

НОВЫЕ РАННИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

¹«Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045. Иваново, Россия;

²«Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153012. Иваново, Россия

Цель: определить новые критерии прогнозирования исхода беременности у женщин с привычным выкидышем на основании особенностей дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяциях Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺). Обследованы 61 женщина с угрожающим и привычным выкидышем в первом триместре гестации. В зависимости от исхода беременности было выделено 3 группы: в I группу вошли 39 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами; во II – 10 женщин с преждевременными родами; в III – 11 пациенток с ранним самопроизвольным выкидышем. Методом трехцветной проточной цитофлуориметрии в периферической венозной крови в популяциях CD8⁺ и CD4⁺ определялось содержание Tn, Tcm, Tem и Temra клеток. Статистический анализ осуществлялся в программах «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2010» и «MedCalc». При проведении ретроспективной оценки установлено, что в группе пациенток, чья беременность завершилась преждевременными родами, процентное содержание CD4⁺ Tem клеток памяти было достоверно выше, а CD4⁺ Tn – ниже, чем в группе со своевременными родами (p=0,013 и p=0,025 соответственно). У пациенток с ранним самопроизвольным выкидышем достоверно снижались уровни CD8⁺ Tn на фоне роста CD8⁺ Tem клеток памяти по сравнению с аналогичными параметрами пациенток со своевременными родами (p=0,040 и p=0,014 соответственно).

Прогнозирование самопроизвольного выкидыша возможно при значении CD4⁺ Tn равном 34,2% и менее (чувствительность – 100,0%, специфичность – 56,4%, точность – 63,8%), преждевременных родов – при значении CD4⁺ Tn равном 35,2% и менее (чувствительность – 66,7%, специфичность – 74,4% точность – 72,9%).

Таким образом, новые дополнительные критерии позволяют своевременно выявить группу риска и назначить адекватное лечение, направленное на пролонгирование желанной беременности.

Ключевые слова: привычный выкидыш; дифференцировка Т-лимфоцитов; Т-клетки памяти.

Для цитирования: Борзова Н.Ю., Иваненкова Н.И., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И. Новые ранние прогностические критерии исхода беременности у пациенток с привычным выкидышем. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 294-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-294-298>

Borzova N.Yu.¹, Ivanenkova N.I.², Sotnikova N.Yu.¹, Malysheva A.I.^{1,2}

NEW EARLY PROGNOSTIC CRITERIA FOR PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

¹«Ivanovo Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov» of Russian Ministry of health. Ivanovo, Russia; ²Ivanovo State Medical Academy. Ivanovo, Russia

To determine the new criteria for predicting the outcome of pregnancy in women with habitual abortion based on features of differentiation of naive T cells and memory cells in a population of T-helper (CD4⁺) and cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺). The study involved 61 women with threatened and habitual abortion in the first trimester of gestation. Depending on the outcome of pregnancy was allocated to 3 groups: I went to 39 women whose pregnancy ended in timely delivery; in II – 10 women whose pregnancies ended in premature birth; in III – 11 patients in whom there was a spontaneous miscarriage. Using three-color flow cytometry as peripheral venous blood in populations of CD8⁺ and CD4⁺ determined by the content Tn, Tcm, Tem and Temra cells. Statistical analysis was carried out in the program «MicrosoftOffice 2010», «Statistica for Windows 6.0» and MedCalc». When conducting a retrospective assessment, it was found that in the group of patients whose pregnancy ended in preterm delivery, the percentage of CD4⁺ Tem memory cells was significantly higher and CD4⁺ Tn lower than in the subgroup with timely delivery (p = 0.013 and p = 0.025, respectively) In patients with early spontaneous miscarriage, the level of CD8⁺ Tn significantly decreased against the background of the growth of CD8⁺ Tem memory cells compared with the same parameters in patients with timely delivery (p = 0.040 and p = 0.014, respectively). Prediction of spontaneous abortion is possible up to CD4⁺ Tn equal to 34.2% or less (sensitivity – 100.0%, specificity – 56.4%, accuracy – 63.8%), premature birth – if the CD4⁺ Tn equal to 35.2% or less (sensitivity – 66.7%, specificity – 74.4% accuracy – 72.9%). Thus, the new criteria will allow additional time to identify risk and assign adequate treatment aimed at prolonging the desired pregnancy.

Key words: habitual miscarriage; differentiation of T cells; memory T-cells.

