

УДК 618.39-021.3

АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

© 2020 Л.В. Кречетова, Л.В. Ванько, В.В. Вторушина,
М.А. Николаева, Е.В. Инвиева*, Н.К. Тетрушвили

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, 117997 Москва, Россия;
электронная почта: e_inviyeva@oparina4.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019

После доработки 20.03.2020

Принята к публикации 20.03.2020

Исследовано значение уровня активации лимфоцитов у женщин с идиопатическим привычным выкидышем (ИПВ) в формировании иммунной толерантности и для исхода беременности при иммуноцитотерапии (ИЦТ). Выявлены особенности фенотипической характеристики и содержания активированных Т- и НК-лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в зависимости от исхода беременности, заключающегося в пролонгировании до доношенного срока или реализации привычного выкидыша. Доля активированных клеток среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+ / CD3^+CD8^+CD69^+$) у женщин с прервавшейся беременностью до ИЦТ была значимо ниже, а после ИЦТ в 5–6 недель беременности выше, чем при пролонгированной беременности. Чрезмерное увеличение в содержании и доле активированных цитотоксических лимфоцитов может быть механизмом нарушения иммунотолерантности матери к аллоантигенам плода, являющегося ведущим фактором прерывания беременности на ранних сроках. Получены данные, подтверждающие участие активированных Th-17-клеток наряду с $FOXP3^+Treg$ в механизмах формирования толерантности к отцовским антигенам плода. Снижение доли $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -лимфоцитов на ранних сроках гестации (5–6 недель) при значимо повышенном уровне продукции ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной крови у женщин с выкидышем, по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью, позволяет предполагать нарушение баланса между провоспалительными Th17- и регуляторными Т-клетками. У женщин с доношенной беременностью показано отсутствие дисбаланса в содержании Т-эффекторных лимфоцитов. В совокупности полученные данные свидетельствуют о важной роли гестационной активации лимфоцитов в формировании реакций женской иммунной системы на аллоантигены плода, необходимые для пролонгирования беременности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммунотолерантность, привычный выкидыш, иммуноцитотерапия, экспрессия CD69, Т-лимфоциты, НК-клетки.

DOI: 10.31857/S0320972520050073

ВВЕДЕНИЕ

Толерантность к отцовским антигенам является необходимым условием для нормального течения беременности и ключевым фактором нормального развития плода. Установлено, что сигналы от оплодотворенной яйцеклетки (ее поверхностные антигены и продуцируемые ею

Принятые сокращения: ИПВ – идиопатический привычный выкидыш; ИЦТ – иммуноцитотерапия; НК-клетки – натуральные клетки-киллеры; AHR – рецептор ароматических углеводородов; Treg – Т-регуляторные клетки; Th1 – Т-хелперы 1 типа; Th17 – Т-хелперы 17 типа; FOXP3 – транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку клеток и экспрессию цитокинов (forkhead box p3), участвующих в супрессии иммунного ответа; ROR γt – транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку Т лимфоцитов в направлении Th17 (retinoid-related orphan receptors).

* Адресат для корреспонденции.

различные пептиды, такие, как факторы роста, цитокины, хорионический гонадотропин человека, преимплантационный фактор) появляются уже через несколько часов после фертилизации и запускают каскад ответных гормональных сигналов, подготавливающих материнский организм к беременности [1]. Распознавание чужеродных отцовских антигенов плода приводит к аллогенной стимуляции материнской иммунной системы и последующему развитию клеточных и гуморальных реакций, способствующих формированию иммунной толерантности, препятствующей отторжению плода и нормальному развитию беременности. Однако у 1–5% женщин наблюдают повторяющиеся спонтанные потери беременности на ранних сроках [2]. Потери беременности на сроках до 7–8 недель при исключении всех известных факторов выкидыша, в том числе, инфекционных, связывают с

нарушениями иммунологических процессов, прежде всего, с нарушением распознавания отцовских антигенов, которое проявляется недостаточным контролем над интенсивностью воспалительных реакций в этот период. Предполагается, что нарушение иммуноtolерантности матери в отношении аллоантигенов плода является ведущим фактором прекращения развития беременности, а в случае неоднократно повторяющихся потерь беременности формирования симптомокомплекса — идиопатического привычного выкидыша (ИПВ).

Проблемы контроля уровня и направленности воспалительных реакций в ранние сроки беременности, как с научной, так и с практической целью, обсуждаются в иммунологии репродукции на протяжении десятилетий, особенно с точки зрения использования различных видов иммунокорректирующей терапии — аллоиммунизации введением отцовских лимфоцитов, или иммуноцитотерапии (ИЦТ), предложенной с целью коррекции нарушений формирования толерантности и пролонгирования беременности до доношенного срока у женщин с ИПВ. Несмотря на достаточно продолжительное время использования ИЦТ для предупреждения прерывания беременности на ранних сроках, мнение об эффективности этого способа лечения неоднозначно [3]. Поэтому продолжают исследования механизмов, лежащих в основе нарушений иммуноtolерантности матери к аллоантигенам плода, и влияния на них ИЦТ.

Изучение проявлений аллоиммунных нарушений при беременности проводится на клеточном и молекулярном уровнях, в клинических исследованиях и на экспериментальных моделях, однако до сих пор недостаточно выяснены вопросы о том, какие иммунные механизмы обеспечивают формирование толерантности и какие изменения в содержании молекулярных и клеточных факторов приводят к нарушению гестационного процесса. Популярной гипотезой долгое время была парадигма Th1/Th2-ответа, отражающая важность определенного соотношения провоспалительных и противовоспалительных факторов, согласно которой клетки, продуцирующие цитокины Th2-типа, являются основой для индукции и поддержания толерантности при беременности и особенно на ранних ее этапах. К настоящему времени она сменяется на парадигму, включающую T-регуляторные клетки (Th1/Th2/Th17/Tрег). Важная роль в формировании и поддержании толерантности отводится цитотоксическим и регуляторным T-клеткам, а также естественным клеткам-киллерам (NK-клетки). Для понимания механизмов влияния ИЦТ на состояние иммунной системы

женщин с привычным выкидышем необходимо учитывать не только соотношение субпопуляций лимфоцитов, но и их способность отвечать на активационный стимул. В эксперименте в качестве активационного стимула используют митогены — поликлональные активаторы, которые вызывают каскад изменений T- и B-лимфоцитов, сходный с происходящими при действии специфических антигенов, но не приводящий к их дальнейшей дифференцировке. Наиболее ранним маркером активации служит мембранный гликопротеин CD69, временно экспрессируемый на активированных лимфоцитах. Экспрессия CD69 T-лимфоцитами индуцируется активационным сигналом через T-клеточный рецептор (ТКР). Неполная активация может приводить к анергии T-эффекторных клеток, а через нарушение продукции трансформирующего фактора роста (ТФР-β) — к дисфункции T-регуляторных клеток (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 [4]. Трег-клетки также отвечают увеличением экспрессии CD69 на активацию митогенами с последующим изменением их функционального состояния [5].

