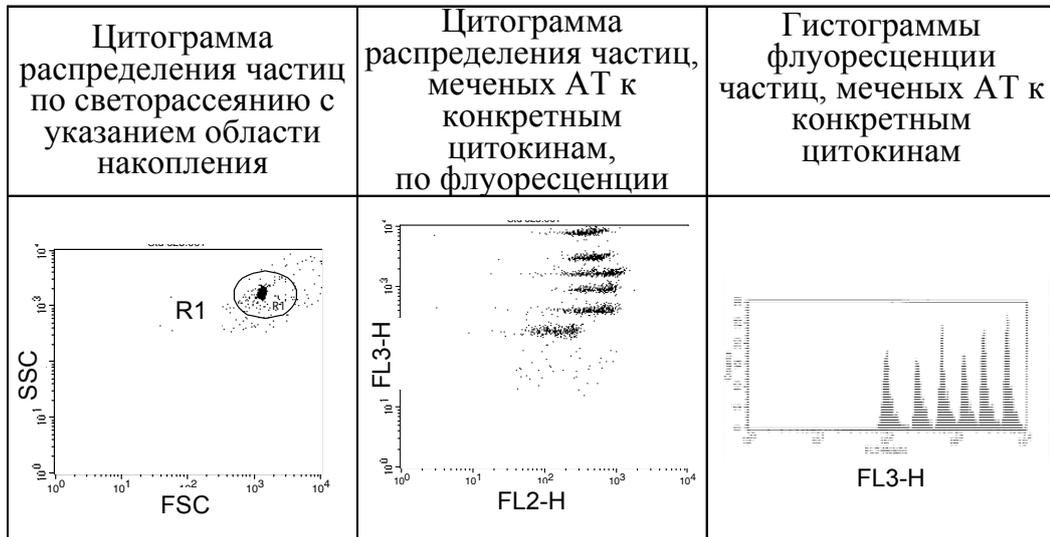


Рисунок 2.8 - Пример цитограмм при анализе цитокинов методом СВА (6-плексный вариант)

Содержание цитокинов провоспалительной (ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12p70) и противовоспалительной (ИЛ-4, ИЛ-10) направленности в супернатантах оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием стандартного набора Human Th1/Th2 11 plex Ready-to-Use Kit (eBioscience, США), содержание ИЛ-17 оценивали методом СВА с помощью стандартного набора «Human IL-17A Flex set» (Becton Dickinson, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0. Примеры анализируемых цитогамм представлены на рисунке 2.9.

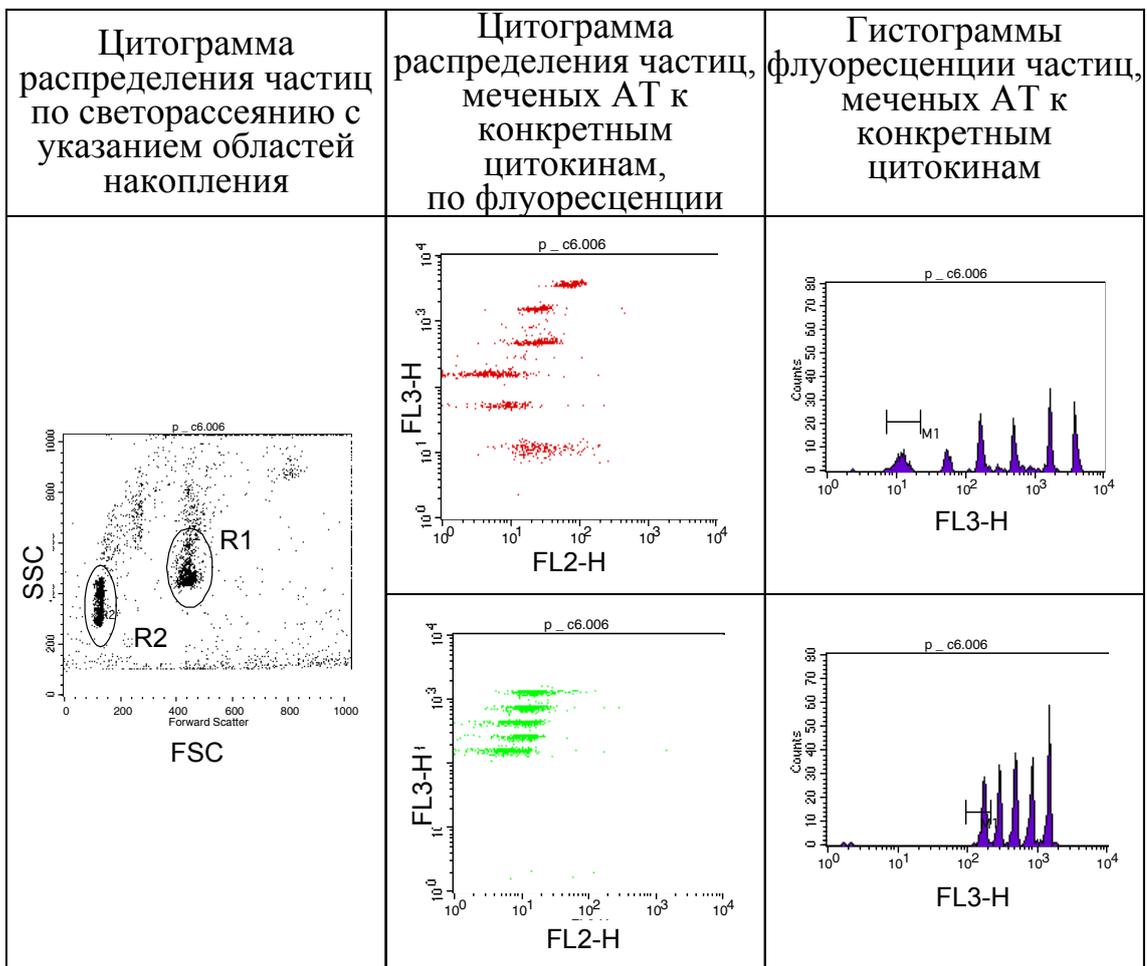


Рисунок 2.9 - Пример цитогамм при анализе цитокинов мультиплексным методом(11-плексный вариант)

2.4. Статистические методы анализа

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, χ^2 Пирсона, U-критерий Манна-Уитни). В случае нормального распределения данные представлены средней арифметической величиной и её стандартной ошибкой ($M \pm m$). В случае отклонения вида распределения данных от нормального данные представлены медианой, минимумом и максимумом, а также как 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клиническая характеристика обследованных пациенток

Всего с целью выяснения причин ПВ за период с 2007 по 2016 гг. в «ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России было обследовано 725 супружеских пар, у которых в анамнезе были потери беременности в первом триместре.

У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Критериями включения в группу исследования явились: 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.

Отбор пациенток проводился вне беременности на стадии предгестационного обследования и подготовки. Предгестационное обследование включало в себя полное клинико-лабораторное обследование, а также специальные методы исследования (ультразвуковые исследования, доплерометрия).

После исключения анатомических, генетических, аутоиммунных, гормональных нарушений, тяжелых экстрагенитальных заболеваний и проведения противовоспалительной терапии (параграф 2.1) в группу исследования были отобраны 131 супружеская пара с ПВ, у которых генез потерь беременности оставался неясным, и они составили 18,1% от всех пар с привычными потерями беременностей. Этим парам в предгестационной подготовке планировалось проведение ИЦТ - аллоиммунизации лимфоцитами партнеров. У 15 супружеских пар были диагностированы противопоказания к проведению ИЦТ, и таким

образом, основную группу составили 116 пар.

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 повторобеременных.

Критериями включения в контрольную группу были: подписанная форма информированного согласия на проведение исследования, наличие, как минимум, одних родов в анамнезе, возраст женщины от 20 до 40 лет, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, отсутствие гормональных нарушений, сопровождающихся изменениями менструального цикла, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия.

Ниже представлен анализ факторов, влияющих на течение беременности: возраст, социально-экономическое положение, экстрагенитальная и гинекологическая патология, особенности течения и исхода предыдущих беременностей.

Средний возраст пациенток основной группы составил $30,5 \pm 2,4$ лет, контрольной группы женщин - $28,2 \pm 4,2$ лет ($n=28$). Обобщенные данные представлены в таблице 3.1.

Практически все супружеские пары проживали в сходных климатогеографических условиях, преимущественно в Москве и Московской области, принадлежали к среднему социально-экономическому классу, имели среднее и высшее образование; условия труда не были связаны с профессиональными вредностями.

При анализе соматических (таблица 3.2) и гинекологических (таблица 3.3) заболеваний выявлено, что у пациенток с ПВ отмечался высокий процент хронических инфекционных и гинекологических заболеваний.

Таблица 3.1 - Распределение обследованных женщин по возрасту на момент обследования

Возраст, лет	Представленность возраста			
	Основная группа (n=116)		Контрольная группа (n=113)	
	Абсолютные значения	%	Абсолютные значения	%
21-24	7	6,0	9	8,0
25-29	34	29,3	46 *	40,7
30-34	52	44,8	38	33,6
35-41	23	19,8	20	17,7
> 30	75	64,6	58 *	51,3

Примечание. * - различия между группами по критерию хи-квадрат (χ^2) значимы при $p \leq 0,05$.

Таблица 3.2 - Структура соматической патологии у женщин основной и контрольной групп

Заболевания	Наличие заболевания			
	Основная группа n=131		Контрольная группа n=113	
	абс.	%	абс.	%
Пролапс митрального клапана без регургитации 1-ой степени	15	11,2	9	8,0
Варикозная болезнь нижних конечностей	8	6,0	3	2,6
Заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический холецистит, хронический гастрит, язвенная болезнь 12-перстной кишки)	14	10,4	2*	1,8
Заболевания мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит, хронический цистит)	23	17,2	7*	6,2
Хронический тонзиллит	36	27,1	-	-
Хронический бронхит	15	11,2	-	-

Примечание. * - различия между группами по критерию χ^2 значимы при $p \leq 0,01$.

Таблица 3.3 - Структура гинекологической патологии у женщин основной группы и контрольной групп

Заболевания	Наличие заболевания			
	Основная группа n=131		Контрольная группа n=113	
	абс.	%	абс.	%
Эктопия шейки матки	41	31,3	-	-
Воспалительные заболевания органов малого таза в анамнезе (хронический эндометрит, хронический сальпингоофорит)	52	39,6	-	-
Оперативные вмешательства в анамнезе в связи с полипом эндометрия, внутриматочными синехиями, эндометриозом, миомой матки	36	27,6	-	-

Примечание. * - различия между группами по критерию χ^2 значимы при $p \leq 0,05$.

Проанализирована репродуктивная функция женщин исследуемых групп. В основную группу вошли женщины с наличием не менее 2 выкидышей ранних сроков от одного и того же партнера. Установлено, что в анамнезе у 131 пациентки с ПВ была 351 беременность, из них потери в I триместре наблюдались у 92 (70,2%) женщин. Во всех случаях потери беременности носили первичный характер.

В контрольной группе у 11 женщин (39,3%) в анамнезе были одни роды, у 16 женщин (57,1%) - рождение 2-х здоровых доношенных детей, у одной - трех здоровых доношенных детей (3,5%).

Осложнений в виде угрожающего выкидыша, угрозы преждевременных родов у беременных контрольной группы не отмечено.

Из 116 супружеских пар, прошедших аллоиммунизацию в предгестационной подготовке, беременность наступила у 90 (77,6%) женщин. Исходы настоящей беременности представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 - Исходы беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации

Исходы	Количество пациенток с исходом (n=90)	
	абс	%
Прерывание беременности по медицинским показаниям	1	1,1
Самопроизвольное прерывание беременности до 12 нед	10	11,1
Самопроизвольное прерывание беременности в сроках 12-22 нед	2	2,2
Преждевременные роды	8	8,9
Своевременные роды	69	76,7
Роды живым плодом	77	85,6

Среди ранних потерь настоящей беременности (n=10) в четырех случаях был обнаружен аномальный кариотип у плода: 47,XX+22, 47,XY+16, 47,XX+21, 47,XY+5.

3.2 Характеристика состояния клеточного звена иммунитета женщин с ИПВ

Практически все типы иммунокомпетентных клеток участвуют в формировании толерантности при беременности, и сложные межклеточные взаимодействия, как контактные, так и опосредованные цитокинами, между различными субпопуляциями определяют механизмы поддержания гестационных процессов. Существуют доказательства того, что субпопуляционный состав и активационное состояние клеток периферической крови беременных отражает состав и активационное состояние клеток маточно-плацентарного интерфейса [266]. Поэтому исследование особенностей субпопуляционного состава крови женщин во время беременности является актуальным в поиске показателей,

значимых для диагностики акушерских осложнений. Ранее рассматривалась точка зрения, что неадекватный воспалительный ответ при распознавании отцовских антигенов в ранней беременности может служить причиной самопроизвольных потерь беременности у пациенток с ИПВ [18]. Исследование соотношений между основными субпопуляциями лимфоцитов (NK-клетками, В- и Т-лимфоцитами) у таких пациенток в период прегравидарной подготовки и в первом триместре наступившей беременности очень важны для поиска клинико-лабораторных критериев назначения иммунокорректирующей терапии, а также для понимания механизмов ее иммуномодулирующего действия.

3.2.1 Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ вне беременности

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ (в дальнейшем пациенток) вне беременности представлены в таблице 3.5.

Как следует из представленных данных, содержание субпопуляций лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^-CD8^+$, $CD19^+$, $CD3^-CD16^+$, $CD3^+CD16^+$ в периферической крови пациенток не отличается от содержания лимфоцитов с таким же фенотипом в крови женщин контрольной группы. Также не обнаружено отличий по общему содержанию лимфоцитов. Полученный результат, с одной стороны, может быть связан с тем, что одним из критериев включения в группу исследования было отсутствие острых инфекционно-воспалительных заболеваний, а, с другой, позволяет положительно оценивать последствия проведенного лечения сопутствующих хронических воспалительных заболеваний органов малого таза у обследованных пациенток.

Таблица 3.5 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин вне беременности (M±m)

Фенотип лимфоцитов	Ед. изм содержания лимфоцитов	Содержание лимфоцитов		p-значение
		Контрольная группа	Группа с ИПВ	
1	2	3	4	5
Без учета фенотипа (общее содержание)	отн.,%	33,3 ± 1,41	33,3 ± 0,98	0,24
	абс, x10 ⁹ кл/л	2,07 ± 0,11	2,0 ± 0,07	0,22
CD3 ⁺ CD4 ⁺	отн.,%	47,4 ± 2,0	47,7 ± 0,9	0,42
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,99 ± 0,07	0,95 ± 0,04	0,25
CD3 ⁺ CD8 ⁺	отн.,%	27,0 ± 2,7	28,2 ± 0,9	0,33
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,55 ± 0,06	0,55 ± 0,02	0,48
CD3 ⁻ CD8 ⁺	отн.,%	3,60 ± 0,36	4,7 ± 0,8	0,019
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,035
CD3 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	2,35 ± 1,17	1,72 ± 0,21	0,30
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,05 ± 0,03	0,032 ± 0,004	0,24
CD3 ⁻ CD16 ⁺	отн.,%	9,09 ± 1,00	10,11 ± 0,72	0,19
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,30
CD56 ⁺	отн.,%	11,0 ± 0,9	16,4 ± 0,8	0,00001
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,23 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,013
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	3,09 ± 0,7	5,7 ± 0,4	0,002
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,003
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	8,5 ± 1,0	11,9 ± 0,7	0,004
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,075
CD5 ⁺ CD19 ⁺	отн.,%	2,0 ± 0,3	2,8 ± 0,1	0,021
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,052
CD19 ⁺	отн.,%	10,5 ± 1,2	11,5 ± 0,8	0,17
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,09
CD200 ⁺	отн.,%	9,9 ± 0,9	15,4 ± 0,6	0,00001
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,20 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,00003

Продолжение таблицы 3.5

1	2	3	4	5
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	отн., %	6,1 ± 0,3	3,6 ± 0,2	0,0000005
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,004	0,00003

Примечание. абс - абсолютное содержание лимфоцитов.

Однако при детальном анализе установлено, что содержание субпопуляций клеток врожденного иммунитета с естественной киллерной активностью и фенотипом CD56⁺ достоверно превышает аналогичный показатель у женщин контрольной группы (16,4±0,8 и 11,0±0,9 соответственно, $p=0,00001$), уровни CD3⁻CD56⁺CD16⁺ также были значимо выше, чем в контроле (11,9±0,7 и 8,5±1,0 соответственно, $p=0,004$). Полученный результат согласуется с многочисленными данными о преобладании субпопуляций с киллерной активностью в периферической крови женщин с ИПВ [148, 306, 307, 308, 318].

Установлено, что достоверно выше, чем в контроле, было содержание субпопуляции NKT-клеток (CD3⁺CD56⁺CD16⁺) и субпопуляции В1-клеток с фенотипом CD5⁺CD19⁺, функцией которой, как считается, является продукция аутоантител.

В то же время, у пациенток с ИПВ существенно ниже, чем в контроле было содержание Трег-клеток (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}), а содержание клеток с фенотипом CD200⁺ достоверно превышали значения у фертильных женщин, что также согласуется с данными других исследователей [288, 319].

Для субпопуляций лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ, содержание которых значимо отличается от содержания субпопуляций лимфоцитов крови женщин контрольной группы, проведена оценка диагностической значимости тестов, представленная в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Диагностическая значимость тестов фенотипирования лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ

Показатель	Специфичность теста	Чувствительность теста	Критериальное значение
CD3 ⁻ CD8 ⁺ , %	85,7	50	> 4,2%
CD3 ⁻ CD8 ⁺ , абс x10 ⁹ кл/л	85,7	50	> 0,08
CD56 ⁺ , %	57,1	87,1	> 10,2%
CD56 ⁺ , абс x10 ⁹ кл/л	92,9	34,5	> 0,33
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	85,7	71,4	> 4,2%
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , абс x10 ⁹ кл/л	78,6	66,7	> 0,07
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	78,6	54,3	> 9,5%
CD200 ⁺ , %	85,7	77,9	> 11,4%
CD200 ⁺ , абс x10 ⁹ кл/л	85,7	69,0	> 0,22
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-} , %	92,9	86,6	< 5,2%
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-} , абс x10 ⁹ кл/л	92,9	83,3	≤ 0,09

Известно, что чувствительность теста - это вероятность того, что тест будет положительным, если пациент действительно болен, и специфичность теста - вероятность того, что тест будет отрицательным, если пациент здоров. Идеальный тест обладает 100% чувствительностью и 100% специфичностью. В данной работе показано, что лучшими характеристиками диагностической значимости с высокой чувствительностью и специфичностью обладает тест определения в периферической крови и относительного и абсолютного содержания Трег-клеток (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}).

3.2.2 Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности

Прегавидарная подготовка женщин с ИПВ включала две процедуры аллоиммунизации (глава 2). Результаты анализа субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток после аллоиммунизации вне беременности представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 - Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ после аллоиммунизации во время предгестационной подготовки ($M \pm m$)

Фенотип лимфоцитов	Ед. изм содержания лимфоцитов	Содержание лимфоцитов	
		до иммунизации (n=52)	после иммунизации (n=43)
1	2	3	4
Без учета фенотипа (общее содержание)	отн.,%	33,3 ± 0,98	32,6 ± 1,2
	абс, $\times 10^9$ кл/л	2,0 ± 0,07	2,0 ± 0,09
CD3 ⁺ CD4 ⁺	отн.,%	47,7 ± 0,9	48,2 ± 1,4
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,95 ± 0,04	0,96 ± 0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺	отн.,%	28,2 ± 0,9	27,8 ± 1,0
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,55 ± 0,02	0,54 ± 0,02
CD3 ⁻ CD8 ⁺	отн.,%	4,7 ± 0,8	5,55 ± 0,6
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01
CD3 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,6
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,032 ± 0,004	0,05 ± 0,01

Продолжение таблицы 3.7

1	2	3	4
CD3 ⁻ CD16 ⁺	отн.,%	10,1 ± 0,7	10,9 ± 1,1
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,03
CD56 ⁺	отн.,%	16,4 ± 0,8	15,6 ± 1,1
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,03
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	5,7 ± 0,4	5,6 ± 0,4
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	11,9 ± 0,7	11,5 ± 0,9
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02
CD5 ⁺ CD19 ⁺	отн.,%	2,8 ± 0,1	3,7 ± 0,9
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02
CD19 ⁺	отн.,%	11,5 ± 0,8	11,9 ± 1,1
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,02
CD200 ⁺	отн.,%	15,4 ± 0,6	16,2 ± 0,9
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,02
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	отн.,%	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,2
	абс, ×10 ⁹ кл/л	0,07 ± 0,004	0,07 ± 0,006

Примечание. абс - абсолютное содержание лимфоцитов.

Из таблицы 3.7 следует, что после предгестационной аллоиммунизации содержание основных субпопуляций лимфоцитов (Т-, В-лимфоцитов), лимфоцитов с киллерной функцией и фенотипом CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁺, а также с фенотипом CD3⁻CD8⁺, НКТ-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16⁺ и CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD200⁺-лимфоцитов и Трег-клеток не отличалось от исходного уровня.

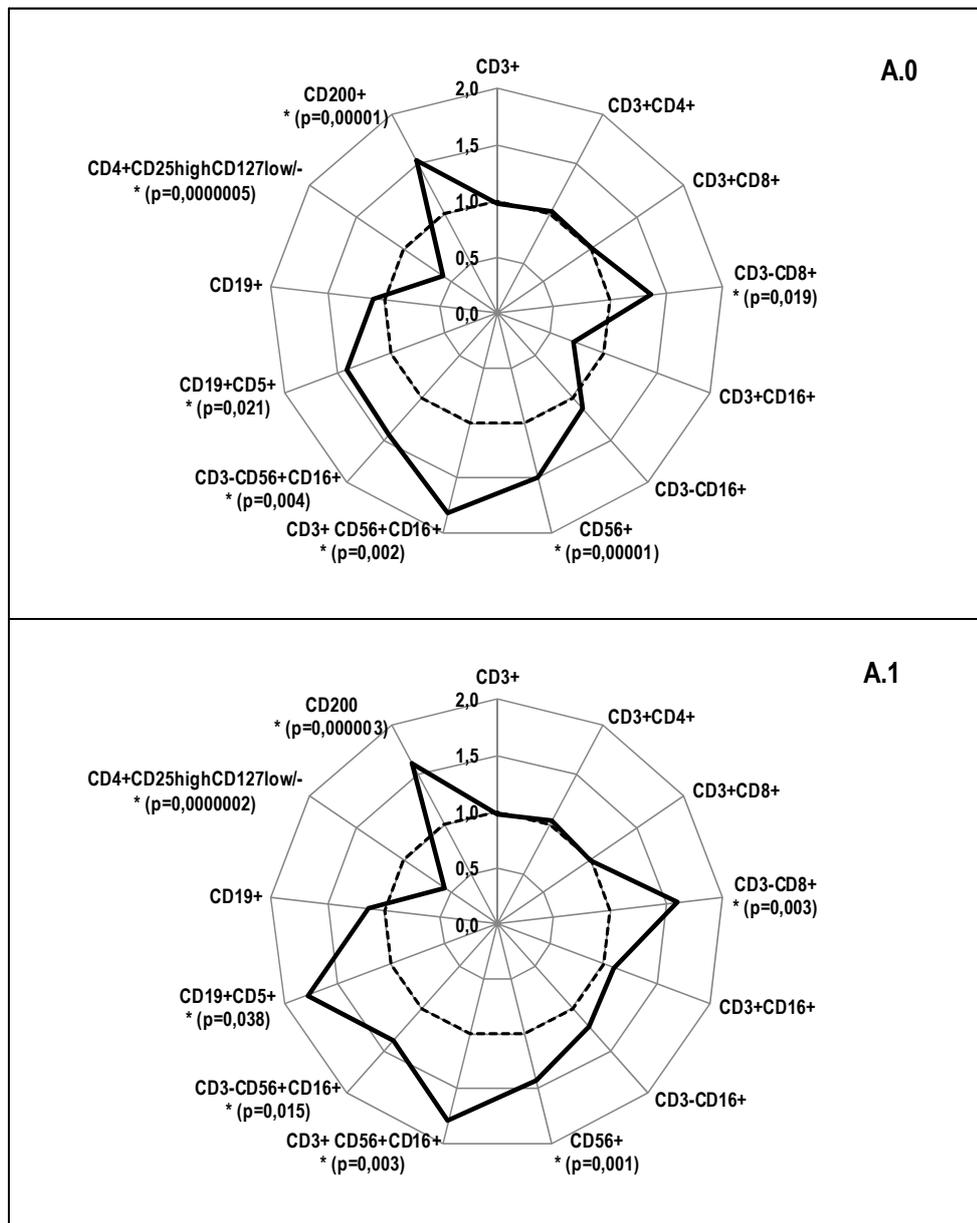
Выше было показано, что содержание лимфоцитов разных фенотипов различается у женщин с ИПВ и здоровых женщин (таблица 3.5). Влияние

предгестационной аллоиммунизации на субпопуляционный состав лимфоцитов пациенток в сравнении с содержанием лимфоцитов в крови женщин контрольной группы отражено на рисунках 3.1 и 3.2.

Как следует из данных, приведенных на рисунках 3.1 и 3.2, после предгестационной аллоиммунизации не выявлено изменений в особенностях субпопуляционного состава лимфоцитов пациенток, которые отмечались до ее проведения в сравнении с содержанием в контрольной группе, а именно: сохранилось отсутствие различий в содержании Т- и В-лимфоцитов, сохранилось увеличенным содержание CD200⁺-лимфоцитов и лимфоцитов с киллерной функцией и фенотипом CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, NKT-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16⁺, сохранилось низким содержание Трег-клеток (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}) (рисунок 3.1). Однако обнаружено увеличение по сравнению с контролем абсолютного содержания В1-лимфоцитов (с фенотипом CD5⁺CD19⁺), что может свидетельствовать о влиянии аллоиммунизации на состояние гуморального иммунитета.

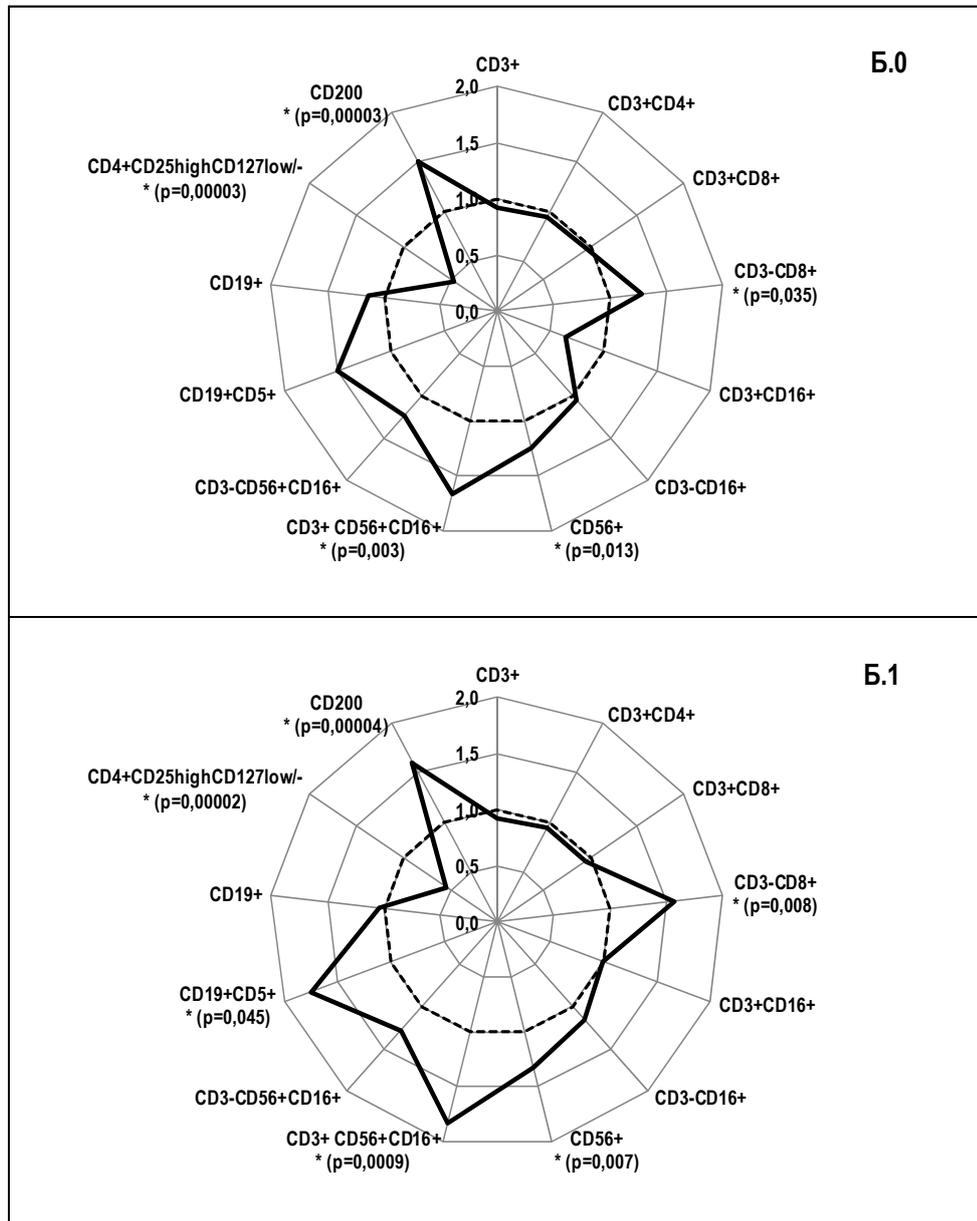
3.2.3. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ после аллоиммунизации в первом триместре наступившей беременности

Во время наступившей беременности, как и в прегравидарной подготовке, было проведено две процедуры аллоиммунизации: в 5 - 6 и 8-9 недель (глава 2). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли в 5 - 6, в 8-9 недель и в 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью. Результаты исследования представлены в таблице 3.8.



По осям представлены отношения средних значений показателей женщин с ИПВ к показателям у фертильных женщин: А.0 - до аллоиммунизации, А.1 - после аллоиммунизации. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся от контрольных значений.

Рисунок 3.1 - Характеристика относительного содержания лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ в течение предгестационной аллоиммунизации



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с ИПВ к показателям у фертильных женщин: Б.0 - до аллоиммунизации, Б.1 - после аллоиммунизации. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся от контрольных значений.

Рисунок 3.2 - Характеристика абсолютного содержания лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ в течение предгестационной аллоиммунизации

Таблица 3.8 - Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ после аллоиммунизации в первом триместре (M±m)

Фенотип лимфоцитов	Ед. изм содержания лимфоцитов	Содержание лимфоцитов		
		5-6 нед (n=23)	8-10 нед (n=21)	12 нед (n=12)
1	2	3	4	5
Без учета фенотипа (общее содержание)	отн.,%	23,8±1,22	22,86±1,09	22,5±0,75
	абс, $\times 10^9$ кл/л	2,08±0,14	2,10±0,09	2,23±0,29
CD3 ⁺	отн.,%	74,4±1,7	76,0±1,5	77,5±1,9
	абс, $\times 10^9$ кл/л	1,53±0,11	1,62±0,08	1,66±0,22
CD3 ⁺ CD4 ⁺	отн.,%	46,3±1,4	45,2±1,6	45,2±2,9
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,99±0,10	0,96±0,05	0,95±0,12
CD3 ⁺ CD8 ⁺	отн.,%	25,7±1,5	28,3±2,6	30,8±2,9
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,53±0,04	0,58±0,05	0,69±0,18
CD3 ⁻ CD8 ⁺	отн.,%	5,3±0,7	4,6±0,6	4,5±0,9
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,10±0,02	0,08±0,01	0,13±0,03
CD3 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	1,4±0,2	1,6±0,3	1,6±0,2
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01
CD3 ⁻ CD16 ⁺	отн.,%	10,6±1,5	9,2±1,5	10,0±2,1
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,21±0,03	0,17±0,03	0,3±0,08
CD56 ⁺	отн.,%	15,1±1,2	16,0±1,3	14,4±2,1
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,29±0,04	0,28±0,03	0,38±0,08
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	4,2±0,5	4,7±0,5	4,0±1,5
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,08±0,01	0,09±0,01	0,09±0,02
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	отн.,%	11,9±1,2	11,9±1,4	10,8±2,0
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,23±0,03	0,20±0,03	0,32±0,07
CD5 ⁺ CD19 ⁺	отн.,%	4,9±1,6* (p=0,015)	2,1±0,7	1,1±0,1
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,13±0,05* (p=0,02)	0,05±0,02	0,02±0,01
CD19 ⁺	отн.,%	15,7±1,8* (p=0,003)	13,2±1,2* (p=0,01)	9,7±0,8
	абс, $\times 10^9$ кл/л	0,36±0,06* (p=0,01)	0,28±0,03	0,21±0,03

Продолжение таблицы 3.8

1	2	3	4	5
CD200 ⁺	отн.,%	16,3±1,0* (<i>p</i> =0,0006)	15,3±1,3* (<i>p</i> =0,01)	11,4±0,9
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,33±0,03* (<i>p</i> =0,03)	0,33±0,03* (<i>p</i> =0,02)	0,24±0,04
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	отн.,%	3,5±0,2* (<i>p</i> =0,0005)	2,9±0,2* (<i>p</i> =0,0001)	6,3±0,6
	абс, x10 ⁹ кл/л	0,10±0,03	0,06±0,01* (<i>p</i> =0,007)	0,12±0,02

Примечание. абс - абсолютное содержание лимфоцитов. * - отличия от содержания лимфоцитов в крови беременных в 12 недель гестации. В 12 недель гестации представлены результаты оценки иммунного статуса пациенток с беременностью, завершившейся рождением ребенка на доношенном сроке.

Из данных, приведенных в таблице 3.8, следует, что в течение первого триместра в периферической крови беременных с ИПВ в анамнезе нет динамики в содержании субпопуляций Т-лимфоцитов, а также в содержании субпопуляций киллерных (CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD3⁻CD16⁺) и НКТ-клеток (CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD3⁺CD16⁺). В содержании субпопуляций В - лимфоцитов (CD5⁺CD19⁺ и CD19⁺), Трег и CD200⁺-клеток выявлена динамика, которая представлена на рисунке 3.3.

Как видно из рисунка 3.3, содержание указанных субпопуляций в сроки беременности 5-6 недель и 8-9 недель не отличаются между собой, а в 12 недель гестации зарегистрирован рост как относительного, так и абсолютного содержания Трег, значимое снижение содержания CD200⁺-клеток и В - лимфоцитов.

На рисунке 3.4 представлено сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов в 12 недель гестации у пациенток с беременностью, завершившейся рождением живого ребенка (n=12), и у беременных контрольной группы (n=11).

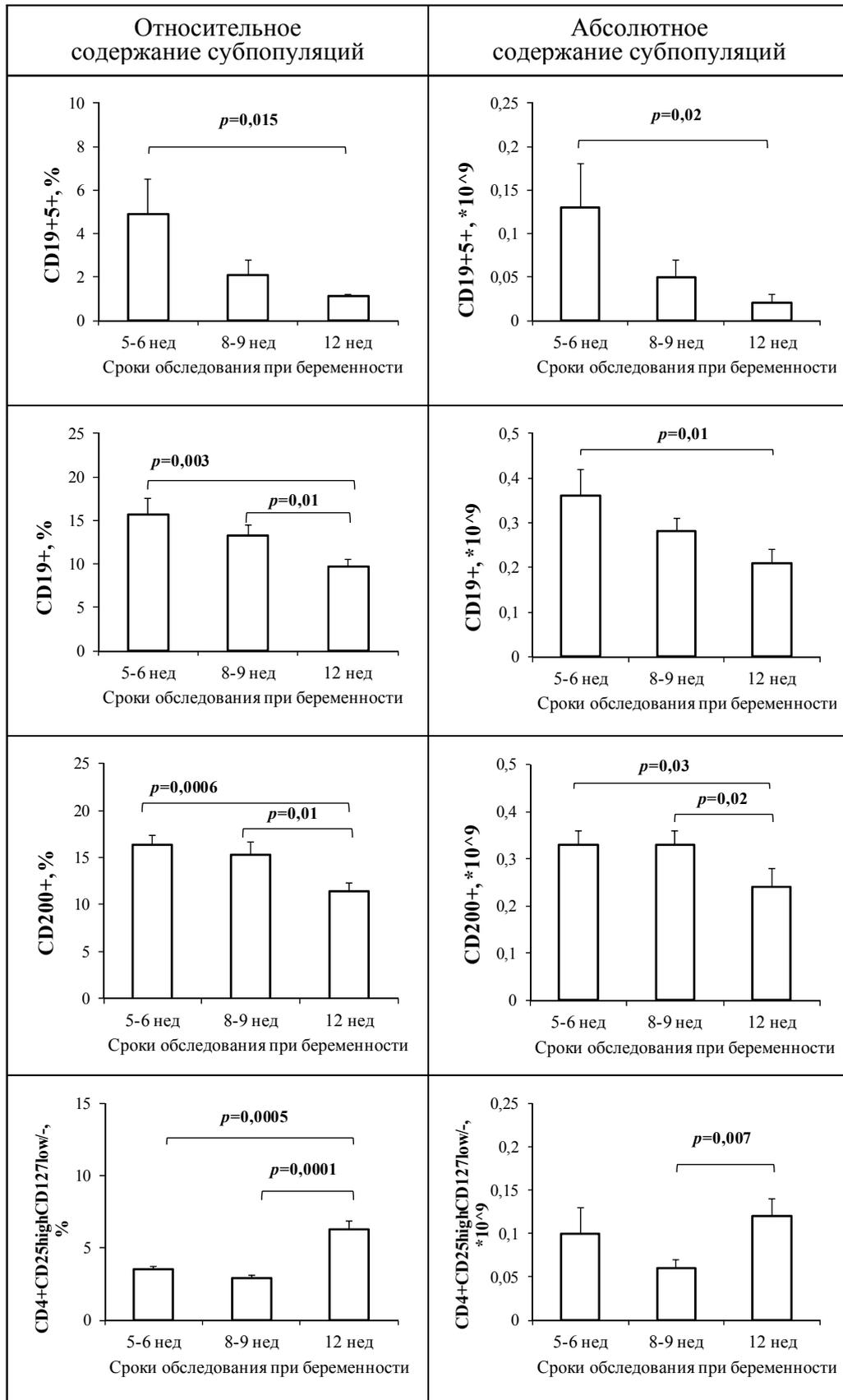
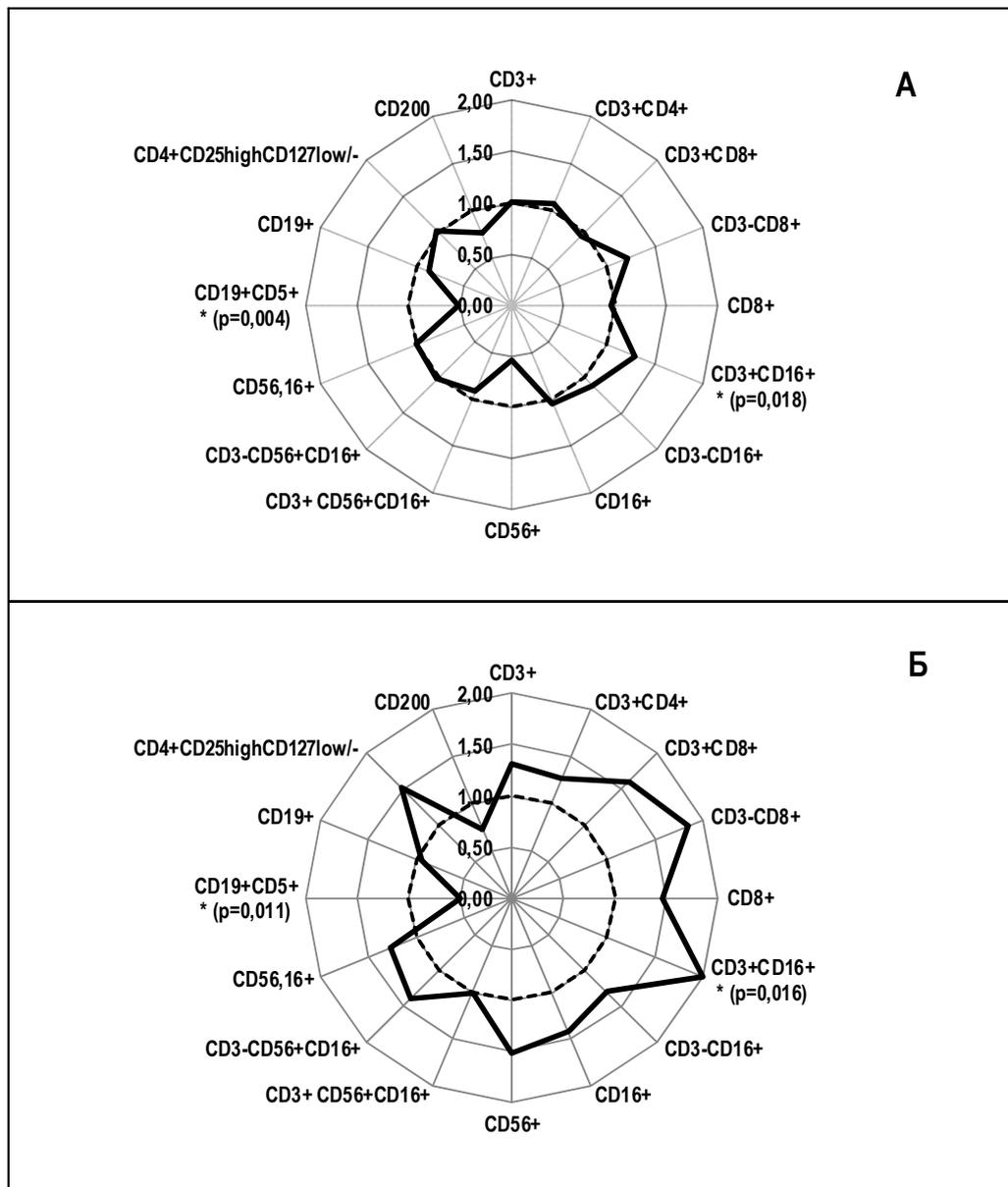


Рисунок 3.3 - Динамика субпопуляций В-лимфоцитов, CD200⁺-клеток и Т-регуляторных клеток в первом триместре у пациенток с ИПВ на фоне аллоиммунизации



А - относительное и Б - абсолютное содержание лимфоцитов. По осям представлены отношения средних значений показателей на сроке 12 недель гестации у пациенток с ИПВ к показателям в контрольной группе. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся от контрольных значений.

Рисунок 3.4 - Характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в 12 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и у беременных контрольной группы

Как показано на рисунке 3.4, у пациенток с ИПВ значительно ниже содержание В1-лимфоцитов ($CD5^+CD19^+$), значительно выше содержание субпопуляции с киллерной активностью и фенотипом $CD3^+CD16^+$ (NKT-клеток) и отсутствуют различия с контрольной группой беременных в содержании остальных субпопуляций, включая содержание Трег ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) и $CD200^+$ -клеток.

Выше было показано, что при обследовании вне беременности у пациенток с ИПВ содержание Трег-клеток было значительно ниже, а $CD200^+$ -клеток, - значительно выше, чем у здоровых женщин (таблица 3.5). Проведение двух курсов иммунизации в предгестационной подготовке не привело к изменению выявленных закономерностей (таблица 3.6). В сроке 5 - 6 недель гестации содержание Трег-клеток и клеток с фенотипом $CD200^+$ было таким же, как до предгестационной подготовки (таблица 3.8). Однако к концу первого триместра беременности, протекающей на фоне ИЦТ, содержание Трег-клеток и $CD200^+$ -клеток оказалось таким же, как в крови беременных контрольной группы.