For citation: Borzova N.Yu., Ivanenkova N.I., Sotnikova N.Yu., Malysheva A.I. New early prognostic criteria for pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 294-298. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-294-298>

For correspondence: Ivanenkova N.I., candidate of medical Sciences, assistant of the department of obstetrics and gynecology, medical genetics; e-mail: dr_ivanenkova@mail.ru

Information about authors:

Borzova N. <https://orcid.org/0000-0002-2247-3963>
Ivanenkova N. <https://orcid.org/0000-0002-4049-8160>
Sotnikova N. <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>
Malyshkina A. <https://orcid.org/0000-0002-1145-0563>

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.03.2020
Accepted 07.03.2020

Введение. Прерывание беременности в первом триместре многими учеными рассматривается не только как важная составляющая и неотъемлемая часть естественного отбора, но и как проявление первых серьезных нарушений в репродуктивном здоровье женщины, которое в дальнейшем может стать причиной привычной потери беременности. Частота привычного выкидыша среди всех желанных беременностей составляет 2 – 5% [1, 2]. Развитие угрозы прерывания в ранние сроки беременности приводит к повышению проницаемости формирующейся плацентарной ткани и ведет к усиленному поступлению клеток плодового происхождения в кровотоки матери, что может нарушать процесс дифференцировки клеток. Иммунные механизмы, протекающие в организме беременной женщины, играют крайне важную роль, а нарушение сложной цепочки иммунорегуляции может повлечь за собой возникновение патологии во время беременности (невынашивание беременности, задержка роста плода, преэклампсия и др.) [3-7].

Цель исследования: определить новые критерии прогнозирования исхода беременности у женщин с привычным выкидышем на основании особенностей дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяции Т-хелперов (Th, CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD8⁺).

Материал и методы. На базе гинекологического стационара ФГБОУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ были отобраны 61 женщина с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования (O20.0; O26.2 по МКБ-10) в первом триместре беременности. На участие в исследовании от каждой женщины было получено письменное информированное согласие. Путем ретроспективного анализа в зависимости от исхода беременности было выделено 3 группы пациенток: в I группу вошли 39 женщин, у которых беременность завершилась своевременными родами; во II – 10 женщин, с преждевременными родами; в III – 11 пациенток, с ранним самопроизвольным выкидышем. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Методом трехцветной проточной цитометрии в периферической венозной крови в популяциях Th и ЦТЛ определяли содержание наивных клеток – Tn (CD45RA⁺CD62L⁺), центральных клеток памяти – Tcm (CD45RA⁺CD62L⁺), претерминально-дифференцированных – Tem (CD45RA⁺CD62L⁻) и терминально-дифференцированных – Temra (CD45RA⁺CD62L⁻) клеток памяти на проточном цитофлюориметре FACSCantoII

в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США). В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD4 PerCP-Cy5.5 (clone OKT-4), анти-CD8 PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T8), анти-CD45RA APC (clone HI100), анти-CD62L FITC (clone DREG-56), производства eBioscience (США).

Статистический анализ полученных результатов проводился по общепринятым методам вариационной статистики, после проверки рядов на нормальность распределения – по критериям Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка. Данные представлены в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m), статистическая значимость показателей в группах определялась по t-критерию Стьюдента и считали статистически значимой при уровне $p < 0,05$. Поиск точки разделения расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ). Статистический анализ осуществлялся с использованием пакетов прикладных лицензионных программ «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2010» и «MedCalc».

Результаты. Проведенный нами ретроспективный анализ полученных результатов показал, что при угрожающем и привычном выкидыше у пациенток, завершивших беременность преждевременными родами, процентное содержание клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ в популяции периферических Th было достоверно выше, а клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ — ниже, по сравнению с показателями в группе женщин завершивших беременность родами в срок ($p=0,013$ и $p=0,025$ соответственно) (табл. 1). Статистически значимых различий в содержании CD4⁺ Tcm и CD4⁺ Temra клеток памяти между показателями I и II группы выявлено не было ($p>0,05$ во всех случаях). Проводя сравнительный анализ процентного содержания Tn, Tcm, Tem, Temra клеток памяти в популяции CD4⁺ лимфоцитов в группах с ранним самопроизвольным выкидышем и со своевременными родами достоверных различий не выявлено ($p>0,05$ во всех случаях).

Проводя оценку характера дифференцировки ЦТЛ на системном уровне у пациенток с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности (табл. 2) было установлено, что в группе женщин, завершивших беременность ранним самопроизвольным выкидышем отмечалось достоверное снижение пула Тn клеток на фоне роста пула Tem клеток памяти по сравнению с таковыми в группе женщин, завершивших беременность родами

в срок ($p=0,040$ и $p=0,014$ соответственно). Нами не было выявлено достоверных различий в содержании $CD8^+T_{cm}$ и $CD8^+T_{emra}$ клеток памяти в I и II группах ($p>0,05$ во всех случаях), как и в уровне наивных клеток и Т-клеток памяти в группах с преждевременными родами и родами в срок ($p>0,05$ во всех случаях).