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 [6], что отражает возможные механизмы участия CD69 в поляризации эффекторного иммунного ответа в направлении Th1/Th17/Tрег-клеток, особенно значимого в ранние сроки беременности. Есть данные, что STAT5 играет ключевую роль в индукции экспрессии FOXP3, транскрипционного фактора T-клеток с естественной супрессорной активностью, что подтверждается, с одной стороны, наличием STAT5-связанных сайтов в промоторном регионе интрона гена *FOXP3* и, с другой, — отсутствием у STAT5-дефицитных мышей FOXP3⁺ Трег-клеток [7]. Следовательно, CD69 может напрямую участвовать в регуляции баланса Th17/Tрег-клеток [8, 9], и поэтому CD69 может рассматриваться как естественный модулятор программ T-клеточной дифференцировки. В отличие от T-лимфоцитов активация NK-клеток связана не с пролиферацией, а с эффекторной функцией, в основе которой лежит баланс ингибиторных и активирующих рецепторов.

Несомненный интерес представляет выяснение особенностей функционирования иммун-

ной системы у пациенток с ИПВ, соотношения и активации цитотоксических иммунных клеток и Трег после применения ИЦТ у женщин с ИПВ в случае успешного пролонгирования беременности до рождения жизнеспособного плода или выкидыша, что может иметь значение для прогноза исхода беременности у женщин с ИПВ.

Целью данной работы было выяснение значения уровня активации лимфоцитов у женщин с идиопатическим привычным выкидышем в формировании толерантности при беременности на фоне иммуноцитотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу исследования составили 36 пациенток с ИПВ, которые забеременели после предгестационной аллоиммунизации, у 30 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, у 6 — прервалась до 12 недель гестации. В контрольной группе обследовано 15 фертильных женщин вне беременности и 11 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Критерии включения в группу исследования: наличие не менее 2-х потерь беременности в I-м триместре (от одного партнера), отсутствие инфекционного, анатомического, генетического, гормонального, аутоиммунного факторов потерь беременности и тяжелой экстрагенитальной патологии.

Критерии включения в контрольную группу: наличие, как минимум, одних родов в анамнезе, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, физиологическое течение данной беременности.

В обеих группах возраст женщин был 20–40 лет, беременность наступала самопроизвольно.

Кровь для анализа забирали натошак из локтевой вены. У женщин вне беременности забор проводили на 18–22 день менструального цикла, у беременных — при сроке 5–6 недель, в 8–9 недель и в 12 недель гестации.

Процедуру ИЦТ проводили лимфоцитами супругов в предгестационной подготовке и в I-м триместре наступившей беременности. Методика выделения лимфоцитов и проведения ИЦТ утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 25 декабря 2012 г.). Для проведения процедуры использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства.

В процедурном кабинете осуществляли забор крови у мужчин из локтевой вены в стерильную пробирку объемом 50 мл, в качестве анти-

коагулянта использовали 200 мкл раствора гепарина (концентрация раствора гепарина 5000 МЕ/мл). В специальном помещении, оснащенном стерильным ламинарным шкафом («АМС-МЗМО», Россия) и необходимым лабораторным оборудованием — центрифугой, («ELMI», Латвия) осуществляли выделение лимфоцитарной взвеси. После тщательного перемешивания кровь инкубировали при 37 °С в течение 1–1,5 ч. После разделения крови на 2 слоя (верхний — плазма с моноклеарными клетками, нижний — эритроциты), верхний слой переносили в центрифужную стерильную пробирку объемом 14 мл и центрифугировали в течение 7 мин при 1500 об./мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 6 мл стерильного физиологического раствора, наслаивали на 3 мл фиколла в двух пробирках параллельно, сохраняя соотношение 1 : 2, и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об./мин. Лимфоцитарные кольца собирали в чистую стерильную пробирку объемом 14 мл, отмывали дважды физиологическим раствором в течение 7 мин при 1500 об./мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, осадок тщательно перемешивали в 2 мл стерильного физиологического раствора. Концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе составляла 30–50 млн в 1 мл раствора. Лимфоциты вводили внутрикожно в ладонную поверхность предплечья женщин дважды с интервалом в один месяц на 5–10 день менструального цикла. Во время наступившей беременности иммунизацию проводили при сроке 5–6 недель и 8–9 недель.

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, оценивали после стимуляции цельной крови фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе («SANYO», Япония) при температуре 37 °С. Для оценки поверхностного фенотипа стимулированных лимфоцитов использовали моноклональные антитела (mAb), объединенные набором FastImmune, предназначенные для определения фенотипов CD3/CD4/CD69, CD3/CD8/CD69, CD45/CD56/CD69, («Becton Dickinson», США). В данных наборах антитела к CD3 и CD45 были мечены перидинин-хлорофилл-протеином (PerCP), антитела к CD4, CD8, CD56 были мечены флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), антитела к CD69 были мечены фикоэритрином (PE). mAb добавляли непосредственно к цельной крови, лизировали с помощью раствора OptiLyse («Beckman Coulter», США).

Для оценки в периферической крови доли Th17-клеток, экспрессирующих RORγt⁺, среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} клетки выделяли стандартным методом центрифугиро-

вания в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [28]. До пермеабилзации клетки окрашивали антителами к CD4, меченными FITC, и антителами к CD25, меченными PE; после пермеабилзации – антителами к ROR γ t, меченными аллофикоцианином (APC) («eBioscience», США). Содержание клеток в лимфоцитарном гейте составляло 1–1,5 млн.

Цитометрический анализ проводили на проточном флуориметре Gallios («Beckman Coulter», США) с использованием программы Kaluza Software Version 1.2 («Beckman Coulter», США).