Таким образом, увеличение в 12 недель гестации содержания Трег-клеток до значений в контрольной группе и снижение до контрольных значений содержания $CD200^+$ клеток может являться следствием состояния активации иммунокомпетентных клеток и, в свою очередь, рассматриваться как результат иммуномодулирующего действия аллоиммунизации, способствующий формированию толерантности и нормальному протеканию беременности.

У 27 женщин с ИПВ в течение беременности, пролонгированной до доношенного срока после аллоиммунизации в предгестационной подготовке и в I триместре гестации и завершившейся рождением живого ребенка, проанализирован субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови в сроке от 16 до 38 недель гестации. Контрольная группа составила 54 беременных на разных сроках физиологически протекающей беременности (от 10 до 17 на каждом сроке). Результаты представлены на рисунке 3.5.

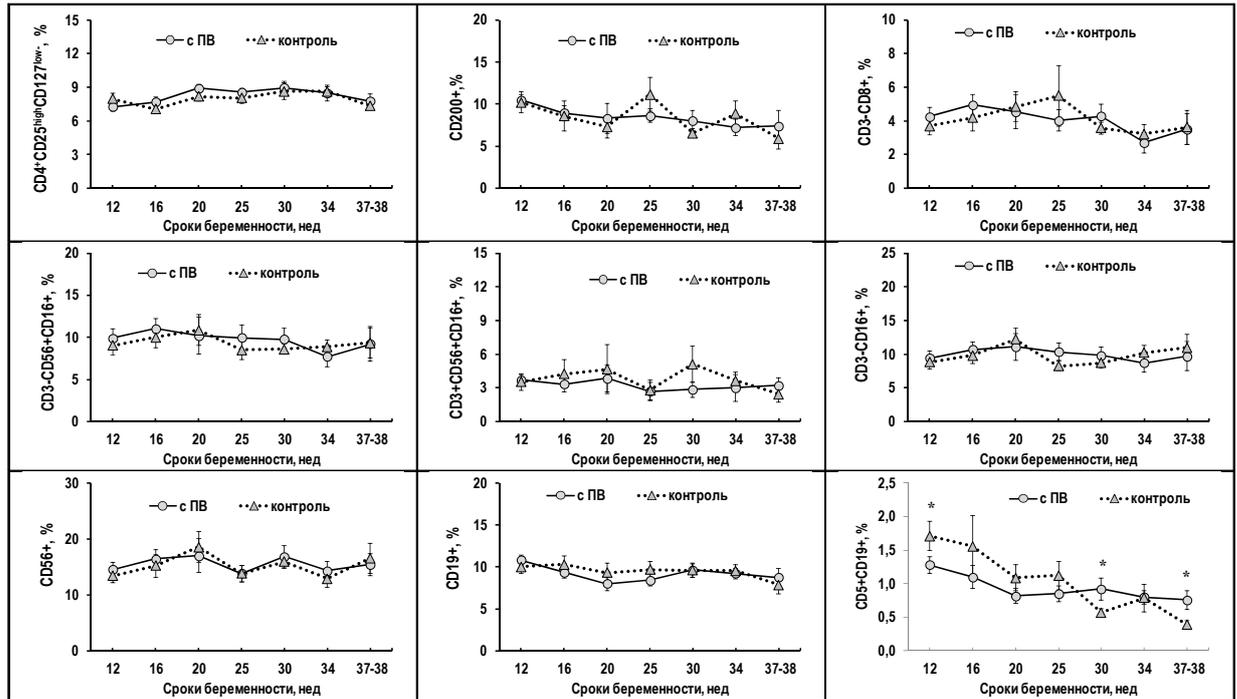


Рисунок 3.5 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в течение беременности, пролонгированной до доношенного срока

Различий в субпопуляционном составе лимфоцитов у женщин с ИПВ и у женщин контрольной группы, в целом, не выявлено в течение всего периода обследования. Исключение составило содержание В1-лимфоцитов ($CD5^+CD19^+$), которое, как упоминалось выше, в 12 недель гестации было значимо ниже контрольных значений, и сохранилось на этом уровне вплоть до 38 недели гестации, хотя в контроле на этот срок и в 30 недель значения были даже ниже. При этом значения в обеих группах женщин не превысили 2%.

Полученный результат позволяет говорить о нормализации субпопуляционного состава лимфоцитов женщин с ИПВ после аллоиммунизации, включая процедуры в предгестационной подготовке и в I триместре гестации.

3.2.4. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови пациенток с разными исходами беременности

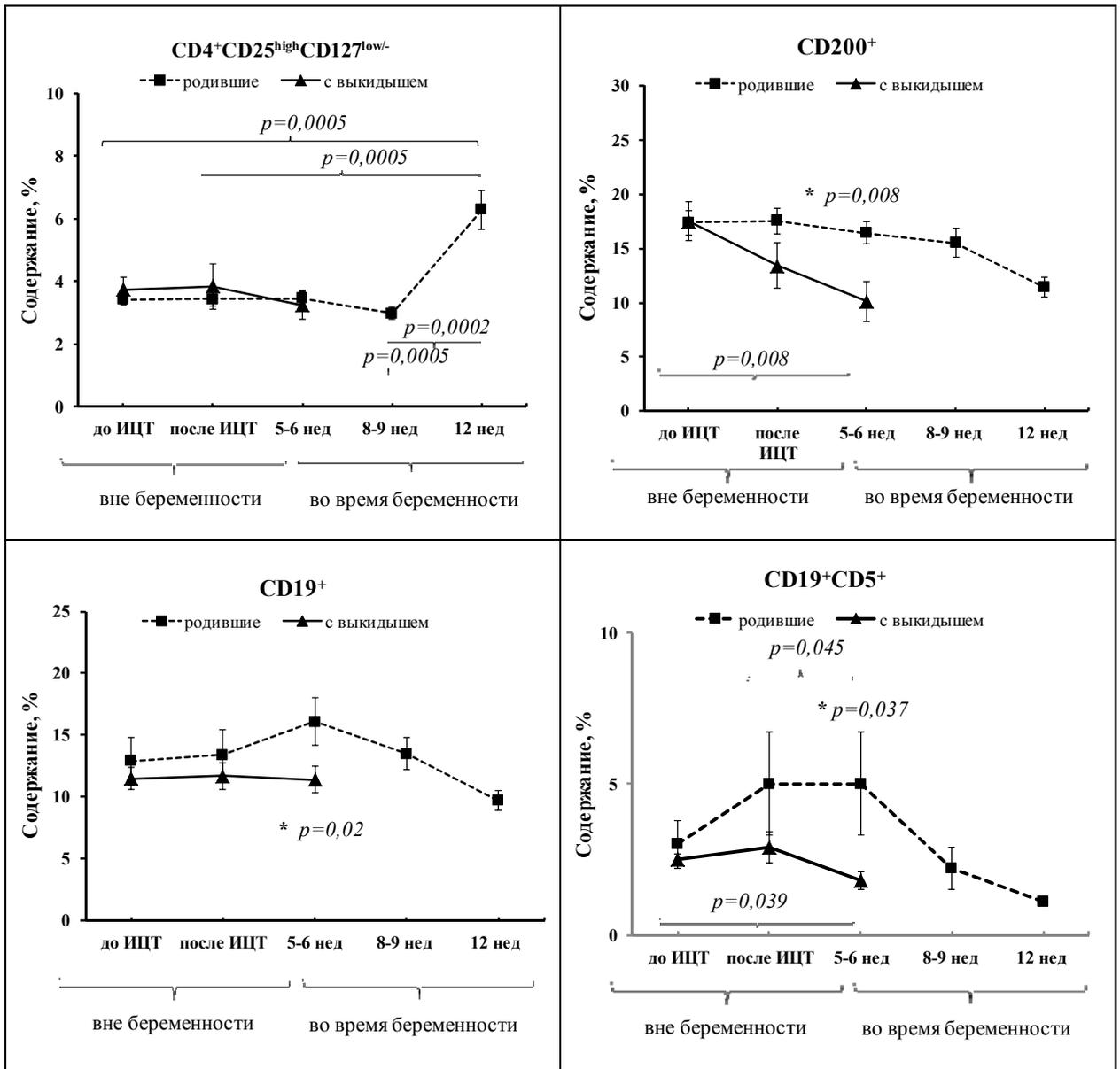
Проведено сравнение динамики субпопуляционного состава лимфоцитов от начала предгестационной подготовки до срока 12 недель гестации у пациенток с беременностью, завершившейся рождением живого ребенка ($n=30$), и до 5-6 недель гестации ($n=6$) у пациенток, потерявших беременность.

В результате проведенного анализа обнаружено, что до назначения аллоиммунизации в предгестационной подготовке пациентки обеих групп не отличались по содержанию Трег-клеток, $CD200^+$, $CD19^+$ и В1-клеток с фенотипом $CD19^+CD5^+$, однако содержание клеток с естественной киллерной активностью у пациенток с потерей беременности оказалось значимо ниже. Динамика указанных субпопуляций лимфоцитов в процессе наблюдения от назначения аллоиммунизации до конца I триместра отражена на рисунках 3.6, 3.7 и 3.8.

Как следует из рисунка 3.6, различий между группами в содержании Трег-клеток до срока в 5 - 6 недель гестации не обнаружено. Рост количества Трег зарегистрирован только в 12 недель пролонгированной беременности ($p=0,0002$ по сравнению с содержанием в 8-9 недель), при этом содержание Трег выросло по сравнению с уровнем до предгестационной аллоиммунизации ($p=0,0005$) и стало равным содержанию у беременных в 12 недель физиологической беременности ($6,3\pm 0,6$ и $5,6\pm 0,7$ соответственно).

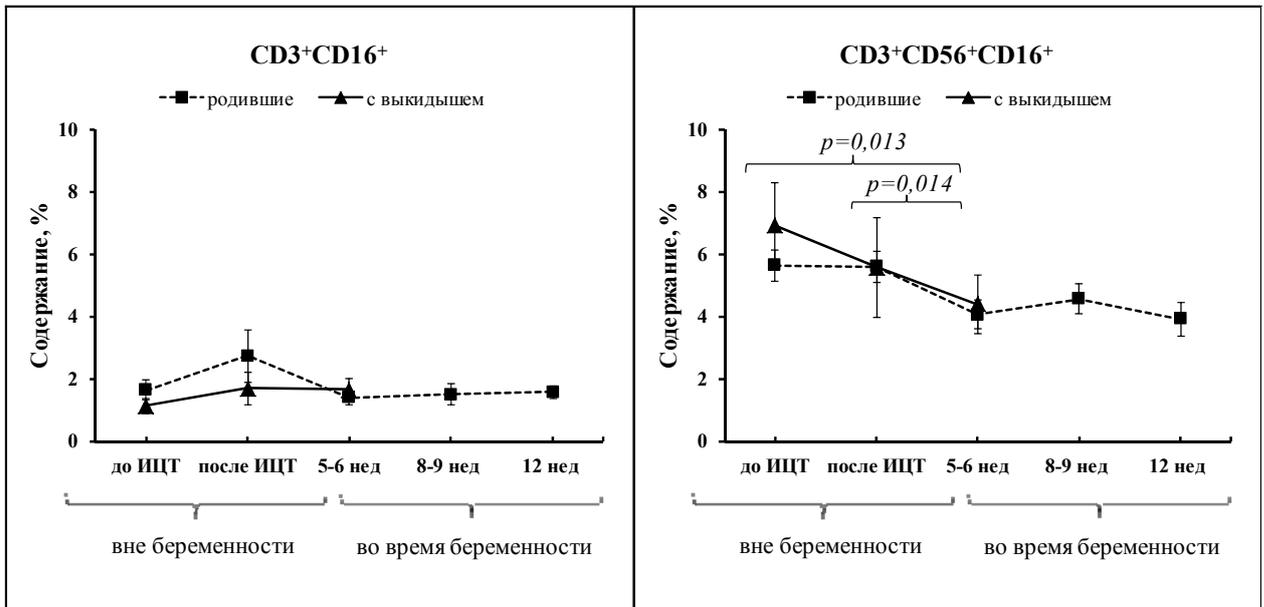
В 5-6 недель беременности у пациенток с потерей беременности, в отличие от пациенток с пролонгированной беременностью, содержание $CD200^+$, В1 ($CD5^+CD19^+$) и В2 ($CD5^-CD19^+$)-клеток стало значимо ниже не только между группами, но и по сравнению со значениями до назначения лечения.

Динамика НКТ-клеток (с фенотипом $CD3^+CD16^+$ и $CD3^+CD56^+CD16^+$), а также субпопуляций с естественной киллерной активностью ($CD56^+$, $CD16^+$, $CD56,16^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD16^+$, а также $CD3^-CD8^+$) у пациенток с разными исходами беременности представлена на рисунках 3.7 и 3.8.



«До ИЦТ» - до предгестационной аллоиммунизации; «после ИЦТ» - после аллоиммунизации. * - различия между группами достоверны.

Рисунок 3.6 - Динамика Трег, CD200⁺, В-лимфоцитов у женщин с ИПВ с различными исходами данной беременности на фоне проведения аллоиммунизации



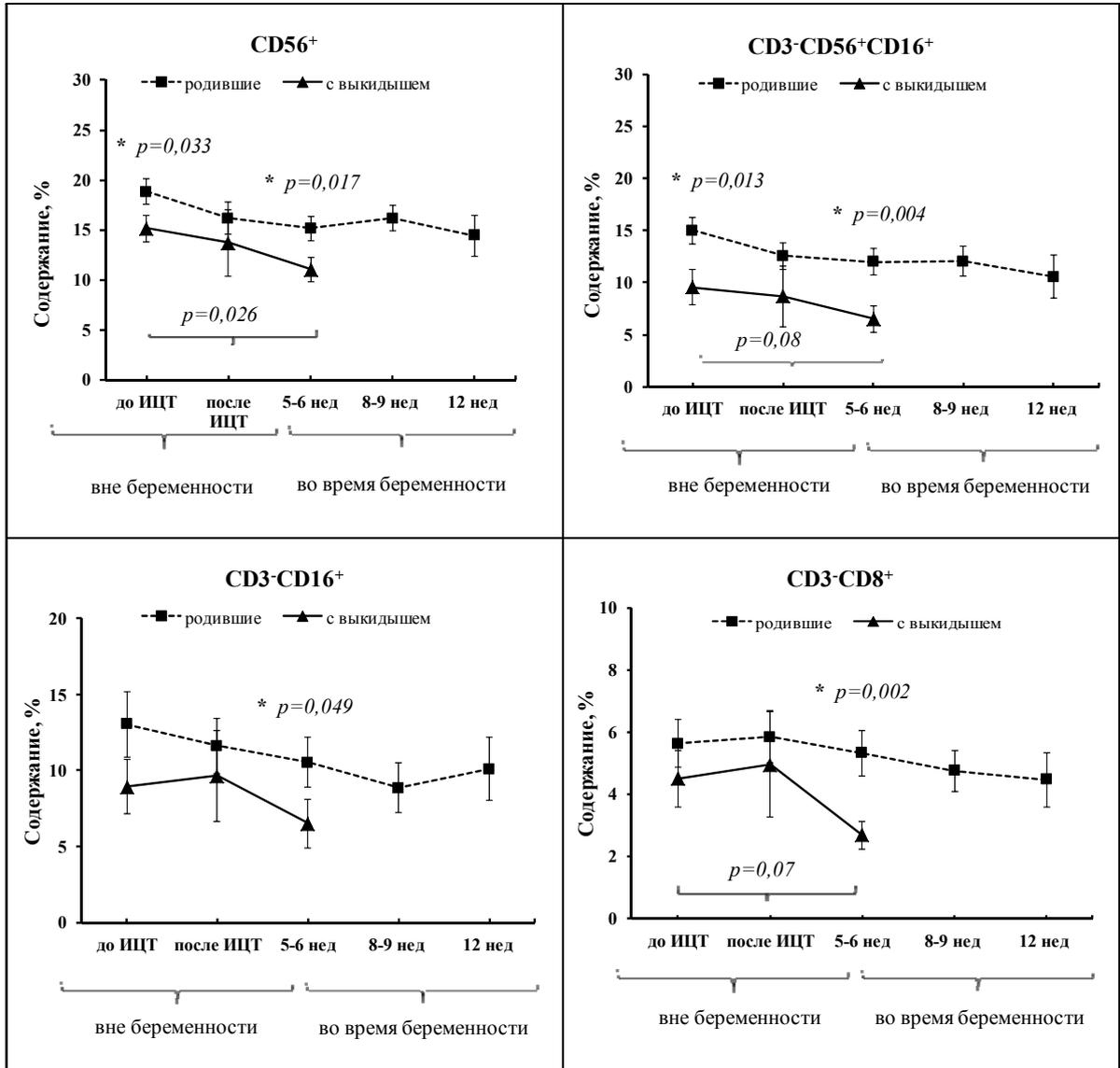
«До ИЦТ» - до предгестационной аллоиммунизации;
 «после ИЦТ» - после аллоиммунизации. * - различия между группами
 достоверны.

Рисунок 3.7 - Динамика НКТ-лимфоцитов в периферической крови
 женщин с ИПВ с различными исходами данной беременности на фоне
 проведения аллоиммунизации

Различий в содержании НКТ-лимфоцитов между двумя группами пациенток с ИПВ до назначения лечения и в динамике наблюдения не обнаружено, а в 5 - 6 недель гестации в группе пациенток с потерей беременности было ниже содержание лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD56⁺CD16⁺ по сравнению с исходными значениями ($p=0,013$), при этом достигнутый уровень не отличался от содержания указанной субпопуляции в группе пациенток с пролонгированной беременностью (рисунок 3.7).

Как следует из рисунка 3.8, уже до предгестационной подготовки содержание субпопуляций с киллерной активностью (CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺) у пациенток с потерей беременности было ниже, чем у пациенток с пролонгированной беременностью, в 5-6 недель гестации осталось ниже, чем у

пациенток с пролонгированной беременностью, и снизилось по сравнению с исходными значениями; а также ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью, стало содержание CD3⁺CD16⁺-клеток.



«до ИЦТ» - до предгестационной аллоиммунизации;

«после ИЦТ» - после аллоиммунизации. * - различия между группами достоверны.

Рисунок 3.8 - Динамика субпопуляций лимфоцитов с цитотоксической функцией в периферической крови женщин с ИПВ с различными исходами данной беременности на фоне проведения аллоиммунизации

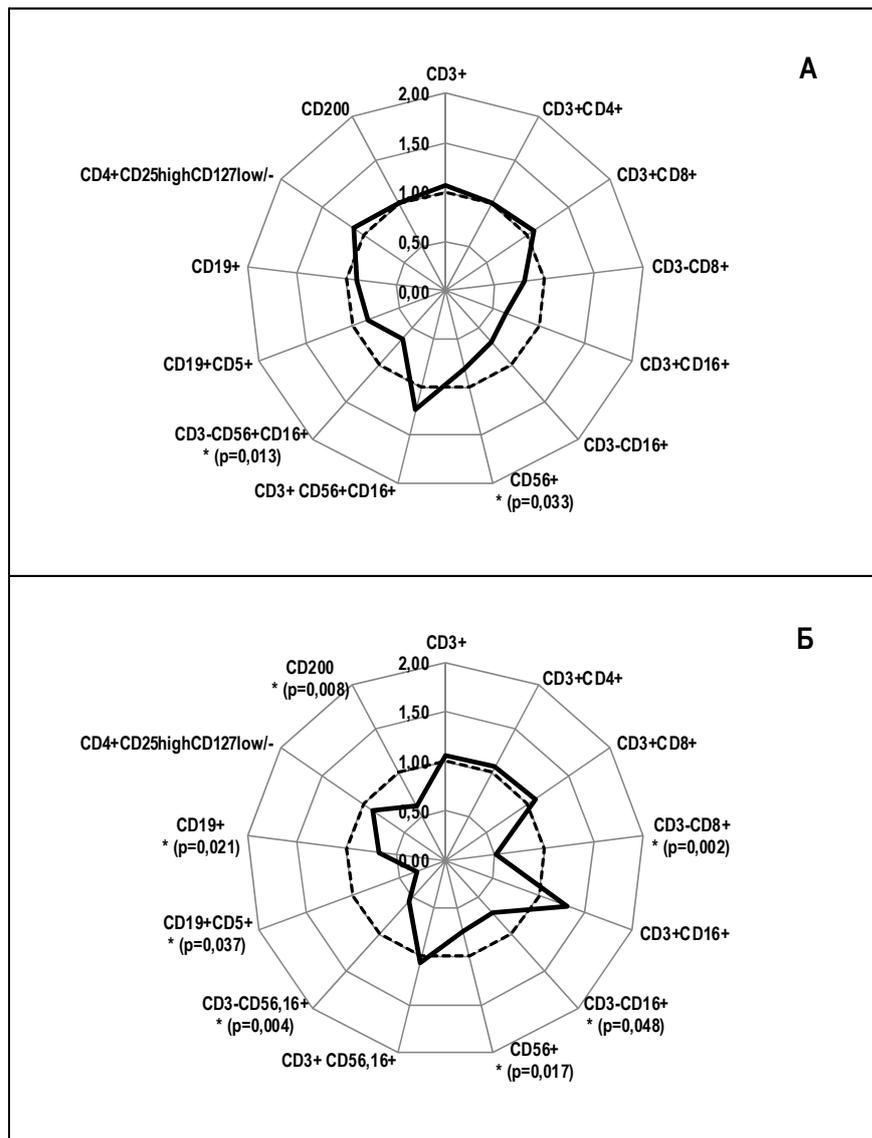
При отсутствии различий между группами в содержании лимфоцитов с фенотипом $CD3^-CD8^+$ до начала лечения, в 5 - 6 недель гестации у пациенток с выкидышем содержание этой субпопуляции также стало ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью.

Таким образом, проведенный анализ показал, что до предгестационной аллоиммунизации у пациенток с выкидышем в субпопуляционном составе лимфоцитов регистрировали более низкое содержание только субпопуляций с киллерной активностью, а в 5-6 недель беременности перечень расширяется, и у пациенток с выкидышем регистрировали сниженное содержание и НК-клеток, и $CD200^+$, и В-клеток по сравнению со значениями у пациенток с пролонгированной беременностью (рисунок 3.9).

Для показателей, измеренных до наступления беременности и значимо различающихся между анализируемыми группами пациенток с ИПВ, рассчитаны характеристики диагностической значимости для прогноза ранней потери беременности (таблице 3.9).

Из данных таблицы 3.9 следует, что вне беременности содержание в периферической крови пациенток с ИПВ субпопуляций $CD56^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+CD16^+$ ниже установленных критериальных значений практически со 100%-ой вероятностью позволяет прогнозировать выкидыш. Следовательно, для этой группы пациентов могут быть рекомендованы другие методы иммунокорректирующей терапии вне беременности.

В таблице 3.10 представлены характеристики диагностической значимости определения субпопуляций с киллерной активностью, В-клеток и $CD200^+$ -клеток для прогноза выкидыша у пациенток с ИПВ в 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации.



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с выкидышем (n=6) к показателям у пациенток с пролонгированной беременностью (n=30) до предгестационной аллоиммунизации (А) и в 5-6 недель беременности (Б). Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся между группами.

Рисунок 3.9 - Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ, потерявших данную беременность

Таблица 3.9 - Диагностическая значимость определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ вне беременности для прогноза выкидыша

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

Таблица 3.10 - Диагностическая значимость определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ в 5-6 недель беременности для прогноза потери в первом триместре

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение	Ценность позитивного прогноза, %	Ценность негативного прогноза, %
CD56 ⁺ , %	100	77,3	≤ 10,3%	100	91,7
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	90,5	60	≤ 5,8%	60	90,5
CD3 ⁻ CD16 ⁺ , %	100	100	≤ 3,1%	100	100
CD19 ⁺ , %	77,3	66,7	≤ 10,6%	44,4	89,5
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	86,4	100	> 4,5%	66,7	100
CD200 ⁺ , %	95,5	66,7	≤ 8,9%	66,7	98,8
CD3 ⁻ 8 ⁺ , %	72,2	83,3	≤ 3,4%	50	92,8

Как следует из данных таблицы 3.10, лучшими характеристиками чувствительности, специфичности для прогноза потери беременности в I триместре обладают тесты определения содержания CD3⁻CD16⁺, CD56⁺.

Показано, что у ИПВ после аллоиммунизации в предгестационной подготовке, в 5 - 6 недель беременности при содержании указанных субпопуляций ниже установленных критериальных значений практически со 100%-ой вероятностью можно прогнозировать потерю беременности.

Таким образом, в 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации, пациентки с состоявшимся выкидышем имели значимо ниже содержание НК-клеток, CD200⁺- и В-клеток по сравнению со значениями у пациенток с пролонгированной беременностью.

Завершая анализ субпопуляционного состава лимфоцитов, можно заключить, что вне беременности для пациенток с ИПВ характерно превалирование субпопуляций с киллерной направленностью и фенотипом CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD3⁻CD8⁺, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, а также CD200⁺- и В - клеток, но низкое содержание Трег клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}. Указанные особенности сохранились и после аллоиммунизации вне беременности.

На фоне двух процедур аллоиммунизации у пациенток с беременностью, завершившейся рождением живого ребенка, в I триместре при отсутствии динамики в содержании субпопуляций с киллерной активностью была обнаружена динамика в содержании субпопуляций Трег, CD200⁺-клеток, В - клеток. В 12 недель гестации содержание Трег, CD200⁺-клеток, В-клеток не отличалось от содержания в 12 недель у женщин с физиологическим течением беременности. Однако при этом содержание НК-клеток (CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD3⁻CD16⁺) также оказалось равным содержанию у женщин с физиологическим течением беременности. К сожалению, не удалось показать динамики субпопуляционного состава лимфоцитов в I триместре нормальной беременности, тем не менее представленные данные согласуются с данными других исследователей об увеличении содержания клеток с натуральной киллерной активностью в ранние сроки и в первом триместре физиологической беременности [158, 320, 321], что согласуется и с представленными в данной работе результатами об отсутствии различий в субпопуляционном составе

лимфоцитов в крови контрольной и исследуемой групп в 12 недель гестации [158].

Изложенные результаты подтверждают выводы, полученные в экспериментах на модельных животных, что за развитие Трег, влияющих на формирование толерантности во время беременности, ответственны аллоантигены, которые экспрессируются именно во время беременности [62, 222]. Также нормализации субпопуляционного состава могли способствовать процессы синтеза гормонов и белков ранней беременности. Например, события, происходящие сразу после имплантации, служат мощным эндогенным стимулом для увеличения секреции ПИБФ (прогестерон-индуцированного блокирующего фактора) - медиатора с антиабортивной активностью, который синтезируется активированными лимфоцитами периферической крови и децидуальными CD56⁺-клетками [90, 96, 97] и который способствует как переключению профиля цитокиновой продукции активированными лимфоцитами с Th1-направленности на Th2 [97, 104], так и стимулирует продукцию В-лимфоцитами характерных для беременности асимметричных антител с измененной структурой [97, 111]. Увеличению экспрессии рецепторов к прогестерону, а, следовательно, и увеличению синтеза ПИБФ, способствует переливание крови [94, 95]. Не исключено, что аллоиммунизация пациенток с ИПВ также является таким экзогенным стимулом.

Однако у 6 из 36 пациенток с ИПВ (16,7%) аллоиммунизация во время беременности оказалась неэффективной.

Был предпринят анализ с целью выявления различий в иммунологических показателях у пациенток, потерявших данную беременность, и у пациенток с беременностью, пролонгированной на фоне аллоиммунизации.

Обнаружено, что в группе пациенток, потерявших данную беременность, содержание клеток с естественной киллерной активностью было значимо ниже по сравнению с содержанием у пациенток с пролонгированной беременностью уже до ИЦТ вне беременности, а в 5-6 недель беременности стало значимо ниже и по сравнению с исходными значениями. Также в 5-6 недель гестации у пациенток с

выкидышем стало значимо ниже содержание $CD3^+CD8^+$, В- и $CD200^+$ - лимфоцитов.

Таким образом, выявление еще до наступления беременности сниженного уровня субпопуляций лимфоцитов с киллерной функцией позволяет прогнозировать ее потерю в первом триместре (таблица 3.9). Такая зависимость между низким содержанием киллерных субпопуляций и вероятностью потери беременности в первом триместре сохраняется и в 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации. Более того, спектр субпопуляций, оценка которых в 5 - 6 недель беременности обладает высокой прогностической значимостью, расширяется и включает в себя субпопуляцию $CD3^+CD8^+$, В- и $CD200^+$ -лимфоциты (таблица 3.10).

Полученные данные, с одной стороны, подтверждают необходимость противовоспалительного состояния иммунной системы женщины в ранние сроки гестации для успешного пролонгирования беременности, а с другой, позволяют формировать персонифицированный подход к выбору различных видов предгестационной иммуномодулирующей терапии, определяемый особенностями клеточного звена иммунитета женщин с ИПВ.

3.2.5. Содержание в периферической крови женщин с ИПВ Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ и внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и ROR γ t

Как уже не раз упоминалось в данной работе, важное значение для пролонгирования беременности имеют Т-лимфоциты с естественной регуляторной функцией FOXP3⁺Трег-клетки, а также их баланс с субпопуляцией Th17-клеток.

Анализ дифференцировки Трег и Th17-клеток показал их взаимное регулирование и совместную эксклюзивную дифференцировочную программу [322]. Транскрипционные факторы (ТФ) FOXP3 и ROR γ t совместно

экспрессируются в стимулированных через Т-клеточный рецептор (ТКР, TCR) наивных CD4⁺Т-клетках в раннюю фазу их дифференцировки [190], и направление дифференцировки антиген-стимулированных Т-клеток по пути Th17 или Трег зависит от баланса ROR γ t и FOXP3, регулируемого цитокинами [168, 199, 200]. Потеря экспрессии FOXP3 происходит в условиях воспаления [170], и сниженная функция Трег при ПВ может стать причиной хронического воспаления [11].

Исходя из изложенного, исследование содержания в периферической крови пациенток с ИПВ Трег-клеток, экспрессирующих FOXP3 (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺-клеток), а также CD4⁺CD25^{high}ROR γ t⁺-клеток, как субпопуляции активированных Th17-клеток, представляет научный и практический интерес.

Оценка доли в периферической крови FOXP3⁺ и ROR γ t⁺-клеток среди Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} проведено у 23 пациенток с ИПВ, забеременевших после проведенной предгестационной подготовки с использованием процедуры аллоиммунизации. У 17 пациенток с ИПВ беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением живого ребенка, у 6 - ти пациенток беременность самопроизвольно прервалась в I триместре. В контрольной группе проанализировано 12 фертильных женщин вне беременности и 10 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Результаты анализа содержания CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитов с указанными ТФ у пациенток с ИПВ в процессе предгестационной аллоиммунизации и в I триместре беременности, пролонгированной на фоне ИЦТ до доношенного срока, представлены на рисунке 3.10.

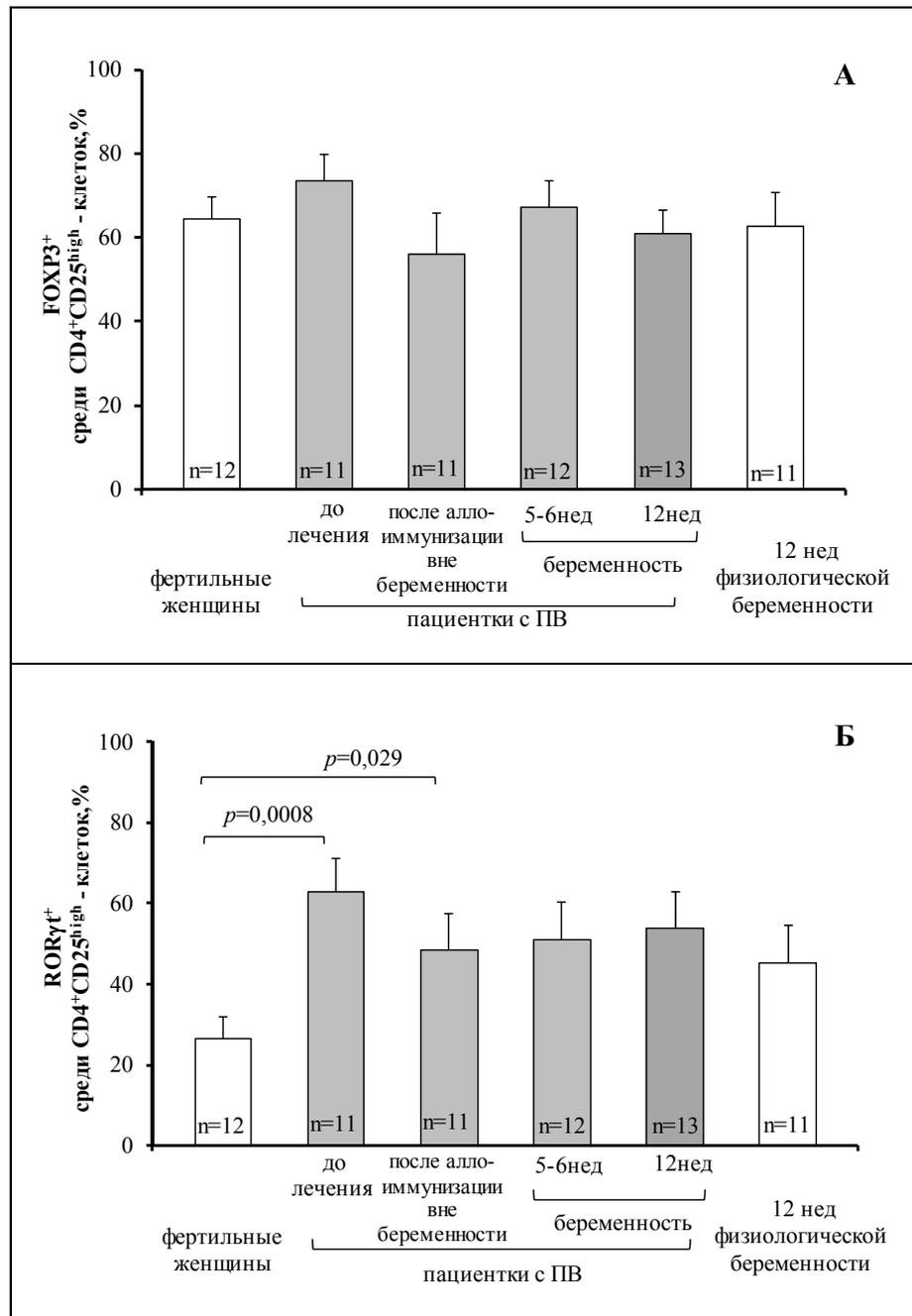


Рисунок 3.10 - Доля FOXP3⁺ (А) и RORγt⁺ (Б) Т - лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} у пациенток с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности и в I триместре пролонгированной беременности

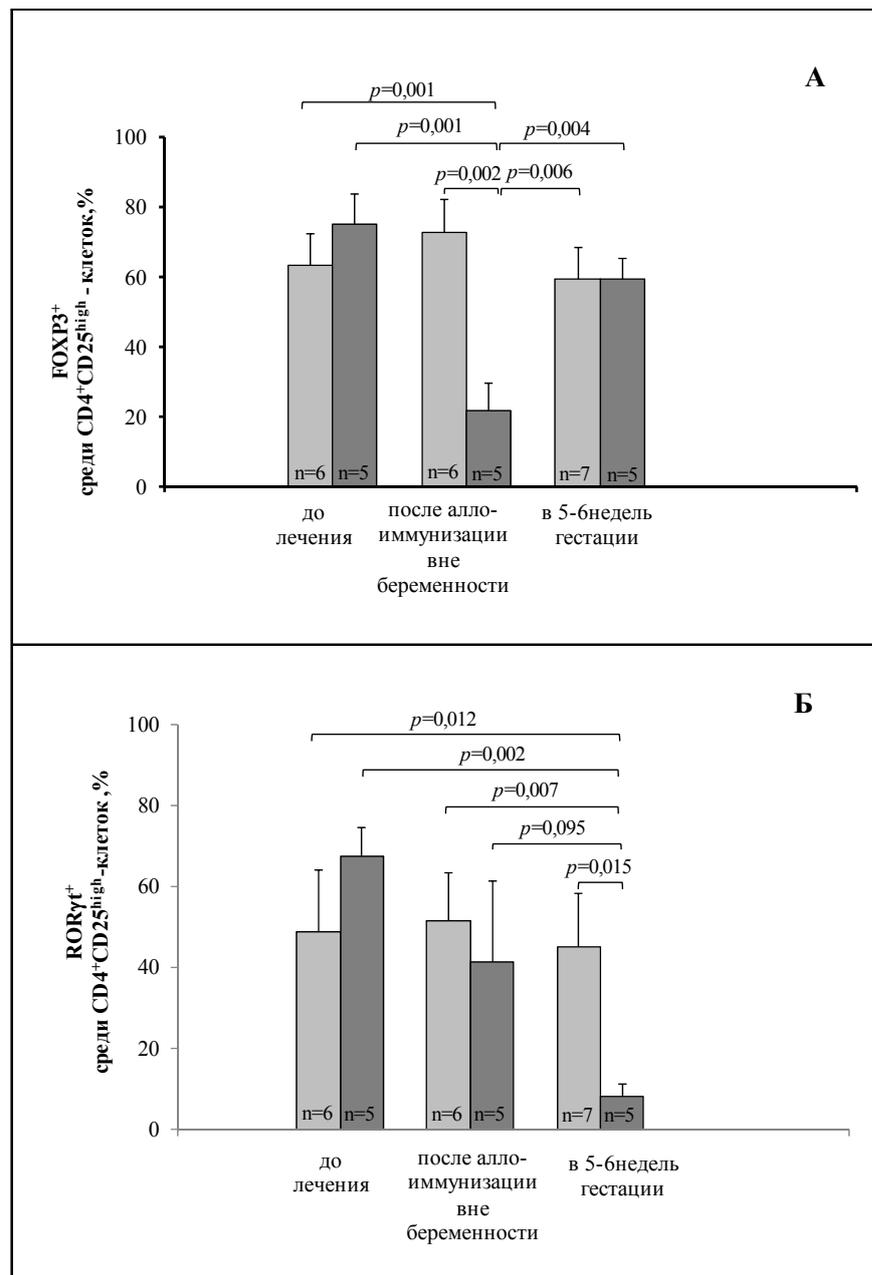
Согласно полученным данным (рисунок 3.10, А), доля FOXP3⁺-Трег среди CD4⁺CD25^{high} - клеток в периферической крови женщин с пролонгированной до

доношенного срока беременностью была сходной в разные сроки обследования, также не отличалась от доли у фертильных женщин вне беременности и от доли у женщин в 12 недель физиологически протекающей беременности.

Доля $ROR\gamma t^+$ -клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ -клеток (рисунок 3.10, Б) до предгестационной аллоиммунизации была значимо выше, чем в контроле ($p=0,0008$). По окончании предгестационной аллоиммунизации различия сохранились ($p=0,029$). В I триместре гестации доля $ROR\gamma t^+$ -клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ -клеток у пациенток с пролонгированной беременностью оставалась без различий с долей данной субпопуляции у женщин с физиологическим течением беременности.

На рисунке 3.11 представлен анализ динамики доли $FOXP3^+$ и $ROR\gamma t^+$ среди $CD4^+CD25^{high}$ -клеток у пациенток с пролонгированной и прервавшейся беременностью как в период предгестационной подготовки, так и в 5 - 6 недель наступившей беременности. Как следует из рисунка 3.11, у пациенток, потерявших беременность, доля $FOXP3^+Treg$ (рисунок 3.11, А) до предгестационной подготовки и в 5 - 6 недель гестации не отличалась от доли у пациенток с пролонгированной беременностью, но после предгестационной аллоиммунизации доля $FOXP3^+Treg$ была значимо ниже и по сравнению с долей у пациенток с пролонгированной беременностью, и по сравнению с исходными значениями в каждой группе, и по сравнению со значениями в 5 - 6 недель гестации в каждой группе.

Доля $ROR\gamma t^+$ -клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов у пациенток, потерявших данную беременность (рисунок 3.11, Б), не отличалась от содержания у пациенток с пролонгированной беременностью в период предгестационной подготовки, но в 5-6 недель гестации стала значимо меньше, чем у пациенток с пролонгированной беременностью, и меньше, чем в период предгестационной аллоиммунизации.



- с пролонгированной беременностью,
 - с прервавшейся беременностью

Рисунок 3.11 - Доля FOXP3⁺ (А) и RORγt⁺ (Б) Т - лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} у пациенток с ИПВ с пролонгированной и прервавшейся беременностью

Таким образом, у пациенток с ИПВ до предгестационной аллоиммунизации в периферической крови преобладает доля субпопуляции RORγt⁺-клеток среди

лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$, что согласуется с данными других исследователей [323, 324].

Полученный результат соответствует литературным данным о потере FOXP3 в условиях воспаления [170] и об ассоциации сниженной супрессивной функции Трег при ПВ с хроническим течением воспалительного процесса [11]. По окончании предгестационной подготовки превалирование $ROR\gamma t^+$ -клеток среди лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ сохраняется.

В 5 - 6 недель наступившей беременности и в 12 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью доля субпопуляции $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -клеток была одинаковой и не отличалась от доли у женщин в 12 недель физиологической беременности (рисунок 3.10), причем у этих пациенток уровень FOXP3⁺Трег на всех сроках обследования оставался достаточно стабильным.

У пациенток с прервавшейся беременностью отмечено снижение уровня FOXP3⁺Трег после предгестационной аллоиммунизации при отсутствии изменений в уровне $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -клеток, а начальные сроки гестации характеризовались низким уровнем $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -клеток при восстановлении уровня FOXP3⁺Трег до исходного. Подобные резкие изменения в содержании исследованных субпопуляций после аллоиммунизации и в ранние сроки гестации, по-видимому, отражают несбалансированность иммунных механизмов, обеспечивающих развитие беременности у пациенток с выкидышем. Снижение у пациенток с прервавшейся беременностью после предгестационной аллоиммунизации уровня FOXP3⁺Трег, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, с одной стороны, и возможная усиленная миграция Th17-клеток из периферической крови перед выкидышем, с другой, - свидетельствуют о наличии особенностей функционирования иммунной системы у данной категории пациенток с ИПВ, являющихся причиной неэффективности аллоиммунизации и невозможности формирования толерантности к аллоантигенам плода.

Изложенные в данном параграфе результаты подтверждают предположения

о необходимости баланса в уровне активированных $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -клеток (активированных Th17-клеток) и $FOXP3^+$ Трег-клеток в ранние сроки гестации для успешного пролонгирования беременности.

Направления дальнейших исследований были связаны с оценкой поверхностной экспрессии раннего активационного маркера CD69 (параграф 3.3) и исследования цитокинового профиля супернатантов митоген-стимулированных *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ (параграф 3.4).

3.3. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови женщин с ИПВ

Считается, что одной из причин ранних самопроизвольных потерь беременности является нарушение механизмов распознавания отцовских антигенов плода, которое может выражаться, в частности, в активации материнских Т-клеток через Т-клеточный рецептор, что приводит к развитию агрессивного воспалительного ответа ее иммунной системы с превалированием реакций отторжения плода вместо формирования толерантности к его антигенам [190].

Оценка состояния активации является очень важным в исследованиях формирования толерантности при беременности. В эксперименте для оценки способности лимфоидных клеток отвечать на активационный стимул часто используют митогены - поликлональные активаторы, которые вызывают в Т- и В-лимфоцитах каскад изменений, сходных с изменениями при действии специфических антигенов, но не вызывают дальнейшей дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

В качестве маркера активации *in vivo* и *in vitro* исследуется экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови. Устойчивое нарастание экспрессии CD69 отмечается в течение 72-х часов, что позволило рекомендовать оценку экспрессии CD69 для характеристики

пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации, инициируемой не только специфическими, но и поликлональными стимуляторами [232, 233, 234, 235, 236].

Особый интерес представляет исследование экспрессии CD69 для оценки блокирующих свойств аутологичной сыворотки в реакции бласттрансформации, которая может быть вариантом оценки способности иммунной системы женщины отвечать на активационный стимул.

Поэтому исследование экспрессии раннего маркера активации CD69 стимулированными лимфоцитами периферической крови пациенток с ИПВ в анамнезе является актуальной задачей.

3.3.1. Особенности экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови после 72-часовой митогенной стимуляции *in vitro*

Известно, что иммунный ответ на митоген является поликлональным. При этом динамика пролиферативной активности разных субпопуляций лимфоцитов может быть различной вследствие их разного функционального состояния и, следовательно, экспрессия раннего маркера активации CD69 лимфоцитами разных субпопуляций будет различной. Предположительно, различным будет и влияние аутологичной сыворотки на активационное состояние лимфоцитов разных субпопуляций.

В пункте 2.3.4 приведена характеристика экспериментальных условий оценки экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови *in vitro* после митогенной стимуляции в течение 72 часов и расчета на этой основе блокирующего эффекта аутологичной сыворотки. На рисунке 3.12 представлены варианты цитограмм распределения стимулированных лимфоцитов после 72-часового культивирования в координатах светорассеяния. Как следует из рисунка 3.12, общий гейт по светорассеянию охватывает широкую область митоген-стимулированных клеток с различными морфологическими

характеристиками.

Анализ вариантов распределения лимфоцитов по светорассеянию позволил выделить 4 области, в которых предпочтительно группировались клетки с различными характеристиками светорассеяния. Условное выделение областей представлено на рисунке 3.13.

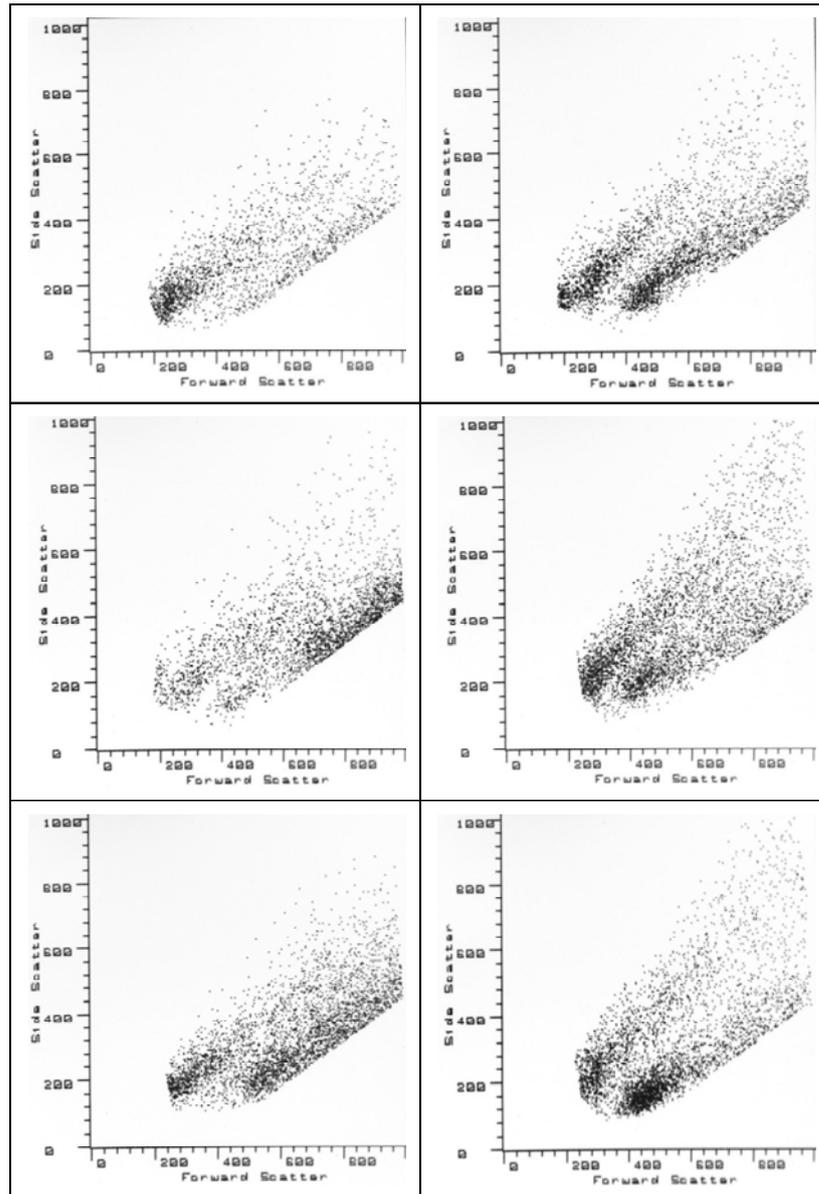
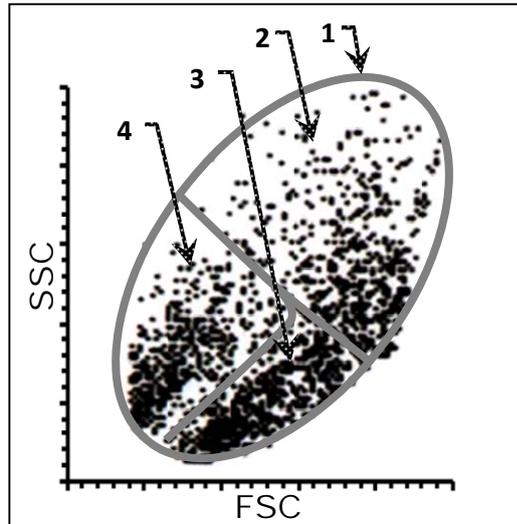


Рисунок 3.12 - Примеры вариантов распределения по светорассеянию лимфоцитов периферической крови пациенток через 72 часа после стимуляции ФГА *in vitro*



1 - универсальное окно (гейт №1), 2 - область бластов и лимфоцитов промежуточного размера (гейт №2), 3 - область зрелых лимфоцитов (гейт №3), 4 - область малых лимфоцитов (гейт №4).

Рисунок 3.13 - Трафарет выделения окон дискриминации для оценки экспрессии CD69 митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови

Представленное деление уже предлагалось другими исследователями при характеристике неоднородности субпопуляций лимфоцитов после митогенной стимуляции, в том числе образцов лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой [325, 326].

В выделенных областях светорассеяния (рисунок 3.14) оценивалось содержание основных субпопуляций лимфоцитов (по маркерам CD45, CD3, CD19 и CD56) после 72-часовой митогенной стимуляции *in vitro*, средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) позитивных клеток (рисунки 3.14 и 3.15), а также количество CD69-позитивных лимфоцитов (рисунки 3.16 и 3.17), на основании которого рассчитывали блокирующий эффект аутологичной сыворотки (рисунок 3.18).

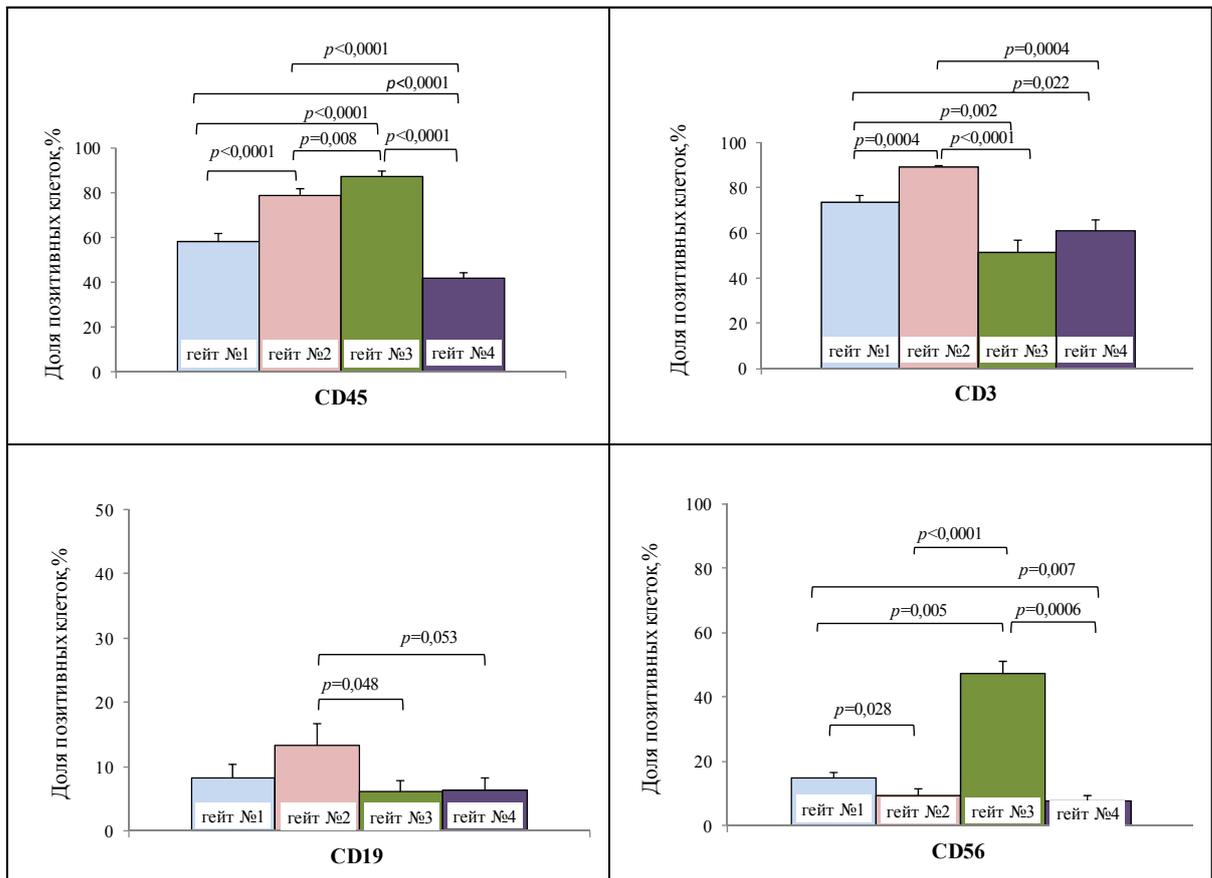


Рисунок 3.14. - Содержание митоген-стимулированных лимфоцитов периферической крови, позитивных по маркерам основных субпопуляций лимфоцитов, в различных гейтах после 72 часов культивирования.

Как видно из данных на рисунках 3.14 и 3.15, содержание позитивных по основным маркерам лимфоцитов клеток, а также СИФ позитивных клеток в различных гейтах значительно различаются.

Очевидно, что морфологическая гетерогенность лимфоцитов в культуре через 72 часа после стимуляции ФГА имеет закономерности в распределении экспрессии исследованных маркеров основных субпопуляций по гейтам, по-видимому, в основном, зависящие от исходного функционального потенциала.

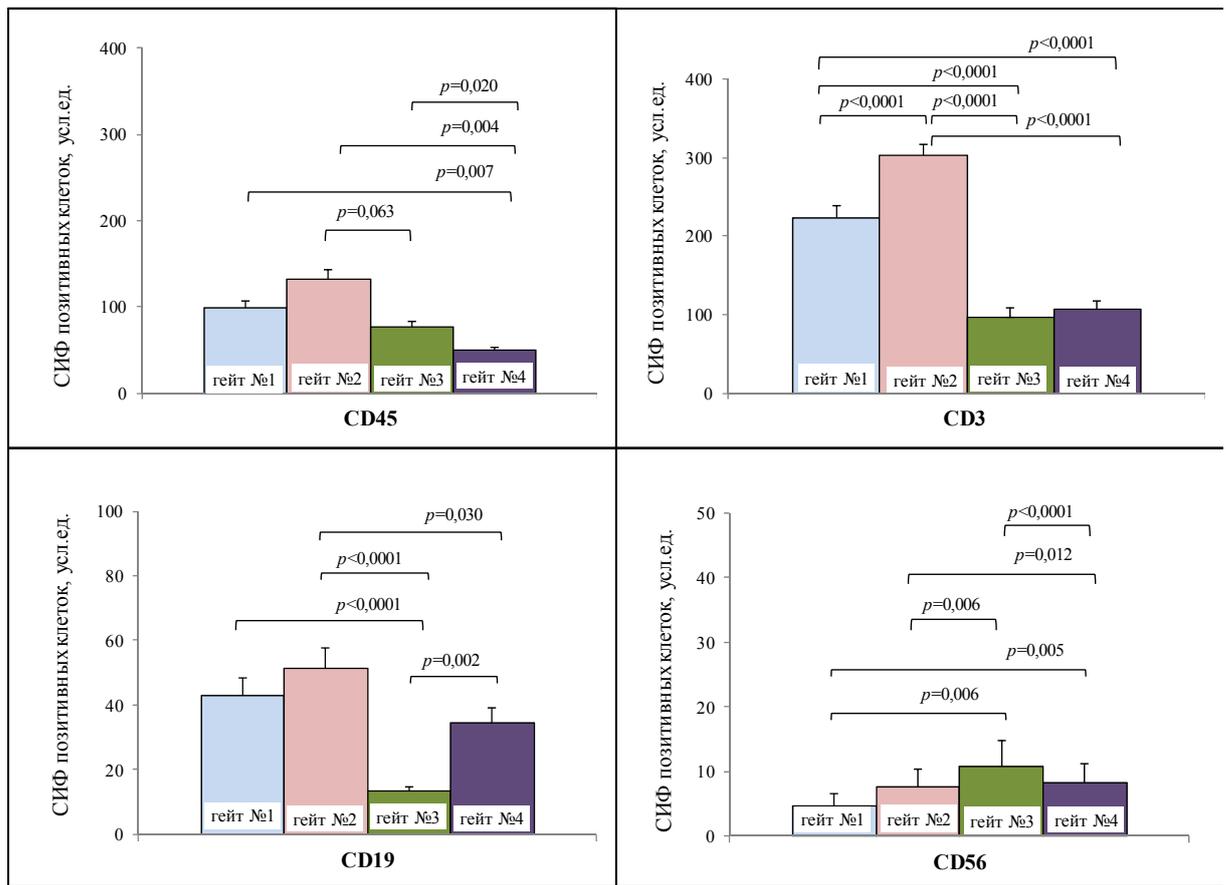


Рисунок 3.15. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови доноров через 72 часа после митогенной стимуляции *in vitro*

Как уже упоминалось, результаты анализа содержания CD69-позитивных лимфоцитов в анализируемых гейтах и их СИФ представлены на рисунке 3.16. Данные на рисунке 3.16 демонстрируют значимо отличающиеся доли CD69⁺-клеток в разных гейтах и значимо отличающийся уровень СИФ позитивных клеток.

Доля митоген-стимулированных CD69⁺-лимфоцитов в анализируемых гейтах и их СИФ после культивирования с добавлением в среду аутологичной сыворотки показаны на рисунке 3.17. Обращает на себя внимание, что, несмотря на различную долю митоген-стимулированных CD69⁺-клеток в разных анализируемых гейтах, СИФ позитивных клеток в условиях культивирования с добавлением аутологичной сыворотки оказалась одинаковой.

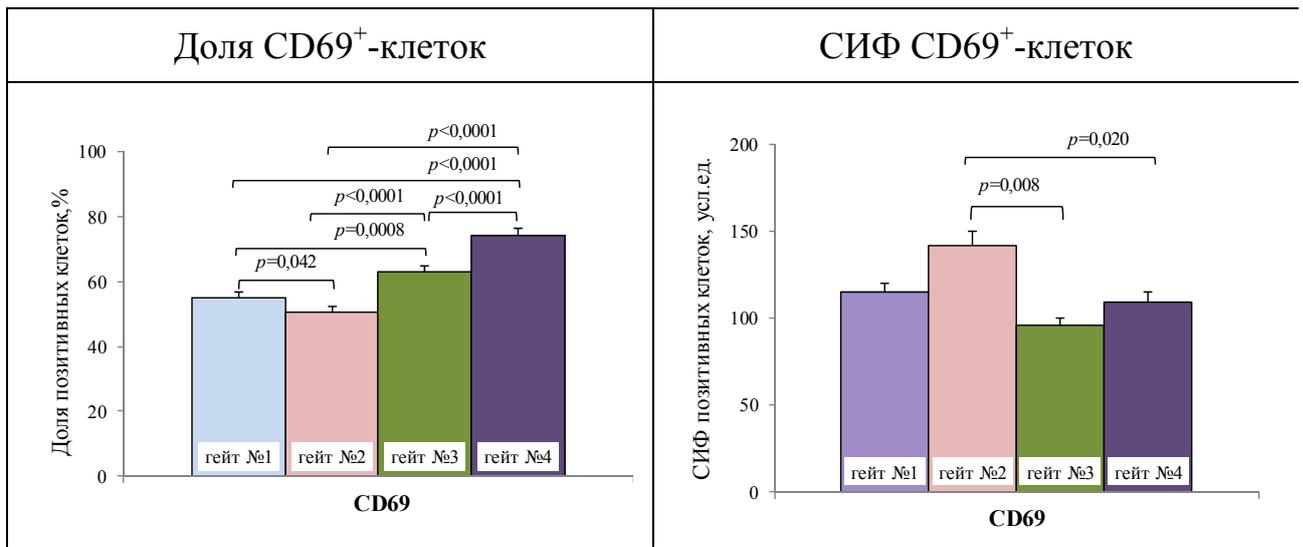


Рисунок 3.16. Доля митоген-стимулированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69, и СИФ положительных клеток в различных гейтах

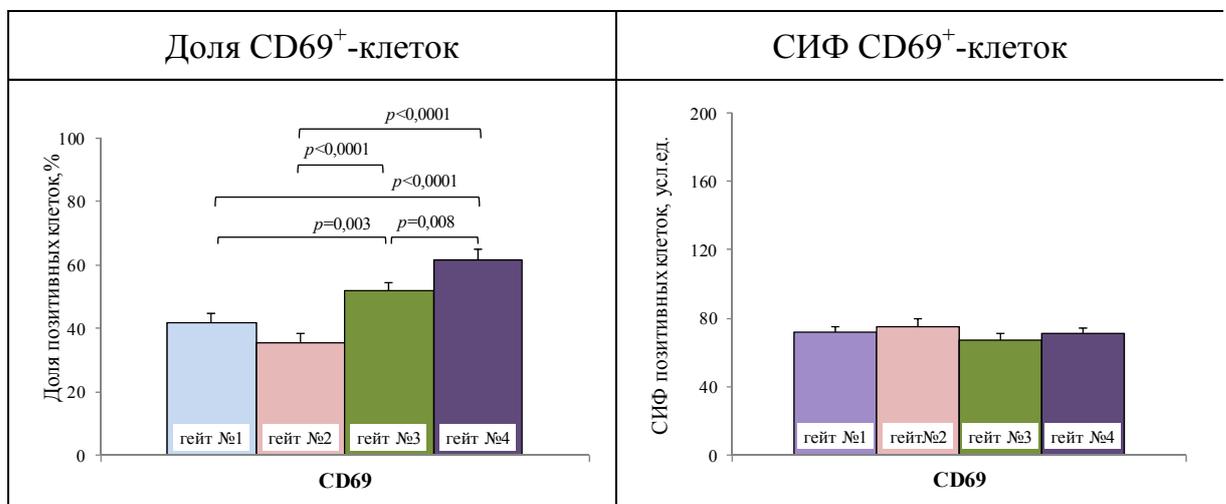


Рисунок 3.17. Доля митоген-стимулированных мононуклеаров, экспрессирующих CD69 в условиях добавления в культуральную среду аутологичной сыворотки, и СИФ положительных клеток в различных гейтах

Расчетные величины блокирующего эффекта аутологичной сыворотки на собственные лимфоциты в культуре с учетом доли лимфоцитов,

экспрессирующих CD69 в различных гейтах, представлены на рисунке 3.18.

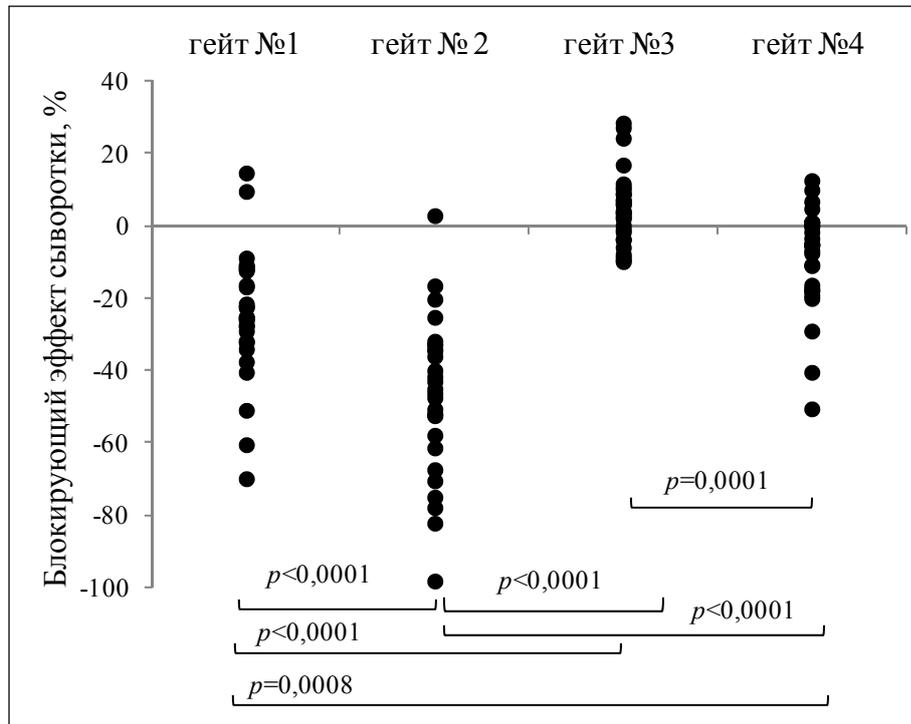


Рисунок 3.18. Расчетная величина блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки в различных гейтах

Средняя расчетная величина блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки в гейте №1 составила минус $24,5 \pm 3,4$, в гейте №2 - минус $47,8 \pm 4,1$, в гейте №3 - плюс $4,9 \pm 1,9$, в гейте №4 - минус $9,0 \pm 2,7$. Указанные величины значительно различаются между собой.

Таким образом, расчетные величины блокирующего эффекта аутологичной сыворотки при использовании доли CD69-позитивных клеток в разных гейтах достоверно отличаются.

С учетом изложенного, были сформулированы два направления исследований. Первое было связано с использованием для оценки экспрессии CD69 и расчета блокирующего эффекта аутологичной сыворотки универсального гейта №1, поскольку он охватывает все типы CD69-позитивных клеток и дает

обобщенный расчет блокирующего эффекта (пункт 3.3.2). Второй был связан с оценкой экспрессии раннего активационного маркера CD69 в условиях краткосрочной митогенной стимуляции лимфоцитов периферической крови, при которой на цитограмме по светорассеянию еще не регистрируется морфологическая гетерогенность клеток (пункт 3.3.3).

3.3.2. Активационная способность лимфоцитов периферической крови и блокирующий эффект аутологичной сыворотки пациенток с ИПВ

Исследованию блокирующих антител в смешанной культуре лимфоцитов партнеров в парах с ИПВ в период ранней беременности было посвящено значительное количество работ [46, 47]. Однако вследствие выраженной гетерогенности выборок пациентов для анализа и гетерогенности схем выявления блокирующих антител однозначного вывода о значимости их для реализации раннего выкидыша сделано не было [3, 74, 282].

Тем не менее интерес к исследованию блокирующих факторов сыворотки беременных поддерживается до настоящего времени [54]. В экспериментальных моделях на линейных мышах показано снижение под влиянием сыворотки беременных самок способности дендритных клеток индуцировать антиген-специфическую пролиферацию и цитокиновую секрецию клетками лимфатических узлов [34]. Нами был предложен способ оценки блокирующего эффекта сыворотки по ее влиянию на экспрессию раннего маркера активации CD69 аутологичными лимфоцитами, стимулированными *in vitro* митогеном [317]. Ранее было показано подавление аутологичной сывороткой реакции бласттрансформации в культуре в различных экспериментальных условиях [31, 327, 328, 329, 330]. Целью настоящей работы было исследование блокирующего эффекта аутологичной сыворотки на активацию лимфоцитов женщин с привычным невынашиванием в анамнезе при подготовке к беременности и в

течение последующей беременности.

Основаниями для проведения излагаемых ниже исследований послужили следующие теоретические и экспериментальные положения:

- неадекватное распознавание антигенов отца иммунной системой женщин с ИПВ в анамнезе приводит к нарушению формирования толерантности к антигенам плода и его отторжению [3, 183, 331, 332];

- формирование толерантности связано с образованием антител, блокирующих функцию цитотоксических лимфоцитов, специфичных к чужеродным антигенам (в данном случае, плода) [44, 45];

- эффективность блокирующих антител *in vitro* можно оценить в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов партнеров по блокированию реакции в СКЛ супругов [6, 46];

- антитела, блокирующие реакцию в СКЛ супругов, блокируют ответ женских лимфоцитов на митоген [56];

- оценка экспрессии раннего маркера активации CD69 коррелирует с оценкой пролиферативного потенциала лимфоцитов по включению в синтез ДНК радиоактивно меченного H^3 -тимидина только в реакции бласттрансформации лимфоцитов (в ответе лимфоцитов на митоген и в сроки активации менее 72 часов), но не в СКЛ [228, 232, 333];

- увеличение экспрессии раннего активационного маркера CD69 коррелирует с острым отторжением трансплантата [254, 255].

Оценку содержания лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих CD69 после 72-часовой митогенной стимуляции *in vitro*, проводили вне беременности у 11 фертильных женщин и у 33 пациенток с ПВ неясного генеза в анамнезе. Было показано, что, в целом, доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* через 72 часа после митогенной стимуляции, у пациенток с ИПВ - ниже, а блокирующий эффект аутологичной сыворотки (БЭ) - выше, чем у фертильных здоровых женщин (таблица 3.11).

Таблица 3.11 - Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* после стимуляции ФГА, и БЭ аутологичной сыворотки у пациенток с ИПВ при обследовании вне беременности ($M \pm m$)

Группа обследованных женщин	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.

Через 2-3 месяца после двух процедур аллоиммунизации в предгестационной подготовке 23 пациентки забеременели, у 17 из них беременность была пролонгирована до доношенного срока, у 6 произошел самопроизвольный выкидыш в I триместре. Характеристики экспрессии CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции лимфоцитов и БЭ сыворотки в течение предгестационной аллоиммунизации у пациенток с пролонгированной беременностью приведены в таблице 3.12.

Был проведен анализ экспрессии CD69 *in vitro* после митогенной стимуляции лимфоцитов и БЭ сыворотки в течение предгестационной аллоиммунизации у пациенток с пролонгированной беременностью и у пациенток, не забеременевших после предгестационной аллоиммунизации. Данные приведены в таблице 3.13.

Таблица 3.12 - Экспрессия CD69 *in vitro* митоген-стимулированными лимфоцитами и БЭ аутологичной сыворотки во время предгестационной подготовки пациенток с пролонгированной беременностью (n=17, M±m)

Группа обследованных	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	СИФ позитивных клеток, УЕФ	БЭ, %
Фертильные (n=11)	76,6 ± 1,7	53,6 ± 6,0	27,5 ± 1,9
Пациентки с ИПВ до аллоиммунизации	70,9 ± 3,4	50,8 ± 5,8	29,1 ± 5,3
Пациентки с ИПВ после аллоиммунизации	70,5 ± 3,2	48,4 ± 5,9	24,1 ± 3,0

Примечание. СИФ - средняя интенсивность флуоресценции. УЕФ - условные единицы флуоресценции. n-количество обследованных. БЭ представлен по абсолютной величине. * - отличия от контроля значимы ($p < 0,05$).

Таблица 3.13 - Экспрессия CD69 *in vitro* митоген-стимулированными лимфоцитами и БЭ аутологичной сыворотки во время предгестационной подготовки у пациенток, у которых беременность не наступила в течение 2-х лет наблюдения (n=10, M±m)

Группа обследованных	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	СИФ позитивных клеток, УЕФ	БЭ, %
Фертильные (n=11)	76,6 ± 1,7	53,6 ± 6,0	27,5 ± 1,9
Пациентки с ИПВ до аллоиммунизации	66,9 ± 5,2 *	54,2 ± 6,2	37,9 ± 6,0*
Пациентки с ИПВ после аллоиммунизации	57,9 ± 6,5 *	45,3 ± 9,9	55,8 ± 5,2 ***

Примечание. СИФ - средняя интенсивность флуоресценции. УЕФ - условные единицы флуоресценции. n-количество обследованных. БЭ представлен по абсолютной величине. * - отличия от контроля (фертильные) значимы ($p < 0,05$). ** - различия значимы ($p < 0,05$) при сравнении со значениями в группе пациенток с пролонгированной беременностью (первичные данные в таблице 3.12).

У пациенток с пролонгированной беременностью до начала лечения и после аллоиммунизации в предгестационной подготовке доля митоген-стимулированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69, не отличалась от значений в контроле (таблица 3.12).

У пациенток, не забеременевших после предгестационной аллоиммунизации, доля митоген-стимулированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69, была значимо меньше, чем у фертильных женщин, как до аллоиммунизации, так и после нее, при этом отличий в СИФ позитивных клеток не выявлено (таблица 3.13).

Блокирующий эффект аутологичной сыворотки в группе женщин с пролонгированной беременностью не отличался от такового у фертильных женщин и до назначения предгестационной аллоиммунизации и после ее проведения (таблица 3.12), а в группе женщин, у которых беременность не наступила в течение двухлетнего периода наблюдения, блокирующий эффект аутологичной сыворотки до назначения лечения был выше, чем у фертильных женщин, а после проведенной предгестационной аллоиммунизации отмечено его дальнейшее увеличение (таблица 3.13).

Из полученных данных можно сделать предположение, что избыточное подавление активных иммунных реакций в предгестационной аллоиммунизации не способствует успешной имплантации, что согласуется с постулатами о необходимости провоспалительных реакций как для наступления беременности, так и для ее развития в ранние сроки [174].

В I триместре у пациенток с ИПВ, беременность которых завершилась рождением живого ребенка, доля CD69⁺-клеток была $66,4 \pm 2,2\%$, что оказалось ниже ($p=0,0003$), чем вне беременности у фертильных женщин ($76,6 \pm 1,7\%$ - из данных в таблице 3.12). При этом отличий от значений в предгестационной подготовке не обнаружено ($70,9 \pm 3,4\%$ и $70,5 \pm 3,2\%$ - до и после предгестационной аллоиммунизации - из данных в таблице 3.12). Однако СИФ позитивных клеток в I триместре, равная $65,9 \pm 5,4$ УЕФ, не отличаясь от контрольных значений вне беременности ($53,6 \pm 6,0$ УЕФ), превышала значения, которые были

зарегистрированы до предгестационной аллоиммунизации ($50,8 \pm 5,7 \text{ УЕФ}$, $p=0,03$) и после аллоиммунизации вне беременности ($48,4 \pm 5,6 \text{ УЕФ}$, $p=0,017$).

Результаты исследования блокирующего эффекта аутологичной сыворотки у пациенток с ИПВ, забеременевших после проведенной предгестационной аллоиммунизации, в целом, представлены на рисунке 3.19.

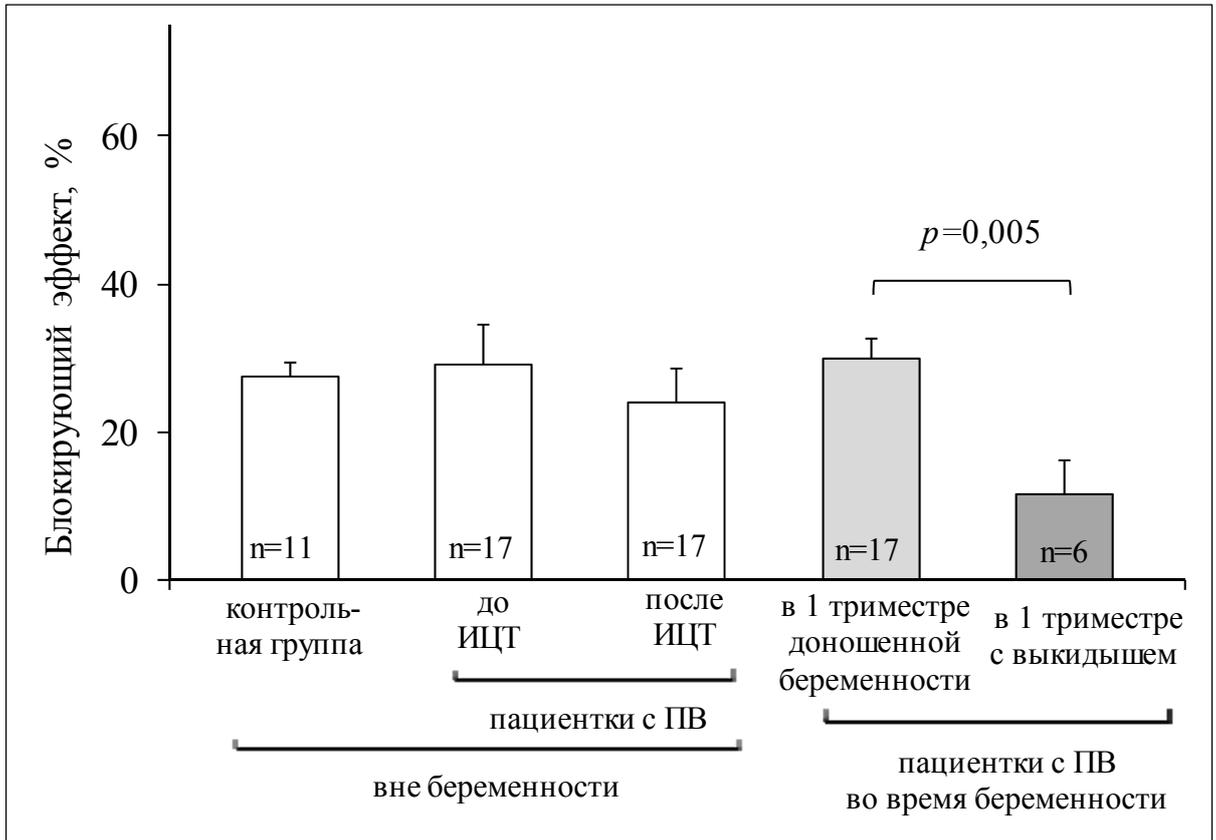


Рисунок 3.19 - Блокирующий эффект аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов пациенток с ИПВ

Как уже отмечалось, до предгестационной аллоиммунизации БЭ аутологичной сыворотки пациенток с ИПВ был сходен с таковым у фертильных женщин. После предгестационной аллоиммунизации изменений в БЭ сыворотки не выявлены.

В течение I триместра беременности БЭ аутологичной сыворотки пациенток с пролонгированной беременностью, в целом (17 пациенток, но 39 измерений в разные сроки I триместра), оставался сходным с контрольными, с исходными

значениями вне беременности и со значениями после предгестационной аллоиммунизации. Однако у пациенток, потерявших наступившую беременность, блокирующий эффект аутологичной сыворотки в I триместре был существенно меньше, чем у пациенток с пролонгированной беременностью ($p=0,005$) (рисунок 3.19).

У 17 пациенток в течение беременности, пролонгированной на фоне аллоиммунизации в I триместре и завершившейся рождением живого ребенка, прослежена динамика блокирующей активности аутологичной сыворотки. Во время беременности у этих пациенток выявлены значительные изменения блокирующего эффекта (рисунок 3.20).

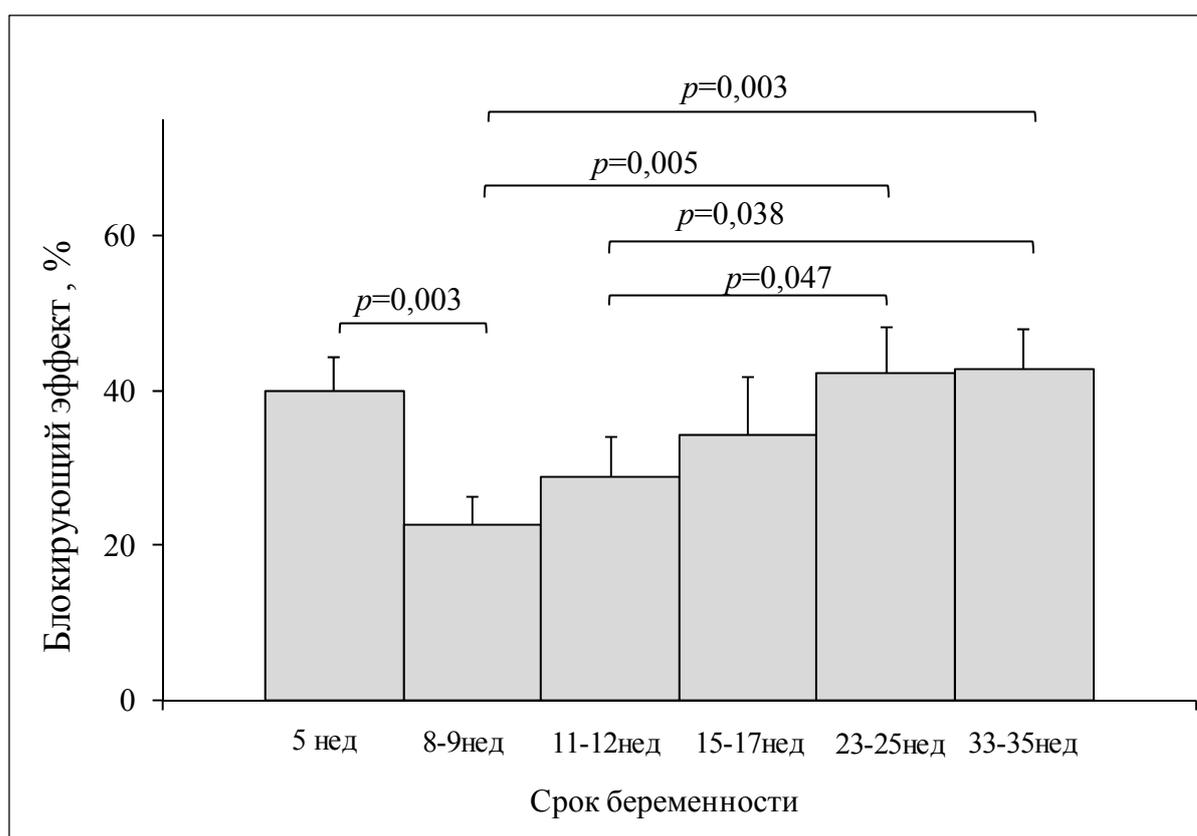


Рисунок 3.20 - Динамика блокирующего эффекта аутологичной сыворотки на митогенную активацию лимфоцитов женщин с ИПВ в течение беременности, завершившейся рождением живого ребенка

Максимальные значения блокирующего эффекта наблюдались на ранних сроках беременности (5 недель) и на более поздних сроках беременности (23 - 25 недель и 33 - 35 недель). Резкое уменьшение блокирующего эффекта было зарегистрировано на сроке 8 - 9 недель, а при дальнейшем развитии беременности наблюдался плавный рост этого параметра.

Данные о динамике блокирующей активности сыворотки в течение I триместра у женщин с пролонгированной беременностью подтверждают значимость при имплантации высокого уровня иммуносупрессии, отражающего усиление иммунного контроля необходимого для имплантации уровня провоспалительного ответа на специфические аллоантигены плода.

В сроке 5 недель беременности зарегистрирован максимально высокий уровень блокирующей активности сыворотки в сравнении с последующими периодами I триместра. В работе по оценке значения ИЦТ в оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения у супружеских пар с совместимостью по антигенам HLA-системы также было показано, что увеличение блокирующего эффекта аутологичной сыворотки после ИЦТ является важным для прогнозирования успеха имплантации перенесенного после ЭКО эмбриона [334].

В сроке 8 - 9 недель происходило резкое падение блокирующего эффекта до минимальных значений среди зарегистрированных в I триместре. Вероятно, высокая блокирующая активность имеет значение именно для периода имплантации, а дальнейший процесс развития беременности, видимо, протекает на фоне снижения иммуносупрессии. Минимальное значение блокирующей активности сыворотки в 8-9 недель гестации может отражать ослабление иммунного контроля первой волны инвазии трофобласта в спиральные артерии матки.

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. Следовательно, низкий уровень блокирующей активности сыворотки на ранних сроках беременности является маркером угрозы прерывания беременности: при условии БЭ < 23,2% могут быть выявлены практически все пациенты с угрозой выкидыша (чувствительность теста 100%). При этом с вероятностью 46% (специфичность теста 46%) в эту группу будут попадать и пациентки без такой угрозы. Однако, учитывая, что все женщины с ИПВ в анамнезе в течение I триместра обязательно получают ИЦТ, то те из них, у которых на фоне терапии блокирующий эффект аутологичной сыворотки менее 23%, должны рассматриваться как группа повышенного риска.

Также выявлено, что в 8-9 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью была отмечена меньшая, чем у женщин с выкидышем ($n=6$), доля клеток, экспрессирующих CD69 через 72 часа после митогенного стимула ($66,4 \pm 2,2\%$ и $82,8 \pm 1,7\%$, соответственно, $p=0,0003$), но с большей СИФ ($65,9 \pm 5,4$ УЕФ и $48,6 \pm 6,4$ УЕФ, соответственно, $p=0,04$), то есть с большей плотностью маркера на клетке.

Проведенный расчет диагностической значимости определения доли CD69⁺-клеток в 8-9 недель гестации у женщин с ИПВ показал, что при превышении доли CD69⁺-клеток критерияльного значения в 82,1% с чувствительностью 80,0% и специфичностью 93,3% (при 95% доверительном интервале) можно прогнозировать развитие самопроизвольного выкидыша. Забеременевшие женщины с ИПВ, у которых в течение I триместра на фоне аллоиммунизации доля CD69⁺-клеток после стимуляции митогеном *in vitro* превышает 82,1%, должны рассматриваться как группа повышенного риска реализации выкидыша.

Следовательно, доля клеток, экспрессирующих CD69 после митогенного стимула, может быть важным показателем для прогноза потери беременности у женщин с ИПВ, забеременевших после предгестационной аллоиммунизации.

Начиная с 11-12 недель беременности, блокирующая активность сыворотки увеличивается, и на сроке 23-25 и 33-35 недель она значимо выше, чем в

I триместре. Такая динамика свидетельствует об изменении функционального состояния иммунной системы женщин в ходе беременности, связанном с увеличением содержания в сыворотке факторов, подавляющих функциональную активность собственных иммунокомпетентных клеток, что согласуется с представлениями о развитии неспецифической гестационной иммуносупрессии [32, 41, 50, 60, 335, 336].