Содержание IL-17 оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием аналитической системы Cytometric Bead Array (CBA), с помощью стандартного набора «Human IL-17A Flex set» («Becton Dickinson», США) в супернатантах клеточных культур после добавления к 1 мл цельной крови смеси митогенов (4 мкг ФГА, 4 мкг конканавалина А (Кон А)), 2 мкг липополисахарида, используя набор «Цитокин-стимул-бест» («Вектор-Бест», Россия). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч. Супернатант получали последовательным центрифугированием сначала в течение 10 мин при 3000 g, затем в течение 3 мин при 10 000g («Hettich», Германия), образцы аликвотировали и хранили при –80 °C. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0 («Becton Dickinson», США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 и программы MedCalc12 для Windows 7. Проверку гипотезы о нормальном распределении осуществляли, используя критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка [29]. Данные представлены средней арифметической величиной и её стандартной ошибкой ($M \pm m$). Для оценки значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Особенности содержания в периферической крови женщин с ИПВ лимфоцитов, экспрессирующих CD69. В табл. 1 представлен ретроспективный анализ содержания лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих CD69 спонтанно и после стимуляции *in vitro*, у пациенток с ИПВ в анамнезе с учетом исходов беременности, наступившей после проведения предгес-

тационной ИЦТ, а также у фертильных женщин контрольной группы вне беременности.

Как следует из представленных данных, у женщин с беременностью, пролонгированной на фоне ИЦТ до доношенного срока, различий в оцениваемых параметрах с контрольной группой фертильных женщин не выявлено ни до назначения лечения, ни после ИЦТ. У женщин, потерявших беременность в I-м триместре содержание лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию *in vitro* до ИЦТ, было значимо меньше, чем в контроле (субпопуляции CD45⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺ и CD45⁺CD56⁺CD69⁺) и у женщин с пролонгированной беременностью (субпопуляции CD45⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺, CD45⁺CD56⁺CD69⁺ и CD45⁺CD3⁺CD69⁺). После ИЦТ в этой группе обнаружена яркая тенденция ($0,05 \leq p \leq 0,09$) к увеличению содержания указанных субпопуляций по сравнению с исходными значениями, а содержание лимфоцитов с цитотоксической активностью, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro* (CD3⁺CD8⁺CD69⁺), было значимо выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью. По-видимому, исходно сниженное и повышенное после ИЦТ количество лимфоцитов, реагирующих на активационный стимул *in vitro*, у женщин, потерявших беременность, может быть связано с измененной функциональной активностью этих клеток, особенно с их цитотоксическим действием.

Для выяснения вопроса о том, происходит ли у пациенток с благополучным исходом беременности на ранних сроках изменение содержания лимфоцитов, экспрессирующих CD69, определяли количество лимфоцитов, отвечающих на активационный стимул *in vitro*, в течение I-го триместра беременности. Результаты проведенного исследования представлены в табл. 2. Как следует из данных таблицы, у женщин с пролонгированной беременностью в течение I-го триместра не выявлено динамики измеренных показателей.

Сравнительный анализ измеренных показателей в 5–6 недель беременности, наступившей после проведенной предгестационной ИЦТ, у женщин с пролонгированной на фоне ИЦТ беременностью и у женщин, потерявших беременность, выявил значимые различия (табл. 3). В 5–6 недель гестации у женщин, потерявших беременность на фоне ИЦТ, определяли значимо большее, чем у женщин с пролонгированной беременностью, количество лимфоцитов, как спонтанно экспрессирующих CD69 (CD45⁺CD69⁺ и CD45⁺CD3⁺CD69⁺), так и после стимуляции митогеном (CD45⁺CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺ и CD3⁺CD8⁺CD69⁺), то есть количество Т-лимфоцитов, но не NK-клеток (CD45⁺CD56⁺CD69⁺).

Таблица 1. Содержание вне беременности в периферической крови пациенток с ИПВ лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* ($M \pm m$)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия		Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
			в контроле ($n = 15$)	с доношенной беременностью ($n = 30$)	с выкидышем ($n = 6$)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	до ИЦТ	7,9 ± 0,8	7,8 ± 0,8	7,3 ± 1,3
		после ИЦТ		7,4 ± 0,6	7,2 ± 1,2
CD45 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	30,7 ± 2,9	30,2 ± 3,7	20,6 ± 2,9* ^{**}
		после ИЦТ		24,9 ± 2,9	42,0 ± 11,7 [#]
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	до ИЦТ	6,2 ± 0,6	6,1 ± 0,7	6,0 ± 1,1
		после ИЦТ		5,7 ± 0,5	5,7 ± 1,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	25,7 ± 3,7	27,1 ± 4,1	19,1 ± 2,7 ^{**}
		после ИЦТ		22,0 ± 2,65	38,9 ± 10,6 [#]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	15,9 ± 2,2	15,4 ± 2,4	12,5 ± 2,1
		после ИЦТ		12,8 ± 1,9	22,2 ± 6,2 [#]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	12,8 ± 1,6	11,7 ± 2,0	6,6 ± 0,7* ^{**}
		после ИЦТ		9,2 ± 0,9	16,7 ± 4,5* [∇] •
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	до ИЦТ	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,8	2,7 ± 0,3* ^{**}
		после ИЦТ		4,0 ± 0,7	5,6 ± 1,3 [∇]

Примечание. Различия значимы при $p \leq 0,05$ при сравнении: * с контролем, ** между группами, [∇] с исходными значениями. Различия значимы при $0,05 \leq p \leq 0,09$ при сравнении: • между группами, # с исходными значениями.

Таблица 2. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в течение первого триместра пролонгированной беременности ($M \pm m$)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
		в 5–6 недель ($n = 19$)	в 8–9 недель ($n = 18$)	в 12 недель ($n = 11$)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	6,5 ± 0,6	5,9 ± 0,6	7,0 ± 0,5
CD45 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	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 ⁺	стимулированная	26,0 ± 3,6	29,7 ± 3,1	35,4 ± 5,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	15,9 ± 2,6	17,6 ± 1,9	18,4 ± 2,5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	10,7 ± 1,3	12,8 ± 1,7	17,0 ± 4,6
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	4,6 ± 0,6	4,7 ± 0,6	6,3 ± 2,5

Была проведена оценка доли активированных лимфоцитов (CD69⁺) среди клеток CD45⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺-субпопуляций (табл. 4) и выявлено, что у пациенток,

потерявших данную беременность, доля Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией, экспрессирующих на своей поверхности CD69 (CD3⁺CD8⁺CD69⁺, $p = 0,006$), до предгестаци-

онной ИЦТ была ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью. После ИЦТ отмечены тенденции к увеличению доли активированных Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD69⁺, $p = 0,09$, CD3⁺CD8⁺CD69⁺, $p = 0,1$), и это увеличение в 5–6 недель гестации стало значимым, особенно для доли Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией (CD3⁺CD8⁺CD69⁺-клеток среди CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов $p = 0,016$). Разницы в доле активированных НК-клеток не обнаружено.