Исследование пролиферативного ответа лимфоцитов на митогены в течение беременности проводилось неоднократно. Большинство исследователей считает, что во время беременности происходит снижение по сравнению с небеременными женщинами митоген-индуцированной пролиферации клеток *in vitro* в ответ на ФГА, КонА. Было показано, что уровень митотической активности лимфоцитов зависит от срока гестации, при этом минимальная активность наблюдается во втором триместре беременности и в этот же период *in vitro* обнаруживается максимальная супрессорная активность аутологичной сыворотки [32, 59].

Считается, что с увеличением срока беременности пролиферативный ответ на аллоантигены и митогены постепенно ослабевает, и во второй половине беременности начинают преобладать неспецифические иммуносупрессивные эффекты сыворотки, связанные с присутствием в крови белков и гормонов беременности, с наличием блокирующих антител, с повышением уровня кортизола, с усилением синтеза простагландина Е макрофагами и Т-лимфоцитами и др. Не исключено, что увеличение блокирующей активности в третьем триместре может отражать и специфическую активацию иммуносупрессивных механизмов, подавляющих избыточный иммунный ответ на усиленную аллогенную стимуляцию со стороны развивающегося плода.

Таким образом, проведенные исследования показали значимость оценки активационной способности лимфоцитов периферической крови по экспрессии CD69 и расчету на ее основе блокирующего эффекта аутологичной сыворотки. Оценка блокирующей активности сыворотки периферической крови представляется перспективной для использования в качестве одного из лабораторных критериев эффективности предгестационной подготовки с

использованием ИЦТ, а также в качестве одного из показателей угрозы выкидыша у женщин с ИПВ на сроке 8-9 недель гестации.

В целом, нами подтверждено наличие феномена неспецифической иммуносупрессии, сопровождающей развитие неосложненной беременности, и показана важная роль неспецифических растворимых факторов в формировании блокирующего эффекта сыворотки. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе представлениями о характере изменений иммунной системы во время беременности. Оценка блокирующего эффекта аутологичной сыворотки представляется важной для понимания механизмов контроля интенсивности провоспалительных реакций материнского организма для наступления и пролонгирования беременности.

3.3.3. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 после краткосрочной митогенной стимуляции *in vitro* лимфоцитами периферической крови женщин с ИПВ в течение предгестационной подготовки и в I триместре гестации

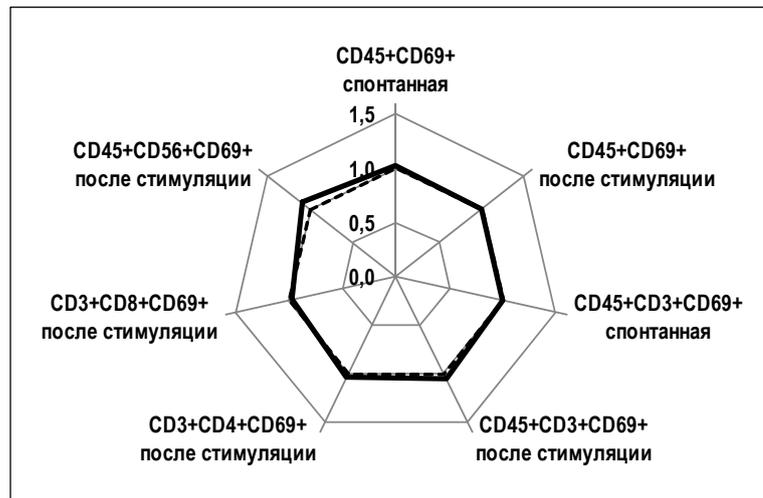
Спонтанную и митоген-индуцированную экспрессию раннего активационного маркера CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD56⁺ после 2-часовой митогенной стимуляции *in vitro* определяли у 34 пациенток с ИПВ до назначения аллоиммунизации, а также после аллоиммунизации в предгестационной подготовке. Контрольная группа состояла из 15 фертильных женщин. Митоген-индуцированную экспрессию CD69 оценивали по методу FastImmune (глава 2). Результаты анализа представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 - Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ вне беременности (M±m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Условия экспрессии	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
		в контрольной группе (n=15)	в группе с ИПВ (n=34)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	7,9 ± 0,8	7,2 ± 0,6
CD45 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	30,7 ± 2,9	28,0 ± 2,1
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	6,2 ± 0,6	5,7 ± 0,5
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	25,7 ± 3,7	25,0 ± 2,2
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	15,9 ± 2,2	14,7 ± 1,3
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	12,8 ± 1,6	10,3 ± 1,0
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	3,8 ± 0,5	4,0 ± 0,5

Как видно из представленных данных, различий в контрольной группе женщин и в группе пациенток с ИПВ до назначения лечения ни по одному из анализируемых параметров не обнаружено. Полученный результат не совпадает с выводом о повышенной и поверхностной и внутриклеточной экспрессии CD69 Т - лимфоцитами и НК-клетками периферической крови женщин с ИПВ, опубликованным в работе [337, 354], что, по-видимому, отражает особенности представленной выборки пациенток, связанные с отсутствием инфекционно-воспалительных заболеваний (один из критериев включения в группу исследования).

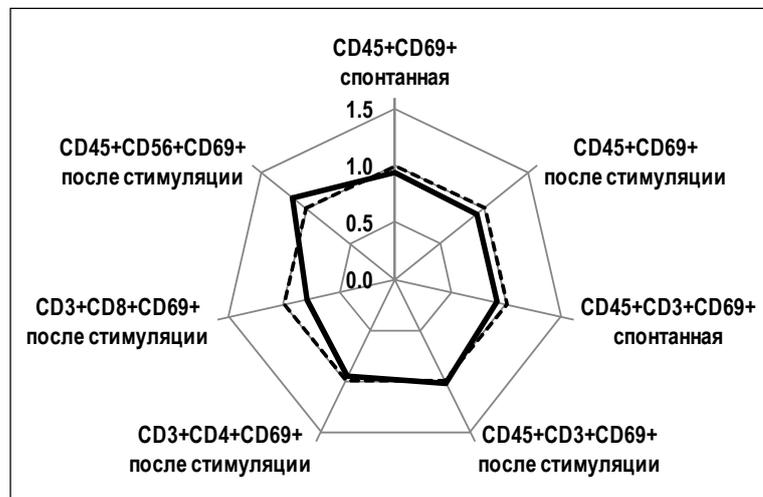
Результаты анализа содержания лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток после предгестационной аллоиммунизации представлены на рисунках 3.21 и 3.22. Как следует из представленных данных, после аллоиммунизации значения всех анализируемых параметров не отличались ни от исходных значений (рисунок 3.21), ни от значений у женщин контрольной группы (рисунок 3.22).



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток после аллоиммунизации к средним значениям до лечения.

Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

Рисунок 3.21 - Содержание активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации (I)



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток после аллоиммунизации к средним значениям у женщин контрольной группы. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений.

Рисунок 3.22 - Содержание активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации (II)

Отсутствие изменений в экспрессии CD69 Т-клетками и NK-клетками после предгестационной иммунотерапии согласуется с данными других исследователей [307, 308, 338]. Усиление экспрессии CD69 NK-клетками зарегистрировать не удалось, что можно считать положительным результатом аллоиммунизации.

В первом триместре гестации основную группу исследования составила 31 беременная, при этом у 25 пациенток беременность была пролонгирована до доношенного срока, у 6 - беременность прервалась в первом триместре. Контрольную группу составили 11 женщин в сроке 12 недель физиологической беременности.

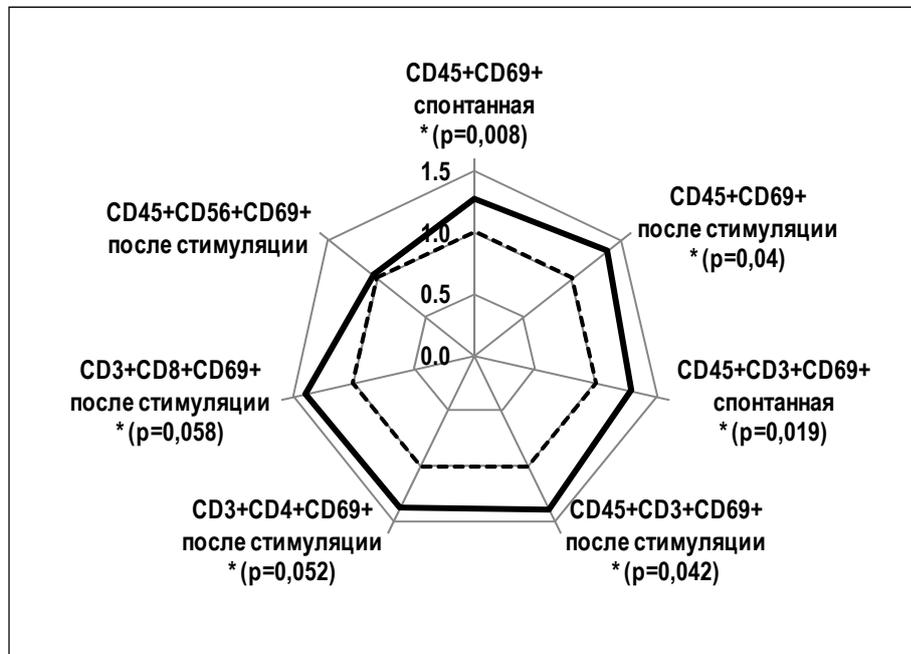
Результаты оценки спонтанной экспрессии CD69 на поверхности CD45⁺ и CD3⁺-лимфоцитов и индуцированной экспрессии CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD56⁺ у пациенток в первом триместре пролонгированной беременности представлены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 - Содержание активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ в течение первого триместра беременности, пролонгированной на фоне аллоиммунизации до доношенного срока (M±m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Условия экспрессии	Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (%), у беременных с ИПВ		
		в 5-6 нед (n=19)	в 8-9 нед (n=18)	в 12 нед (n=11)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	6,5 ± 0,6	5,9 ± 0,6	7,0 ± 0,5
CD45 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	29,2 ± 4,0	33,6 ± 2,8	37,2 ± 5,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	5,0 ± 0,5	5,9 ± 0,6	5,0 ± 0,4
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	26,0 ± 3,6	29,7 ± 3,1	35,4 ± 5,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	15,9 ± 2,6	17,6 ± 1,9	18,4 ± 2,5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	10,7 ± 1,3	12,8 ± 1,7	17,0 ± 4,6
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	после стимуляции	4,6 ± 0,6	4,7 ± 0,6	6,3 ± 2,5

Как видно из представленных данных, изменений анализируемых показателей в течение первого триместра не выявлено.

Результаты сравнения исследованных показателей в 5-6 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и у пациенток с выкидышем представлены на рисунке 3.23. Количество лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD69^+$ у женщин с выкидышем было значимо выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью, как при оценке спонтанной экспрессии маркера, так и после стимуляции митогеном. При этом отличий в количестве лимфоцитов с киллерной функцией $CD56^+CD69^+$ не выявлено.



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с выкидышем (n=6) к средним значениям у пациенток с пролонгированной беременностью (n=31). Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - различия между группами достоверны.

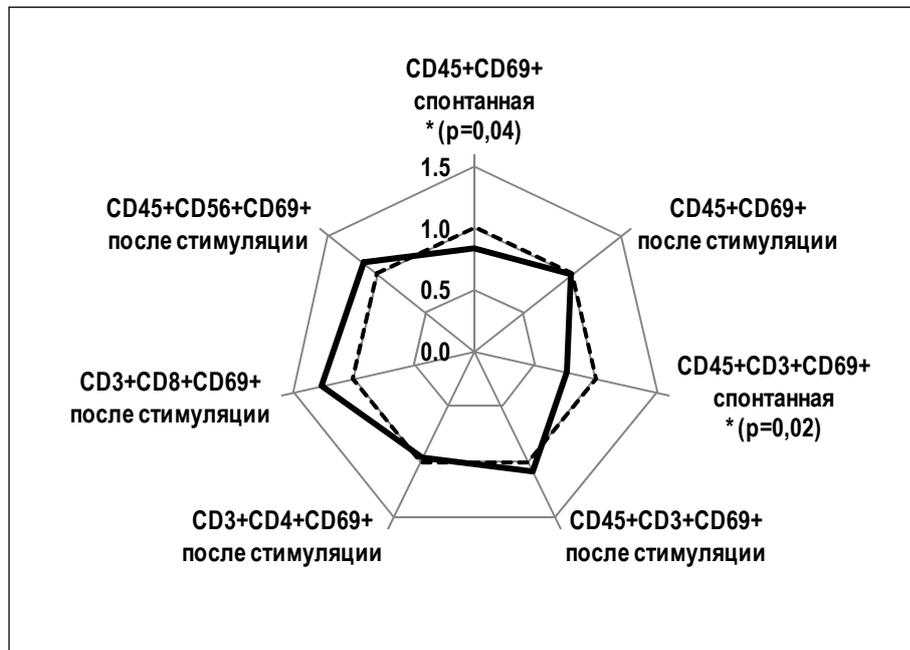
Рисунок 3.23 - Доля активированных лимфоцитов в 5-6 недель гестации у пациенток с ИПВ, потерявших беременность

Приведенные результаты согласуются с данными иммуногистохимических исследований активационного статуса различных субпопуляций лимфоцитов в децидуальной оболочке abortивного материала, полученного от пациенток с выкидышем в сравнении с материалом, полученным от женщин с медицинским абортom [339]. Отмечено, что в децидуальной оболочке abortивного материала, полученного от пациенток с ИПВ, при увеличении числа активированных лейкоцитов других субпопуляций не зарегистрировано увеличения числа натуральных киллерных клеток. Авторы сделали вывод о вовлечении клеток адаптивного иммунитета в реализацию ПВ. В более ранней работе [340] также было показано, что в децидуальной оболочке abortивного материала от пациенток с ИПВ в анамнезе больше активированных лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD69^+$, чем с фенотипом $CD56^+CD69^+$.

Приведенные результаты согласуются также и с данными собственных исследований. В сроке 5-6 недель гестации у беременных с выкидышем содержание в периферической крови субпопуляций с киллерной активностью ($CD56^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD16^+$) было даже значимо ниже, чем у пациенток с пролонгированной беременностью [341].

Сравнение анализируемых показателей в 12 недель гестации у женщин с физиологическим течением беременности и у пациенток с пролонгированной беременностью представлено на рисунке 3.24.

У пациенток с пролонгированной беременностью значимо меньше содержание в периферической крови клеток с фенотипом $CD45^+CD69^+$ и клеток с фенотипом $CD3^+CD69^+$, но при этом не обнаружено различий в количестве клеток всех исследованных субпопуляций, экспрессирующих $CD69$ после стимуляции *in vitro*. Полученный результат свидетельствует о том, что у пациенток с ИПВ в случае пролонгирования беременности на фоне аллоиммунизации ответ лимфоцитов периферической крови *in vitro* на стимулирующее воздействие в сроке 12 недель не отличается от ответа лимфоцитов в группе женщин с физиологическим течением беременности.



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с пролонгированной беременностью к средним значениям у женщин с физиологическим течением беременности. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - различия между группами достоверны.

Рисунок 3.24 - Содержание активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ в 12 недель беременности, пролонгированной до доношенного срока

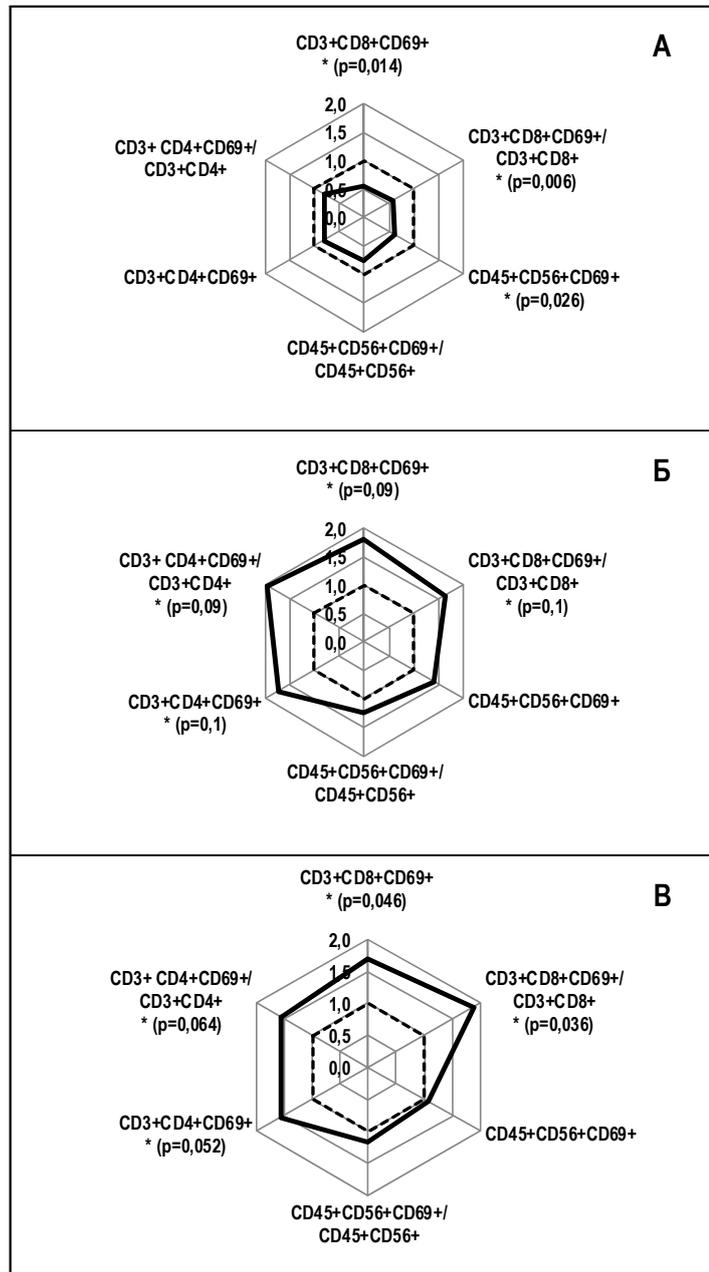
Можно предположить, что во время беременности уровень спонтанной экспрессии CD69 на поверхности Т-лимфоцитов является маркером уровня специфического ответа Т-лимфоцитов на антигены плода. Возможно, что у женщин с выкидышем повышен не только ответ лимфоцитов на поликлональную стимуляцию, выявленный в 5-6 недель, но также и специфический ответ Т-лимфоцитов на антигены плода, о чем свидетельствует повышенная спонтанная экспрессия маркера Т-лимфоцитами у этой группы пациенток. Нельзя исключить, что у пациенток с пролонгированной беременностью аллоиммунизация способствовала предотвращению избыточного ответа

лимфоцитов как на поликлональную стимуляцию, так и на стимуляцию антигенами плода, поэтому уровень экспрессии CD69 на поверхности CD3⁺-лимфоцитов у этой категории пациенток был стабильным на всех сроках беременности.

У женщин с пролонгированной беременностью (n=30) и с выкидышем (n=6) был проведен анализ доли активированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro*, среди субпопуляций с фенотипом CD45⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ в сроках от начала предгестационной подготовки до 5 - 6 недель наступившей беременности (рисунок 3.25).

Выявлено, что у пациенток с выкидышем уже до предгестационной подготовки была снижена доля Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией (CD3⁺CD8⁺), экспрессирующая на своей поверхности CD69 (рисунок 3.25, А). После аллоиммунизации вне беременности у пациенток с выкидышем отмечались тенденции к повышению доли активированных Т-клеток ($p=0,09$) (рисунок 3.25, Б). В 5-6 недель гестации между группами женщин с выкидышем и с пролонгированной беременностью не обнаружено разницы в доле экспрессирующих CD69 *in vitro* NK-клеток (рисунок 3.25, В), но было зарегистрировано повышение уровня экспрессирующих CD69 Т-клеток и особенно доли активированных *in vitro* CD3⁺CD8⁺CD69⁺-клеток среди CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов ($p=0,036$).

Для показателей, значимо различающихся между группами пациенток с выкидышем и пролонгированной беременностью, были рассчитаны характеристики диагностической значимости для прогноза потери беременности как до назначения аллоиммунизации в предгестационной подготовке (таблица 3.16), так и в 5-6 недель беременности (таблица 3.17).



По осям представлены отношения средних показателей у пациенток с выкидышем к средним значениям у пациенток с пролонгированной беременностью: А - до аллоиммунизации, Б - после предгестационной аллоиммунизации, В - в 5-6 недель гестации. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - различия между группами достоверны.

Рисунок 3.25 - Доля активированных *in vitro* лимфоцитов у пациенток с ИПВ с разными исходами беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации

Таблица 3.16 - Диагностическая значимость для прогноза выкидыша у пациенток с ИПВ определения субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* через 2 часа после стимуляции митогеном вне беременности

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

Таблица 3.17 - Диагностическая значимость для прогноза выкидыша у пациенток с ИПВ в 5-6 недель беременности определения субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* через 2 часа после стимуляции митогеном

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

Известно, что чувствительность теста - это вероятность того, что тест будет положительным, если пациент действительно болен, и специфичность теста - вероятность того, что тест будет отрицательным, если пациент здоров.

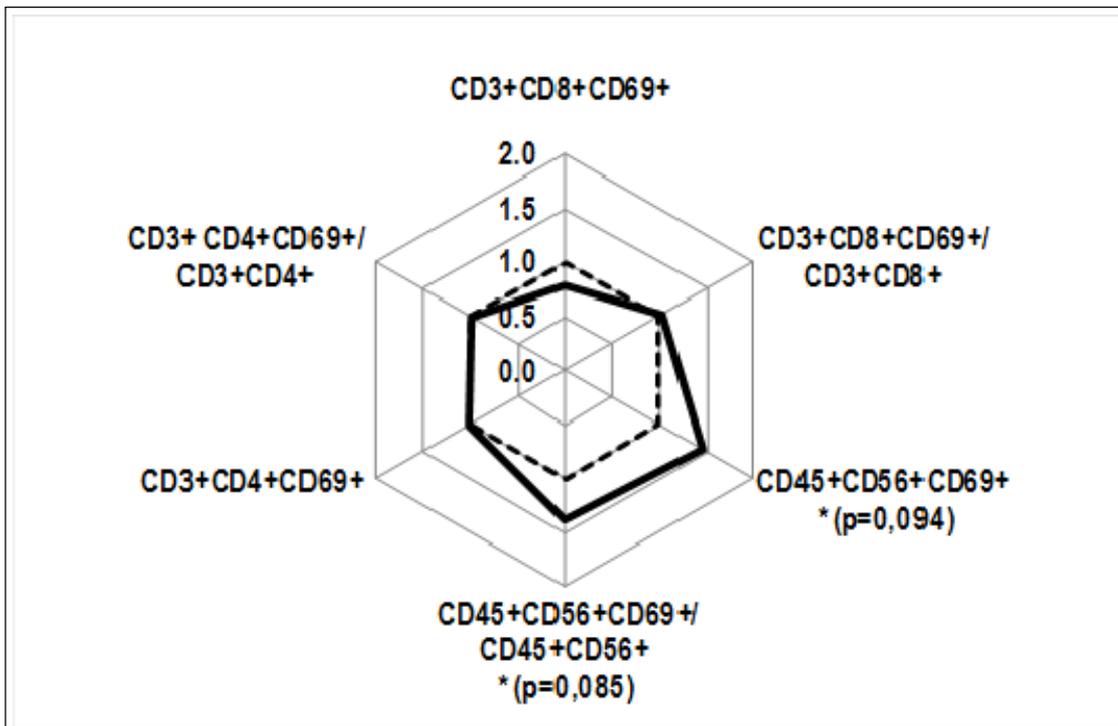
Поэтому, в соответствии с данными таблицы 3.16, 100%-ная специфичность тестов определения активированных цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток означает, что у всех пациенток, имеющих вероятность выносить следующую беременность, тесты будут отрицательными, однако примерно у 35% пациенток, у которых есть вероятность потерять беременность, тест также будет отрицательным.

В 5-6 недель беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации, у 100% пациенток, способных доносить наступившую беременность, будут отрицательными тесты определения активированных лимфоцитов в субпопуляции $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ (таблица 3.17), но примерно в 30% случаев у пациенток, способных потерять беременность, тесты определения активированных лимфоцитов в субпопуляции $CD3^+CD4^+$ также будут отрицательным, а в случае определения активированных лимфоцитов среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов - даже в половине случаев.

Тем не менее, высокая специфичность указанных тестов позволяет выявлять пациенток с угрозой выкидыша, что может иметь значение для персонализированного назначения терапии таким пациенткам.

Сравнение доли экспрессирующих *in vitro* CD69 субпопуляций лимфоцитов в сроке 12 недель гестации у пациенток с пролонгированной беременностью и у беременных контрольной группы (n=11) представлено на рисунке 3.26.

Как следует из рисунка 3.26, в 12 недель гестации различий в уровне экспрессии *in vitro* CD69 Т-лимфоцитов у женщин с физиологически протекающей беременностью и у пациенток с пролонгированной беременностью не выявлено. Отмечается тенденция к увеличению доли экспрессирующих CD69 НК-клеток, что вместе с данными об увеличении к этому сроку в периферической крови пациенток с пролонгированной беременностью Трег-клеток и $CD200^+$ -лимфоцитов (параграф 3.2) может свидетельствовать о нормализации состояния иммунной системы пациенток с ИПВ после проведения аллоиммунизации и о необходимости активации НК-клеток для развития беременности.



По осям представлены отношения средних значений показателей у пациенток с пролонгированной беременностью к средним значениям у женщин с физиологическим течением беременности. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - различия между группами достоверны.

Рисунок 3.26 - Доля активированных *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ в 12 недель пролонгированной беременности

Таким образом, проведенные исследования показали важность исследования экспрессии раннего активационного маркера CD69 для понимания клеточных механизмов пролонгирования или прерывания беременности.

3.4. Продукция цитокинов *in vitro* митоген-стимулированными клетками периферической крови женщин с ИПВ

Формирование толерантности к отцовским антигенам плода связано с формированием периферических индуцибельных специфических Трег-клеток, зависимым, в том числе и от цитокинового окружения. Сниженная функция Трег и снижение их содержания в периферической крови и в децидуальной оболочке при ПВ отмечается в ряде исследований и является отражением хронического воспаления у этой категории пациенток [11, 224, 225, 226]. Кроме того, известно, что успешное протекание процессов имплантации и инвазии трофобласта во многом зависит от функционирования децидуальных НК-клеток, обеспечивающих ремоделирование спиральных артерий матки. Развитие децидуальных НК-клеток происходит под влиянием необходимого микроокружения, появляющегося в случае адекватного распознавания фетальных антигенов, что, в свою очередь, является условием возникновения специфической периферической толерантности при нормальной беременности [152]. Именно цитокины образуют регуляторную сеть, обеспечивающую равновесие иммунных реакций между материнским организмом и плодом. От баланса цитокинов в регуляторной сети зависит характер течения ранних сроков беременности [342, 343].

Поэтому исследования цитокинового профиля супернатантов активированных *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ является актуальной задачей для понимания механизмов, лежащих как в основе формирования иммунной толерантности к аллоантигенам плода, так и в основе ее нарушения.

3.4.1. Продукция цитокинов *in vitro* митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови пациенток с ИПВ в процессе предгестационной аллоиммунизации и в первом триместре наступившей беременности

Оценка цитокиновой продукции митоген-стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови проведена у 33 пациенток с ИПВ, забеременевших после предгестационной аллоиммунизации. При этом обследовано 19 пациенток до назначения ИЦТ, после аллоиммунизации вне беременности - 16, в 5-6 недель наступившей беременности - 17 и в 12 недель - 11 пациенток. В контрольной группе проанализировано 12 фертильных женщин вне беременности и 9 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Результаты анализа цитокиновой продукции клетками цельной крови до предгестационной подготовки женщин с ИПВ представлены в таблице 3.18. Как видно из представленных данных, до назначения аллоиммунизации вне беременности продукция ИЛ-4 митоген-стимулированными клетками цельной крови пациенток с ИПВ была значимо выше. Обнаружена тенденция к увеличенной продукции ИЛ - 2, который вырабатывается в ответ на митогенную стимуляцию не только Т-, но и В-лимфоцитами и сам стимулирует выработку как других провоспалительных цитокинов, так и ИЛ - 4. Одной из функций ИЛ-4 является подавление секреции макрофагами ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-6, что подтверждается выявленными нами тенденциями к снижению продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6. При этом соотношения ИЛ-1 β /ИЛ-4 и ИЛ-1 β /ИЛ-10 были значимо ниже, чем у женщин контрольной группы. Также значимо ниже, чем в контроле, оказалось соотношение ИЛ-5/ИЛ - 10 при тенденции к снижению продукции ИЛ-5 (цитокин из группы гранулоцитарно-макрофагальных колоние-стимулирующих факторов) клетками крови пациенток с ИПВ.

Таблица 3.18 - Характеристика продукции цитокинов *in vitro* клетками стимулированной цельной крови женщин с ИПВ вне беременности

Группа параметров	Параметр, ед.изм.	Значения параметра		p-значение
		в контрольной группе (n=12)	у женщин с ИПВ (n=19)	
1	2	3	4	5
Содержание цитокинов	ФНО- α , пг/мл	10450 \pm 1446	9753 \pm 1315	0,362
	ИФН- γ , пг/мл	3109 \pm 530	3926 \pm 814	0,204
	ИЛ-1 β , пг/мл	3693 \pm 546	2689 \pm 397	0,076
	ИЛ-2, пг/мл	194 \pm 32	265 \pm 39	0,084
	ИЛ-4, пг/мл	20,4 \pm 1,5	38,5 \pm 7,2	0,012
	ИЛ-5, пг/мл	682 \pm 153	401 \pm 71	0,057
	ИЛ-6, пг/мл	13709 \pm 821	12078 \pm 552	0,057
	ИЛ-8, пг/мл	19151 \pm 3078	14576 \pm 914	0,091
	ИЛ-10, пг/мл	803 \pm 108	904 \pm 104	0,253
	ИЛ-12p70, пг/мл	45,9 \pm 9,0	62,6 \pm 7,98	0,089
	ИЛ-17, пг/мл	1261 \pm 215	998 \pm 54	0,131
Соотношение провоспалительных цитокинов и ИЛ-10	ФНО- α /ИЛ-10	17,1 \pm 3,6	11,4 \pm 1,6	0,085
	ИФН- γ / ИЛ-10	4,37 \pm 0,84	4,87 \pm 0,92	0,347
	ИЛ-1 β / ИЛ-10	5,44 \pm 0,99	3,20 \pm 0,44	0,028
	ИЛ-2/ ИЛ-10	0,25 \pm 0,04	0,30 \pm 0,05	0,225
	ИЛ-5/ ИЛ-10	1,12 \pm 0,36	0,46 \pm 0,11	0,049
	ИЛ-6/ ИЛ-10	19,9 \pm 2,7	15,8 \pm 2,07	0,121
	ИЛ-8/ ИЛ-10	29,5 \pm 7,0	19,6 \pm 2,5	0,105
	ИЛ-12p70/ ИЛ-10	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,412
	ИЛ-17/ ИЛ-10	1,83 \pm 0,35	1,98 \pm 0,21	0,198

Продолжение таблицы 3.18

1	2	3	4	5
Соотношение провоспалительных цитокинов и ИЛ-4	ФНО- α /ИЛ-4	465 \pm 108	366 \pm 65	0,221
	ИФН- γ / ИЛ-4	165 \pm 31	205 \pm 52	0,254
	ИЛ-1 β / ИЛ-4	195 \pm 32	96 \pm 18	0,008
	ИЛ-2/ ИЛ-4	8,24 \pm 1,16	8,83 \pm 1,07	0,356
	ИЛ-5/ ИЛ-4	34,0 \pm 7,9	18,5 \pm 6,1	0,067
	ИЛ-6/ ИЛ-4	707 \pm 53	665 \pm 172	0,411
	ИЛ-8/ ИЛ-4	984 \pm 179	763 \pm 167	0,188
	ИЛ-12p70/ ИЛ-4	2,29 \pm 0,42	2,86 \pm 0,71	0,248
	ИЛ-17/ ИЛ-4	65,1 \pm 15,1	51,3 \pm 13,3	0,251

Все вместе указанные различия можно рассматривать как проявление склонности к формированию у пациенток с ИПВ на этапе подготовки к беременности (после противовоспалительной терапии до назначения аллоиммунизации) преимущественно Th2-направленности иммунных реакций.

Сравнительная характеристика продукции цитокинов после аллоиммунизации в предгестационной подготовке иллюстрируется диаграммами на рисунках 3.27 и 3.28.

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.27, после предгестационной аллоиммунизации у женщин с ИПВ по сравнению с контрольной группой сохраняется увеличенной продукция ИЛ-4 ($p=0,012$ и $p=0,040$) и выявляется достоверное снижение продукции ИЛ-1 β ($p=0,004$) и ИЛ-5 ($p=0,034$).

Продукция ИЛ-1 β также значимо снижена по сравнению с исходными значениями ($p=0,037$), а продукция остальных исследованных цитокинов осталась на уровне, одинаковом со значениями до лечения (рисунок 3.28).

По сравнению с контрольной группой также не изменились соотношения практически всех исследованных провоспалительных цитокинов к ИЛ-10

(рисунок 3.27, Б) и к ИЛ-4 (рисунок 3.27, В). Обнаружено лишь значимое снижение соотношения ИЛ - 5/ИЛ-4 и исчезновение различий в соотношении ИЛ - 5/ИЛ-10.

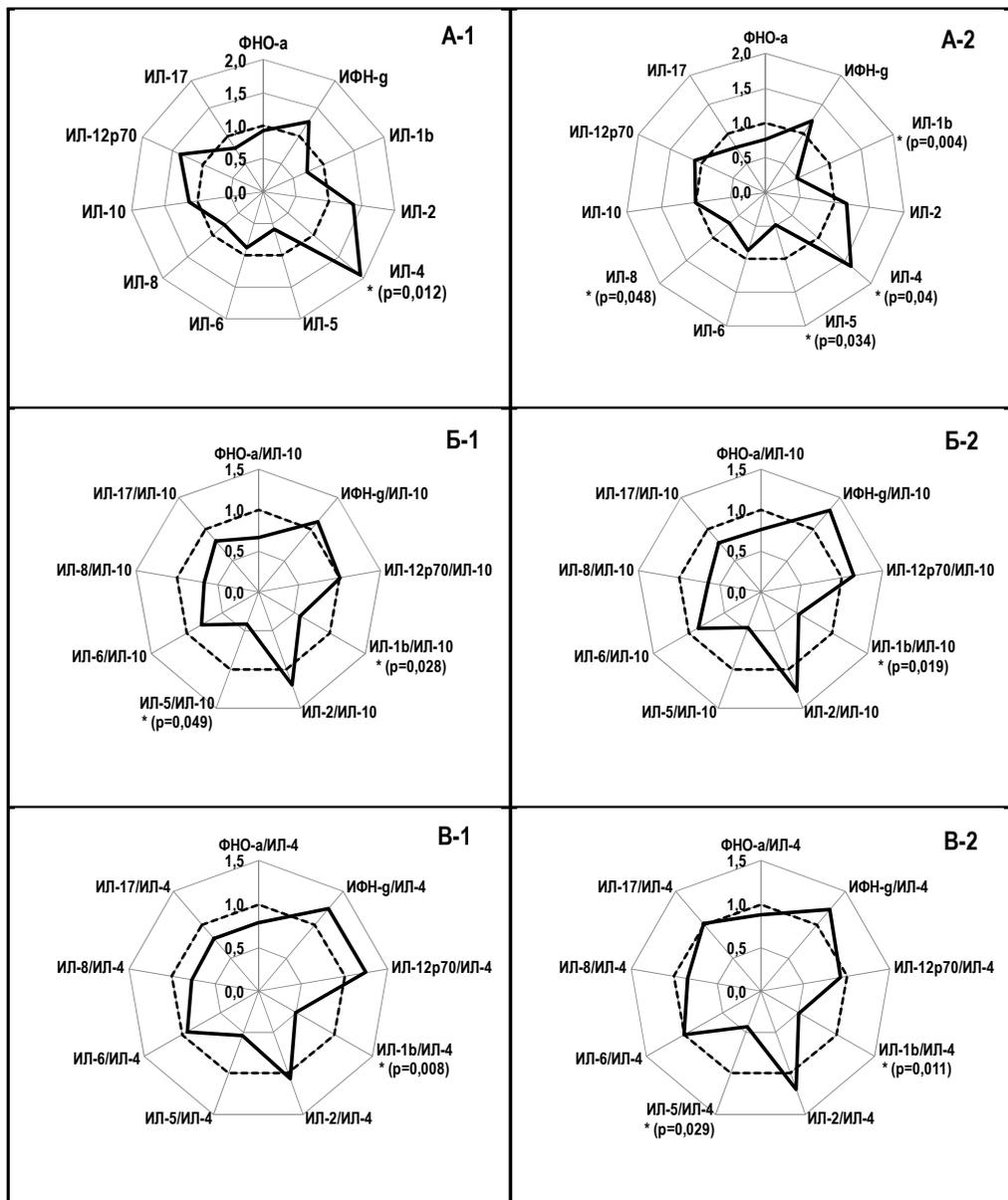
Следовательно, после аллоиммунизации в предгестационной подготовке у пациенток с ИПВ сохранилась склонность к формированию преимущественно Th2-направленности иммунных реакций.

Полученный результат согласуется с данными об отсутствии значимых изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов после аллоиммунизации в предгестационной подготовке (параграф 3.2).

В 5-6 недель беременности у пациенток с пролонгированной беременностью отмечалась тенденция к увеличению продукции ИЛ-5 ($p=0,068$), значимых изменений других параметров цитокиновой продукции по сравнению со значениями после предгестационной аллоиммунизации не выявлено (рисунок 3.29).

Результаты анализа цитокиновой продукции стимулированными клетками периферической крови пациенток с доношенной беременностью в сроке 12 недель представлены на рисунке 3.30.

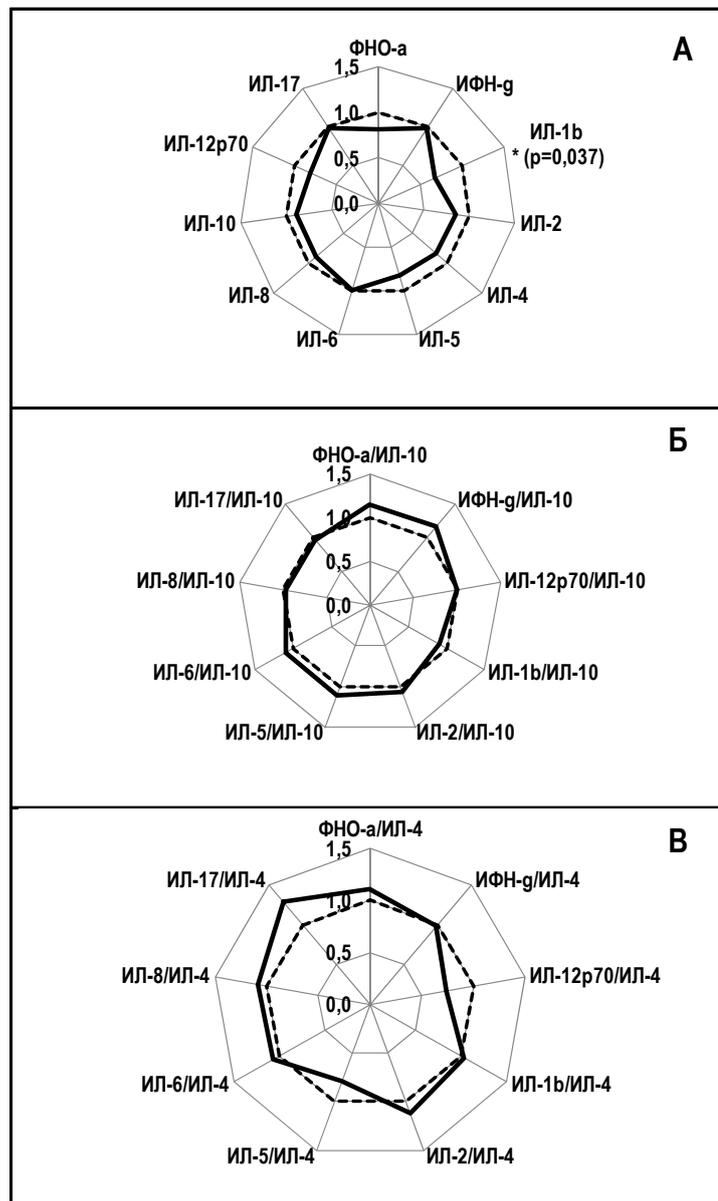
Как показано на рисунке 3.30, продукция цитокинов в 12 недель гестации не отличалась от таковой в 5-6 недель, но значимо выше стало соотношение ФНО- α /ИЛ-10 ($p=0,042$). При этом по сравнению с контролем в 12 недель у пациенток с ИПВ преобладает продукция *in vitro* клетками цельной крови ИФН - γ и, соответственно, значимо выше соотношения ИФН - γ /ИЛ-10 и ИФН - γ /ИЛ-4. При этом соотношения ИЛ-2/ИЛ - 10, ИЛ - 6/ИЛ-10, ИЛ-8/ИЛ-10 не отличались от соотношений в контрольной группе беременных, и наблюдалось преобладание всех исследованных провоспалительных цитокинов над ИЛ-4 по сравнению с контрольной группой.



По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ (n=19) к средним значениям в контрольной группе (n=12) до аллоиммунизации (1) и после аллоиммунизации - (2).

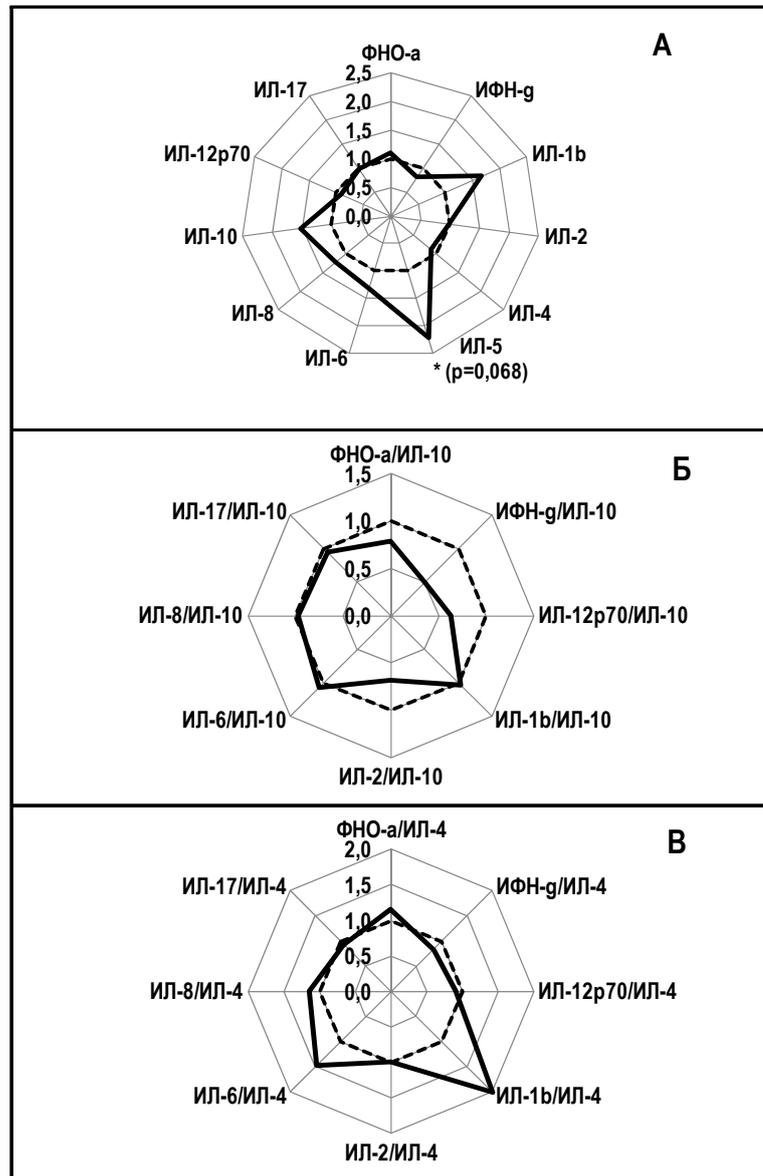
А - содержание цитокинов; отношение содержания провоспалительных цитокинов к ИЛ-10 - **Б**, к ИЛ-4 - **В**. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся от значений в контрольной группе.

Рисунок 3.27 - Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности



По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации к исходным значениям (n=19). 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 отличающийся от исходных значений.

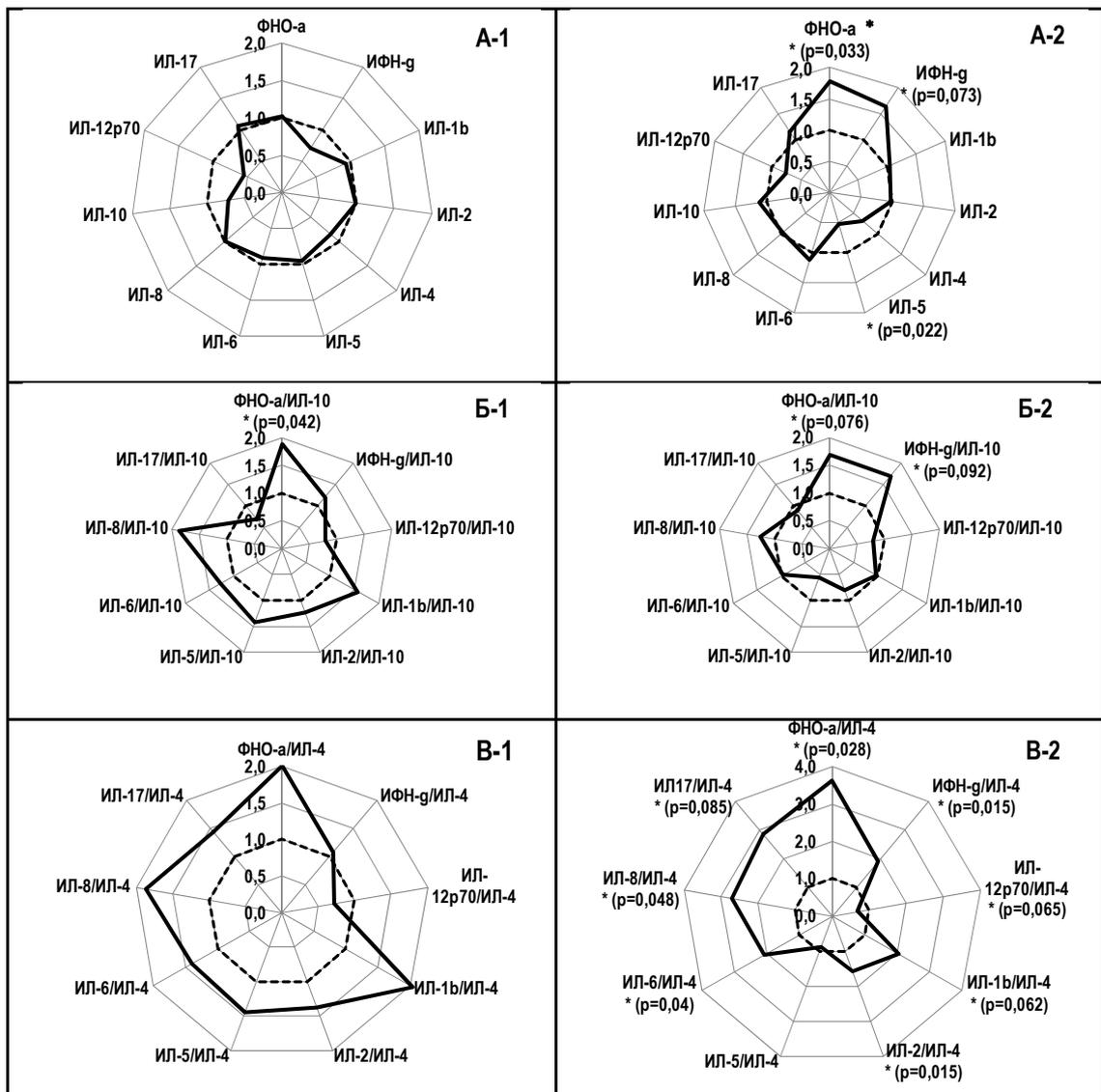
Рисунок 3.28. Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации



По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ (n=11) в 5 - 6 недель гестации к средним значениям после предгестационной аллоиммунизации. 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.

* - достоверно отличающиеся показатели.

Рисунок 3.29. Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ в 5-6 недель беременности, пролонгированной до доношенного срока



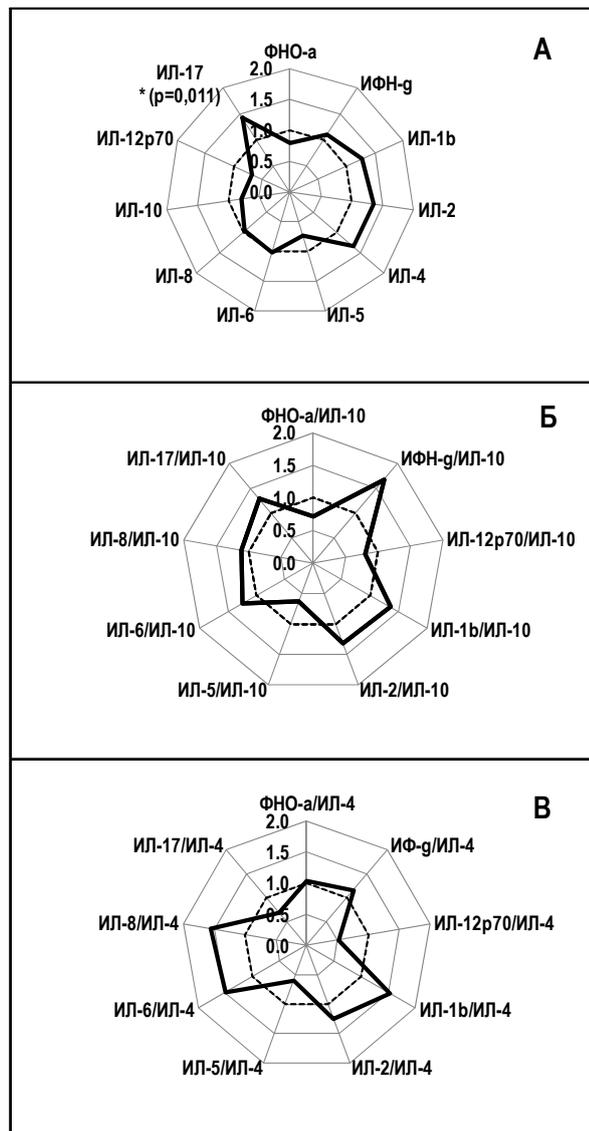
По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ (n=11) в 12 недель доношенной беременности к средним значениям в 5 - 6 недель гестации (1) и в контрольной группе (n=9) - (2). А - содержание цитокинов; Б - отношение содержания провоспалительных цитокинов к ИЛ-10; В - отношение содержания провоспалительных цитокинов к ИЛ-4. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, достоверно отличающийся от значений в 5-6 недель и от значений в контрольной группе.

Рисунок 3.30 - Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ в 12 недель беременности, пролонгированной до доношенного срока

Полученные результаты свидетельствуют о большем числе признаков провоспалительного типа иммунного реагирования у пациенток с доношенной беременностью в 12 недель гестации по сравнению с типом реагирования у женщин с физиологически протекающей беременностью, что может быть связанным и с процедурами аллоиммунизации пациенток с ИПВ в I триместре гестации (в 5 - 6 недель и в 8 - 9 недель согласно существующему протоколу [314]), которые привели к формированию Th1-направленности иммунного ответа, необходимого для успешности процессов первой и второй волны инвазии трофобласта. Об успешности протекающих процессов свидетельствует и сходство субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с пролонгированной до доношенного срока беременностью с субпопуляционным составом женщин с физиологическим течением беременности (параграф 3.2).

Выше было показано, что в 12 недель гестации субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с доношенной беременностью, включая содержание Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ (параграф 3.2), доли FOXP3⁺ и RORγt⁺Т-клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ -лимфоцитов (параграф 3.3), не отличались от тех же показателей у женщин с физиологически протекающей беременностью.

Как уже упоминалось, одной из причин привычной потери беременности считается нарушение процессов иммунного распознавания фетальных антигенов, приводящее к формированию неадекватного для нормального течения беременности типа иммунных реакций [18, 224]. Можно предположить, что аллоиммунизация в I триместре приводит к формированию Th1-провоспалительного типа продукции цитокинов у женщин с ИПВ, что, по-видимому, является необходимым стимулом для успешности процессов второй волны инвазии трофобласта и плацентации у этой категории пациентов, и в достаточной степени адекватным, поскольку беременность завершилась рождением живого ребенка. Анализ продукции цитокинов в 5-6 недель наступившей беременности у пациенток с доношенной беременностью и с выкидышем представлен на рисунке 3.31.



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 отличающийся между группами.

Рисунок 3.31. - Продукция цитокинов *in vitro* клетками цельной крови пациенток с ИПВ в 5-6 недель при доношенной беременности и при выкидыше

Как следует из данных на рисунке 3.31, при отсутствии различий в соотношении про- и противовоспалительных цитокинов Th1 и Th2-типа, соответственно, (рисунок 3.31, Б и 3.31, В) у пациенток в 5 - 6 недель беременности с последующим выкидышем оказалась значимо выше ($p=0,011$) продукция клетками периферической крови *in vitro* ИЛ-17.

Полученный результат согласуется с данными, представленными в параграфе 3.2, о снижении уровня в периферической крови женщин с выкидышем после предгестационной аллоиммунизации FOXP3⁺Трег, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, и низком содержании в сроке 5-6 недель CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-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 в периферической крови клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о дисбалансе иммунного ответа у пациенток с ИПВ, потерявшим беременность на фоне аллоиммунизации и подтверждает участие CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-лимфоцитов (активированных Th-17-клеток) наряду с FOXP3⁺Трег в механизмах формирования толерантности и к отцовским антигенам плода.

В целом, особенности продукции цитокинов *in vitro* отражают дисфункции иммунной системы в гестационном процессе первого триместра *in vivo*.

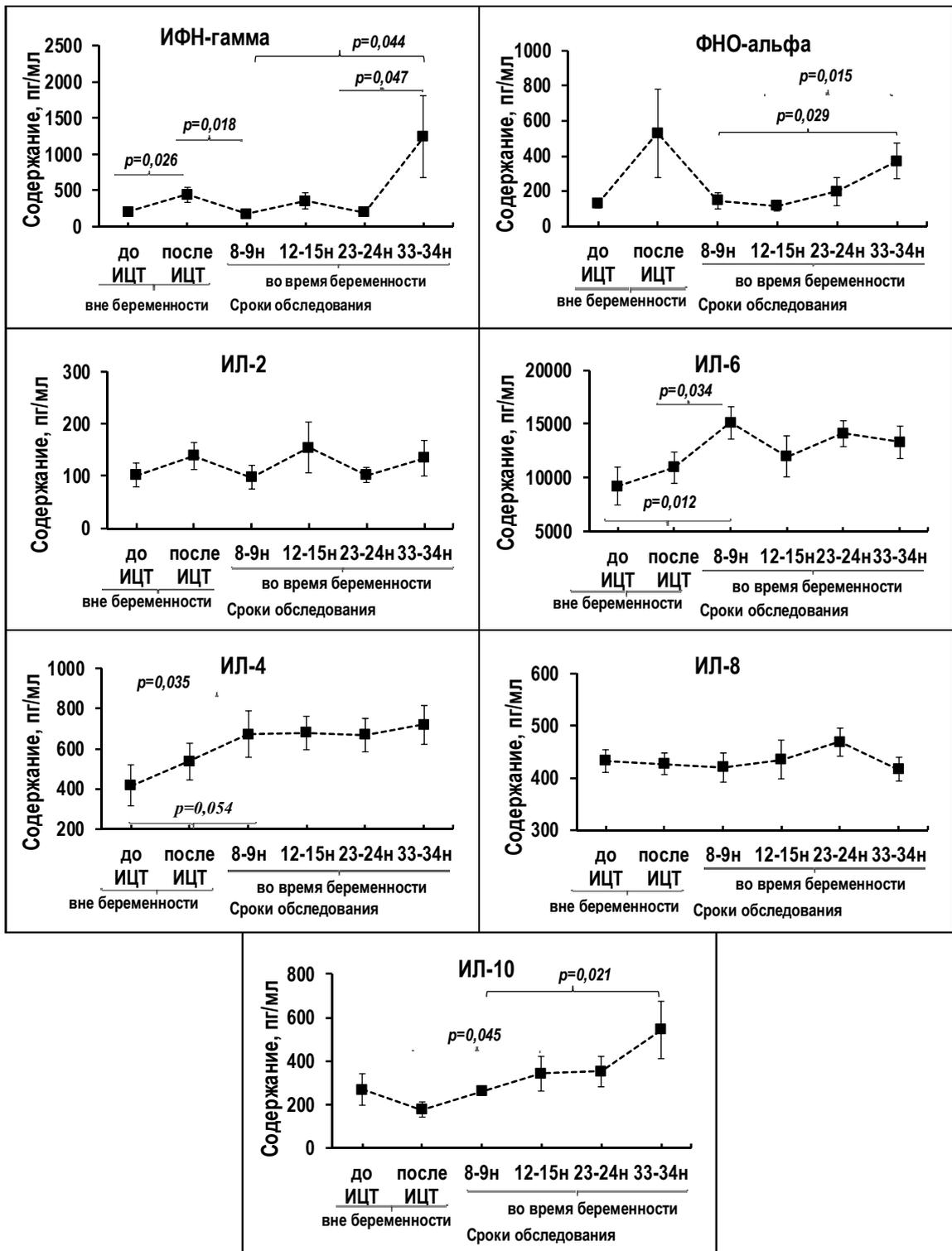
В отличие от пациенток с выкидышем у пациенток с доношенной беременностью процедура аллоиммунизации способствовала формированию Th1-типа иммунного ответа, необходимого для успешности процессов и первой и второй волны инвазии трофобласта и дальнейшей плацентации.

3.4.2. Оценка продукции цитокинов *in vitro* лимфоцитами периферической крови пациенток с ИПВ в течение пролонгированной беременности

У 12 женщин с ИПВ, у которых беременность наступила после предгестационной аллоиммунизации, была пролонгирована на фоне аллоиммунизации в I триместре до доношенного срока и завершилась рождением живого ребенка, изучена продукция *in vitro* цитокинов провоспалительных (Th1-типа) и противовоспалительных (Th2-типа) митоген-стимулированными лимфоцитами, выделенными из периферической крови (глава 2). Результаты представлены на рисунках 3.32 и 3.33.

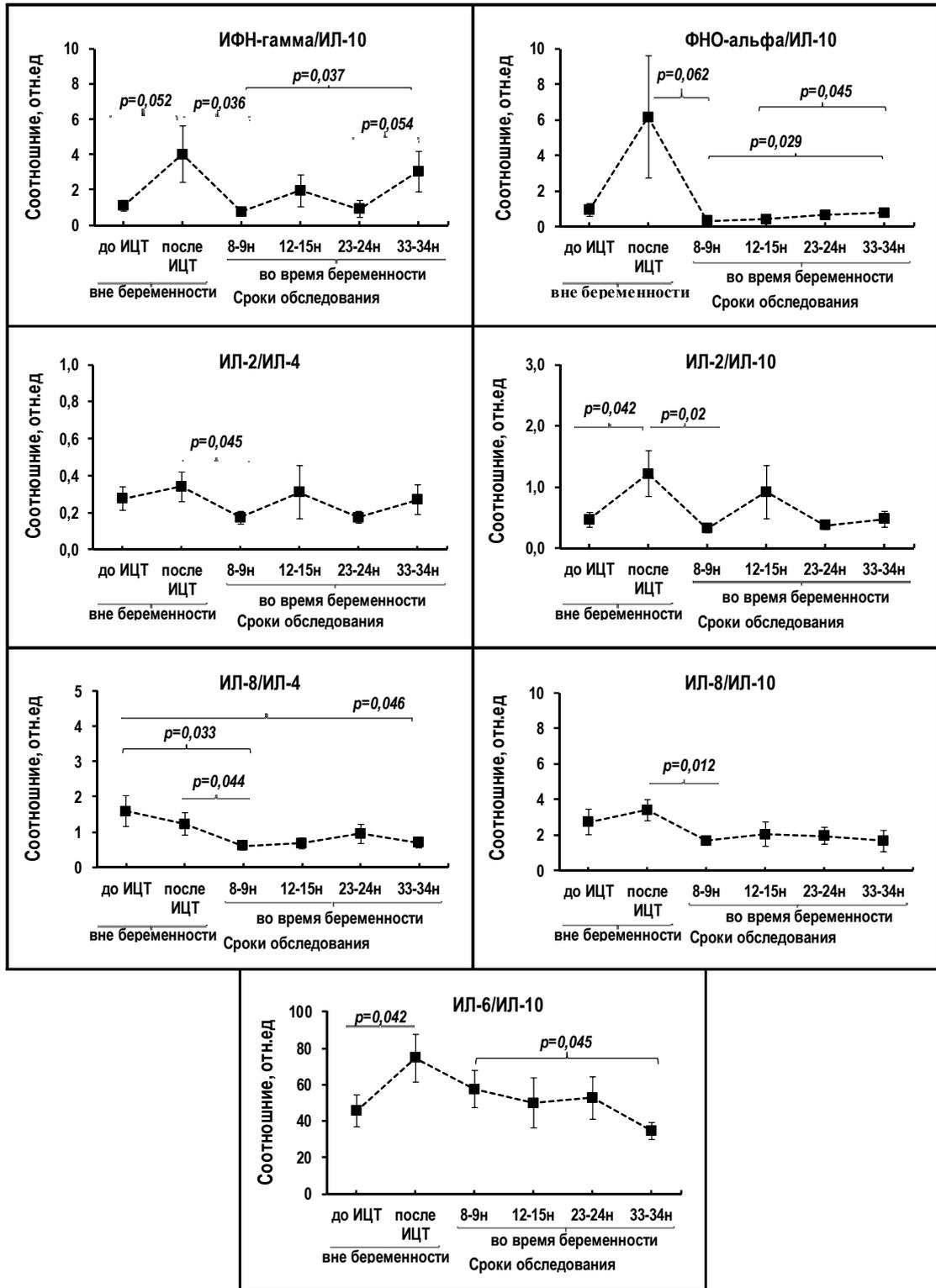
Как видно на рисунках 3.32 и 3.33, после аллоиммунизации вне беременности отмечается увеличение продукции ИФН- γ ($p=0,026$), увеличение соотношения продукции ИЛ-6 и противовоспалительного цитокина ИЛ - 10 ($p=0,042$) и яркая тенденция к увеличению продукции ИФН- γ над продукцией ИЛ-10 ($p=0,052$), что свидетельствует о превалировании после предгестационной аллоиммунизации продукции лимфоцитами пациенток с доношенной беременностью цитокинов провоспалительной направленности.

На сроке 8-9 недель беременности, после аллоиммунизации в 5 - 6 недель, продукция ИФН - γ была ниже, а продукция ИЛ-6 - выше по сравнению с уровнем после аллоиммунизации вне беременности. При этом выявлено значимое снижение соотношений цитокинов ИЛ-2/ИЛ-4, ИЛ - 8/ИЛ - 4, ИЛ-2/ИЛ-10, ИЛ - 8/ИЛ - 10, ИФН- γ /ИЛ-10, отмечена тенденция к снижению соотношения ФНО- α /ИЛ-10, что, в целом, свидетельствует о снижении интенсивности провоспалительных реакций в этот период. Следует упомянуть, что при исследовании динамики блокирующего эффекта аутологичной сыворотки пациенток с доношенной на фоне аллоиммунизации беременностью именно в сроке 8-9 недель гестации блокирующий эффект был минимальным (пункт 3.3.2).



«до ИЦТ» - до аллоиммунизации; «после ИЦТ» - после аллоиммунизации.

Рисунок 3.32 - Динамика продукции *in vitro* цитокинов лимфоцитами пациенток с ИПВ в период предгестационной аллоиммунизации и в течение беременности, пролонгированной до доношенного срока



«до ИЦТ» - до аллоиммунизации; «после ИЦТ» - после аллоиммунизации.

Рисунок 3.33 - Соотношения цитокинов про- и противовоспалительной направленности, продуцируемых *in vitro* лимфоцитами пациенток с беременностью, пролонгированной на фоне аллоиммунизации до доношенного срока

Возможно, что как снижение соотношений в продукции *in vitro* лимфоцитами про- и противовоспалительных цитокинов, так и минимальное значение блокирующей активности сыворотки в 8-9 недель гестации отражают преходящее ослабление иммунного контроля инвазии трофобласта в спиральные артерии матки. В пользу данного предположения свидетельствует и увеличение продукции ИЛ-10 на сроке в 12-15 недель.

Надо отметить, что в 23-24 недели гестации продукция всех исследованных цитокинов не отличалась от их уровня, определяемого в I триместре, а изменений в продукции ИЛ-2, ИЛ-8 и ИЛ-4 не было выявлено в течение всего периода наблюдения прогрессирующей беременности.

В III триместре продукция цитокинов провоспалительной направленности (ИФН- γ и ФНО- α) была выше, чем в I триместре. При этом выявлено и увеличение соотношений ИФН- γ /ИЛ-10, ФНО- α /ИЛ-10 несмотря на то, что продукция ИЛ-10 оказалась даже выше по сравнению с уровнем в 8-9 недель. Видимо, по этой причине соотношение ИЛ-6/ИЛ-10 на сроке 33-34 недели оказалось сниженным, поскольку изменений в продукции ИЛ-6 во второй половине беременности не отмечалось. Полученные результаты согласуются с данными о том, что механизмы иммунорегуляции последнего этапа беременности и родов включают в себя физиологические системные воспалительные процессы [174].

В целом, полученные результаты подтверждают представление о том, что направленность Th1/Th2-реакций зависит от срока гестации - на самых ранних стадиях беременности преобладают воспалительные реакции, сдвиг в сторону Th-2-направленности наблюдается на более поздних сроках, а в конце беременности снова преобладает провоспалительный фон.

Таким образом, исследование баланса Th1/Th2/Th17-реакций является важным для понимания роли иммунной системы в регуляции репродуктивной функции при беременности.

3.5. Антиотцовские антилейкоцитарные антитела у женщин с ИПВ

Одним из показателей, отражающих активацию лимфоцитов и развитие специфического иммунного ответа женщины на аллоантигены партнера после ИЦТ, является уровень антиотцовских антилейкоцитарных антител (АОАТ) в женской сыворотке.

3.5.1. Выбор метода определения антиотцовских антилейкоцитарных антител с помощью проточной цитометрии

Прототип метода определения АОАТ известен в трансплантологии как метод перекрестной цитотоксичности, заключающийся в выявлении антител в сыворотке реципиента, способных связываться с поверхностными антигенными детерминантами лимфоцитов донора. Использование проточной цитометрии (ПЦМ) для идентификации таких антител позволило повысить чувствительность метода и сделать его рутинным клиническим методом в трансплантологии [357]. Метод определения АОАТ с помощью ПЦМ заключается в определении связывания флуоресцентно-меченых антител к иммуноглобулину G (IgG) человека с антителами на поверхности лимфоцитов партнера.

Существуют несколько модификаций выявления антител методом ПЦМ, в которых используется разное время и температура инкубирования сыворотки реципиента с клетками донора, а также различные разведения тестируемых сывороток и различные концентрации клеток [39]. Одна из модификаций, предложенная Ormerod M.G. [358], рекомендована для скрининга перекрестно-реагирующих антител в трансплантологии. Модификация, предложенная Maruyama T. [37], была применена для оценки эффективности иммунизации женщин с повторяющимися спонтанными абортами [359, 360].

В связи с изложенным, одной из методических задач явилось сравнение двух методов определения АОАТ с помощью проточной цитометрии (Maruyama T. - метод 1 - и Ormerod M.G. - метод 2) и выбор метода, оптимального для мониторинга эффективности последовательных аллоиммунизаций при иммунокоррекции ПВ.

Описание особенностей двух методов, используемых для определения АОАТ, приведены в таблице 3.19.

Были обследованы сыворотки 170 женщин, которым при подготовке к беременности была назначена ИЦТ. Из них у 82 женщин АОАТ определяли методом 1, а у 88 - методом 2.

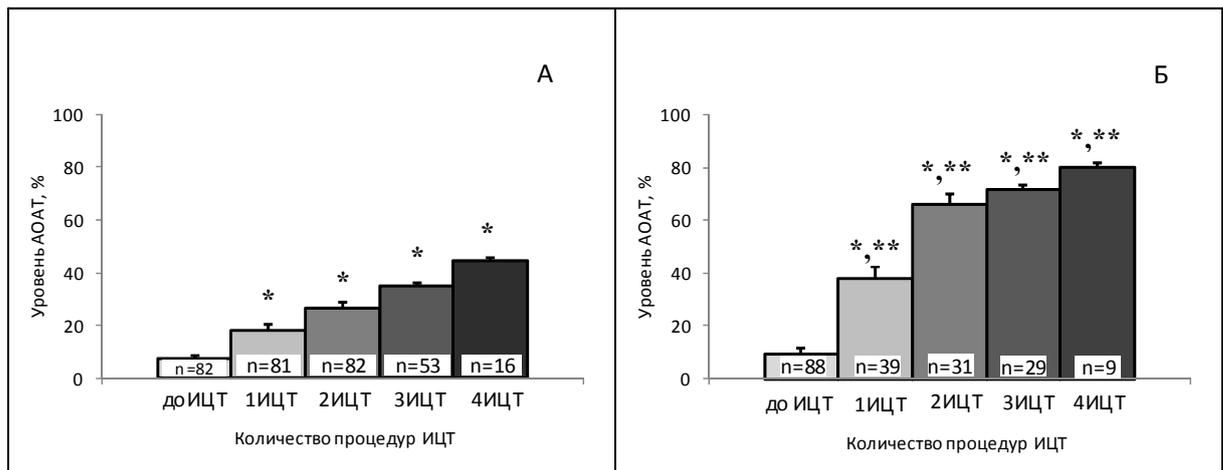
Таблица 3.19 - Характеристика методов проточной цитометрии, используемых для выявления АОАТ

Этапы	Параметры этапов	Значения параметров этапа	
		метод 1	метод 2
Инкубация мужских МНК с женской сывороткой	Температура инкубации	23°C	37°C
	Время инкубации	15 мин	30 мин
	Разведение сыворотки	1:4	1:1
Отмывка мужских МНК от женской сыворотки	Раствор для отмывки	ФСБ с 0,5%БСА	ФСБ с 1%ЭТС
	Количество отмывок	2	3
	Температура отмывок	4°C	23°C
Инкубация мужских МНК с вторичными антителами	Время инкубации	15 мин	30 мин
Отмывка мужских МНК от вторичных антител	Раствор для отмывки	ФСР с 0,5%БСА	ФСР с 1%ЭТС
	Количество отмывок	2	1
	Температура отмывок	4°C	4°C

Примечание. МНК - моноклеарные клетки, ФСБ - фосфатно-солевой буфер, БСА - бычий сывороточный альбумин, ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка.

Результаты определения АОАТ с помощью описанных методов 1 и 2, представлены на рисунке 3.34. Показано, что ИЦТ вызывает достоверное увеличение АОАТ с высоким уровнем значимости ($p < 0,001$) при использовании обоих методов. Однако значения, получаемые с использованием метода 2, значимо выше, чем в случае использования метода 1 ($p < 0,001$).

Был выявлен нелинейный характер зависимости уровня АОАТ от времени инкубации мужских лимфоцитов с женской сывороткой и от разведения женской сыворотки при использовании метода 1 (рисунки 3.35 и 3.36). Это указывает на то, что условия проведения анализа в данной модификации не являются оптимальными.



n - количество обследованных. * - различия значимы при сравнении с уровнем АОАТ до ИЦТ при $p < 0,001$. ** - различия значимы при сравнении уровней АОАТ, определяемых разными модификациями, после соответствующей ИЦТ при $p < 0,001$.

Рисунок 3.34 - Результаты определения уровня АОАТ методом 1 (А) и методом 2 (Б)

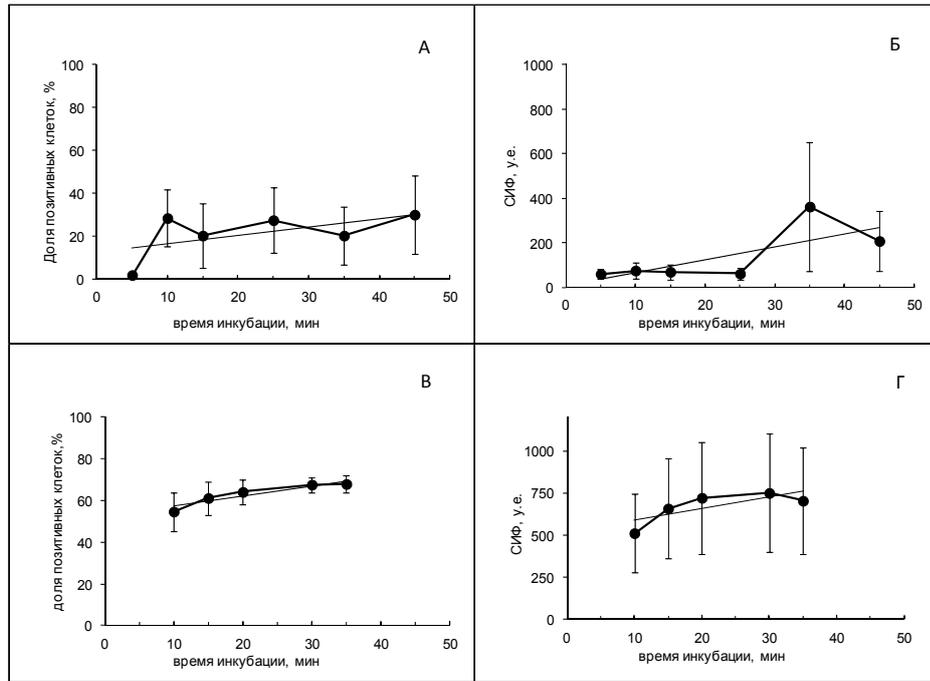


Рисунок 3.35 - Зависимости доли покрытых АОАТ лимфоцитов мужа (А, В) и средней интенсивности флуоресценции позитивных клеток (Б, Г) от времени инкубации с женской сывороткой, определяемых с помощью метода 1 (А, Б, n=6) и метода 2 (В, Г, n=4)

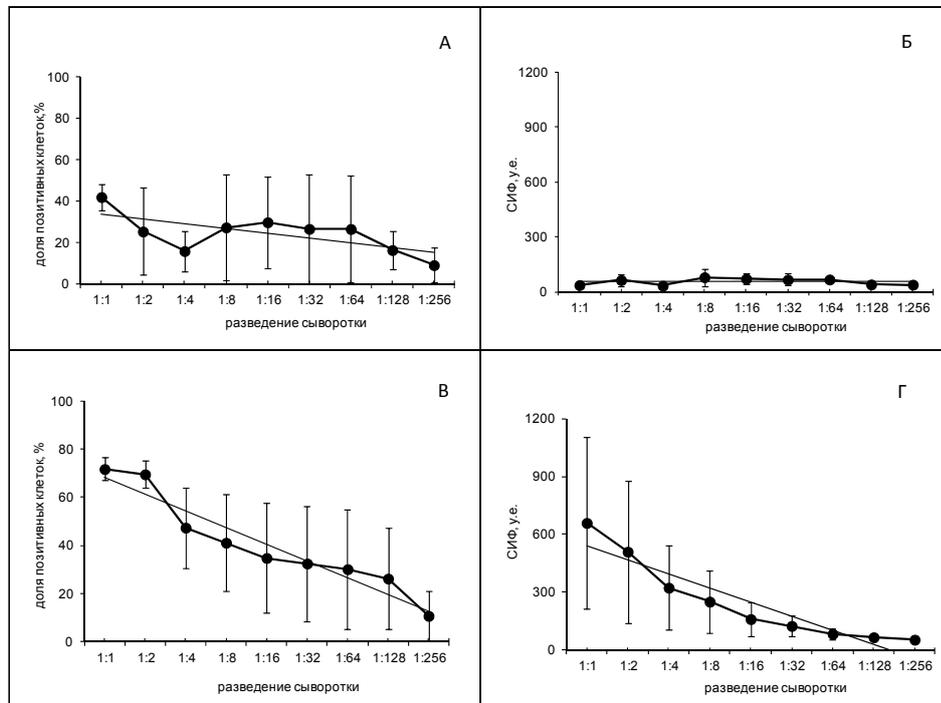


Рисунок 3.36 - Зависимости доли покрытых АОАТ лимфоцитов мужа (А, В) и средней интенсивности флуоресценции позитивных клеток (Б, Г) от разведения женской сыворотки, определяемых с помощью метода 1 (А, Б, n=4) и метода 2 (В, Г, n=4)

Главной особенностью метода 1 является инкубация мужских МНК и женской сыворотки при комнатной температуре с последующей отмывкой смеси при 4°C, тогда как по методу 2 инкубация мужских МНК и женской сыворотки происходит при 37°C с последующей отмывкой смеси при комнатной температуре, то есть в более физиологичных условиях. Известно, что при низких температурах наблюдается, в частности, повышенное образование активных форм кислорода [361], способствующих возникновению различных молекулярных повреждений. В том числе могут иметь место нарушения в структуре комплексов антигенов с антителами, приводящие к их распаду или слущиванию с поверхности клеток. Кроме того, описано существование холодowych и тепловых антител, величина константы связывания которых с антигеном определяется температурой инкубационной смеси. Этими причинами можно объяснить меньшую флуоресценцию клеток, регистрируемую методом 1 (рисунки 3.35, 3.36) и, соответственно, нестабильные результаты определения уровня АОАТ данным методом (рисунок 3.34), что ограничивает возможность его использования для оценки эффектов последовательных аллоиммунизаций.

Исходя из проведенных исследований, определение уровня антиотцовских антилейкоцитарных антител с помощью проточной цитометрии методом 2, предложенным Ormerod M.G., было признано оптимальным способом для контроля эффективности аллоиммунизации, и определение АОАТ в дальнейшем проводили именно этим методом.

3.5.2. Оценка уровня антиотцовских антилейкоцитарных антител у женщин с ИПВ в процессе предгестационной аллоиммунизации и в первом триместре наступившей беременности

Группу исследования вне беременности составили 53 женщины с ИПВ. Во время беременности АОАТ определяли у 25 забеременевших после проведенной предгестационной аллоиммунизации пациенток. У 6 пациенток произошел

выкидыш в первом триместре, у 19 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока.

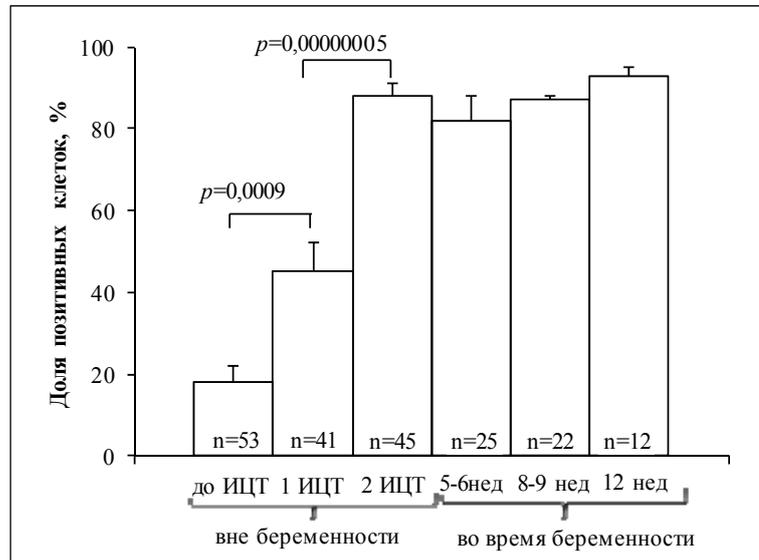
В контрольной группе было обследовано вне беременности 20 фертильных женщин без соматических заболеваний с неотягощенным акушерским анамнезом, имеющих последнего ребенка не старше 2 лет, а также 7 женщин с физиологическим течением первой беременности.

Представлены данные проспективного исследования.

В контрольной группе первобеременных женщин в течение первого триместра гестации не было выявлено АОАТ.

Не было обнаружено различий в уровне АОАТ у женщин с ИПВ до назначения лечения и в группе фертильных здоровых женщин ($16,6 \pm 3,5$, $n=53$ и $24,2 \pm 6,7$, $n=20$).

Результаты оценки АОАТ у женщин с ИПВ во время предгестационной подготовки и во время наступившей беременности представлены на рисунке 3.37.



«до ИЦТ» - до предгестационной аллоиммунизации;

«1ИЦТ» - после первой процедуры; «2ИЦТ» - после второй процедуры.

n - количество обследованных женщин

Рисунок 3.37 - Доля позитивных мужских лимфоцитов с фенотипом $CD3^+$, покрытых АОАТ, после их инкубации с сывороткой пациенток

Как видно из рисунка 3.37, до назначения иммунизации уровень АОАТ у женщин с ИПВ был низким. Проведение процедуры ИЦТ приводит к постепенному значимому повышению уровня АОАТ по сравнению с исходным. Уровень АОАТ, достигнутый после второй процедуры ИЦТ, сохраняется стабильным у забеременевших в дальнейшем женщин на протяжении всего первого триместра.

Отличий между уровнем АОАТ после последней иммунизации вне беременности и уровнями АОАТ на разных сроках первого триместра не выявлено.

При этом нами выявлено, что сходная динамика и не отличающиеся уровни АОАТ были как у женщин с выкидышем, так и у женщин с пролонгированной беременностью (таблица 3.20).

Таблица 3.20 - Доля позитивных мужских лимфоцитов с фенотипом CD3⁺, покрытых АОАТ, после их инкубации с сывороткой женщин с разными исходами беременности (M±m)

Группа женщин с ИПВ	Уровень АОАТ, %		
	после ИЦТ вне беременности	в 5-6 нед беременности	в 8-9 нед беременности
с выкидышем (n=6)	96,5 ± 1,9	76,8 ± 15,6	93,0 ± 2,5
с пролонгированной беременностью (n=19)	95,1 ± 0,9	82,1 ± 7,2	84,7 ± 7,3

Данный результат может являться подтверждением высказанного в литературе предположения об отсутствии связи АОАТ с ранними потерями беременности [38, 5]. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что высокий уровень АОАТ у женщин с ПВ является следствием проведенной иммунизации аллогенными клетками партнеров и не является необходимым для пролонгирования беременности.

Подтверждение данного заключения получены при анализе уровня АОАТ у 45 женщин с ИПВ 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 3.21.

Таблица 3.21 - Выявление АОАТ в течение беременности

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

Как следует из данных таблицы 3.21, 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.

Анализ абсолютных значений уровня АОАТ представлен в таблице 3.22. При анализе данных таблицы 3.22 обращает на себя внимание, что уровень АОАТ был на одинаковом уровне в течение всего гестационного периода в обеих группах, но в группе женщин с ИПВ - существенно выше, чем в контрольной группе беременных.

Таблица 3.22 - Уровни АОАТ у пациенток с ИПВ и женщин контрольной группы в динамике на различных гестационных сроках

Сроки обследования	Группы пациенток	Статистические характеристики уровня АОАТ в разные сроки беременности				
		Минимум	Максимум	Медиана	$M \pm \sigma$	<i>p</i> -значение
1	2	3	4	5	6	7
5-6 нед	Контрольная	0	2	0	$0,57 \pm 0,3$	0,0002
	ИЦТ	0	100	87	$71,7 \pm 33,6$	
8-9 нед	Контрольная	0	1	0	$0,1 \pm 0,1$	0,0001
	ИЦТ	0	100	92,5	$83,5 \pm 26,4$	
12 нед	Контрольная	0	76	0	$5,0 \pm 4,5$	0,0001
	ИЦТ	27	99	96	$90,4 \pm 15,0$	
16 нед	Контрольная	0	83	0	$6,1 \pm 5,9$	0,0001
	ИЦТ	1	99	94,5	$85,6 \pm 24,2$	
20 нед	Контрольная	0	95	0	$11,3 \pm 7,1$	0,0001
	ИЦТ	0	99	95	$81,6 \pm 30,5$	
25 нед	Контрольная	0	92	0	$9,9 \pm 4,8$	0,0001
	ИЦТ	0	97	90,5	$76,6 \pm 29,5$	
30 нед	Контрольная	0	47	0	$4,6 \pm 3,7$	0,0001
	ИЦТ	0	99	64,8	$71,4 \pm 36,1$	
34 нед	Контрольная	0	94	0	$8,0 \pm 5,7$	0,0004
	ИЦТ	0	98	94	$81,1 \pm 30,0$	

Примечание. * - различия значимы при сравнении со значениями в контрольной группе.

Таким образом, уровень АОАТ, достигнутый после ИЦТ в предгестационной подготовке пациенток с ИПВ, сохраняется не только в течение I триместра беременности, но и практически до конца беременности. У женщин контрольной группы в течение всей физиологически протекающей беременности АОАТ не выявлялись и их уровень не менялся, следовательно, они не являются необходимыми для пролонгирования беременности. Поэтому, с одной стороны,

можно заключить, что появление антиотцовских антилейкоцитарных антител во время пролонгированной беременности у женщин с ИПВ является следствием процедуры иммунизации женщин лимфоцитами партнеров и свидетельствует о значимости теста АОАТ как отражающего иммуномодулирующее действие процедуры аллоиммунизации. С другой стороны, сохранение высокого уровня АОАТ на фоне аллоиммунизации в I триместре позволяет считать достаточным две процедуры аллоиммунизации вне беременности, что имеет значение для медицинской практики.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Толерантность к отцовским антигенам является необходимым условием для нормального течения беременности и ключевым фактором нормального развития плода. Представления о механизмах формирования толерантности развивались в течение более полувека, сначала в связи с проблемами трансфузии крови и трансплантации органов, а несколько позже и с проблемами репродукции, когда взаимоотношения матери и плода стали рассматривать как взаимоотношения организма-хозяина и полуаллогенного трансплантата, каковым с этой точки зрения является плод. Поэтому эволюция взглядов на формирование толерантности к аллоантигенам плода в полной мере отражает развитие представлений о механизмах формирования толерантности к чужеродным антигенам. Именно поэтому перечень исследуемых показателей в иммунологии репродукции соответствует перечню иммунологических параметров, характеризующих различные аспекты иммунологических процессов, ответственных за толерантность. Поскольку успех беременности зависит от событий на самых ранних ее этапах, то нарушения реакций материнской иммунной системы на отцовские антигены, приводящие к срыву формирования толерантности, могут быть причиной самопроизвольных прерываний беременности в ранние сроки гестации. С этим связано выделение особой акушерской патологии - ПВ неясного, предположительно, аллоиммунного генеза, а также поиск способов ее иммунокоррекции. Выявление аллоиммунных причин выкидыша рассматривается как необходимая предпосылка для обоснования патогенетической иммуномодулирующей терапии, и именно этим обусловлена актуальность исследований по поиску маркеров иммунологических нарушений при ПВ неясной этиологии.