Сравнительный анализ активированных лимфоцитов исследованных субпопуляций у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации с уровнем у женщин с физиологическим течением беременности не выявил значимых различий в содержании лимфоцитов, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro*, за исключением количества лимфоцитов, спонтанно экспрессирующих CD69 *in vitro* (табл. 5). У пациенток с пролонгированной беременностью содержание таких активирован-

Таблица 3. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в 5–6 недель гестации (M ± m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
		при пролонгированной беременности	при выкидыше
		в 5–6 недель (n = 19)	в 5–6 недель (n = 6)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	6,5 ± 0,6	9,0 ± 0,7 ($p = 0,008$)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	29,2 ± 4,0	45,1 ± 6,9 ($p = 0,04$)
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	5,0 ± 0,5	7,1 ± 0,7 ($p = 0,019$)
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	26,0 ± 3,6	41,8 ± 7,1 ($p = 0,042$)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	15,9 ± 2,6	24,7 ± 4,1 ($p = 0,052$)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	10,7 ± 1,3	17,2 ± 3,3 ($p = 0,058$)
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	4,6 ± 0,6	4,9 ± 0,9

Таблица 4. Доля активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ с разными исходами беременности, наступившей после предгестационной ИЦТ (M ± m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Исходы беременности	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
		до ИЦТ	после ИЦТ	в 5–6 недель гестации
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺	пролонгированная до доношенного срока	24,8 ± 4,3	21,1 ± 3,0	25,7 ± 4,2
	выкидыш в I триместре	20,3 ± 3,3	41,1 ± 12,2; $p = 0,09$	40,3 ± 7,6; $p = 0,06$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	пролонгированная до доношенного срока	33,3 ± 4,3	26,2 ± 2,6	32,5 ± 3,8
	выкидыш в I триместре	19,4 ± 2,4; $p = 0,006$	42,6 ± 10,7; $p = 0,1$	51,4 ± 8,2; $p = 0,016$
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺ /CD45 ⁺ CD56 ⁺	пролонгированная до доношенного срока	28,9 ± 4,0	25,5 ± 3,2	34,6 ± 4,9
	выкидыш в I триместре	21,9 ± 3,7	31,8 ± 7,7	39,9 ± 3,8

Примечание. Указаны значимые различия между показателями в группах с разными исходами беременности на конкретном этапе обследования.

Таблица 5. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в 12 недель гестации ($M \pm m$)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
		при физиологической беременности	при пролонгированной беременности
CD45 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	8,4 ± 0,5	7,0 ± 0,5 ($p = 0,04$)
CD45 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	37,2 ± 5,4	37,2 ± 5,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	спонтанная	6,6 ± 0,6	5,0 ± 0,4 ($p = 0,02$)
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	27,5 ± 2,6	35,4 ± 5,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	19,4 ± 2,5	18,4 ± 2,5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	13,4 ± 2,4	17,0 ± 4,6
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺	стимулированная	5,5 ± 0,9	6,3 ± 2,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺	стимулированная	32,0 ± 4,3	32,3 ± 4,4
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	стимулированная	42,3 ± 7,2	42,7 ± 7,2
CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD69 ⁺ /CD45 ⁺ CD56 ⁺	стимулированная	43,4 ± 5,6	38,3 ± 5,9

ных клеток было ниже (CD45⁺CD69⁺ и CD45⁺CD3⁺CD69⁺, $p = 0,04$ и $p = 0,02$ соответственно). При оценке доли активированных лимфоцитов (CD69⁺) среди стимулированных субпопуляций CD45⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ также не обнаружено значимых различий между группами.

Таким образом, у пациенток с ИПВ, получавших ИЦТ, в случае пролонгирования беременности ответ Т-лимфоцитов на стимулирующее воздействие в течение I-го триместра не отличается от ответа лимфоцитов контрольной группы.

Содержание Th17-лимфоцитов и продукция *in vitro* ИЛ-17 у женщин с ИПВ. До предгестацион-

ной ИЦТ и после ее проведения в периферической крови женщин, потерявших беременность, и женщин с пролонгированной беременностью не обнаружено различий ни в доле Th17-клеток (ROR γ t⁺) среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high}, ни в уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови (рис. 1).

В 5–6 недель гестации при значимом снижении доли субпопуляции CD4⁺CD25^{high}ROR γ t⁺ выявлен значимо повышенный уровень продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови женщин с выкидышем по сравнению с уровнями указанных показателей у женщин с пролонгированной беременностью.

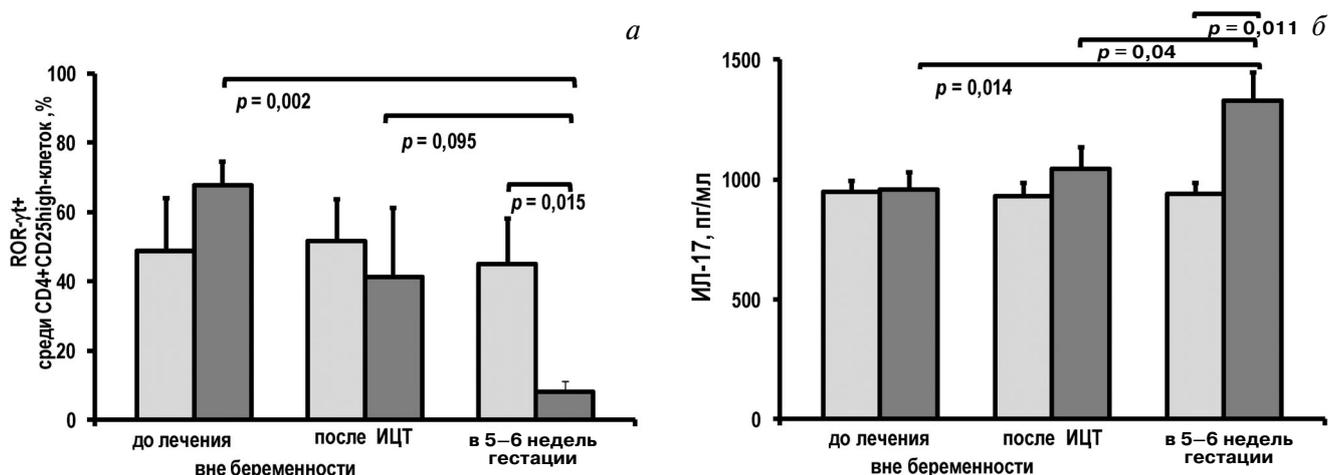


Рис. 1. Доля субпопуляции ROR γ t⁺ среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} в периферической крови женщин с ИПВ (а) и продукция ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови (б). Квадрат светло-серого цвета – группа с пролонгированной беременностью, квадрат темно-серого цвета – группа с прервавшейся беременностью

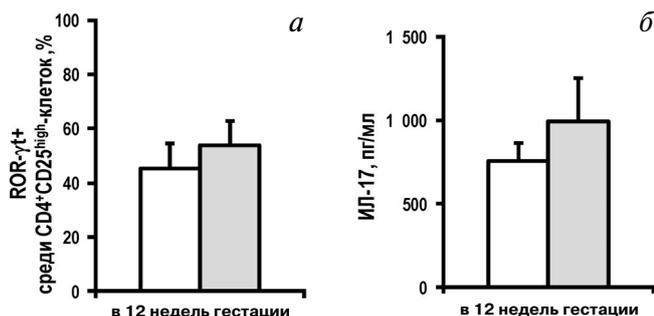


Рис. 2. Доля субпопуляции RORγt⁺ среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} (а) и продукция ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови (б) женщин с ИПВ в 12 недель пролонгированной беременности. Квадрат белого цвета – группа с физиологическим течением беременности; квадрат светло-серого цвета – группа с пролонгированной беременностью

В 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью и с физиологическим течением беременности не выявлено значимых различий в доле CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-лимфоцитов и в уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови (рис. 2).

Следовательно, у пациенток с пролонгированной беременностью доля Th17-клеток среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} и продукция ИЛ-17 митоген-стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови в 12 недель не отличается от показателей контрольной группы.

Таким образом, выявленное в 5–6 недель гестации снижение доли CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-лимфоцитов при значимо повышенном уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови у женщин с выкидышем, по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью, позволяет предполагать нарушение баланса между Th17-клетками и регуляторными Т-клетками, важного для нормального формирования иммунологической толерантности и регуляции иммунного ответа в самые ранние сроки гестационного периода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Толерантность к отцовским антигенам является необходимым условием для нормального течения беременности и ключевым фактором нормального развития плода. Очевидна необходимость иммунологического контроля уровня возникающих воспалительных реакций в ранние сроки гестации для создания гармоничного равновесия между процессами сохранения функциональной и анатомической целостности материнского организма при процессах дециду-

ализации матки, имплантации эмбриона, инвазии трофобласта, плацентации и последующего роста плода (при условии отсутствия у него генетических аномалий). Лимитирующими являются события на сроках до 5–6 недель гестации, когда при ультразвуковом исследовании четко визуализируется плодное яйцо и устанавливается наличие ритмичного сердцебиения. Поэтому потери беременности на сроках до 7–8 недель при исключении известных факторов выкидыша связывают с нарушениями иммунологических процессов и с недостаточностью контроля интенсивности связанных с распознаванием отцовских антигенов воспалительных реакций, приводящих либо к отторжению плода, либо к остановке его роста (замершей беременности). Идиопатический привычный выкидыш является, пожалуй, единственным акушерским осложнением, в генезе которого иммунологические причины признаются ведущими.

Проблемы контроля уровня и направленности воспалительных реакций в ранние сроки беременности с помощью ИЦТ до сих пор являются дискуссионными. 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 [10, 11]. Успех ИЦТ в случае пролонгирования беременности до последнего времени связывают с изменением провоспалительного состояния иммунной системы беременной на противовоспалительное. Однако все чаще звучат утверждения о необходимости провоспалительного состояния материнской иммунной системы для успешности процессов и имплантации, и плацентации, что вызывает необходимость переосмысления роли ИЦТ для пролонгирования беременности у женщин с ИПВ [12].

В представленной работе анализируются результаты исследования содержания среди лимфоцитов периферической крови субпопуляций, которые при стимуляции митогеном *in vitro*, экспрессируют CD69 – самый ранний антиген, появление которого на клеточной поверхности свидетельствует об ответе на активационный стимул. CD69 индуцируется на клетках большинства типов гемопоэтических линий, включая Т-, В- и NK-клетки, и регистрируется уже через час после активационного стимула [13].

Оценка субпопуляций, экспрессирующих CD69, в ответ на активирующие сигналы в течение гестационного периода может иметь важное значение для понимания механизмов формиро-

вания толерантности и регуляции баланса реакций иммунной системы матери на антигены плода отцовского происхождения.

В настоящее время обсуждается участие CD69 в поляризации эффекторного иммунного ответа в направлении Th1/Th17/Трег-клеток посредством нескольких механизмов [4, 14, 15]. С одной стороны, известно, что одним из специфических лигандов для CD69 является галектин-1 (Gal-1), который экспрессируется стромальными клетками эндометрия на протяжении всего менструального цикла со значительным увеличением во время имплантации. Gal-1 индуцирует дифференцировку дендритных клеток в направлении фенотипа, который подавляет пути дифференцировки Th1/Th17 через ИЛ-10 и ИЛ-27. Взаимодействие галектина-1 с CD69, с одной стороны, способно стимулировать сигнальные пути JAK3/STAT5, участвующие в формировании клеток с фенотипом, присущим клеткам с естественной регуляторной (супрессивной) активностью (Трег, или FOXP3-экспрессирующие Трег). С другой стороны, экспрессия CD69 в активированных лимфоцитах способствует интернализации и деградации рецептора S1PR1 и блокированию STAT3-индуцированной экспрессии ИЛ-17, поскольку взаимодействие сфингозин-фосфата-1 (S1P1) с его рецептором S1PR1 (сопряженным с G-белком) стимулирует сигнальные пути mTORc/HIF-1 α (mammalian target of rapamycin/Нурохиа-inducible factor 1-alpha) и JAK2/pSTAT3, запускающие формирование Th1 или Th17 эффекторных реакций. И в этом варианте поддерживаются сигнальные пути, направленные на формирование Трег-клеток [14, 15].

Также участие CD69 в поддержании баланса Th1/Th17/Трег-клеток возможно через усиление транспорта триптофана комплексом LAT1-CD98 и активацию рецептора ароматических углеводородов (АНР) в результате связывания с высокоафинным природным лигандом FICZ (6-формилиндоло[3,2-b] карбазолом), индуцирующего Th17-направленность иммунного ответа через передачу сигнала на соответствующий промоторный участок (DRE – dioxin responsible element, или, что то же, AHRE aryl hydrocarbon responsible element) [30]. Также транспорт аминокислот комплексом CD69/LAT1-CD98 активирует серин-треониновую протеинкиназу mTOR – субъединицу внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов TORC1 и TORC2, направляя развитие Th1 и Th17 эффекторного ответа и предотвращая дифференцировку Трег-клеток. Кроме того, mTOR контролирует активность HIF-1 α , который негативно регулирует функцию Трег-клеток, способ-

ствуя деградации Foxp3. Однако активация АНР ослабляет HIF-1 α -опосредованные эффекты, тем самым влияя на направленность дифференцировки эффекторных Т-клеток [14, 15].