На настоящий момент причины отторжения плода связывают с нарушениями механизмов иммунного распознавания, одной из причин неадекватного распознавания считают совместимость супругов по антигенам гистосовместимости. Использование для лечения ПВ ИЦТ - иммунизации

женщин аллогенными лейкоцитарными клетками партнера - может способствовать, с одной стороны, коррекции распознавания аллоантигенов отца, с другой, - коррекции интенсивности иммунного ответа на них.

Кроме того, открытие субпопуляции Т-хелперных клеток, обладающих иммуносупрессивной функцией (Трег), способствовало пересмотру взглядов на механизмы толерантности и отходу от уже ставшего привычным взгляда на отторжение плода через развитие преимущественно гуморальных реакций [364]. Исходя из изложенного, анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови является актуальным в поиске маркеров иммунных нарушений при ПВ неясного генеза и, соответственно, маркеров иммуномодулирующего действия ИЦТ.

В результате исследований, представленных в данной работе, показано, что содержание основных популяций лимфоцитов (с фенотипом $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD16^+$) вне беременности до назначения иммунотерапии в периферической крови женщин с ИПВ не отличалось от содержания лимфоцитов с таким же фенотипом фертильных женщин контрольной группы (параграф 3.2). Также не обнаружено отличий по общему содержанию лимфоцитов. Полученный результат указывает на отсутствие у женщин с ИПВ заметных особенностей на уровне основных популяций лимфоцитов и указывает на важность исследования субпопуляционного состава для понимания причин этой патологии. Кроме того, данный результат дает дополнительное подтверждение отсутствию у включенных в обследование женщин с ИПВ острых воспалительных заболеваний (критерий включения) и эффективности лечения у них сопутствующих хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (проведение обследования спустя 2-3месяца после этого лечения).

В то же время, согласно полученным данным, содержание субпопуляций клеток врожденного иммунитета с естественной киллерной активностью и фенотипом $CD56^+$, а также с фенотипом $CD3^-CD56^+CD16^+$ достоверно превышает аналогичный показатель у женщин контрольной группы (параграф 3.2). Достоверно выше, чем в контроле, было содержание субпопуляции клеток

адаптивного иммунитета с киллерной функцией $CD3^+CD56^+CD16^+$, и субпопуляции В1-клеток с фенотипом $CD5^+CD19^+$, клеток с фенотипом $CD200^+$, и существенно ниже, чем в контроле, было содержание Трег-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$. Приведенные результаты согласуются с данными, представленными в ряде опубликованных работ, об измененном состоянии иммунной системы пациенток с ИПВ [278, 293, 308]. Однако сниженный уровень Трег не может объясняться хроническим воспалением у обследованных пациенток с ПВ [11].

Также, кроме описанного выше отсутствия отличий по основным популяциям лимфоцитов в проведенных нами исследованиях (параграф 3.2), не получено различий с контрольной группой в количестве лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+CD69^+$, $CD3^+CD4^+CD69^+$, $CD45^+CD56^+CD69^+$, значимо отвечающих на митогенную стимуляцию *in vitro* при острых и хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях [354].

Аллоиммунизация пациенток с ИПВ лимфоцитами партнера, проведенная в ходе предгестационной подготовки в виде монотерапии, согласно протоколу, описанному в Главе 2, не приводит у них к изменениям в общем иммунном статусе по сравнению с исходным уровнем (параграф 3.2). Не отмечается изменений и в количестве отвечающих на митогенный стимул *in vitro* НК-клеток ($CD45^+CD56^+CD69^+$) (параграф 3.3.3). Значения, равные исходным и значениям в контрольной группе женщин, после аллоиммунизации в предгестационной подготовке пациенток с ИПВ зарегистрированы также и в исследованиях блокирующего эффекта аутологичной сыворотки, который оценивали по экспрессии $CD69$ лимфоцитами периферической крови после стимуляции митогеном *in vitro* в течение 72-х часов (параграф 3.3.2).

Тем не менее, при общей невыраженности изменений показателей состояния иммунной системы пациенток с ИПВ после предгестационной иммунотерапии, некоторые признаки активации иммунной системы до наступления беременности можно отметить. Во-первых, они проявляются в тенденции увеличения содержания субпопуляции В1-клеток по сравнению с

уровнем до ИЦТ ($p=0,095$) и в сохранении их увеличенного содержания в 5-6 недель гестации по сравнению с уровнем у фертильных женщин (параграф 3.2.3). Во-вторых, наблюдается увеличение содержания клеток с фенотипом $CD3^+$, экспрессирующих рецепторы для иммуноглобулина класса IgG, и, соответственно, в уровне АОАТ, который до ИЦТ был низким и не отличался от уровня АОАТ вне беременности у фертильных женщин (параграф 3.5.2).

Наиболее значимые изменения в иммунном статусе и в экспрессии $CD69$ *in vitro* митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови пациенток с ИПВ после иммунотерапии были обнаружены во время беременности (параграфы 3.2.4 и 3.3.3). Они были выявлены в результате анализа выделенных двух подгрупп пациенток, а именно: пациенток с беременностью, пролонгированной до доношенного срока на фоне аллоиммунизации в I триместре и завершившейся рождением живого ребенка, и пациенток, потерявших беременность в I триместре.

При анализе иммунного статуса беременных с ИПВ с пролонгированной данной беременностью при отсутствии в течение первого триместра динамики в содержании основных субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) и субпопуляций киллерных клеток ($CD56^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD16^+$, $CD3^-CD16^+$) выявлена динамика в содержании субпопуляций В-лимфоцитов ($CD5^+CD19^+$ и $CD19^+$), Трег и $CD200^+$ -клеток. И если в сроке 5 - 6 недель гестации содержание Трег-клеток и клеток с фенотипом $CD200^+$ было таким же, как до предгестационной подготовки, то к концу первого триместра беременности, протекающей на фоне ИЦТ, оказалось таким же, как в крови беременных контрольной группы. И в целом, в 12 недель гестации субпопуляционный состав лимфоцитов у пациенток с ИПВ и у беременных контрольной группы не различался (параграф 3.2).

Полученный результат, с одной стороны, отражает положительный эффект аллоиммунизации у тех пациенток с ИПВ, у которых беременность была пролонгирована до доношенного срока. С другой, подтверждает полученные в экспериментах на модельных животных доказательства, что за развитие Трег,

влияющих на формирование толерантности во время беременности, ответственны аллоантигены, которые экспрессируются именно во время беременности [62, 222]. Данные цитируемых публикаций согласуются и с отсутствием изменений в содержании Трег в периферической крови пациенток после аллоиммунизации вне беременности.

Интересно, что у женщин с пролонгированной беременностью (таблица 3.15) не было выявлено значимой динамики в течение первого триместра количества лимфоцитов, спонтанно экспрессирующих CD69 и отвечающих на митогенный стимул *in vitro* (CD3⁺CD8⁺CD69⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺, CD45⁺CD56⁺CD69⁺). Однако в 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью при более низком содержании в периферической крови клеток со спонтанной экспрессией CD69 (CD45⁺CD69⁺ и CD3⁺CD69⁺) не обнаружено различий с женщинами контрольной группы в количестве клеток исследованных субпопуляций, экспрессирующих CD69 после стимуляции. Полученный результат свидетельствует о том, что у женщин с ИПВ в анамнезе в случае пролонгирования на фоне ИЦТ беременности ответ лимфоцитов периферической крови на стимулирующее воздействие *in vitro* не отличается от ответа лимфоцитов в группе женщин с физиологическим течением беременности.

После аллоиммунизации в I триместре наблюдалось увеличение АОАТ, как и после аллоиммунизации вне беременности (параграф 3.5.2). Но поскольку в контрольной группе первобеременных в течение первого триместра гестации нами не было выявлено АОАТ и поскольку сходная динамика и не отличающиеся уровни АОАТ были как у женщин с состоявшимся выкидышем, так и у женщин с пролонгированной беременностью, то увеличение АОАТ во время беременности, скорее всего, является следствием иммуномодулирующего действия самой процедуры введения аллогенных клеток партнера.

Однако такой существенный результат как нормализация исследованных показателей иммунного статуса и отсутствие повышенной экспрессии CD69 после митогенной стимуляции иммунокомпетентных клеток *in vitro* у пациенток с ИПВ во время пролонгированной беременности может быть связан не только с

эффектом аллоиммунизации. В значительной степени это может быть обусловлено синтезом гормонов и белков ранней беременности, индуцированных появлением бластоцисты, которые, в свою очередь, запускают каскад изменений в иммунной системе матери. Это так называемый фактор ранней беременности, плодовые и плацентарные факторы [58, 217, 218]. Одними из наиболее изученных для активации иммунной системы являются ПИБФ (прогестерон-индуцированный блокирующий фактор) и ПИФ (преимплантационный фактор), а также МИФ (миграцию макрофагов ингибирующий фактор).

Как уже упоминалось, экзогенным стимулом для синтеза ПИБФ является, например, переливание крови, который способствует увеличению экспрессии рецепторов к прогестерону, что, вероятно, имеет место и при аллоиммунизации пациенток с ИПВ вне беременности [94, 95]. Однако события, происходящие сразу после имплантации, служат мощным стимулом для увеличения секреции ПИБФ - медиатора с антиабортивной активностью, который синтезируется активированными лимфоцитами периферической крови и децидуальными CD56⁺-клетками [90, 96, 97]. ПИБФ, с одной стороны, способствует переключению профиля цитокиновой продукции активированными лимфоцитами с Th1-направленности на Th2 [97, 104], а с другой, стимулирует продукцию асимметричных антител В-лимфоцитами [97, 111].

ПИФ определяется в сыворотке женщин сразу после фертилизации, уже до имплантации [116] и действует через активацию иммунной системы и создание модуляции в направлении Th2 (Th2/Th1) без иммуносупрессии [124]. Считается доказанным, что ПИФ играет определяющую роль в регуляции системного иммунного ответа при беременности [128].

Также высказано предположение, что один из механизмов поддержания беременности и развития эмбриона гормоном ХГЧ связан с иммуномодуляторными и ангиогенными свойствами МИФ - белка, продуцируемого активированными Т-лимфоцитами. Обнаружено, что ХГЧ стимулирует экспрессию МИФ в эндометриальных стромальных клетках [138]. Показано, что НК-клетки эндометрия беременной матки способны отвечать на

МИФ и сами продуцируют МИФ [139], но более всего МИФ продуцируется клетками трофобласта, в связи с чем постулируется его значимость в процессах имплантации, плацентации, поддержания беременности [134, 140].

Все вышесказанное позволяет объяснить результаты экспериментов по адоптивному переносу мышам Трег-клеток, в которых показано, что отторжение плода у животных-моделей спонтанных аборт, предотвращается только переносом Трег от беременных самок при условии нормального течения их беременности [365]. Кроме того, известны данные об увеличении Трег во время беременности после 4-кратного введения лимфоцитов партнера только у тех пациенток с ИПВ, у кого беременность была успешно пролонгирована, при этом отмечалось как увеличение блокирующих антител в смешанной культуре лимфоцитов партнеров, так и антиидиотипических антител [366].

С учетом изложенного, в данной работе проведен анализ исследуемых показателей у пациенток с разными исходами беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации (параграф 3.2.4). В результате обнаружено, что уже до предгестационной аллоиммунизации содержание субпопуляций с киллерной активностью у женщин с выкидышем было ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью, а в 5-6 недель гестации содержание субпопуляций $CD56^+$, $CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD56^+CD16^+$, $CD3^-CD8^+$, $CD5^+CD19^+$ и $CD200^+$ -клеток было даже ниже, чем исходный уровень. Показано, что содержание субпопуляций $CD56^+$, $CD56^+CD16^+$ и $CD3^-CD16^+$ -клеток ниже порогового уровня в 5-6 недель гестации с высокой диагностической значимостью (100%-специфичность, 77,3%, 75% и 100%-чувствительность соответственно, 100%-ценность позитивного прогноза) может прогнозировать следующий выкидыш у женщин с ИПВ. Полученные результаты подтверждают мнение о том, что поскольку НК-клетки децидуальной ткани играют роль в модулировании материнского иммунного ответа в направлении формирования толерантности поддержанием длительной индукции Трег, то, как низкое содержание Трег, так и низкое содержание НК-клеток являются значимыми маркерами спонтанных абортов [75].

В 5-6 недель гестации у пациенток с прервавшейся беременностью была выше доля клеток с фенотипом $CD3^+CD69^+$, как спонтанно экспрессирующих маркер, так и после митогенной стимуляции *in vitro*. При этом отличий в доле активированных $CD56^+CD69^+$ лимфоцитов не выявлено. До предгестационной подготовки уровень экспрессии CD69 на Т-клетках с цитотоксической функцией и NK-клетках в этой группе пациенток был ниже. По окончании предгестационной подготовки были обнаружены тенденции к повышению уровня экспрессии CD69 на Т-клетках в обеих группах пациенток, и в 5-6 недель наступившей беременности в группе пациенток с состоявшимся выкидышем была значимо выше доля активированных цитотоксических Т-лимфоцитов $CD3^+CD8^+CD69^+$ -клеток (параграф 3.3.3).

Считается, что для нормального развития беременности важен баланс между цитотоксической активностью Т-лимфоцитов и NK-клеток [296]. Вероятно, уровень экспрессии CD69 на поверхности Т-лимфоцитов, определяемый в периферической крови до стимуляции *in vitro*, является маркером уровня специфического ответа Т-лимфоцитов на антигены плода. В таком случае можно предположить, что у женщин с выкидышем был повышен не только ответ лимфоцитов на поликлональную стимуляцию, но и специфический ответ Т-лимфоцитов на антигены плода. Нельзя исключить, что у большинства пациенток аллоиммунизация может предотвращать избыточный ответ лимфоцитов как на поликлональную стимуляцию, так и на стимуляцию Т-лимфоцитов антигенами плода, о чем свидетельствует выявленный нами стабильный на всех сроках беременности уровень экспрессии CD69 на поверхности $CD3^+$ -лимфоцитов у женщин с пролонгированной беременностью. Следовательно, у пациенток с выкидышем регистрируется повышенная митоген-стимулированная экспрессия *in vitro* CD69 Т-лимфоцитами с цитотоксической направленностью, но не NK-клетками.

Уже устоялось представление о том, что во время нормальной беременности NK-клетки - это, прежде всего, клетки, формирующиеся для обеспечения процессов инвазии трофобласта и ремоделирования спиральных

артерий под влиянием микроокружения, появляющегося в случае адекватного распознавания фетальных антигенов, что, в свою очередь, является условием возникновения специфической периферической толерантности при нормальной беременности [152]. Такое представление подтверждается результатами наших исследований, в которых показано, что в 5-6 недель беременности у 100% пациенток, способных доносить наступившую беременность, уровень экспрессии CD69 на поверхности лимфоцитов субпопуляций CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ после 2-часовой стимуляции митогеном (таблица 3.17) будет превышать критериальные значения, с которыми может быть сделан прогноз потери беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации.

Однако отмеченное превышение имеет ограничения. Исследование экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови после 72-часовой митогенной стимуляции *in vitro* выявило, что в I триместре гестации у женщин с пролонгированной беременностью была отмечена меньшая, чем у женщин с выкидышем, доля клеток, экспрессирующих CD69 после митогенного стимула (параграф 3.3.2). Проведенный расчет диагностической значимости определения доли CD69⁺-клеток в 8-9 недель гестации у женщин с ИПВ показал, что при превышении доли CD69⁺-клеток критериального значения в 82,1% с чувствительностью 80,0% и специфичностью 93,3% можно прогнозировать развитие выкидыша. Забеременевшие женщины с ИПВ, у которых в течение I триместра на фоне аллоиммунизации доля CD69⁺-клеток после стимуляции митогеном превышает 82,1%, должны рассматриваться как группа повышенного риска реализации выкидыша.

Анализ в группах пациенток с пролонгированной и прервавшейся беременностью Трег-клеток с внутриклеточной экспрессией транскрипционных факторов FOXP3 и активированных Th17-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high} RORγt⁺ показал, что содержание FOXP3⁺Трег в 5-6 недель наступившей беременности в этих группах было одинаковым, но содержание CD4⁺CD25^{high} RORγt⁺-клеток в 5 - 6 недель гестации у пациенток, потерявших беременность, было значимо меньше (параграф 3.2.5), и, соответственно, у этих

пациенток содержание среди Трег FOXP3⁺-клеток в среднем в 12 раз превышало содержание Th-17клеток по сравнению с содержанием у пациенток с пролонгированной беременностью (рисунок 3.11).

Для нормального развития беременности важен баланс данных типов Т-лимфоцитов, поскольку отражает баланс в реакциях формирования толерантности и развития быстрых интенсивных иммунных воспалительных реакций, за которые ответственны Th17-клетки и ТФ ROR γ t [170]. Баланс, называемый опасным и нестабильным, поскольку линия Th17-клеток является мостом между врожденным и адаптивным иммунитетом, обеспечивает сильный воспалительный ответ, который может приводить и к развитию воспаления патологического характера [198].

В данном исследовании (параграф 3.2.5) у пациенток с прервавшейся беременностью начальные сроки гестации характеризовались низким уровнем Th17-клеток и превалированием FOXP3⁺Трег, низким содержанием NK-клеток и отсутствием различий в экспрессии CD69 киллерными клетками по сравнению с аналогичными показателями у женщин с пролонгированной беременностью, и это, по-видимому, отражает нарушения в активации клеток фетальными антигенами через Т-клеточный рецептор на самых ранних этапах беременности, а также дальнейшие нарушения во взаимодействии активированных клеток с натуральными киллерными клетками, что является обязательным при формировании необходимого Th1-типа провоспалительного фона в процессах имплантации, а затем и плацентации.

Это предположение также подкрепляется результатами анализа продукции цитокинов митоген-стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови пациенток с ИПВ, забеременевших после предгестационной аллоиммунизации (параграф 3.4). При анализе выяснилось, что у пациенток с ИПВ до назначения аллоиммунизации при подготовке к беременности определяется преимущественно Th2-направленность иммунного ответа, которая после предгестационной аллоиммунизации сохранилась.

Однако у пациенток с пролонгированной беременностью в 5-6 недель

гестации в митоген-стимулированной продукции цитокинов появились признаки к изменению типа иммунных реакций, заключающихся в значимом увеличении соотношений ИФН- γ /ИЛ-10, ИФН- γ /ИЛ-4 ИЛ-12p70/ИЛ-10 ($p=0,025$, $p=0,016$ и $p=0,022$, соответственно) по сравнению со значениями после предгестационной подготовки, а в 12 недель гестации выявлено преобладание признаков Th1-типа провоспалительных реакций как при сравнении с контрольной группой беременных, так и при сравнении с данными в 5 - 6 недель гестации.

У пациенток с выкидышем в 5-6 недель наступившей беременности при значимо более низком содержании в периферической крови $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma_t^+$ -клеток в сравнении с уровнем у пациенток с пролонгированной беременностью и одинаковым содержании FOXP3⁺Трег-клеток (параграф 3.2.5) была значимо выше продукция ИЛ-17 митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови. С одной стороны, низкий уровень в периферической крови клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma_t^+$ может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови, а с другой, высокий уровень продукции ИЛ-17 отражает присутствие в периферической крови клеток, способных при стимуляции интенсивно продуцировать ИЛ-17 и формировать Th17-тип провоспалительных реакций. Такими клетками, помимо активированных Th17-клеток являются и другие типы Т-клеток, например, $\gamma\delta$ -Т-клетки и $CD8^+$ -Т-клетки [346, 347, 348, 349, 350]. Источником ИЛ - 17 являются эозинофилы [351], нейтрофилы и макрофаги [344, 352, 353]. Обнаружена способность к продукции ИЛ-17 после стимуляции у субпопуляции инвариантных НКТ-лимфоцитов (iNKT) [355]. Кроме того, продуцируемые стимулированными митогеном клетками в культуре ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-21, ИФН- γ через транскрипционные факторы IRF4, BATF и активатор транскрипции STAT3 могут усиливать продукцию ИЛ-17 Th17- клетками [344, 345]. Значимым источником ИЛ-17, независимым от экспрессии ROR γ_t , могут являться и активированные В - клетки [356].

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о дисбалансе иммунного ответа у пациенток с ИПВ, потерявших беременность на фоне аллоиммунизации и подтверждает участие $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma_t^+$ -лимфоцитов (активированных Th-17-

клеток) наряду с FOXP3⁺Трег в механизмах формирования толерантности к отцовским антигенам плода. В будущем еще предстоит оценить участие ТФ ROR γ t и Th17–клеток в механизмах формирования или срыва толерантности к отцовским антигенам плода при беременности [367]. И хотя в данной работе не показана возможность одновременной экспрессии ROR γ t и FOXP3 в клетках с фенотипом CD4⁺CD25^{high}, однако есть экспериментальные данные о том, что именно с экспрессией ROR γ t в FOXP3⁺Трег связана продукция высокого уровня интерферон-регулирующего фактора 4, который наделяет Трег способностью супрессировать Th2-ответ, что очень важно именно в ранние сроки беременности [202]. Изложенное указывает на необходимость поиска методов терапевтического воздействия, способных ослаблять, но не отменять Th17-ответ во время лечения, проводимого для пролонгирования беременности.

Нормальное развитие гестационных процессов определяется адекватным соотношением системных реакций активации и супрессии, контролирующей интенсивность и последовательность иммунных реакций на разных этапах беременности. Важную роль для течения беременности может играть присутствие в сыворотке крови беременных факторов, ограничивающих реакцию иммунокомпетентных клеток на активирующие стимулы и препятствующих проявлению избыточности в этих реакциях. Этим объясняется интерес к исследованию блокирующего (ингибирующего, супрессирующего) действия аутологичной сыворотки на экспрессию раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами после митогенной стимуляции *in vitro*. В результате проведенных исследований обнаружено, что у женщин с выкидышем блокирующий эффект аутологичной сыворотки в I триместре был существенно меньше, чем у пациенток с пролонгированной беременностью (рисунок 3.19).

Необходимо отметить, что при анализе иммунного статуса и изменений иммунных показателей в динамике наблюдения у пациенток с пролонгированной беременностью практически по всем исследованным показателям не выявлено отличий с иммунным статусом здоровых фертильных женщин вне беременности. Это касается субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови,

включая содержание FOXP3⁺Трег и активированных Th17-клеток (параграф 3.2), экспрессии раннего активационного маркера CD69, оцениваемого в различных экспериментальных условиях (параграф 3.3), продукции цитокинов (параграф 3.4), блокирующей активности аутологичной сыворотки (параграф 3.3.2). После аллоиммунизации в предгестационной подготовке пациенток с ИПВ, проведенной в качестве монотерапии, изменений в иммунологических показателях не обнаружено. Значимые изменения выявлены в конце I триместра, после аллоиммунизации в 5-6 и 8-9 недель, и как уже излагалось выше, обусловлены эти изменения, скорее всего, гормональным фоном самой беременности. В связи с этим интерес представила оценка блокирующей активности аутологичной сыворотки пациенток с ИПВ и продукции цитокинов митоген-стимулированными лимфоцитами их периферической крови в динамике беременности, пролонгированной до доношенного срока и завершившейся рождением живого ребенка.

Результатом проведенной оценки явилось выявление динамики блокирующей активности сыворотки не только в течение всей беременности, но и в течение I триместра. Выявлено резкое падение блокирующей активности сыворотки до минимальных значений в сроке 8-9 недель, что, по-видимому, связано с необходимостью иммунного контроля первой волны инвазии трофобласта в спиральные артерии матки после высокой блокирующей активности в период имплантации. О развитии интенсивных противовоспалительных реакций в этот период свидетельствует выявленное увеличение митоген-стимулированной продукции ИЛ-6 и снижение продукции ИФН- γ , а также значимое снижение соотношений цитокинов ИЛ - 2/ИЛ - 4, ИЛ - 8/ИЛ - 4, ИЛ - 8/ИЛ - 10, ИФН - γ /ИЛ - 10 (параграф 3.4.2).

Однако при снижении значений блокирующей активности аутологичной сыворотки ниже 23,2% с чувствительностью 100% и специфичностью 46% можно прогнозировать потерю беременности. И пациентки с ИПВ, у которых в 8-9 недель гестации на фоне иммунотерапии блокирующий эффект аутологичной сыворотки менее 23%, должны рассматриваться как группа повышенного риска

для реализации выкидыша.

Начиная с 11-12 недель беременности, блокирующая активность сыворотки увеличивается, и на сроке 23-25 и 33-35 недель она значимо выше, чем в I триместре. К сожалению, нет данных о блокирующей активности сыворотки перед родами. Тем не менее, высокая блокирующая активность в третьем триместре может отражать специфическую активацию иммуносупрессивных механизмов, подавляющих избыточный иммунный ответ на усиленную аллогенную стимуляцию со стороны развивающегося плода. Выявленная динамика блокирующей активности сыворотки в течение всего гестационного периода у пациенток с доношенной беременностью свидетельствует об изменении функционального состояния иммунной системы, связанном с увеличением содержания в сыворотке факторов, подавляющих функциональную активность собственных иммунокомпетентных клеток, что согласуется с представлениями о развитии неспецифической гестационной иммуносупрессии, обусловленной гормонами и специфическими белками беременности.

Отмечено, что высокая блокирующая активность сыворотки на митогенную активацию периферических лимфоцитов была в группе пациенток, у которых она до назначения лечения была значимо выше, чем у фертильных женщин, а после проведенной предгестационной аллоиммунизации стала еще выше, и у таких пациенток беременность не наступила в течение двухлетнего периода наблюдения (таблица 3.13), что может быть обусловлено достижением состояния иммунной системы, не способного развить необходимого воспалительного фона, способствующего успешной имплантации.

Также высокий противовоспалительный фон может и, скорее, должен сопровождать процессы роста плода в срединные сроки гестации, что было показано как анализом блокирующей активности сыворотки, так и анализом продукции *in vitro* цитокинов митоген-стимулированными лимфоцитами пациенток с доношенной беременностью. На сроке в 12-15 недель зарегистрировано увеличение продукции ИЛ-10, и во II триместре беременности продукция всех исследованных цитокинов не отличалась от их уровня,

определяемого в I триместре (параграф 3.4.2). В 33-34 недели проявилась тенденция к увеличению продукции цитокинов провоспалительной направленности (ИФН- γ и ФНО- α) и увеличение соотношений ИФН- γ /ИЛ-10, ФНО- α /ИЛ-10 несмотря на то, что продукция ИЛ-10 оказалась даже выше по сравнению с уровнем в I триместре. Такая динамика митоген-стимулированной продукции цитокинов согласуется с данными о том, что механизмы иммунорегуляции последнего этапа беременности и родов включают в себя воспалительные процессы [174].

В целом, полученные результаты подтверждают представление о том, существует динамика направленности иммунных реакций во время беременности, связанная с временными закономерностями формирования и роста плода. Эта динамика нашла свое отражение в результатах исследований блокирующей активности аутологичной сыворотки, оцениваемой по митоген-индуцированной экспрессии раннего активационного маркера CD69, и продукции цитокинов митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови.

Выявленная динамика названных показателей наряду с данными о нормализации субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и способности лимфоцитов отвечать на стимулирующее воздействие *in vitro* экспрессией CD69, с данными о балансе FOXP3⁺Трег-клеток и активированными Th17-клетками согласуется с современными представлениями о динамике иммунных взаимоотношений матери и плода в случае физиологического течения беременности. Полученные результаты позволяют сделать вывод о состоявшемся формировании толерантности к аллоантигенам плода отцовского происхождения у пациенток с ИПВ, у которых беременность наступила после аллоиммунизации в предгестационной подготовке, была пролонгирована до доношенного срока на фоне аллоиммунизации в I триместре и завершилась рождением живого ребенка.

Таким образом, проведенная работа способствовала уточнению представлений о роли гуморальных и клеточных факторов иммунорегуляции различных этапов репродуктивного процесса при иммунокоррекции ПВ с использованием процедуры аллоиммунизации лимфоцитарными клетками

партнеров. В результате исследований определены показатели, диагностически значимые для назначения процедуры аллоиммунизации, показатели, отражающие эффективность аллоиммунизации, что важно для клинической практики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование толерантности к аллоантигенам плода отцовского происхождения при беременности сложный, хронологически детерминированный процесс, включающий в себя аллогенную стимуляцию материнской иммунной системы отцовскими антигенами и последующее развитие клеточных и гуморальных реакций, подавляющих отторжение плода. Этот процесс многофакторный, зависящий не только от состояния материнской иммунной системы, но и от гормональных сигналов, характерных для ранней беременности, гармоничный при физиологической беременности, завершающейся рождением живого ребенка на доношенном сроке.

Дисбаланс во взаимодействии клеток материнской иммунной системы и сигналов, исходящих от формирующегося плода, считается патогенетическим фактором, приводящим к потере беременности при ИПВ. Для коррекции состояния иммунной системы женщин с идиопатическим привычным невынашиванием беременности предлагают использование процедуры аллоиммунизации партнерскими лимфоцитами.

К сожалению, однозначного мнения об эффективности данной процедуры в мировой практике нет, что обусловлено разнородностью анамнеза женщин, включенных в исследование, разными протоколами иммунизации и разнообразием показателей, используемых для оценки состояния женской иммунной системы при иммунизации. При этом довольно устойчиво мнение, что успех иммунизации женщин партнерскими лимфоцитами в случае пролонгирования беременности связан с изменением провоспалительного состояния их иммунной системы на противовоспалительное. Однако все чаще в последнее десятилетие звучат утверждения о необходимости провоспалительного состояния материнской иммунной системы для успешности процессов и имплантации, и плацентации.

В данное исследование включали женщин с первичным ИПВ, отбор проводили по анамнестическим признакам с соблюдением принципа исключения

всех известных причин ПВ. Процедура аллоиммунизации в предгестационной подготовке применялась в качестве монотерапии, а в I триместре - в качестве обязательного компонента комплексной терапии.

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. 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.

Показано, что успех пролонгирования беременности у данной категории женщин связан с формированием провоспалительного состояния иммунной системы в ранние сроки гестации и с наличием динамики иммунологических показателей как в течение I триместра, так и в течение всего гестационного периода, включая динамику блокирующей активности аутологичной сыворотки и динамику Th1/Th2-баланса цитокиновой продукции митоген-стимулированными лимфоцитами.

И, наоборот, у женщин, потерявших данную беременность, выявлено низкое содержание клеток с естественной киллерной активностью по сравнению с содержанием у пациенток с пролонгированной беременностью уже до иммунизации вне беременности. Зависимость между низким содержанием киллерных субпопуляций и вероятностью потери беременности в первом триместре сохраняется и в 5-6 недель беременности, при этом спектр субпопуляций, оценка которых обладает высокой прогностической значимостью, расширяется и включает в себя субпопуляцию $CD3^+CD8^+$, В- и $CD200^+$ -лимфоциты.

Успешное пролонгирование беременности у женщин после иммунизации в I триместре сопровождается увеличением уровня Т-лимфоцитов с естественной

регуляторной активностью и фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ к концу I триместра гестации. Этот факт свидетельствует о важной роли растворимых факторов ранней беременности в формировании реакций женской иммунной системы на аллоантигены плода, поскольку после предгестационной иммунизации такого эффекта не наблюдалось.

Высокое содержание активированных клеток среди Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией в периферической крови женщин, потерявших беременность на фоне иммунизации, а также формирование гуморальной реакции на введение лимфоцитов партнера (образование антиотцовских антилейкоцитарных антител) у иммунизированных женщин может отражать отсутствие нарушений в распознавании аллоантигенов плода у женщин с ПВ, а, с другой стороны, может подтверждать наличие дисбаланса во взаимодействии иммунокомпетентных клеток материнской иммунной системы и ранних сигналов от плода у женщин с данной акушерской патологией.

Кроме того, в отличие от пациенток с успешно доношенной беременностью, у которых аллоиммунизация способствовала формированию необходимого Th1-типа иммунного реагирования на ранних сроках гестации, у пациенток с прервавшейся беременностью, сформировался провоспалительный Th17-тип иммунного реагирования. В пользу такого утверждения свидетельствует снижение после предгестационной аллоиммунизации уровня $FOXP3^+Treg$, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, а также низкий уровень активированных $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -лимфоцитов и высокая продукция *in vitro* митоген-стимулированными клетками периферической крови ИЛ-17 в начальные сроки гестации. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования значимости ИЦТ в контроле интенсивности воспалительного ответа у женщин с ИПВ.

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 ИПВ в анамнезе и у женщин с физиологическим течением

беременности не отличается;

- 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, с одной стороны, свидетельствуют об успешном формировании толерантности к аллоантигенам плода у женщин с ИПВ, в лечении которых использовали процедуру иммунизации лимфоцитами партнеров, с другой, 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⁺- 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⁺-лимфоцитов, NK-, NKT-клеток и лимфоцитов с фенотипом CD3⁻CD8⁺ 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⁺ и CD8⁺) как у женщин с пролонгированной беременностью, так и у женщин с выкидышем при отсутствии различий в доле экспрессирующих CD69 NK-клеток (CD45⁺CD56⁺CD69⁺/CD45⁺CD56⁺) в 5-6 недель гестации. При этом превышение у пациенток с выкидышем доли CD69⁺CD3⁺CD8⁺-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⁺Treg у женщин с идиопатическим привычным выкидышем и у фертильных не отличалась; а доля RORγt⁺-клеток среди CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитов была значимо выше. В 5-6 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью доля RORγt⁺-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}RORγt⁺-лимфоцитов не отличались от контрольных значений, что свидетельствует об успешном формировании толерантности к аллоантигенам плода на фоне иммуноцитотерапии.

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-γ и ФНО-α, а также баланс продукции ИФН-γ/ИЛ-10 и ФНО-α/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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для женщин с установленным диагнозом идиопатического привычного выкидыша при отсутствии двух и более выношенных беременностей от одного партнера показано проведение предгестационной подготовки [314]. Перед назначением процедур в предгестационной подготовке необходимо исследование иммунного статуса с оценкой содержания в периферической крови лимфоцитов с фенотипом NK- и NKT-клеток, $CD200^+$, $CD3^-CD8^+$, В1-клеток, Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$. 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 $CD56^+$ -лимфоцитов менее 14,6%, $CD3^-CD56^+CD16^+$ - менее 12,2%, $CD3^+CD56^+CD16^+$ - 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 $CD3^+$ -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 [314]. При установлении маточной беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации, в 5 - 6 недель женщинам рекомендуется исследование иммунного статуса. При содержании в периферической крови $CD56^+$ -лимфоцитов менее 10,3%, $CD3^-CD56^+CD16^+$ - менее 5,8%, $CD3^-CD16^+$ - менее 3,1%, $CD200^+$ - менее 8,9%, $CD3^-CD8^+$ - 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 с выявлением характера связей показателей, отражающих состояние иммунной системы женщин с идиопатическим привычным выкидышем при беременности, развивающейся на фоне иммунокоррекции, с уровнем факторов ранней беременности для более глубокого понимания механизмов, способствующих успешному формированию толерантности к отцовским антигенам плода и пролонгированию беременности, и с поиском маркеров осложнений течения второго триместра гестации и предикции преждевременных родов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

абс	- абсолютное содержание
АГ	- антиген
АОАТ	- антиотцовские антилейкоцитарные антитела
АПК	- антигенпредставляющие клетки
АФС	- антифосфолипидный синдром
БСА	- бычий сывороточный альбумин
БЭ	- блокирующий эффект аутологичной сыворотки
ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения (World Health Organization, WHO).
ВРТ	- вспомогательные репродуктивные технологии
ГМКФ	- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ИЛ	- интерлейкин
ИПВ	- идиопатический привычный выкидыш
ИФН	- интерферон
ИЦТ	- иммуцитотерапия, иммунизация женщин с ПВ в анамнезе аллогенными клетками партнеров
КонА	- конканавалин А
мАт	- моноклональные антитела
МИФ	- миграцию макрофагов ингибирующий фактор
МКБ	- Международная классификация болезней
МНК	- мононуклеары периферической крови
ПВ	- привычный выкидыш

ПИБФ	- прогестерон-индуцированный блокирующий фактор
ПИФ	- преимплантационный фактор
ПЦМ	- проточная цитометрия
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭ	- преэклампсия
СИФ	- средняя интенсивность флуоресценции позитивных клеток
СКЛ	- смешанная культура лимфоцитов
Трег	- Т-лимфоциты с естественной регуляторной активностью
ТФ	- транскрипционный фактор
УЕФ	- условные единицы флуоресценции
УЗИ	- ультразвуковое исследование
ФГА	- фитогемагглютинин
ФНО	- фактор некроза опухоли
ФСБ	- фосфатно-солевой буфер
ХГЧ	- хорионический гонадотропин человека
ЭКО	- экстракорпоральное оплодотворение
ЭТС	- эмбриональная телячья сыворотка
АРС	- аллофикоцианин
CD	- кластер дифференцировки (англ. cluster of differentiation)
FITC	- флюоресцеинизотиоцианат
FOXP3	- транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку клеток и экспрессию цитокинов, участвующих в супрессии иммунного ответа.

HLA	- человеческие лейкоцитарные антигены (англ. human leukocyte antigens)
MHC	- главный комплекс гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex)
NK	- натуральные (естественные) киллеры
NKT	- субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих маркеры NK- и T-клеток
PE	- фикоэритрин
Per-CP	- перидинин-хлорофилл протеин
PKC	- протеин-киназа C
ROR γ t	- транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку T-лимфоцитов в направлении Th17
ТФР- β	- трансформирующий фактор роста β
Th1, Th2, Th17	- Т-хелперы 1, Т-хелперы 2, Т-хелперы 17
$\gamma\delta$ ТКР	- $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Matthiesen, L. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm / L. Matthiesen, S. Kalkunte, S. Sharma // American Journal of Reproductive Immunology. - 2012. - V. 67. - № 4. - P. 334-340.
2. Williams, Z. Inducing tolerance to pregnancy / Z. Williams // New England Journal of Medicine. - 2012. - V. 367. - № 12. - P. 1159-1161.
3. Farquharson, R.G. Early pregnancy / R.G. Farquharson, M.D. Stephenson. – 2-nd ed. - Cambridge: Cambridge University Press, 2017. - 344 p.
4. Kishore, R. HLA sharing, anti-paternal cytotoxic antibodies and MLR blocking factors in women with recurrent spontaneous abortion / R. Kishore, S. Agarwal, A. Halder, V. Das, B.R. Shukla, S.S. Agarwal // Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. - 1996. - V. 22. - № 2. - P. 177-183.
5. Ober, C. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study / C. Ober, T. Hyslop, S. Elias, L.R. Weitkamp, W.W. Hauck // Human Reproduction. - 1998. - V. 13. - № 1. - P. 33-38.
6. Agrawal, S. Prevalence of MLR blocking antibodies before and after immunotherapy / S. Agrawal, M.K. Pandey, A. Pandey // Journal of hematotherapy & stem cell research. - 2000. - V. 9. - № 2. - P. 257-262.
7. Umapathy, S. Role of anti-human lymphocyte culture cytotoxic antibodies in recurrent spontaneous pregnancy loss women / S. Umapathy, A. Shankarkumar, V. Ramrakhiyani, K. Ghosh // Journal of human reproductive sciences. - 2011. - V. 4. - № 1. - P. 17.
8. Saito, S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta / S. Saito // Journal of reproductive immunology. - 2001. - V. 52. - № 1. - P. 15-33.
9. Fest, S. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy / S. Fest, P.B. Aldo, V.M. Abrahams, I. Visintin, A. Alvero,

R. Chen, S.L. Chavez, R. Romero, G. Mor // American journal of reproductive immunology. - 2007. - V. 57. - № 1. - P. 55-66.

10. Mor, G. The immune system in pregnancy: a unique complexity / G. Mor, I. Cardenas // American journal of reproductive immunology. - 2010. - V. 63. - № 6. - P. 425-433.

11. Wang, W.J. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / W.J. Wang, C.F. Hao, Yi-Lin, G.J. Yin, S.H. Bao, L.H. Qiu, Q.D. Lin // Journal of reproductive immunology. - 2010. - V. 84. - № 2. - P. 164-170.

12. Saito, S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia / S. Saito // Immunology and cell biology. - 2010. - V. 88. - № 6. - P. 615.

13. Saito, S. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology / S. Saito, A. Nakashima, M. Ito, T. Shima // Expert review of clinical immunology. - 2011. - V. 7. - № 5. - P. 649-657.

14. Petroff, M.G. Review: Fetal antigens-identity, origins, and influences on the maternal immune system / M.G. Petroff // Placenta. - 2011. - V. 32. - P. S176-S181.

15. Tomura, M. Naive CD4⁺ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function / M. Tomura, K. Itoh, O. Kanagawa // The Journal of Immunology. - 2010. - V. 184. - № 9. - P. 4646-4653.

16. Moldenhauer, L.M. Utilising T cell receptor transgenic mice to define mechanisms of maternal T cell tolerance in pregnancy / L.M. Moldenhauer, J.D. Hayball, S.A. Robertson // Journal of reproductive immunology. - 2010. - V. 87. - № 1. - P. 1-13.

17. Martín, P. CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses / P. Martín, F. Sánchez-Madrid // Science Signaling - 2011. - V. 4. - № 165. - pe14. – 3 p. URL: <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;4/165/pe14>. Дата обращения: 05.10.2017.

18. Leber, A. Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses / A. Leber, M.L. Zenclussen, A. Teles, N. Brachwitz, P. Casalis, T. El-Mouseh, F. Jensen, K. Woidacki, A.C. Zenclussen // *Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols*. - 2011. - P. 397-417.

19. Toldi, G. The frequency of peripheral blood CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia / G. Toldi, S. Saito, T. Shima, A. Halmos, Z. Veresh, B. Vásárhelyi, J. Rigó, A. Molvarec // *American journal of reproductive immunology*. - 2012. - V. 68. - № 2. - P. 175-180.

20. Erlebacher, A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus / A. Erlebacher // *Nature Reviews Immunology*. - 2013. - V. 13. - № 1. - P. 23-33.

21. Arruvito, L. A physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure / L. Arruvito, A.I. Sotelo, A. Billordo, L. Fainboim // *Clinical Immunology*. - 2010. - V. 136. - № 3. - P. 432-441.

22. Saito, S. CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells in human pregnancy / S. Saito, Y. Sasaki, M. Sakai // *Journal of reproductive immunology*. - 2005. - V. 65. - № 2. - P. 111-120.

23. Peterson, R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression / R.A. Peterson // *Toxicologic pathology*. - 2012. - V. 40. - № 2. - P. 186-204.

24. Caruso, A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation / A. Caruso, S. Licenziati, M. Corulli, A.D. Canaris, M.A. De Francesco, S. Fiorentini, L. Peroni, F. Fallacara, F. Dima, A. Balsari, A. Turano // *Cytometry*. - 1997. - V. 27. - № 1. - P. 71-76.

25. Lindsey, W.B. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery / W.B. Lindsey, M.W. Lowdell, G.E. Marti, F. Abbasi, V. Zenger, K.M. King, L.S. Lamb // *Cytotherapy*. - 2007. - V. 9. - № 2. - P. 123-132.