При ранней беременности в условиях измененного метаболизма под влиянием гормонов и белков данного периода один из преимущественных путей передачи сигнала через CD69 может быть связан с усилением транспорта триптофана комплексом LAT1-CD98 и активацией АНР. Кроме того, в условиях гипоксии, которая характерна для ранних сроков беременности в физиологических условиях децидуализации эндометрия и перестройки спиральных артерий матки, могут нарушаться регуляторные механизмы, что приводит к недостаточному образованию Трег.

При действии ИЦТ скорее всего активируются оба этих механизма, поскольку помимо метаболической активации введение большого количества антигенов при действии ИЦТ активирует специфический иммунный ответ и на слабые антигены (адьювантный эффект). Ответ лимфоцитов на активирующее воздействие в разных локальных условиях (кожа, матка) различен, и скорее всего в матке во время беременности как минимум один из механизмов в условиях временной гипоксии не способствует образованию Трег.

Все вышеизложенное суммируется на схеме, представленной на рис. 3. За основу рисунка была принята схема, предложенная Sibrian и Sanchez-Madrid [14].

Активация иммунной системы женщин с ИПВ при иммунизации лимфоцитами супруга подтверждается появлением антиотцовских антителкоцитарных антител и динамикой указанных антител от процедуры к процедуре как вне беременности, так и во время беременности [16, 17]. Однако признаков активации Т-клеточного звена после ИЦТ вне беременности при анализе субпопуляционного состава лимфоцитов, включая содержание Трег с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}, в периферической крови женщин с доношенной настоящей беременностью нами не было обнаружено [18], как не выявлено и изменений в содержании Th17-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high}ROR γ t⁺ (рис.1, а), в продукции ИЛ-17 (рис.1, б), в субпопуляционном составе лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (табл. 1). Динамика Трег-клеток у женщин с доношенной беременностью была обнаружена в I-м триместре гестации [19], что свидетельствует о важной роли гестационной метаболической активации и различных регуляторных белков и пептидов ранней беременности в формировании реакций женской иммунной

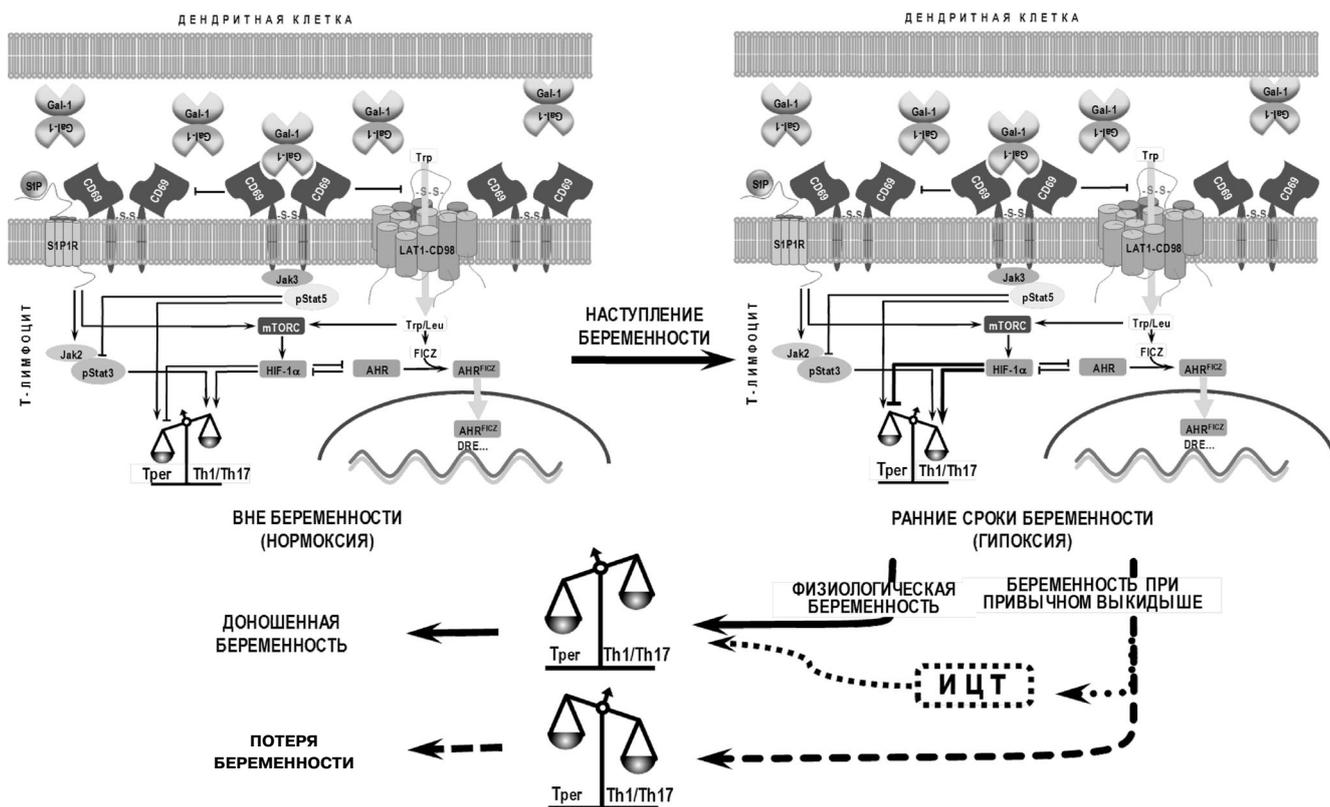


Рис. 3. Возможные механизмы регуляции баланса Th1/Th17/Tрег во время физиологической беременности и при привычном выкидыше

системы на аллоантигены плода. В субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ, доживших беременность, и у женщин с физиологическим течением беременности, начиная с 12-ти недель гестации, не было выявлено отличий [20], так же как в составе лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (табл. 5), в доле CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-лимфоцитов и продукции ИЛ-17 (рис. 2). Следовательно, ИЦТ способствовала пролонгированию беременности у данной категории женщин, и успех связан с формированием баланса в содержании Т-эффекторных лимфоцитов и цитокиновой продукции, поддерживающего развитие беременности (рис. 3).