26. Saldanha-Araujo, F. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF- κ B signalling / F. Saldanha-Araujo, R. Haddad, K.C. Farias, P. Souza Ade, P.V. Palma, A.G. Araujo, M.D. Orellana, J.C. Voltarelli, D.T. Covas, M.A. Zago, R.A. Panepucci // Journal of cellular and molecular medicine. - 2012. - V. 16. - № 6. - P. 1232-1244.

27. Montelli, T.C. Immunologic aspects of West syndrome and evidence of plasma inhibitory effects on T cell function / T.C. Montelli, A.M. Soares, M.T. Peraçoli // Arquivos de neuro-psiquiatria. - 2003. - V. 61. - № 3B. - P. 731-737.

28. Valencic, E. T cells stimulated *in vitro* have a suppressive function but do not contain only regulatory T cells / E. Valencic, E. Piscianz, A. Tommasini, M. Granzotto // Clinical & Experimental Immunology. - 2007. - V. 150. - № 3. - P. 561-566.

29. Takizawa, K. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin / K. Takizawa, S. Kitani, F. Takeuchi, K. Yamamoto // Endocrine journal. - 2005. - V. 52. - № 5. - P. 635-641.

30. Yan, C.H. Preparation of placenta factor and its immunoregulatory effects on lymphocytes *in vitro* / C.H. Yan, D.P. Lu // Journal of experimental hematology of Chinese Association of Pathophysiology. - 2007. - V. 15. - № 3. - P. 567-572.

31. Matthiesen, L. Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy / L. Matthiesen, G. Berg, J. Ernerudh, L. Håkansson // American Journal of Reproductive Immunology. - 1996. - V. 35. - № 2. - P. 70-79.

32. Шмагель, К.В. Иммунитет беременной женщины / К. В. Шмагель, В.А. Черешнев - М.: Медицинская книга, 2003. – 225 с.

33. Shojaeian, J. Immunosuppressive effect of pregnant mouse serum on allostimulatory activity of dendritic cells / J. Shojaeian, S.M. Moazzeni, S. Nikoo, M. Bozorgmehr, M. Nikougofar, A.H. Zarnani // Journal of reproductive immunology. - 2007. - V. 75. - № 1. - P. 23-31.

34. Bozorgmehr, M. Suppressive effect of pregnant serum on murine dendritic cell function / M. Bozorgmehr, A.H. Zarnani, S. Nikoo, S.M. Moazzeni // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. - 2012. - V. 38. - № 5. - P. 797-803.
35. Mowbray, J.F. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells / J.F. Mowbray, C. Gibbings, H. Liddell, P.W. Reginald, J.L. Underwood, R.W. Beard // *The Lancet*. - 1985. - V. 325. - № 8435. - P. 941-943.
36. Regan, L. Recurrent miscarriage / L. Regan // *BMJ: British Medical Journal*. - 1991. - V. 302. - № 6776. - P. 543.
37. Maruyama, T. Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortions who underwent paternal leukocyte immunotherapy / T. Maruyama, T. Makino, T. Sugi, K. Iwasaki, N. Ozawa, H. Matsubayashi, S. Nozawa // *American journal of obstetrics and gynecology*. - 1993. - V. 168. - № 5. - P. 1528-1536.
38. Nielsen, H.S. The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of a live birth / H.S. Nielsen, M.D. Witvliet, R. Steffensen, G.W. Haasnoot, E. Goulmy, O.B. Christiansen, F. Claas // *Journal of reproductive immunology*. - 2010. - V. 87. - № 1. - P. 67-73.
39. Shenton, B.K. Importance of methodology in the flow cytometric crossmatch: a multicentre study / B.K. Shenton, A.E. Bell, A.W. Harmer [et al.] // *Transplantation proceedings*. - 1997. - V. 29. - № 1-2. - P. 1454-1455.
40. Lashley, E.E. Beneficial or harmful effect of antipaternal human leukocyte antibodies on pregnancy outcome? A systematic review and meta-analysis / E.E. Lashley, T. Meuleman, F.H.J. Claas // *American journal of reproductive immunology*. - 2013. - V. 70. - № 2. - P. 87-103.
41. Сотникова, Н.Ю. Иммунологическая загадка беременности / Под ред. Н.Ю. Сотниковой. - Иваново: Изд-во МИК, 2005. – 276 с.

42. Beer, A.E. Immunobiology of mammalian reproduction / A.E. Beer, R.E. Billingham // *Advances in immunology*. - 1971. - V. 14. - P. 1-84.

43. Фонталин, Л.Н. Иммунологическая толерантность / Л.Н. Фонталин, Л.А. Певницкий, М.: Медицина. - 1978. – 312 с.

44. Voisin, G.A. Immunological tolerance to living cells, homologous disease and immunological facilitation (enhancement phenomenon). A working hypothesis allowing a unified concept / G.A. Voisin // *Mechanisms of immunological tolerance* / ed. by M. Hašek, A. Lengerová, M. Vojtíšková – Prague: Publishing House of Czech Academy of Sciences - 1962. - P.435-455.

45. Voisin, G.A. Relationship between tolerance and facilitation of allografted cells / G.A. Voisin, R. Kinsky, H.T. Duc // *Transplantation proceedings*. - 1972. - V. 4. - № 3. - P. 377-382.

46. Pandey, M.K. Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: a current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization for women with recurrent spontaneous abortion / M.K. Pandey, S. Agrawal // *International immunopharmacology*. - 2004. - V. 4. - № 2. - P. 289-298.

47. Nonaka, T. Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions--prospective non-randomized cohort study / T. Nonaka, K. Takakuwa, I. Ooki, M. Akashi, T. Yokoo, A. Kikuchi, K. Tanaka // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2007. - V. 58. - № 6. - P. 530-536.

48. Agrawal, S. Humoral immune response to an allogenic foetus in normal fertile women and recurrent aborters / S. Agrawal, M.K. Pandey, S. Mandal, L. Mishra, S. Agarwal // *BMC pregnancy and childbirth*. - 2002. - V.2. - №.1. - P. 6.

49. Rabson, A.R. The blocking by autologous serum of maternal cell-mediated immune reactions to placental antigen / A.R. Rabson, M.C. Bey, J.E. Kerrich, H.J. Koornhof // *South African medical journal*. - 1976. - V. 50. - № 7. - P. 201-205.

50. Ширшев, С.В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции: в 2-х томах / С.В. Ширшев. -Екатеринбург: РАН УО Ин-т экологии и генетики микроорганизмов, 2002.

51. Chaouat, G. Should We Re-Examine the Status of Lymphocyte Alloimmunization Therapy for Recurrent Spontaneous Abortion? / G. Chaouat // American Journal of Reproductive Immunology. - 2003. - V. 50. - № 6. - P. 433-438.

52. Roumen, G. A role for TLX antigens in pregnancy / G. Roumen, M.D. Roussev, O.A. Vanderpuye, D.R. Wagenknecht, J.A. McIntyre // Acta Europaea Fertilitatis. - 1990. - V. 22. - № 3. - P. 181-187.

53. Ito, K. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors / K. Ito, T. Tanaka, N. Tsutsumi, F. Obata, N. Kashiwagi // Human reproduction. - 1999. - V. 14. - № 3. - P. 650-655.

54. Khonina, N.A. Mixed lymphocyte reaction blocking factors (MLR-Bf) as potential biomarker for indication and efficacy of paternal lymphocyte immunization in recurrent spontaneous abortion / N.A. Khonina, E.V. Broitman, E.Y. Shevela, N.M. Pisman, E.R. Chernykh // Archives of gynecology and obstetrics. - 2013. - V. 288. - № 4. - P. 933-937.

55. Regan, L. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy / L. Regan, P.R. Braude, D.P. Hill // Human Reproduction. - 1991. - V. 6. - № 2. - P. 294-298.

56. Pandey, M.K. Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy/ M.K. Pandey, V. Saxena, S. Agrawal // BMC pregnancy and childbirth. - 2003. - V.3. - №.1 : 2. - 7 p. URL: <https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2393-3-2>. Дата обращения: 05.10.2017.

57. Останин, А.А. Показатели иммунитета беременных в раннем прогнозе развития фетоплацентарной недостаточности / А.А. Останин, С.М. Кустов,

Т.В. Тыринова, М.А. Тихонова, Н.А. Хонина, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // *Акушерство и гинекология*. - 2010. - № 1. - P. 33-38.

58. Chen, Q. Early Pregnancy Factor Enhances the Generation and Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells / Q. Chen, X. Zhu, R. Chen, J. Liu, P. Liu, A. Hu, L. Wu, H. Hua, H. Yuan // *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. - 2016. - V. 240. - № 3. – P. 215-220.

59. Ширшев, С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С.В. Ширшев – Екатеринбург: РАН УО Ин-т экологии и генетики микроорганизмов, 2009. – 582 с.

60. Сухих, Г.Т. Иммунология беременности / Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько - М.: Изд-во РАМН, 2003. - 400 с.

61. Agrawal, S. Development of anti-idiotypic antibodies to HLA antigens during pregnancy/ S. Agrawal, R.K. Sharma, R. Kishore, S.S. Agarwal // *The Indian journal of medical research*. - 1994. - V. 99. - P. 42-46.

62. Zhao, J.X. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy / J.X. Zhao, Y.Y. Zeng, Y. Liu // *Journal of reproductive immunology*. - 2007. - V. 75. - № 2. - P. 71-81.

63. Beer, A.E. Histocompatibility gene polymorphisms and maternal-fetal interactions / A.E. Beer, R.E. Billingham // *Transplantation proceedings*. - 1977. - V. 9. - № 2. - P. 1393-1401.

64. Lauritsen, J.G. Materno-fetal ABO incompatibility as a cause of spontaneous abortion / J.G. Lauritsen, N. Grunnet, O.M. Jensen // *Clinical genetics*. - 1975. - V. 7. - № 4. - P. 308-316.

65. Lauritsen, J.G. Significance of HLA and blood-group incompatibility in spontaneous abortion / J.G. Lauritsen, J. Jørgensen, F. Kissmeyer-Nielsen // *Clinical genetics*. - 1976. - V. 9. - № 6. - P. 575-582.

66. Gill, T.J. Mechanisms of action of major-histocompatibility-complex-linked genes affecting reproduction / T.J. Gill // American Journal of Reproductive Immunology. - 1999. - V. 41. - № 1. - P. 23-33.

67. Shankarkumar, U. HLA allele associations in idiopathic recurrent spontaneous abortion patients from India / U. Shankarkumar, A. Pawar, P. Gaonkar, D. Parasannavar, V. Salvi, K. Ghosh // Journal of human reproductive sciences. - 2008. - V. 1. - № 1. - P. 19-24.

68. Sterzik, K. Idiopathic habitual abortion: experiences with active immunotherapy / K. Sterzik, E. Strehler, M. De Santo, E. Oblinger, B. Rosenbusch, R. Kreienberg // Geburtshilfe und Frauenheilkunde. - 1995. - V. 55. - № 9. - P. 493-499.

69. Wagenknecht, D.R. Analyses of HLA-DQ alleles in recurrent spontaneous abortion (RSA) couples / D.R. Wagenknecht, K.M. Green, J.A. McIntyre // American Journal of Reproductive Immunology. - 1997. - V. 37. - № 1. - P. 1-6.

70. Souza, S.S. Immunological evaluation of patients with recurrent abortion / S.S. Souza, R.A. Ferriani, C.M. Santos, J.C. Voltarelli // Journal of reproductive immunology. - 2002. - V. 56. - № 1. - P. 111-121.

71. Varla-Leftherioti, M. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report from the reproductive immunology component / M. Varla-Leftherioti, T. Keramitsoglou, M. Spyropoulou-Vlachou, M. Papadimitropoulos, V. Kontopoulou-Antonopoulou, C. Tsekoura, U. Sankarkumar, N. Papanistidis, K. Ghosh, A. Pawar, V. Vrani, M. Daniilidis, E. Parapanissiou, A.S. Diler, M. Carin, C. Stavropoulos-Giokas // Tissue Antigens. - 2007. - V. 69. - №.1. - P. 297-303.

72. Bartel, G. Prevalence and qualitative properties of circulating anti-human leukocyte antigen alloantibodies after pregnancy: No association with unexplained recurrent miscarriage / G. Bartel, K. Walch, M. Wahrman, S. Pils, L. Küssel, S. Polterauer, C. Tempfer, G.A. Böhmig // Human immunology. - 2011. - V. 72. - № 2. - P. 187-192.

73. Степанова, Е.О. Сравнение результатов выявления 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, Л.В. Кречетова, Е.Л. Голубева, В.В. Вторушина, Л.В. Ванько, З.С. Ходжаева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т. 160. - №. 11. - С. 680-683.

74. Carp, H.J.A. Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment / ed. by H.J.A. Carp. - 2-nd ed. - London: CRC Press, 2014. – 456 p.

75. Vacca, P. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy / P. Vacca, L. Moretta, A. Moretta, M.C. Mingari // Trends in immunology. - 2011. - V. 32. - № 11. - P. 517-523.

76. Rajagopalan, S. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells / S. Rajagopalan, E.O. Long // The Journal of experimental medicine. - 1999. - V 189. - № 7. - P. 1093-1100.

77. Toyoda, M. Cellular allo reactivity against paternal HLA antigens in normal multiparous females as detected by intracellular cytokine flow cytometry remains elevated over years despite diminution of anti-HLA antibody levels / M. Toyoda, S. Ge, A. Pao, A. Vo, N. Deer, A. Aguiluz, A. Karasyov, S.C. Jordan // Transplant immunology. - 2010. - V. 23. - № 3. - P. 133-140.

78. Van den Boogaardt, D.E. The influence of inherited and noninherited parental antigens on outcome after transplantation / D.E. Van den Boogaardt, J.J. van Rood, D.L. Roelen, F.H. Claas // Transplant international. - 2006. - V. 19. - № 5. - P. 360-371.

79. Semple, J.W. Gamma-globulins prepared from sera of multiparous women bind anti-HLA antibodies and inhibit an established *in vivo* human alloimmune response / J.W. Semple, M. Kim, A.H. Lazarus, J. Freedman // Blood. - 2002. - V. 100. - № 3. - P. 1055-1059.

80. Bell, S.C. Humoral immune responses in murine pregnancy. I. Anti-paternal alloantibody levels in maternal serum / S.C. Bell, W.D. Billington // Journal of reproductive immunology. - 1981. - V. 3. - № 1. - P. 3-13.

81. Zenclussen, A.C. Asymmetric antibodies and pregnancy / A.C. Zenclussen, T. Gentile, G. Kortebani, A. Mazzolli, R. Margni // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2001. - V. 45. - № 5. - P. 289-294.

82. Gutierrez, G. Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy / G. Gutierrez, T. Gentile, S. Miranda, R.A. Margni // *Immunology of Pregnancy. Chemical Immunology and Allergy* / ed. by Markert U.R. – Basel: Karger Publishers, 2005. - V. 89. - P. 158-168.

83. Margni, R.A. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies / R.A. Margni, I.M. Borel // *Immunological reviews*. - 1998. - V. 163. - № 1. - P. 77-87.

84. Margni, R.A. The proportion of symmetric and asymmetric IgG antibody molecules synthesized by a cellular clone (hybridoma) can be regulated by placental culture supernatants / R.A. Margni, I.M. Borel, M. Kapovic, J. Angelucci, S. Miranda, R. Kinsky, G. Chaouat // *Cellular immunology*. - 1992. - V. 142. - № 2. - P. 287-295.

85. Gentile, T. Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rats immunized with paternal particulate antigens. Effect on pregnancy / T. Gentile, I.M. Borel, J. Angelucci, S. Miranda, R.A. Margni // *Journal of reproductive immunology*. - 1992. - V. 22. - № 2. - P. 173-183.

86. Borel, I.M. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human / I.M. Borel, T. Gentile, J. Angelucci, J. Pividori, M.C. Guala, R.A. Binaghi, R.A. Margni // *Journal of reproductive immunology*. - 1991. - V. 20. - № 2. - P. 129-140.

87. 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.

88. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник/А.А. Ярилин.-М.: ГЭОТАР - Медиа, 2010. – 752 с.

89. Anderle, C. Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor / C. Anderle, A. Hammer, B. Polgár, M. Hartmann, R. Wintersteiger, A. Blaschitz, G. Dohr, G. Desoye, J. Szekeres-Barthó, P. Sedlmayr // *Journal of reproductive immunology*. - 2008. - V. 79. - № 1. - P. 26-36.

90. Bogdan, A. Progesterone induced blocking factor isoforms in normal and failed murine pregnancies / A. Bogdan, B. Polgar, J. Szekeres-Bartho // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2014. - V. 71. - № 2. - P. 131-136.

91. Polgár, B. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome / B. Polgár, E. Nagy, E. Mikó, P. Varga, J. Szekeres-Barthó // *Biology of reproduction*. - 2004. - V. 71. - № 5. - P. 1699-1705.

92. Hudić, I. Progesterone - induced blocking factor (PIBF) and Th(1)/Th(2) cytokine in women with threatened spontaneous abortion / I. Hudić, Z. Fatusić // *Journal of perinatal medicine*. - 2009. - V. 37. - № 4. - P. 338-342.

93. Szekeres-Bartho, J. ELISA test for the detection of an immunological blocking factor in human pregnancy serum / J. Szekeres-Bartho, P. Varga, B. Pejtsik // *Journal of reproductive immunology*. - 1989. - V. 16. - № 1. - P. 19-29.

94. Arck, P. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress / P. Arck, P.J. Hansen, B. Mulac Jericevic, M.P. Piccinni, J. Szekeres-Bartho // *American journal of reproductive immunology*. - 2007. - V. 58. - № 3. - P. 268-279.

95. Szekeres-Bartho, J. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients / J. Szekeres-Bartho, B.J. Weill, G. Mike, D. Houssin, G. Chaouat // *Immunology letters*. - 1989. - V. 22. - № 4. - P. 259-262.

96. Check, J.H. Progesterone induced blocking factor seen in pregnancy lymphocytes soon after implantation / J.H. Check, J. Szekeres-Bartho, A. O'Shaughnessy // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1996. - V. 35. - № 3. - P. 277-280.

97. Druckmann, R. Progesterone and the immunology of pregnancy / R. Druckmann, M.A. Druckmann // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. - 2005. - V. 97. - № 5. - P. 389-396.

98. Ku, C.W. How can we better predict the risk of spontaneous miscarriage among women experiencing threatened miscarriage? / C.W. Ku, J.C. Allen Jr., R. Malhotra, H.C. Chong, N.S. Tan, T. Østbye, S.M. Lek, D. Lie, T.C. Tan // *Gynecological Endocrinology*. - 2015. - V. 31. - № 8. - P. 647-651.

99. Hudić, I. Maternal serum progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the prediction of preterm birth / I. Hudić, B. Stray-Pedersen, J. Szekeres-Bartho, Z. Fatušić, L. Dizdarević-Hudić, V. Tomić, B. Polgar, B. Hadžiefendić, J. Fatušić // *Journal of reproductive immunology*. - 2015. - V. 109. - P. 36-40.

100. Beta, J. Maternal serum progesterone-induced blocking factor at 11-13 weeks' gestation in spontaneous early preterm delivery / J. Beta, J. Szekeres-Bartho, E. Skyfta, R. Akolekar, K.H. Nicolaides // *Fetal diagnosis and therapy*. - 2011. - V. 29. - № 3. - P. 197-200.

101. Faust, Z. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells / Z. Faust, G. Laskarin, D. Rukavina, J. Szekeres-Bartho // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - V. 42. - № 2. - P. 71-75.

102. Laskarin, G. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity / G. Laskarin, V.S. Tokmadžić, N. Strbo, T. Bogović, J. Szekeres-Bartho, L. Randić, E.R. Podack, D. Rukavina // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2002. - V. 48. - № 4. - P. 201-209.

103. Szekeres-Bartho, J. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes / J. Szekeres-Bartho, Z. Faust, P. Varga // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1995. - V. 34. - № 6. - P. 342-348.

104. Raghupathy, R. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm

delivery / R. Raghupathy, E. Al-Mutawa, M. Al-Azemi, M. Makhseed, F. Azizieh, J. Szekeres-Bartho // *Journal of reproductive immunology*. - 2009. - V. 80. - № 1. - P. 91-99.

105. Szekeres-Bartho, J. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy / J. Szekeres-Bartho, G. Par, L. Szereday, C.Y. Smart, I. Achatz // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1997. - V. 38. - № 3. - P. 176-182.

106. Szekeres-Bartho, J. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance / J. Szekeres-Bartho, T.G. Wegmann // *Journal of reproductive immunology*. - 1996. - V. 31. - № 1-2. - P. 81-95.

107. Kozma, N. Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor / N. Kozma, M. Halasz, B. Polgar, T.G. Poehlmann, U.R. Markert, T. Palkovics, M. Keszei, G. Par, K. Kiss, J. Szeberenyi, L. Grama, J. Szekeres-Bartho // *The Journal of Immunology*. - 2006. - V. 176. - № 2. - P. 819-826.

108. Szekeres-Bartho, J. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways / J. Szekeres-Bartho, M. Halasz, T. Palkovics // *Journal of reproductive immunology*. - 2009. - V. 83. - № 1. - P. 60-64.

109. Szekeres-Bartho, J. The Role of γ/δ T Cells in Progesterone-Mediated Immunomodulation During Pregnancy: A Review / J. Szekeres-Bartho, A. Barakonyi, B. Polgar, G. Par, Z. Faust, T. Palkovics, L. Szereday // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - V. 42. - № 1. - P. 44-48.

110. Barakonyi, A. The role of gamma/delta T-cell receptor-positive cells in pregnancy: part II/ A. Barakonyi, B. Polgar, J. Szekeres-Bartho // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - V. 42. - № 2. - P. 83-87.

111. Kelemen, K. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies / K. Kelemen, I. Bogнар, M. Paal, J. Szekeres-Bartho // *Cellular immunology*. - 1996. - V. 167. - № 1. - P. 129-134.

112. Barnea, E.R. PIF direct immune regulation: Blocks mitogen-activated PBMCs proliferation, promotes TH2/TH1 bias, independent of Ca(2+) / E.R. Barnea, D. Kirk,

K. Todorova, J. McElhinney, S. Hayrabedian, N. Fernández // Immunobiology. - 2015. - V. 220. - № 7. - P. 865-875.

113. Paidas, M.J. A genomic and proteomic investigation of the impact of preimplantation factor on human decidual cells / M.J. Paidas, G. Krikun, S.J. Huang, R. Jones, M. Romano, J. Annunziato, E.R. Barnea // American journal of obstetrics and gynecology. - 2010. - V. 202. - № 5. - P. 459. e1-459. e8.

114. Ramu, S. PreImplantation factor (PIF) detection in maternal circulation in early pregnancy correlates with live birth (bovine model) / S. Ramu, C. Stamatkin, L. Timms, M. Ruble, R.G. Roussev, E.R. Barnea // Reproductive Biology and Endocrinology. - 2013. - V. 11. - № 1. - P. 105.

115. Barnea, E.R. Applying embryo-derived immune tolerance to the treatment of immune disorders / E.R. Barnea // Annals of the New York Academy of Sciences. - 2007. - V 1110. - № 1. - P. 602-618.

116. Roussev, R.G. Embryonic origin of preimplantation factor (PIF): biological activity and partial characterization/ R.G. Roussev, C.B. Coulam, B.D. Kaider, M. Yarkoni, P.C. Leavis, E.R. Barnea // Molecular Human Reproduction. - 1996. - V.2 - № 11. - P. 883-887.

117. Coulam, C.B. Preimplantation factor (PIF) predicts subsequent pregnancy loss / C.B. Coulam, R.G. Roussev, E.J. Thomason, E.R. Barnea // American Journal of Reproductive Immunology. - 1995. - V. 34. - № 2. - P. 88-92.

118. Roussev, R.G. A novel bioassay for detection of preimplantation factor (PIF) / R.G. Roussev, E.R. Barnea, E.J. Thomason, C.B. Coulam // American Journal of Reproductive Immunology. - 1995. - V. 33. - № 1. - P. 68-73.

119. Barnea, E.R. Progress in characterization of pre-implantation factor in embryo cultures and *in vivo* / E.R. Barnea, J. Simon, S.P. Levine, C.B. Coulam, G.S. Taliadouros, P.C. Leavis // American Journal of Reproductive Immunology. - 1999. - V. 42. - № 2. - P. 95-99.

120. Barnea, E.R. Embryo maternal dialogue: From pregnancy recognition to proliferation control / E.R. Barnea // *Early Pregnancy*. - 2001. - V. 5. - № 1. - P. 65-66.

121. Barnea, E.R. Insight into PreImplantation Factor (PIF*) mechanism for embryo protection and development: target oxidative stress and protein misfolding (PDI and HSP) through essential RIKP binding site / E.R. Barnea, D.M. Lubman, Y.H. Liu, V. Absalon-Medina, S. Hayrabedian, K. Todorova, R. Gilbert, J. Guingab, T.J. Barder // *PloS ONE*. - 2014. - V. 9. - № 7 : e0100263. – 16 p. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100263>. Дата обращения: 05.10.2017.

122. Roussev, R.G. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy / R.G. Roussev, B.V. Dons'koi, C. Stamatkin, S. Ramu, V.P. Chernyshov, C.B. Coulam, E.R. Barnea // *Reproductive biomedicine online*. - 2013. - V. 26. - № 1. - P. 79-87.

123. Mueller, M. PreImplantation factor promotes neuroprotection by targeting microRNA let-7 / M. Mueller, J. Zhou, L. Yang, Y. Gao, F. Wu, A. Schoeberlein, D. Surbek, E.R. Barnea, M. Paidas, Y. Huang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2014. - V. 111. - № 38. - P. 13882-13887.

124. Barnea, E.R. PreImplantation Factor (PIF) promoting role in embryo implantation: increases endometrial Integrin- $\alpha 2\beta 3$, amphiregulin and epiregulin while reducing betacellulin expression via MAPK in decidua / E.R. Barnea, D. Kirk, M.J. Paidas // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2012. – V. 10. – №. 1 : 50. – 9 p. URL: <https://rbej.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1477-7827-10-50>. Дата обращения: 05.10.2017.

125. Moindjie, H. Preimplantation factor (PIF) promotes human trophoblast invasion / H. Moindjie, E.D. Santos, L. Loeuillet, H. Gronier, P. de Mazancourt, E.R. Barnea, F. Vialard, M.N. Dieudonne // *Biology of reproduction*. - 2014. - V. 91. - № 5. - P. 1-10.

126. Barnea, E.R. PreImplantation Factor (PIF*) endogenously prevents preeclampsia: Promotes trophoblast invasion and reduces oxidative stress / E.R. Barnea,

F. Vialard, H. Moindjie, S. Ornaghi, M.N. Dieudonne, M.J. Paidas // Journal of reproductive immunology. - 2016. - V. 114. - P. 58-64.

127. Duzyj, C.M. Preimplantation factor promotes first trimester trophoblast invasion / C.M. Duzyj, E.R. Barnea, M. Li, S.J. Huang, G. Krikun, M.J. Paidas // American journal of obstetrics and gynecology. - 2010. - V. 203. - № 4. - P. 402. e1-402. e4.

128. Azar, Y. Preimplantation factor reduces graft-versus-host disease by regulating immune response and lowering oxidative stress (murine model) / Y. Azar, R. Shainer, O. Almogi-Hazan, R. Bringer, S.R. Compton, M.J. Paidas, E.R. Barnea, R. Or // Biology of Blood and Marrow Transplantation. - 2013. - V. 19. - № 4. - P. 519-528.

129. Barnea, E.R. PreImplantation Factor (PIF) orchestrates systemic antiinflammatory response by immune cells: effect on peripheral blood mononuclear cells / E.R. Barnea, D. Kirk, S. Ramu, B. Rivnay, R. Roussev, M.J. Paidas // American journal of obstetrics and gynecology. - 2012. - V. 207. - № 4. - P. 313. e1-313. e11.

130. Патент 2014598 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (1990.01). Способ прогнозирования угрозы прерывания беременности у женщин с привычным невынашиванием / Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Мартенова А.А., Мозжухина Л.А., Быкова Е.Я., Корулина М.В.; заявитель и патентообладатель Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова. – № 904818487; заявл. 23.04.1990; опубл.15.06.1994, Бюлл.27.

131. Calandra, T. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production / T. Calandra, J. Bernhagen, C.N. Metz, L.A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami, R. Bucala // Nature. - 1995. - V. 377. - № 6544. - P. 68-71.

132. Pearce, B.D. Serum macrophage migration inhibitory factor in the prediction of preterm delivery / B.D. Pearce, S.E. Garvin, J. Grove, E.A. Bonney, D.J. Dudley, D.E. Schendel, P. Thorsen // American journal of obstetrics and gynecology. - 2008. - V. 199. - № 1. - P. 46. e1-46. e6.

133. Mitchell, R.A. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action / R.A. Mitchell, C.N. Metz, T. Peng, R. Bucala // *Journal of Biological Chemistry*. - 1999. - V. 274. - № 25. - P. 18100-18106.

134. Arcuri, F. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts / F. Arcuri, M. Cintorino, R. Vatti, A. Carducci, S. Liberatori, L. Paulesu // *Biology of reproduction*. - 1999. - V. 60. - № 6. - P. 1299-1303.

135. Arcuri, F. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy / F. Arcuri, C. Ricci, F. Ietta, M. Cintorino, S.A. Tripodi, I. Cetin, E. Garzia, F. Schatz, P. Klemi, R. Santopietro, L. Paulesu // *Biology of reproduction*. - 2001. - V. 64. - № 4. - P. 1200-1205.

136. Arcuri, F. Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface / F. Arcuri, L. Buchwalder, P. Toti, M. Cintorino, P. Tosi, C.J. Lockwood, B. Rybalov, F. Schatz // *Biology of reproduction*. - 2007. - V. 76. - № 3. - P. 433-439.

137. Viganò, P. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface / P. Viganò, M. Cintorino, F. Schatz, C.J. Lockwood, F. Arcuri // *Seminars in immunopathology*. - 2007. - V. 29. - № 2. - P. 135-150.

138. Akoum, A. Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone / A. Akoum, C.N. Metz, M. Morin // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. - 2005. - V. 90. - № 5. - P. 2904-2910.

139. Arcuri, F. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor / F. Arcuri, M. Cintorino, A. Carducci, S. Papa,

M.G. Riparbelli, S. Mangioni, A.M. Di Blasio, P. Tosi, P. Viganò // *Reproduction*. - 2006. - V. 131. - № 1. - P. 175-182.

140. Bevilacqua, E. Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface / E. Bevilacqua, L. Paulesu, E.A. Ferro, F. Ietta, M.R. Faria, A.R. Lorenzon, A.F. Costa, M. Martucci // *Placenta*. - 2014. - V. 35. - P. S51-S56.

141. Ietta, F. Macrophage migration inhibitory factor in human pregnancy and labor / F. Ietta, T. Todros, C. Ticconi, E. Piccoli, A. Zicari, E. Piccione, L. Paulesu // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2002. - V. 48. - № 6. - P. 404-409.

142. Comba, C. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss / C. Comba, E. Bastu, O. Dural, C. Yasa, G. Keskin, M. Ozsurmeli, F. Buyru, H. Serdaroglu // *Fertility and Sterility*. - 2015. - V. 104. - № 6. - P. 1467-1474. e1.

143. Todros, T. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in preeclampsia / T. Todros, S. Bontempo, E. Piccoli, F. Ietta, R. Romagnoli, M. Biolcati, M. Castellucci, L. Paulesu // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. - 2005. - V. 123. - № 2. - P. 162-166.

144. Hristoskova, S. Macrophage migration inhibition factor is elevated in pregnancy, but not to a greater extent in preeclampsia / S. Hristoskova, W. Holzgreve, X.Y. Zhong, S. Hahn // *Archives of gynecology and obstetrics*. - 2006. - V. 274. - № 1. - P. 25-28.

145. Cardaropoli, S. Lower macrophage migration inhibitory factor concentrations in maternal serum before pre-eclampsia onset / S. Cardaropoli, F. Ietta, R. Romagnoli, A. Rolfo, L. Paulesu, T. Todros // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. - 2014. - V. 34. - № 7. - P. 537-542.

146. Cardaropoli, S. Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preeclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction / S. Cardaropoli, L. Paulesu, R. Romagnoli, F. Ietta, D. Marzioni, M. Castellucci, A. Rolfo, E. Vasario,

E. Piccoli, T. Todros // *Clinical and Developmental Immunology*. - 2011. - V. 2012. – 9 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/639342>. Дата обращения: 05.10.2017.

147. Gershon, R.K. Suppressor T Cells / R.K. Gershon, P. Cohen, R. Hencin, S.A. Lieber // *The Journal of Immunology*. - 1972. - V. 108. - № 3. - P. 586-590.

148. Yoo, J.H. Peripheral blood NK cell cytotoxicities are negatively correlated with CD8(+) T cells in fertile women but not in women with a history of recurrent pregnancy loss / J.H. Yoo, J. Kwak-Kim, A.R. Han, H. Ahn, S.H. Cha, M.K. Koong, I.S. Kang, K.M. Yang // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2012. - V. 68. - № 1. - P. 38-46.

149. Scaife, P.J. Effector activity of decidual CD8⁺ T lymphocytes in early human pregnancy / P.J. Scaife, J.N. Bulmer, S.C. Robson, B.A. Innes, R.F. Searle // *Biology of reproduction*. - 2006. - V. 75. - № 4. - P. 562-567.

150. Meggyes, M. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy / M. Meggyes, E. Miko, B. Polgar, B. Bogar, B. Farkas, Z. Illes, L. Szereday // *PloS ONE*. - 2014. - V. 9. - № 3 : e0092371. – 10 p. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371>. Дата обращения: 05.10.2017.

151. Yagel, S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface / S. Yagel // *American journal of obstetrics and gynecology*. - 2009. - V. 201. - № 4. - P. 344-350.

152. Siewiera, J. Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes / J. Siewiera, J. Gouilly, H.R. Hocine, G. Cartron, C. Levy, R. Al-Daccak, N. Jabrane-Ferrat // *Nature communications*. – 2015. – V. 6. – №. 10183. – 12 p. URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms10183.pdf>. Дата обращения: 05.10.2017.

153. Fukui, A. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia / A. Fukui, A. Funamizu, M. Yokota, K. Yamada, R. Nakamura, R. Fukuhara, H. Kimura,

H. Mizunuma // Journal of reproductive immunology. - 2011. - V. 90. - № 1. - P. 105-110.

154. Rajalingam, R. Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system / R. Rajalingam // Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice. - 2012. - P. 391-414.

155. Kennedy, P.R. Activating KIR2DS4 Is Expressed by Uterine NK Cells and Contributes to Successful Pregnancy / P.R. Kennedy, O. Chazara, L. Gardner, M.A. Ivarsson, L.E. Farrell, S. Xiong, S.E. Hiby, F. Colucci, A.M. Sharkey, A. Moffett // The Journal of Immunology. - 2016. - V. 197. - № 11. - P. 4292-4300.

156. Wang, S. Recurrent miscarriage is associated with a decline of decidual natural killer cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors specific for human leukocyte antigen C / S. Wang, Y.P. Li, B. Ding, Y.R. Zhao, Z.J. Chen, C.Y. Xu, Y.B. Fu, X.T. Wang // Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. - 2014. - V. 40. - № 5. - P. 1288-1295.

157. Tao, Y. CD56(bright)CD25+ NK cells are preferentially recruited to the maternal/fetal interface in early human pregnancy / Y. Tao, Y.H. Li, H.L. Piao, W.J. Zhou, D. Zhang, Q. Fu, S.C. Wang, D.J. Li, M.R. Du // Cellular & molecular immunology. - 2015. - V. 12. - № 1. - P. 77-86.

158. Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss / S. Sharma // The International journal of developmental biology. - 2014. - V. 58. - P. 219-229.

159. Co, E.C. Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy / E.C. Co, M. Gormley, M. Kapidzic, D.B. Rosen, M.A. Scott, H.A. Stolp, M. McMaster, L.L. Lanier, A. Bárcena, S.J. Fisher // Biology of reproduction. - 2013. - V. 88. - № 6 : 155. - P. 1-9.

160. Sotnikova, N. Interaction of decidual CD56+ NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation / N. Sotnikova, D. Voronin, Y. Antsiferova, E. Bukina // Scandinavian journal of immunology. - 2014. - V. 80. - № 3. - P. 198-208.

161. Fu, Q. Trophoblasts and decidual stromal cells regulate decidual NK cell functions via interaction between collagen and LAIR-1 / Q. Fu, Y. Tao, H. Piao, M.R. Du, D.J. Li // American Journal of Reproductive Immunology. - 2014. - V. 71. - № 4. - P. 368-378.

162. Park, D.W. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages / D.W. Park, H.J. Lee, C.W. Park, S.R. Hong, J. Kwak-Kim, K.M. Yang // American Journal of Reproductive Immunology. - 2010. - V. 63. - № 2. - P. 173-180.

163. Spaggari, G.M. Soluble HLA class I molecules induce natural killer cells apoptosis through the engagement CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptors superfamily / G.M. Spaggari, P. Contini, R. Carosio, M. Arvigo, M. Ghio, D. Oddone, A. Dondero // Blood. - 2002. - V. 99. - № 5. - P. 1706-1714.

164. Dons'koi, B.V. Accentuated hypo- and hyper-NK lymphocyte CD8 expression is a marker of NK subsets' misbalance and is predictive for reproductive failures / B.V. Dons'koi // Immunobiology. - 2015. - V. 220. - № 5. - P. 649-655.

165. Chernyshov, V.P. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy / V.P. Chernyshov, B.V. Dons'koi, I.O. Sudoma, Y.O. Goncharova // Immunology letters. - 2014. - V. 162. - № 2. - P. 217-221.

166. Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various immune diseases / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda // The Journal of Immunology. - 1995. - V. 155. - № 3. - P. 1151-1164.

167. Степанова, Е.О. Роль регуляторных Т-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. - P. 24-28.

168. Ayyoub, M. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the Th17 lineage-specific transcription factor ROR γ t / M. Ayyoub, F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley, D. Valmori // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2009. - V. 106. - № 21. - P. 8635-8640.

169. Peck, A. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example / A. Peck, E.D. Mellins // *Immunology*. - 2010. - V. 129. - № 2. - P. 147-153.

170. Chen, Z. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17 / Z. Chen, F. Lin, Y. Gao, Z. Li, J. Zhang, Y. Xing, Z. Deng, Z. Yao, A. Tsun, B. Li // *International immunopharmacology*. - 2011. - V. 11. - № 5. - P. 536-542.

171. Wegmann, T.G. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? / T.G. Wegmann, H. Lin, L. Guilbert, T.R. Mosmann // *Immunology today*. - 1993. - V. 14. - № 7. - P. 353-356.

172. Romero, R. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury / R. Romero, F. Gotsch, B. Pineles, J.P. Kuzanovic // *Nutrition reviews*. - 2007. - V. 65. - № 12. - P. S194-S202.

173. Mor, G. Inflammation and Pregnancy / G. Mor // *Annals of the New York Academy of Sciences*. - 2008. - V. 1127. - № 1. - P. 121-128.

174. Mor, G. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site / G. Mor, I. Cardenas, V. Abrahams, S. Guller // *Annals of the New York Academy of Sciences*. - 2011. - V. 1221. - № 1. - P. 80-87.

175. Chaouat, G. Cytokines, implantation and early abortion: re-examination the Th1/Th2 paradigm leads to question the single path way, single therapy concept / G. Chaouat, N. Ledee-Bataille, S. Zourbas, S. Ostojic, S. Dubanchet, J. Martal, R. Frydman // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2003. - V. 50. - № 3. - P. 177-186.

176. Aluhivare, V.R. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to fetus / V.R. Aluhivare, M. Kallikourdis, A.G. Betz // *Nature immunology*. - 2004. - V. 5. - № 3. - P. 266-271.

177. Zeldovich, V. Host defence and tolerance: unique challenges in the placenta / V. Zeldovich, A. Bakardjiev // *PLoS Pathogens*. - 2012. - V. 8. - № 8 : e1002804. – 4 p. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002804>. Дата обращения: 05.10.2017.

178. Munoz-Suano, A. Gimme shelter: the immune system during pregnancy / A. Munoz-Suano, A.B. Hamilton, A.G. Betz // *Immunological reviews*. - 2011. - V. 241. - № 1. - P. 20-38.

179. Saito, S. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima, M. Ito // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2010. - V. 3. - P. 601-610.

180. Saito, S. Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima // *Journal of reproductive immunology*. - 2011. - V. 90. - № 1. - P. 91-95.

181. Kwak-Kim, J. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress / J. Kwak-Kim, S. Bao, S.K. Lee, J.W. Kim, A. Gilman-Sachs // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2014. - V. 72. - № 2. - P. 129-140.

182. Ernerudh, J. Regulatory T Helper Cells in Pregnancy and their Roles in Systemic versus Local Immune Tolerance / J. Ernerudh, G. Berg, J. Mjösberg // *American journal of reproductive immunology*. - 2011. - V. 66. - № 1. - P. 31-43.

183. Wilczyński, J.R. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? / J.R. Wilczyński // *Human immunology*. - 2006. - V. 67. - № 7. - P. 492-511.

184. Shevach, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression / E.M. Shevach // *Immunity*. - 2009. - V. 30. - № 5. - P. 636-645.

185. Sakaguchi, S. Regulatory T cells and immune tolerance / S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // *Cell*. - 2008. - V. 133. - № 5. - P. 775-787.

186. Ziegler, S.F. FOXP3 and the Regulation of Treg/Th17 Differentiation / S.F. Ziegler, J.H. Buckner // *Microbes and Infection*. - 2009. - V. 11. - № 5. - P. 594-598.

187. Hall, B.M. Do Natural T Regulatory Cells become Activated to Antigen Specific T Regulatory Cells in Transplantation and in Autoimmunity? / B.M. Hall, G.T. Tran, N.D. Verma, K.M. Plain, C.M. Robinson, M. Nomura, S.J. Hodgkinson // *Frontiers in immunology*. - 2013. - V. 4. - P. 208.

188. Mjösberg, J. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs / J. Mjösberg, G. Berg, J. Ernerudh, C. Ekerfelt // *Immunology*. - 2007. - V. 120. - № 4. - P. 456-466.

189. Lu, L.F. Molecular orchestration of differentiation and function of Regulatory T cells / L.F. Lu, A. Rudensky // *Genes & development*. - 2009. - V. 23. - № 11. - P. 1270-1282.

190. Ichiyama, K. Foxp3 Inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA Transcription through Direct Interaction with ROR γ t / K. Ichiyama, H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, T. Kobayashi // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2008. - V. 283. - № 25. - P. 17003-17008.

191. Koenen, H.J. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells / H.J. Koenen, R.L. Smeets, P.M. Vink, E. van Rijssen, A.M. Boots, I. Joosten // *Blood*. - 2008. - V. 112. - № 6. - P. 2340-2352.

192. Deknuydt, F. IL-1 β and IL-2 convert human Treg into Th17 cells / F. Deknuydt, G. Bioley, D. Valmori, M. Ayyoub // *Clinical immunology*. - 2009. - V. 131. - № 2. - P. 298-307.

193. Valmori, D. Human ROR γ t⁺Th17 cells preferentially differentiated from naïve FOXP3⁺ Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors / D. Valmori, C. Raffin, I. Raimbaud, M. Ayyoub // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2009. - V. 107. - № 45. - P. 19402-19407.

194. Voo, K.S. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans / K.S. Voo, Y.H. Wang, F.R. Santori, C. Boggiano, Y.H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D.R. Littman, Y.J. Liu // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2009. - V. 106. - № 12. - P. 4793-4798.