У женщин с ИПВ, потерявших данную беременность в I-м триместре, до назначения ИЦТ было значимо меньше содержание лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию *in vitro*, чем у женщин с пролонгированной беременностью (табл. 1). После предгестационной иммунотерапии в этой группе обнаружено увеличенное содержание CD3⁺CD8⁺CD69⁺-лимфоцитов, а в 5–6 недель гестации определяли значимо большее количество именно Т-лимфоцитов, как спонтанно экспрессирующих CD69 (CD45⁺CD69⁺ и

CD45⁺CD3⁺CD69⁺), так и после стимуляции митогеном (CD45⁺CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺ и CD3⁺CD8⁺CD69⁺), а также увеличение доли Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией CD3⁺CD8⁺CD69⁺-клеток среди CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (табл. 3 и 4). Разницы в содержании НК-клеток, экспрессирующих CD69, и в доле активированных НК-клеток не обнаружено.

Уже устоялось представление о том, что во время нормальной беременности НК-клетки – это, прежде всего клетки, обеспечивающие процессы 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 физиологической беременности [21]. Баланс между цитотоксической активностью Т-лимфоцитов и НК-клеток является очень важным для нормального развития беременности [22]. Вероятно, уровень экспрессии CD69 на поверхности Т-лимфоцитов, определяемый в периферической крови до стимуляции *in vitro* в условиях ИЦТ, является маркером уровня специфического ответа Т-лимфоцитов на отцовские

антигены плода. В таком случае можно предположить, что у женщин с выкидышем повышенный ответ цитотоксических лимфоцитов на поликлональную стимуляцию отражает и усиление специфического ответа на антигены плода.

Таким образом, по результатам представленного исследования гипотеза о нарушении распознавания отцовских антигенов плода как ведущего фактора выкидыша не подтверждается. И на первый план выдвигается гипотеза о контроле воспалительных реакций в ответ на появление антигенов полуаллогенного плода в репродуктивном тракте женщины. Вполне вероятно, что одним из таких контролирующих терапевтических мероприятий и выступает ИЦТ. Нельзя исключить, что у большинства пациенток ИЦТ может снижать 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, но не у пациенток с выкидышем, у которых митоген-стимулированная экспрессия *in vitro* CD69 Т-лимфоцитами с цитотоксической направленностью была выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью без различий в уровне ответа НК-клеток на поликлональный стимул.

Ранее нами было показано, что у женщин, потерявших данную беременность, содержание клеток с естественной киллерной активностью было низким по сравнению с содержанием у пациенток с пролонгированной беременностью уже до иммунизации вне беременности, и зависимость между низким содержанием CD56⁺-лимфоцитов и вероятностью потери беременности в I-м триместре сохранялась и в 5–6 недель беременности [23], что подтверждает мнение о том, что как низкое содержание Трег, так и низкое содержание НК-клеток являются значимыми маркерами спонтанных аборт [24]. Низкий уровень Трег с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} в периферической крови был характерен для женщин с ИПВ как до предгестационной ИЦТ, так и в 5–6 недель гестации [23,25], и рост содержания этих лимфоцитов, как уже упоминалось, наблюдали в I-м триместре только у пациенток с пролонгированной беременностью. Кроме того, нами обнаружено не только снижение на фоне ИЦТ уровня НК-клеток до минимального в 5–6 недель гестации по сравнению с исходным у женщин, потерявших данную беременность [23], но и снижение доли субпопуляции CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺-лимфоцитов, которое также стало минимальным

в 5–6 недель гестации при высоком уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной периферической крови (рис. 1). С одной стороны, низкий уровень в периферической крови клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ 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.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о дисбалансе иммунного ответа у пациенток с ИПВ, потерявших беременность, и о неэффективности ИЦТ у данной категории пациенток в контроле воспалительных реакций, развивающихся в ранние сроки беременности. При этом высокий уровень продукции ИЛ-17 стимулированными клетками периферической крови женщин с физиологическим течением беременности и у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации свидетельствует о том, что терапевтические мероприятия, проводимые для пролонгирования беременности, должны приводить к ослаблению, но не к отмене Th17-ответа у женщин с ИПВ.

Полученные результаты подтверждают участие активированных Th-17-клеток наряду с FOXP3⁺Tрег в механизмах формирования толерантности к отцовским антигенам плода. В будущем еще предстоит оценить роль транскрипционных факторов RORγt и Th17-клеток в механизмах формирования или срыва толерантности к отцовским антигенам плода при беременности [26]. И хотя в данной работе не показана возможность одновременной экспрессии RORγt и FOXP3 в клетках с фенотипом CD4⁺CD25^{high}, однако есть экспериментальные данные о том, что именно с экспрессией RORγt в FOXP3⁺Tрег связана продукция высокого уровня интерферон-регулирующего фактора 4, который наделяет Трег способностью супрессировать Th2-ответ, что очень важно именно в ранние сроки беременности [27].

Таким образом, представленные результаты оценки способности лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ отвечать на стимулирующее воздействие *in vitro* экспрессией CD69 согласуются с современными представлениями об иммунных взаимоотношениях матери и плода в ранние сроки беременности, подтверждают формирование толерантности к аллоантигенам плода отцовского происхождения у пациенток с ИПВ, у которых беременность была пролонгирована до доношенного срока на фоне ИЦТ в предгестационной подготовке и в I-м триместре