195. Bettelli, E. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells / E. Bettelli, M. Dastrange, M. Oukka // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2005. - V. 102. - № 14. - P. 5138-5143.

196. Wu, Y. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT / Y. Wu, M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, A. Rao // Cell. - 2006. - V. 126. - № 2. - P. 375-387.

197. Sefik, E. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells / E. Sefik, N. Geva-Zatorsky, S. Oh, L. Konnikova, D. Zemmour, A.M. McGuire, D. Burzyn, A. Ortiz-Lopez, M. Lobera, J. Yang, S. Ghosh, A. Earl, S.B. Snapper, R. Jupp, D. Kasper, D. Mathis, C. Benoist // Science. - 2015. - V. 349. - № 6251. - P. 993-997.

198. Peck, A. Precarious balance: Th17 cells in host defense / A. Peck, E.D. Mellins // Infection and immunity. - 2010. - V. 78. - № 1. - P. 32-38.

199. Ivanov, I.I. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation / I.I. Ivanov, L. Zhou, D.R. Littman // Seminars in immunology. - Academic Press, 2007. - V. 19. - № 6. - P. 409-417.

200. Zhou, L. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function / L. Zhou, J.E. Lopes, M.M. Chong, I.I. Ivanov, R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, D.R. Littman // Nature. - 2008. - V. 453. - № 7192. - P. 236-240.

201. Lochner, M. *In vivo* equilibrium of proinflammatory IL-17 and regulatory IL-10 Foxp3 ROR γ T cells / M. Lochner, L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa,

F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J.P. Di Santo, G. Eberl // *Journal of Experimental Medicine*. - 2008. - V. 205. - № 6. - P. 1381-1393.

202. Ohnmacht, C. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells / C. Ohnmacht, J.H. Park, S. Cording, J.B. Wing, K. Atarashi, Y. Obata, V. Gaboriau-Routhiau, R. Marques, S. Dulauroy, M. Fedoseeva, M. Busslinger, N. Cerf-Bensussan, I.G. Boneca, D. Voehringer, K. Hase, K. Honda, S. Sakaguchi, G. Eberl // *Science*. - 2015. - V. 349. - № 6251. - P. 989-993.

203. Hegazy, A.N. Microbiota ROR γ t⁺ regulates intestinal suppressor T cells. (Cut microbes influence the balance of regulatory T cell subtypes to control inflammation) / A.N. Hegazy, F. Powrie // *Science*. - 2015. - V. 349. - № 6251. - P. 929-930.

204. Shen, X. The balance of intestinal Foxp3⁺regulatory T-cells and Th17-cells and its biological significance / X. Shen, J. Du, W. Guan, Y. Zhao // *Expert review of clinical immunology*. - 2014. - V. 10. - № 3. - P. 353-362.

205. Kawamoto, S. Foxp3⁺ T cells regulate immunoglobulin A selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis / S. Kawamoto, M. Maruya, L.M. Kato, W. Suda, K. Atarashi, Y. Doi, Y. Tsutsui, H. Qin, K. Honda, T. Okada, M. Hattori, S. Fagarasan // *Immunity*. - 2014. - V. 41. - № 1. - P. 152-165.

206. Pabst, O. Oral tolerance to food protein / O. Pabst, A.M. Mowat // *Mucosal immunology*. - 2012. - V. 5. - № 3. - P. 232-239.

207. Vickery, B.P. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy / B.P. Vickery, A.M. Scurlock, S.M. Jones, A.W. Burks // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 2011. - V. 127. - № 3. - P. 576-584.

208. Lan, F. Forkhead box protein 3 in human nasal polyp regulatory T cells is regulated by the protein suppressor of cytokine signaling 3 / F. Lan, N. Zhang, J. Zhang, O. Krysko, Q. Zhang, J. Xian, L. Derycke, Y. Qi, K. Li, S. Liu, P. Lin, C. Bachert // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 2013. - V. 132. - № 6. - P. 1314-1321.

209. Van Wijk, F. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity / F. van Wijk, H. Cheroutre // *Seminars in immunology*. - Academic Press, 2009. - V. 21. - № 3. - P. 130-138.

210. Nutsch, K.M. T cell tolerance and immunity to commensal bacteria / K.M. Nutsch, C.S. Hsieh // *Current opinion in immunology*. - 2012. - V. 24. - № 4. - P. 385-391.

211. Sujino, T. Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation / T. Sujino, M. London, D.P. Hoytema van Konijnenburg, T. Rendon, T. Buch, H.M. Silva, J.J. Lafaille, B.S. Reis, D. Mucida // *Science*. - 2016. - V. 352. - № 6293. - P. 1581-1586.

212. Black, C.A. Vaginal mucosa serves as an inductive site for tolerance / C.A. Black, L.C. Rohan, M. Cost, S.C. Watkins, R. Draviam, S. Alber, R.P. Edwards // *The Journal of Immunology*. - 2000. - V. 165. - № 9. - P. 5077-5083.

213. Hickey, D.K. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections / D.K. Hickey, M.V. Patel, J.V. Fahey, C.R. Wira // *Journal of reproductive immunology*. - 2011. - V. 88. - № 2. - P. 185-194.

214. Robertson, S.A. Seminal fluid drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice / S.A. Robertson, L.R. Guerin, J.J. Bromfield, K.M. Branson, A.C. Ahlström, A.S. Care // *Biology of reproduction*. - 2009. - V. 80. - № 5. - P. 1036-1045.

215. Schumacher, A. Regulatory T Cells: Regulators of Life / A. Schumacher, A.C. Zenclussen // *American journal of reproductive immunology*. - 2014. - V. 72. - № 2. - P. 158-170.

216. Rowe, J.H. Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens / J.H. Rowe, J.M. Ertelt, M.N. Aguilera, M.A. Farrar, S.S. Way // *Cell host & microbe*. - 2011. - V. 10. - № 1. - P. 54-64.

217. Marcoli, N. Differential influence of maternal and fetal pregnancy factors on the in-vitro induction of human regulatory T cells: a preliminary study / N. Marcoli, M. Østensen, C.B. Portmann-Lanz, D. Surbek, P.M. Villiger, F. Förger // *Swiss medical weekly*. - 2015. - V. 145. - № w14172. - P. w14172.

218. Blois, S.M. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice / S.M. Blois, G. Sulkowski, I. Tirado-González, J. Warren, N. Freitag, B.F. Klapp, D. Rifkin, I. Fuss, W. Strober, G.S. Dveksler // *Mucosal immunology*. - 2014. - V. 7. - № 2. - P. 348-358.

219. Tafuri, A. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy / A. Tafuri, J. Alferink, P. Möller, G.J. Hämmerling, B. Arnold // *Science*. - 1995. - V. 270. - № 5236. - P. 630.

220. Moldenhauer, L.M. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy / L.M. Moldenhauer, K.R. Diener, D.M. Thring, M.P. Brown, J.D. Hayball, S.A. Robertson // *The Journal of Immunology*. - 2009. - V. 182. - № 12. - P. 8080-8093.

221. Rowe, J.H. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen / J.H. Rowe, J.M. Ertelt, L. Xin, S.S. Way // *Nature*. - 2012. - V. 490. - № 7418. - P. 102-106.

222. Xiong, H. Proportional changes of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in maternal peripheral blood during pregnancy and labor at term and preterm / H. Xiong, C. Zhou, G. Qi // *Clinical & Investigative Medicine*. - 2010. - V. 33. - № 6. - P. 422-428.

223. Jin, L.P. The CD4⁺CD25⁺ bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage / L.P. Jin, Q.Y. Chen, T. Zhang, P.F. Guo, D.J. Li // *Clinical Immunology*. - 2009. - V. 133. - № 3. - P. 402-410.

224. Zenclussen, A.C. Regulatory T cells in pregnancy / A.C. Zenclussen // *Springer seminars in immunopathology*. - 2006. - V. 28. - № 1. - P. 31-39.

225. Saito, S. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? / S. Saito, T. Shima, A. Nakashima, A. Shiozaki, M. Ito, Y. Sasaki // Journal of assisted reproduction and genetics. - 2007. - V. 24. - № 9. - P. 379-386.

226. Guerin, L.R. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? / L.R. Guerin, J.R. Prins, S.A. Robertson // Human reproduction update. - 2009. - V. 15. - № 5. - P. 517-535.

227. Marzio, R. CD69 and regulation of the immune function / R. Marzio, J. Mauël, S. Betz-Corradin // Immunopharmacology and immunotoxicology. - 1999. - V. 21. - № 3. - P. 565-582.

228. Mardiney, M. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals/ M. Mardiney, M.R. Brown, T.A. Fleisher // Cytometry. - 1996. - V. 26 - №4. - P. 305-310.

229. Lim, L.C. A Whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry / L.C. Lim, M.N. Fiordalisi, J.L. Mantell, J.L. Schmitz, J.D. Folds // Clinical and diagnostic laboratory immunology. - 1998. - V. 5. - № 3. - P. 392-398.

230. Xu, L. Inhibitory effects of berberine on the activation and cell cycle progression of human peripheral lymphocytes / L. Xu, Y. Liu, X. He // Cell Mol Immunol. - 2005. - V. 2. - № 4. - P. 295-300.

231. Arneth, B.M. Measurement of T cell activation after 16-hr *in vitro* stimulation with concanavalin A / B.M. Arneth // Current Protocols in Cytometry. - 2010. - P. 6.28.1-6.28.10.

232. Patent 7169571 USA, Int. Cl. B2 G01N 33/53 (20060101); C12Q 1/70 (20060101); G01N 33/553 (20060101) Methods for measurement of lymphocyte function / Marjorie L.Wier; applicant and assignee Cylex, Inc - N 10/661,782; appl. 15.09.2003; publ. 30.01.2007 - 10 p.

233. Hu, Y.P. Effects of ConA on early activation and function of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in mice / Y.P. Hu, X.J. Li, S.W. Liu // Chinese journal of cellular and molecular immunology. - 2010. - V. 26. - № 2. - P. 118-120.

234. Green, K.J. Acute exercise and T-lymphocyte expression of the early activation marker CD69 / K.J. Green, D.G. Rowbottom, L.T. Mackinnon // Medicine and science in sports and exercise. - 2003. - V. 35. - № 4. - P. 582-588.

235. Biselli, R. Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes / R. Biselli, P.M. Matricardi, R. D'Amelio, A. Fattorossi // Scandinavian journal of immunology. - 1992. - V. 35. - № 4. - P. 439-447.

236. Werfel, T. Rapid expression of the CD69 antigen on T cells and natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell suspensions / T. Werfel, M. Boeker, A. Kapp // Allergy. - 1997. - V. 52. - № 4. - P. 465-469.

237. Simms, P.E. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation / P.E. Simms, T.M. Ellis // Clinical and diagnostic laboratory immunology. - 1996. - V. 3. - № 3. - P. 301-304.

238. Garcia, G.G. Ex vivo enzymatic treatment of aged CD4 T cells restores antigen-driven CD69 expression and proliferation in mice / G.G. Garcia, R.A. Miller // Immunobiology. - 2011. - V. 216. - № 1. - P. 66-71.

239. Aw, D. The effect of age on the phenotype and function of developing thymocytes / D. Aw, A.B. Silva, D.B. Palmer // Journal of comparative pathology. - 2010. - V. 142. - № 1. - P. S45-S59.

240. Petersen, C.C. Increased expression of CD69 on T cells as an early immune marker for human cytomegalovirus reactivation in chronic lymphocytic leukemia patients / C.C. Petersen, L. Nelderby, A.S. Roug, A. Skovbo, N.A. Peterslund, P. Hokland, B. Nielsen, M. Hokland // Viral immunology. - 2011. - V. 24. - № 2. - P. 165-169.

241. Martín, P. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity / P. Martín, M. Gómez, A. Lamana, A.M. Marín, J.R. Cortés, M. Ramírez-Huesca, O. Barreiro, P. López-Romero, C. Gutiérrez-Vázquez, H. de la Fuente, A. Cruz-Adalia, F. Sánchez-Madrid // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 2010. - V. 126. - № 2. - P. 355-365.

242. Hutnick, N.A. Exercise and lymphocyte activation following chemotherapy for breast cancer / N.A. Hutnick, N.I. Williams, W.J. Kraemer, E. Orsega-Smith, R.H. Dixon, A.D. Bleznak, A.M. Mastro // *Medicine and science in sports and exercise*. - 2005. - V. 37. - № 11. - P. 1827-1835.

243. Vega-Ramos, J. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection / J. Vega-Ramos, E. Alari-Pahissa, J.D. Valle, E. Carrasco-Marín, E. Esplugues, M. Borràs, C. Martínez-A, P. Lauzurica // *Immunology and cell biology*. - 2010. - V. 88. - № 7. - P. 707-715.

244. Schwulst, S.J. Lymphocyte phenotyping to distinguish septic from nonseptic critical illness / S.J. Schwulst, J.T. Muenzer, K.C. Chang, T.S. Brahmhatt, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss // *Journal of the American College of Surgeons*. - 2008. - V. 206. - № 2. - P. 335-342.

245. Lee, W. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G1 arrest in activated human lymphocytes / W. Lee, L. Pankoski, A. Zekavat, B.J. Shenke // *Molecular Oral Microbiology*. - 2004. - V. 19. - № 3. - P. 144-149.

246. Avgustin, B. CD69 expression on CD4⁺ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against *Mycobacterium tuberculosis* antigens / B. Avgustin, V. Kotnik, M. Skoberne, T. Malovrh, A. Skralovnik-Stern, M. Tercej // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. - 2005. - V. 12. - № 1. - P. 101-106.

247. Steinbachová, M. Evaluation of lymphocyte activation in patients in intensive care units by using flow cytometry for determining expression of early activation antigen CD69 / M. Steinbachová, M. Průcha, I. Herold, B. Kavka // *Epidemiologie,*

mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne. - 2004. - V. 53. - № 1. - P. 12-16.

248. Sancho, D. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation / D. Sancho, M. Gómez, F. Sánchez-Madrid // Trends in immunology. - 2005. - V. 26. - № 3. - P. 136-140.

249. Nielsen, S.D. Expression of the activation antigen CD69 predicts functionality of *in vitro* expanded peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and HIV-infected patients / S.D. Nielsen, P. Afzelius, A.K. Ersbøll, J.O. Nielsen, J.E. Hansen // Clinical and experimental immunology. - 1998. - V. 114. - № 1. - P. 66-72.

250. Kovalová, A. Synthetic N-acetyl-D-glucosamine based fully branched tetrasaccharide, a mimetic of the endogenous ligand for CD69, activates CD69+ killer lymphocytes upon dimerization via a hydrophilic flexible linker / A. Kovalová, M. Ledvina, D. Saman et al. // Journal of medicinal chemistry. - 2010. - V. 53. - № 10. - P. 4050-4065.

251. Heitger, A. Defective T-helper Cell function after T-cell-depleting therapy affecting naïve and memory populations / A. Heitger, P. Winklehner, P. Obexer, J. Eder, C. Zelle-Rieser, G. Kropshofer, M. Thurnher, W. Holter // Blood. - 2002. - V. 99. - № 11. - P. 4053-4062.

252. Hasegawa, A. Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation / A. Hasegawa, T. Nakayama // Japanese journal of clinical immunology. - 2009. - V. 33. - № 4. - P. 189-195.

253. Renaudet, O. Synthesis of multivalent glycoconjugates containing the immunoactive LELTE peptide: Effect of glycosylation on cellular activation and natural killing by human peripheral blood mononuclear cells / O. Renaudet, K. Krenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kádek, D. Adámek, O. Vanek, D. Kavan, R. Gazák, M. Sulc, K. Bezouska, V. Kren // Journal of the American Chemical Society. - 2010. - V. 132. - № 19. - P. 6800-6808.

254. Schowengerdt, K.O. Increased expression of the lymphocyte early activation marker CD69 in peripheral blood correlates with histologic evidence of cardiac allograft

rejection / K.O. Schowengerdt, F.J. Fricker, K.S. Bahjat, S.T. Kuntz // *Transplantation*. - 2000. - V. 69. - № 10. - P. 2102-2107.

255. Posselt, A.M. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipient / A.M. Posselt, F. Vincenti, M. Bedolli, M. Lantz, J.P. Roberts, R. Hirose // *Transplantation*. - 2003. - V. 76. - № 1. - P. 190-195.

256. Karpinski, M. Heightened peripheral blood lymphocyte CD69 expression is neither sensitive nor specific as a noninvasive diagnostic test for renal allograft rejection / M. Karpinski, D. Rush, J. Jeffery, D. Pochinco, D. Milley, P. Nickerson // *Journal of the American Society of Nephrology*. - 2003. - V. 14. - № 1. - P. 226-233.

257. Dons'koi, B.V. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay / B.V. Dons'koi, V.P. Chernyshov, D.V. Osypchuk // *Journal of immunological methods*. - 2011. - V. 372. - № 1. - P. 187-195.

258. Donskoï, B.V. The immunophenotypic characteristics of two functionally different natural killer cell subpopulations in peripheral human blood / B.V. Donskoï, V.P. Chernyshov, D.V. Osypchuk // *Fiziologichnyi zhurnal*. - 2011. - V. 57. - № 1. - P. 29-35.

259. Lü, H.Z. Lower concentrations of methyl- β -cyclodextrin combined with interleukin-2 can preferentially induce activation and proliferation of natural killer cells in human peripheral blood / H.Z. Lü, A.Y. Zhu, Y. Chen, J. Tang, B.Q. Li // *Human immunology*. - 2011. - V. 72. - № 7. - P. 538-546.

260. 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. 519-523.

261. Martín, P. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation / P. Martín, M. Gómez, A. Lamana, A. Cruz-Adalia, M. Ramírez-Huesca, M.A. Ursa, M. Yáñez-Mo, F. Sánchez-Madrid // *Molecular and cellular biology*. - 2010. - V. 30. - № 20. - P. 4877-4889.

262. Miki-Hosokawa, T. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation / T. Miki-Hosokawa, A. Hasegawa, C. Iwamura, K. Shinoda, S. Tofukuji, Y. Watanabe, H. Hosokawa, S. Motohashi, K. Hashimoto, M. Shirai, M. Yamashita, T. Nakayama // *The Journal of Immunology*. - 2009. - V. 183. - № 12. - P. 8203-8215.

263. 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. Тетруашвили, В.В. Вторушина // *Российский аллергологический журнал*. - 2013. - Т. 2. - №. 2. - С. 161-162.

264. Chen, S.J. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation / S.J. Chen, Y.L. Liu, H.K. Sytwu // *Clinical and Developmental Immunology*. - 2011. - V. 2012. – № 258391. - 10 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/258391>. Дата обращения: 05.10.2017.

265. Carbone, J. Peripheral blood T- and B-cell immunophenotypic abnormalities in selected women with unexplained recurrent miscarriage / J. Carbone, E. Sarmiento, A. Gallego, N. Lanio, J. Navarro, S. García, E. Fernandez-Cruz // *Journal of reproductive immunology*. - 2016. - V. 113. - P. 50-53.

266. Loewendorf, A. Normal human pregnancy results in maternal immune activation in the periphery and at the uteroplacental interface / A. Loewendorf, T.A. Nguyen, M.N. Yesayan, D.A. Kahn // *PloS ONE*. - 2014. - V. 9. - № 5 : e96723. – 13 p. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096723>. Дата обращения: 05.10.2017.

267. Yang, K.M. Women with multiple implantation failures and recurrent pregnancy losses have increased peripheral blood T cell activation / K.M. Yang,

E. Ntrivalas, H.J. Cho, N.Y. Kim, K. Beaman, A. Gilman-Sachs, J. Kwak-Kim // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2010. - V. 63. - № 5. - P. 370-378.

268. Соловьева, А.Е. Соотношение различных популяций естественных киллеров и уровень их активации у женщин с привычным невынашиванием беременности / А.Е. Соловьева, Н.Ю. Сотникова, В.В. Вторушина // *Материалы республиканской научной конференции "Иммунология репродукции"* 11-14 апреля 2005 г., Иваново. / *Российский иммунологический журнал*. – 2005. - Т. 9. - № S2. - С. 179-180.

269. Kuon, R.J. Patients with idiopathic recurrent miscarriage show higher levels of DR+ activated T-cells that are less responsive to mitogens / R.J. Kuon, J. Schaumann, T. Goeggel, T. Strowitzki, M. Sadeghi, G. Opelz, V. Daniel, B. Toth // *Journal of reproductive immunology*. - 2015. - V. 112. - P. 82-87.

270. Fainboim, L. Mechanisms involved in the expansion of Tregs during pregnancy: role of IL-2/STAT5 signalling / L. Fainboim, L. Arruvito // *Journal of reproductive immunology*. - 2011. - V. 88. - № 2. - P. 93-98.

271. Giacomucci, E. Immunologically mediated abortion (IMA) / E. Giacomucci, C. Bulletti, V. Polli, R.A. Prefetto, C. Flamigni // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. - 1994. - V. 49. - № 2. - P. 107-121.

272. Beer, A.E. The immunobiology and immunopathology of the maternal-fetal relationship / A.E. Beer, J.F. Quebbeman // *Progress in clinical and biological research*. - 1982. - V. 87. - № 2. - P. 289-326.

273. Надеина, О.В. Трансплантация в системе комплексного лечения самопроизвольных потерь беременности / О.В. Надеина, А.И. Любимова, Д.В. Умбрумянц // *Акушерство и гинекология*. - 1972. - № 9. - С. 35-38.

274. Говалло, В.И. Сравнительный анализ методов иммунотерапии самопроизвольных выкидышей / В.И. Говалло, Е.Я. Быкова, И.К. Кальке // *Акушерство и гинекология*. - 1985. - № 3. - P. 41-43.

275. Bukovský, A. Therapeutic transplantation of a skin graft from the partner into an infertile female patient / A. Bukovský, J. Presl, A. Zwinger, J. Beran // Ceskoslovenska gynekologie. - 1988. - V. 53. - № 4. - P. 291-294.

276. Despodova, T. Our experience in treating habitual abortions by skin grafts / T. Despodova // Akusherstvo i ginekologija. - 1985. - V. 25. - № 2. - P. 42-48.

277. Говалло, В.И. Иммунизация беременных женщин аллогенными лимфоцитами мужа как метод профилактики самопроизвольных выкидышей / В.И. Говалло, В.М. Сидельникова // Акушерство и гинекология. - 1983. - №12. - С. 25-27.

278. Beer, A.E. New horizons in the diagnosis, evaluation and therapy of recurrent spontaneous abortion / A.E. Beer // Clinics in obstetrics and gynaecology. - 1986. - V. 13. - № 1. - P. 115-124.

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

280. Pandey, M.K. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion / M.K. Pandey, S. Thakur, S. Agrawal // Archives of gynecology and obstetrics. - 2004. - V. 269. - № 3. - P. 161-172.

281. Гузов, И.И. Иммунобиология и иммунопатология беременности. - URL: <http://www.cironline.ru/articles/174/92435/>. Дата обращения: 05.10.2017.

282. Porter, T.F. Immunotherapy for recurrent miscarriage/ T.F. Porter, Y. LaCoursiere, J.R. Scott // Cochrane Database of Systematic Reviews. - 2006. - № 2 : CD000112. - 32 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD000112.pub2>. Дата обращения: 05.10.2017.

283. Duckitt, K. Recurrent miscarriage / K. Duckitt, A. Qureshi // *BMJ clinical evidence*. - 2011. - V. 2011. - № 1409. – 23 p. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275302/pdf/2011-1409.pdf>. Дата обращения: 05.10.2017.

284. Wong, L.F. Immunotherapy for recurrent miscarriage/ L.F. Wong, T.F. Porter, J.R. Scott // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. - 2014. - № 10 : CD000112. - 52 p. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000112.pub3/pdf>. Дата обращения: 05.10.2017.

285. Ober, C. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial / C. Ober, T. Karrison, R.B. Odem, R.B. Barnes, D.W. Branch, M.D. Stephenson // *The Lancet*. - 1999. - V. 354. - № 9176. - P. 365-369.

286. Check, J.H. A practical approach to the prevention of miscarriage: part 2 -- active immunotherapy / J.H. Check // *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*/ - 2010. – V. 37. - №1. – P. 5-9.

287. Clark, D.A. CD200-dependent and nonCD200-dependent pathways of NK cell suppression by human IVIG / D.A. Clark, K. Wong, D. Banwatt, Z. Chen, J. Liu, L. Lee, R.M. Gorczynski, M.A. Blajchman // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2008. - V. 25. - № 2-3. - P. 67-72.

288. Clark, D.A. Cell surface CD200 may predict efficacy of paternal mononuclear leukocyte immunotherapy in treatment of human recurrent pregnancy loss / D.A. Clark // *American journal of reproductive immunology*. - 2009. - V. 61. - № 1. - P. 75-84.

289. Klein, H.G. Immunologic aspects of blood transfusion / H.G. Klein // *Seminars in oncology*. - 1994. - V. 21. - № 2 : Suppl. 3. - P. 16-20.

290. Beer, A.E. Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles; HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization / A.E. Beer, A.E. Semprini, X.Y. Zhu, J.F. Quebbeman // *Experimental and clinical immunogenetics*. - 1984. - V. 2. - № 3. - P. 137-153.

291. Peña, R.B. The production of MLR-blocking factors after lymphocyte immunotherapy for RSA does not predict the outcome of pregnancy / R.B. Peña, A.P. Cadavid, J.H. Botero, G.P. García, M.I. Gallego, J.E. Ossa // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1998. - V. 39. - № 2. - P. 120-124.

292. Park, M.I. Interpretation of blocking activity in maternal serum depends on the equation used for calculation of mixed lymphocyte culture results / M.I. Park, S.S. Edwin, J.R. Scott, D.W. Branch // *Clinical & Experimental Immunology*. - 1990. - V. 82. - № 2. - P. 363-368.

293. Сидельникова, В.М. Невынашивание беременности: руководство для практикующих врачей / В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих. -М.: ООО "Медицинское информационное агенство", 2011. – 516 с.

294. 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.

295. Lee, S.K. Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss / S.K. Lee, B.J. Na, J.Y. Kim, S.E. Hur, M. Lee, A. Gilman-Sachs, J. Kwak-Kim // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2013. - V. 70. - № 5. - P. 398-411.

296. Nakashima, A. The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage / A. Nakashima, T. Shima, K. Inada, M. Ito, S. Saito // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2012. - V. 67. - № 4. - P. 304-310.

297. Faridi, R.M. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages / R.M. Faridi, V. Das, G. Tripathi, S. Talwar, F. Parveen, S. Agrawal // *Human reproduction*. - 2009.-V. 24. - № 7. - P. 1758-1764.

298. Kwak-Kim, J. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation / J. Kwak-Kim, K.M. Yang, A. Gilman-Sachs // Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. - 2009. - V. 35. - № 4. - P. 609-622.

299. Kwak-Kim, J. Immunological modes of pregnancy loss / J. Kwak-Kim, J.C. Park, H.K. Ahn, J.W. Kim, A. Gilman-Sachs // American journal of reproductive immunology. - 2010. - V. 63. - № 6. - P. 611-623.

300. Gharesi-Fard, B. Effect of leukocyte therapy on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production in patients with recurrent spontaneous abortion / B. Gharesi-Fard, J. Zolghadri, E. Kamali-Sarvestani // American Journal of Reproductive Immunology. - 2008. - V. 59. - № 3. - P. 242-250.

301. Yamada, H. Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion: decreased TNF-alpha levels in abortion with normal chromosome karyotype / H. Yamada, M. Morikawa, I. Furuta, E.H. Kato, S. Shimada, F. Sata, R. Kishi, H. Minakami // The Hokkaido journal of medical science. - 2004. - V. 79. - № 3. - P. 237-241.

302. Wilczyński, J.R. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? / J.R. Wilczyński, P. Radwan, H. Tchórzewski, M. Banasik // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. - 2012. - V. 60. - № 2. - P. 151-160.

303. Патент 2283653 Российская Федерация, МПК А61К 35/14 (2006.01), А61Р 15/06 (2006.01), А61В 8/00 (2006.01). Способ лечения невынашивания беременности / Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., Кирющенко П.А., Верясов В.Н.; заявитель и патентообладатель Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., Кирющенко П.А., Верясов В.Н. - № 2004111829/14; заявл. 20.04.2004; опубл. 20.09.2006; Бюл. № 26. - 6 с.

304. Higuchi, K. Suppression of natural killer cell activity by monocytes following immunotherapy for recurrent spontaneous aborters / K. Higuchi, K. Aoki, T. Kimbara,

N. Hosoi, T. Yamamoto, H. Okada // American Journal of Reproductive Immunology. - 1995. - V. 33. - № 3. - P. 221-227.

305. Wold, A.S. Natural killer cells and reproductive failure / A.S. Wold, A. Arici // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. - 2005. - V. 17. - № 3. - P. 237-241.

306. Tang, A.W. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review / A.W. Tang, Z. Alfirevic, S. Quenby // Human reproduction. - 2011.-V. 26. - № 8. - P. 1971-1980.

307. Szpakowski, A. The influence of paternal lymphocyte immunization on the selected subpopulations of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent spontaneous abortion of unknown etiology / A. Szpakowski, A. Malinowski, J. Cieślak, M. Nowak, J.R. Wilczyński, M. Banasik, M. Szpakowski, H. Tchórzewski // Ginekologia polska. - 2003. - V. 74. - № 4. - P. 288-296.

308. Liang, P. Comprehensive Analysis of Peripheral Blood Lymphocytes in 76 Women with Recurrent Miscarriage before and after Lymphocyte Immunotherapy / P. Liang, M. Mo, G.G. Li, B. Yin, J. Cai, T. Wu, X. He, X. Zhang, Y. Zeng // American Journal of Reproductive Immunology. - 2012. - V. 68. - № 2. - P. 164-174.

309. Gao, L. Characteristics of immune cell changes before and after immunotherapy and their clinical significance in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion / L. Gao, J.P. Zhang, H. Chen, S.N. Zhang, L.B. Chen, J.P. Tan, M.L. Liu, L.L. Meng, Y.H. Wang, R. Zhang, Y.L. Liu, W.B. Cai // Genet Mol Res. - 2014. - V. 13. - № 1. - P. 1169-1178.

310. Yang, H. Proportional change of CD4+ CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / H. Yang, L. Qiu, W. Di, A. Zhao, G. Chen, K. Hu, Q. Lin // Fertility and sterility. - 2009. - V. 92. - № 1. - P. 301-305.

311. 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. – Р. 59-66.

312. Wu, L. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy / L. Wu, L.H. Luo, Y.X. Zhang, Q. Li, B. Xu, G.X. Zhou, H.B. Luan, Y.S. Liu // *Reproductive Biology and Endocrinology.* - 2014. - V. 12. - № 1. - P. 74.

313. Rafiee, M. Altered Th17/Treg Ratio in Recurrent Miscarriage after Treatment with Paternal Lymphocytes and Vitamin D3: a Double-Blind Placebo-Controlled Study / M. Rafiee, M. Gharagozloo, A. Ghahiri, F. Mehrabian, M.R. Maracy, S. Kouhpayeh, I.L. Pieper, A. Rezaei // *Iranian Journal of Immunology.* - 2015. - V. 12. - № 4. - P. 252.

314. Сидельникова В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: методические рекомендации и клинические протоколы / В.М. Сидельникова. - 3-е изд. - М: МЕДпресс-информ, 2013. – 224 с.

315. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. – 368 с.

316. Liu, W. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells / W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B.F. de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, J.A. Bluestone // *Journal of Experimental Medicine.* - 2006. - V. 203. - № 7. - P. 1701-1711.

317. 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.

318. Coulam, C.B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? / C.B. Coulam, B. Acacio // American Journal of Reproductive Immunology. - 2012. - V. 67. - №. 4. - P. 296-304.

319. Mei, S. Changes of CD4+ CD25 high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / S. Mei, J. Tan, H. Chen, Y. Chen, J. Zhang // Fertility and sterility. - 2010. - V. 94. - № 6. - P. 2244-2247.

320. Somerset, D.A. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset / D.A. Somerset, Y. Zheng, M.D. Kilby, D.M. Sansom, M.T. Drayson // Immunology. - 2004. - V. 112. - №. 1. - P. 38-43.

321. Santillán, I. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? / I. Santillán, I. Lozano, J. Illán, V. Verdú, S. Coca, J.M. Bajo-Arenas, F. Martinez // Journal of reproductive immunology. - 2015. - V. 108. - P. 142-148.

322. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, V.K. Kuchroo // Nature. - 2006. - V. 441. - №. 7090. - P. 235-238.

323. Lee, S.K. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3+ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss / S.K. Lee, J.Y. Kim, S.E. Hur, C.J. Kim, B.J. Na, M. Lee, A. Gilman-Sachs, J. Kwak-Kim // Human reproduction. - 2011. - V. 26. - № 11. - P. 2964-2971.

324. Liu, Y.S. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion / Y.S. Liu, L. Wu, X.H. Tong, L.M. Wu, G.P. He, G.X. Zhou, L.H. Luo, H.B. Luan // American Journal of Reproductive Immunology. - 2011. - V. 65. - № 5. - P. 503-511.

325. Симонова, А.В. Фенотип лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях человека / А.В. Симонова. - М.: "ИНТО", 2001. – 228 с.

326. Ohnuma, K. Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level assay without staining / K. Ohnuma, T. Yomo, M. Asashima, K. Kaneko // BMC cell biology. – 2006. – V. 7. – №. 1 : 25. – 12 p. URL: <https://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-7-25>. Дата обращения: 05.10.2017.

327. Kim, H.M. Facilitation of apoptosis by autologous serum and related immunosuppression in the splenocyte culture / H.M. Kim, G.T. Oh, D.H. Hong, B.H. Hyun, Y.N. Cha, B.S. Yoo, S.B. Han // Immunopharmacology. – 1996. – V. 34. – №. 1. – P. 39-50.

328. Weiler, J.M. Inhibition of human lymphocyte blastogenesis by C3: the role of serum in the tissue culture medium / J.M. Weiler, Z.K. Ballas, T.L. Feldbush, B.W. Needleman // Immunology. – 1982. – V. 46. – №. 2. – P. 247-252.

329. Barta, O. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology / O. Barta, P.P. Oyekan // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 1981. – V. 4. – №. 2. – P. 209-221.

330. Minchin, M.A. Lymphocyte blastogenesis in nephrotic syndrome / M.A. Minchin, K.J. Turner, G.D. Bower // Clinical and experimental immunology. – 1980. – V. 42. – №. 2. – P. 241-246.

331. Koch, C.A. T cell recognition and immunity in the fetus and mother / C.A. Koch, J.L. Platt // Cellular immunology. – 2007. – V. 248. – №. 1. – P. 12-17.

332. Zarnani, A.H. Recurrent pregnancy loss through the lens of immunology / A.H. Zarnani // Journal of reproduction and infertility. – 2015. – V. 16. – №. 2. – P.59-60.

333. Caruso, A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T-cells and their correlation with cell proliferation / A. Caruso, S. Licenziati, M. Corulli, A.D. Canaris, M.A. DeFrancesco, S. Fiorentini, L. Peroni, F. Fallacara, F. Dima, A. Balsari, A. Turano // Cytometry. – 1997. – V. 27. – №. 1. – P. 71-76.

334. Велиева, Э.Э. Значение лимфоцитиммунотерапии в оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения у супружеских пар с совместимостью по антигенам HLA-системы : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.01 / Э.Э. Велиева. - Москва, 2010. – 24 с.

335. Хонина, Н.А. Проявления и механизмы формирования иммуносупрессии на различных этапах репродуктивного процесса в норме и при патологии : дис. ... докт. мед. наук : 14.00.36 / Н.А. Хонина. - Новосибирск, 2007. – 195 с.

336. Кречетова, Л.В. Влияние иммуноцитотерапии на экспрессию активационных маркеров CD69 и CD95 у женщин с привычным выкидышем / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Н.А. Хачатрян, Н.К. Тетруашвили // Материалы XIV Всероссийского научного форума "Мать и Дитя" 24-27 сентября 2013 г., Москва/ под ред. Г.Т. Сухих – М.: «МЕДИ Экспо» - 2013. - С. 96-97.

337. Prado-Drayer, A. Immunophenotype of peripheral T lymphocytes, NK cells and expression of CD69 activation marker in patients with recurrent spontaneous abortions, during the mid-luteal phase / A. Prado-Drayer, J. Teppa, P. Sánchez, M.I. Camejo // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2008. – V. 60. – №. 1. – P. 66-74.

338. Robertson, S.A. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid / S.A. Robertson, L.R. Guerin, L.M. Moldenhauer, J.D. Hayball // *Journal of reproductive immunology*. – 2009. – V. 83. – №. 1. – P. 109-116.

339. Quack, K.C. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion / K.C. Quack, N. Vassiliadou, J. Pudney, D.J. Anderson, J.A. Hill // *Human Reproduction*. – 2001. – V. 16. – №. 5. – P. 949-955.

340. Vassiliadou, N. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss / N. Vassiliadou, R.F. Searle, J.N. Bulmer // *Human Reproduction*. – 1999. – V. 14. – №. 5. – P. 1194-1200.

341. 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.

342. Зиганшина, М.М. Динамика цитокинового профиля в ранние сроки физиологической беременности и при привычном невынашивании в анамнезе / М.М. Зиганшина, 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.

343. Saini, V. Cytokines in recurrent pregnancy loss / V. Saini, S. Arora, A. Yadav, J. Bhattacharjee // *Clinica chimica acta*. – 2011. – V. 412. – №. 9. – P. 702-708.

344. Wichner, K. Dysregulated development of IL-17-and IL-21-expressing follicular helper T cells and increased germinal center formation in the absence of ROR γ t / K. Wichner, D. Stauss, B. Kampfrath, K. Krüger, G. Müller, A. Rehm, M. Lipp, U.E. Höpken // *The FASEB Journal*. - 2016. - V. 30. - № 2. - P. 761-774.

345. Van Hamburg, J.P. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology / J.P. van Hamburg, M.J. de Bruijn, C.R. de Almeida, M. van Zwam, M. van Meurs, E. de Haas, L. Boon, J.N. Samsom, R.W. Hendriks // *European journal of immunology*. – 2008. – V. 38. – №. 9. – P. 2573-2586.

346. Martin, B. Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals / B. Martin, K. Hirota, D.J. Cua, B. Stockinger, M. Veldhoen // *Immunity*. – 2009. – V. 31. – №. 2. – P. 321-330.

347. Lockhart, E. IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection / E. Lockhart, A.M. Green, J.L. Flynn // *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 177. – №. 7. – P. 4662-4669.

348. Sutton, C.E. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity / C.E. Sutton, S.J. Lalor, C.M. Sweeney, C.F. Brereton, E.C. Lavelle, K.H. Mills // *Immunity*. – 2009. – V. 31. – №. 2. – P. 331-341.

349. Zhao, Y. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis / Y. Zhao, A. Balato, R. Fischelevich, A. Chapoval, D.L. Mann, A.A. Gaspari // *British Journal of Dermatology*. - 2009. - V. 161. - № 6. - P. 1301-1306.

350. Quesniaux, V. IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity / V. Quesniaux, B. Ryffel, F. Di Padova. – 2-nd ed. – Basel: Springer Science & Business Media, 2012. – 354 p.

351. Molet, S. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines / S. Molet, Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Pagé, R. Olivenstein, J. Elias, J. Chakir // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2001. – V. 108. – №. 3. – P. 430-438.

352. Ferretti, S. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger / S. Ferretti, O. Bonneau, G.R. Dubois, C.E. Jones, A. Trifilieff // *The Journal of Immunology*. – 2003. – V. 170. – №. 4. – P. 2106-2112.

353. Stark, M.A. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17 / M.A. Stark, Y. Huo, T.L. Burcin, M.A. Morris, T.S. Olson, K. Ley // *Immunity*. – 2005. – V. 22. – №. 3. – P. 285-294.

354. González-Amaro, R. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? / R. González-Amaro, J. R. Cortés, F. Sánchez-Madrid, P. Martín // *Trends in molecular medicine*. – 2013. – V. 19. – №. 10. – P. 625–632.

355. Michel, M.L. Identification of an IL-17-producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia / M.L. Michel, A.C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P.B. Savage, C.H. Wong, E. Schneider, M. Dy,

M.C. Leite-de-Moraes // *Journal of Experimental Medicine*. – 2007. – V. 204. – №. 5. – P. 995-1001.

356. León, B. IL-17-producing B cells combat parasites / B. León, F.E. Lund // *Nature immunology*. – 2013. – V. 14. – №. 5. – P. 419-421.

357. Riethmüller, S. Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation / S. Riethmüller, S. Ferrari-Lacraz, M.K. Müller, D.A. Raptis, K. Hadaya, B. Rüsi, G. Laube, G. Schneiter, T. Fehr, J. Villard // *Transplantation*. – 2010. – V. 90. – №. 2. – P. 160-167.

358. Ormerod, M.G. *Flow cytometry: a practical approach* / M.G. Ormerod. – 3-rd ed. - Oxford: University Press, 2000. – 276 p.

359. Chaichian, S. Factors influencing success rate of leukocyte immunization and anti-paternal antibodies in spontaneous recurrent miscarriage / S. Chaichian, S. Shoae, A. Saremi, S. Pedar, F. Firouzi // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2007. – V. 57. – №. 3. – P. 169-176.

360. Gilman-Sachs, A. Analysis of anti-lymphocyte antibodies by flow cytometry or microlymphocytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortions immunized with paternal leukocytes / A. Gilman-Sachs, S.P. Luo, A.E. Beer, K.D. Beaman // *Journal of clinical & laboratory immunology*. – 1989. – V. 30. – №. 2. – P. 53-59.

361. Ali, S.S. Metabolic depression and increased reactive oxygen species production by isolated mitochondria at moderately lower temperatures / S.S. Ali, M.C. Marcondes, H. Bajova, L.L. Dugan, B. Conti // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – №. 42. – P. 32522-32528.

362. Chong, P.J. Benefit of leukocyte immunizations? / P.J. Chong, W.L. Matzner, W.T.W. Ching // *Fertility and sterility*. – 1993. – V. 59. – №. 1. – P. 247-249.

363. Chong, P.J. Controversy about immunotherapy / P.J. Chong, W.L. Matzner, W.T.W. Ching // *Fertility and sterility*. – 1993. – V. 59. – №. 5. – P. 1138-1139.

364. Chaouat, G. Tolerance to the foetal allograft? / G. Chaouat, M. Petitbarat, S. Dubanchet, M. Rahmati, N. Ledee // American Journal of Reproductive Immunology. – 2010. – V. 63. – №. 6. – P. 624-636.

365. Zenclussen, A.C. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model / A.C. Zenclussen, K. Gerlof, M.L. Zenclussen, A. Sollwedel, A.Z. Bertoja, T. Ritter, K. Kotsch, J. Leber, H.D. Volk // The American journal of pathology. – 2005. – V. 166. – №. 3. – P. 811-822.

366. Yuan, M.M. Combination of CD4⁺ CD25⁺ CD127-regulatory T cells with MLC-BE and BE-Ab2: an efficient evaluation of the therapy of paternal lymphocyte induced immunization in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / M.M. Yuan, M.R. Du, M.Y. Wang, Z.L. Duan, Y. Meng, L.P. Jin, M.Q. Li, D.J. Li // International journal of clinical and experimental pathology. – 2015. – V. 8. – №. 4. – P. 4022-4032.

367. Nakachima, A. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy / A. Nakachima, M. Ito, S. Yoneda, A. Shiozaki, T. Hidaka, S. Saito // American journal of reproductive immunology. – 2010. – V. 63. – №. 2. – P. 104-109.