гестации и завершилась рождением живого ребенка, а также неэффективность ИЦТ в контроле иммунных реакций, направленных на формирование толерантности, у женщин с ИПВ, потерявших данную беременность. Полученные результаты расширяют наши представления о роли активации лимфоцитов в формировании иммунной толерантности к аллоантигенам плода в ранние сроки беременности у женщин с ИПВ.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Всеми женщинами было подписано информированное согласие на проведение исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сухих Г. Т., Ванько Л. В. (2003) *Иммунология беременности*, Изд-во РАМН, Москва.
2. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. (2011) *Невынашивание беременности: руководство для практикующих врачей*, Медицинское информационное агентство, Москва.
3. Carr, H. J. A. (2014) *Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment*, CRC Press, London.
4. Sancho, D., Gómez, M., and Sánchez-Madrid, F. (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation, *Trends Immunol.*, **26**, 136-140, doi: 10.1016/j.it.2004.12.006.
5. Hu, Y. P., Li, X. J., and Liu, S. W. (2010) Effects of ConA on early activation and function of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in mice, *Chinese J. Cell. Mol. Immunol.*, **26**, 118-120, [in Chinese].
6. Martín, P., Gómez, M., Lawana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M. A., Yáñez-Mo, M., and Sánchez-Madrid F. (2010) CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 4877-4889, doi: 10.1128/MCB.00456-10.
7. Lu, L. F., and Rudensky, A. (2009) Molecular orchestration of differentiation and function of Regulatory T cells, *Genes Dev.*, **23**, 1270-1282, doi: 10.1101/gad.1791009.
8. Martín, P., and Sánchez-Madrid, F. (2011) CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses, *Sci. Signal.*, **4**, 14, doi: 10.1126/scisignal.2001825.
9. Miki-Hosokawa, T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T. (2009) CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation, *J. Immunol.*, **183**, 8203-8215, doi: 10.4049/jimmunol.0900646.
10. Farquharson, R. G., and Stephenson, M. D. (2017) *Early pregnancy*, Cambridge University Press, Cambridge.
11. Porter, T. F., LaCoursiere, Y., and Scott, J. R. (2006) Immunotherapy for recurrent miscarriage, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD000112, doi: 10.1002/14651858.CD000112.pub2.
12. Mor, G. (2008) Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1127**, 121-128, doi: 10.1196/annals.1434.006.
13. Marzio, R., Mauël, J., and Betz-Corradin, S. (1999) CD69 and regulation of the immune function, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **21**, 565-582, doi: 10.3109/08923979909007126.
14. Cibrian, D., and Sanchez-Madrid, F. (2017) CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper, *Eur. J. Immunol.*, **47**, 946-953, doi: 10.1002/eji.201646837.
15. Labiano, S., Meléndez-Rodríguez, F., Palazón, A., Teijeira, A., Garasa, S., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Sánchez-Paulete, A. R., Azpilikueta, A., Bolaños, E., Molina, C., de la Fuente, H., Maiso, P., Sánchez-Madrid, F., de Landázuri, M. O., Aragonés, J., and Melero, I. (2017) CD69 is a direct HIF-1 α target gene in hypoxia as a mechanism enhancing expression on tumor-infiltrating T lymphocytes, *Oncimmunology*, **6**, doi: 10.1080/2162402X.2017.1283468.
16. Кречетова Л. В., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Голубева Е. Л., Николаева М. А., Сухих Г. Т. (2015) Динамика выработки антилейкоцитарных антител к отцовским антигенам при иммунизации аллогенными клетками женщин с привычным выкидышем, *Акушерство и гинекология*, **3**, 16-20.
17. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Николаева М. А., Голубева Е. Л., Сарибегова В. А., Агаджанова А. А., Ванько Л. В. (2017) Динамика выработки антилейкоцитарных антител в течение беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **9**, 48-55, doi: 10.18565/aig.2017.9.48-55.
18. Кречетова Л. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Вторушина В. В., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Сухих Г. Т. (2015) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем при предгестационной иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **4**, 37-43.
19. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А. (2015) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **6**, 59-66.
20. Тетруашвили Н. К., Кречетова Л. В., Сарибегова В. А., Вторушина В. В., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А., Агаджанова А. А. (2017) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с привычным выкидышем аллоиммунного генеза в течение беременности, *Акушерство и гинекология: Новости, Мнения, Обучение*, **4**, 28-36.
21. Siewiera, J., Siewiera, J., Gouilly, J., Hocine, H. R., Cartron, G., Levy, C., Al-Daccak, R., and Jabrane-Ferrat, N. (2015) Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes, *Nat. Commun.*, **6**, 12, doi: 10.1038/ncomms10183.
22. Nakashima, A., Nakashima, A., Shima, T., Inada, K., Ito, M., and Saito, S. (2012) The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **67**, 304-310, doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01115.x.
23. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Николаева М. А., Хачатрян Н. А., Агаджанова А. А., Ванько Л. В., Иванец Т. Ю., Сухих Г. Т. (2017) Особенности

- ности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности на фоне иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **7**, 52-60, doi: 10.18565/aig.2017.7.52-60.
24. Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A., and Mingari, M. C. (2011) Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy, *Trends Immunol.*, **32**, 517-523, doi: 10.1016/j.it.2011.06.013.
 25. Кречетова Л. В., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Сухих Г. Т. (2014) Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем, *Акушерство и гинекология*, **10**, 27-33.
 26. Nakachima, A., Ito, M., Yoneda, S., Shiozaki, A., Hidaka, T., and Saito, S. (2010) Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **63**, 104-109, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00771.x.
 27. Ohnmacht, C., Park, J. H., Cording, S., Wing, J. B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., Busslinger, M., Cerf-Bensussan, N., Boneca, I. G., Voehringer, D., Hase, K., Honda, K., Sakaguchi, S., and Eberl, G. (2015) The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ ⁺ T cells, *Science*, **349**, 989-993, doi: 10.1126/science.aac4263.
 28. Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. (1987) *Лабораторные методы исследования в клинике*, Медицина, Москва.
 29. Shapiro, S. S., and Wilk, M. B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika*, **52**, 591-611.
 30. Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2008) Control of T reg and TH 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor, *Nature*, **453**, 65-71, doi: 10.1038/nature06880.

LYMPHOCYTE ACTIVATION IN IMMUNE TOLERANCE DEVELOPMENT IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

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

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997 Moscow, Russian Federation; E-mail: e_inviyaeva@oparina4.ru

Received November 8, 2019
Revised March 20, 2020
Accepted March 20, 2020

Association between lymphocyte activation and formation of immune tolerance, as well as pregnancy outcome, in the case of immunocytotherapy (ICT) was studied in women with idiopathic recurrent pregnancy loss (IRPL). The content and phenotypic characteristics of activated T lymphocytes and NK cells were investigated in the peripheral blood of IRPL patients with different pregnancy outcomes (pregnancy prolongation to the full term and habitual miscarriage). The fraction of activated cells in the subpopulation of cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺/CD3⁺CD8⁺CD69⁺) before ICT was significantly lower in women who lost the pregnancy. After ICT, the fraction of these cells during weeks 5-6 of pregnancy in woman with miscarriage was higher than in women with pregnancy prolonged to the full-term. Excessive content of activated cytotoxic lymphocytes can be a mechanism underlying impaired maternal immunotolerance to fetal alloantigens, which is a leading factor of early pregnancy loss. The obtained data confirm the involvement of activated Th17 cells and FOXP3⁺ Treg cells in the formation of tolerance to paternal antigens of the fetus. Comparison of the decrease in the fraction of CD4⁺CD25^{high}ROR γ ⁺ lymphocytes at the early gestation period (5-6 weeks) and significant upregulation of the IL-17 production by *in vitro* stimulated whole blood cells in women with miscarriage with the same parameters in women with prolonged pregnancy suggested an imbalance between pro-inflammatory Th17 cells and Treg cells. No such imbalance in the content effector T lymphocytes was observed in women with the full-term pregnancy. Taken together, our data indicate an important role of gestational activation of lymphocytes in the formation of maternal immune response to fetal alloantigens necessary for the prolongation of pregnancy.

Keywords: immunotolerance, recurrent pregnancy loss, immunocytotherapy, CD69 expression, T lymphocytes, NK cells