В результате проведенного исследования были получены новые данные, которые позволили разработать дополнительные прогностические критерии раннего самопроизвольного выкидыша и преждевременных родов у женщин с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования,

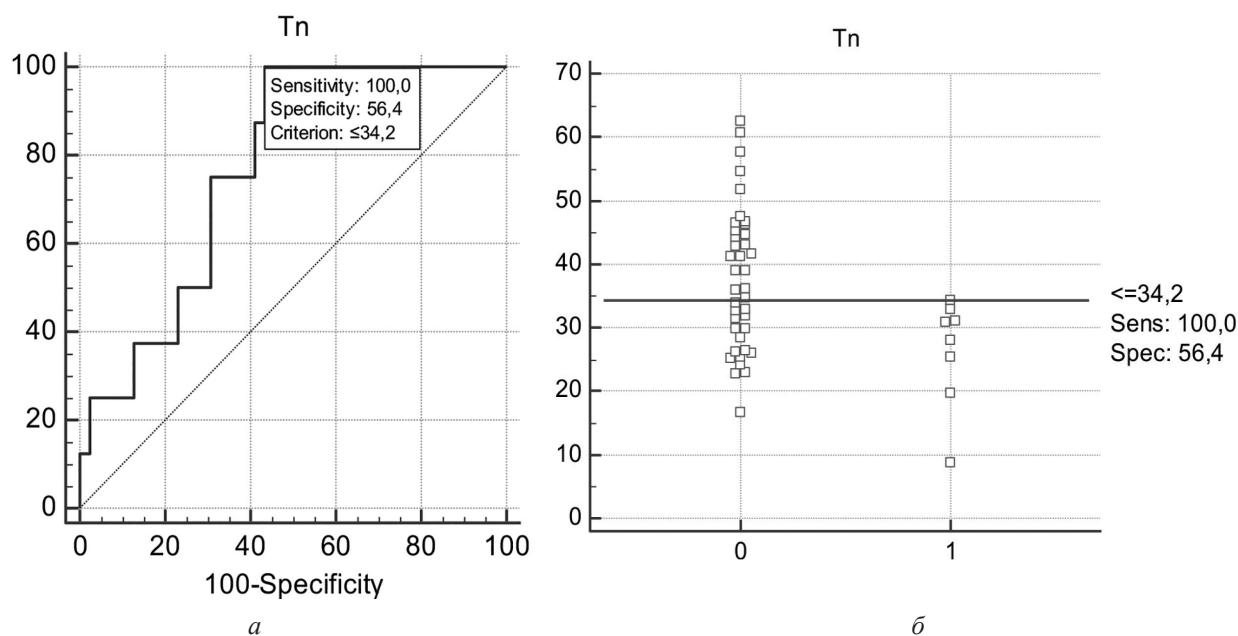


Рис. 1. ROC-анализ показателя наивных клеток в популяции периферических $CD8^+$ лимфоцитов при самопроизвольном выкидыше у женщин с привычным невынашиванием. а - ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания $CD8^+Tn$; б - относительный показатель $CD8^+Tn$ в периферической венозной крови у женщин с привычным невынашиванием со своевременными родами (0) и с самопроизвольным выкидышем (1).

Таблица 1

Характер дифференцировки периферических Т-хелперов у женщин с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности, %

Показатель	Исход беременности		
	Своевременные роды ($n = 39$)	Преждевременные роды ($n = 10$)	Ранний самопроизвольный выкидыш ($n = 11$)
$CD45RA^+CD62L^+$ (Tn)	$41,67 \pm 1,86$	$34,48 \pm 2,32$ $p_1=0,025$	$36,43 \pm 3,69$
$CD45RA^-CD62L^+$ (Tem)	$32,42 \pm 1,58$	$32,14 \pm 2,18$	$31,86 \pm 2,03$
$CD45RA^-CD62L^-$ (Tem)	$21,04 \pm 1,76$	$29,88 \pm 2,63$ $p_1=0,013$	$28,15 \pm 4,17$
$CD45RA^+CD62L^-$ (Temra)	$4,32 \pm 0,73$	$3,51 \pm 1,04$	$3,60 \pm 0,69$

Примечание. p_1 - уровень статистической значимости между группами с преждевременными родами по сравнению с своевременными родами.

Таблица 2

Характер дифференцировки периферических цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности, %

Показатель	Исход беременности		
	Своевременные роды ($n = 39$)	Преждевременные роды ($n = 10$)	Ранний самопроизвольный выкидыш ($n = 11$)
$CD45RA^+CD62L^+$ (Tn)	$37,66 \pm 1,79$	$33,45 \pm 3,06$	$28,61 \pm 3,51$ $p_1=0,040$
$CD45RA^-CD62L^+$ (Tem)	$12,45 \pm 0,80$	$12,50 \pm 1,29$	$11,59 \pm 1,22$
$CD45RA^-CD62L^-$ (Tem)	$21,08 \pm 1,48$	$22,10 \pm 2,00$	$25,90 \pm 1,15$ $p_1=0,014$
$CD45RA^+CD62L^-$ (Temra)	$28,79 \pm 1,65$	$31,94 \pm 3,13$	$33,90 \pm 3,76$

Примечание. p_1 - уровень статистической значимости между группами с ранним самопроизвольным выкидышем по сравнению с своевременными родами.

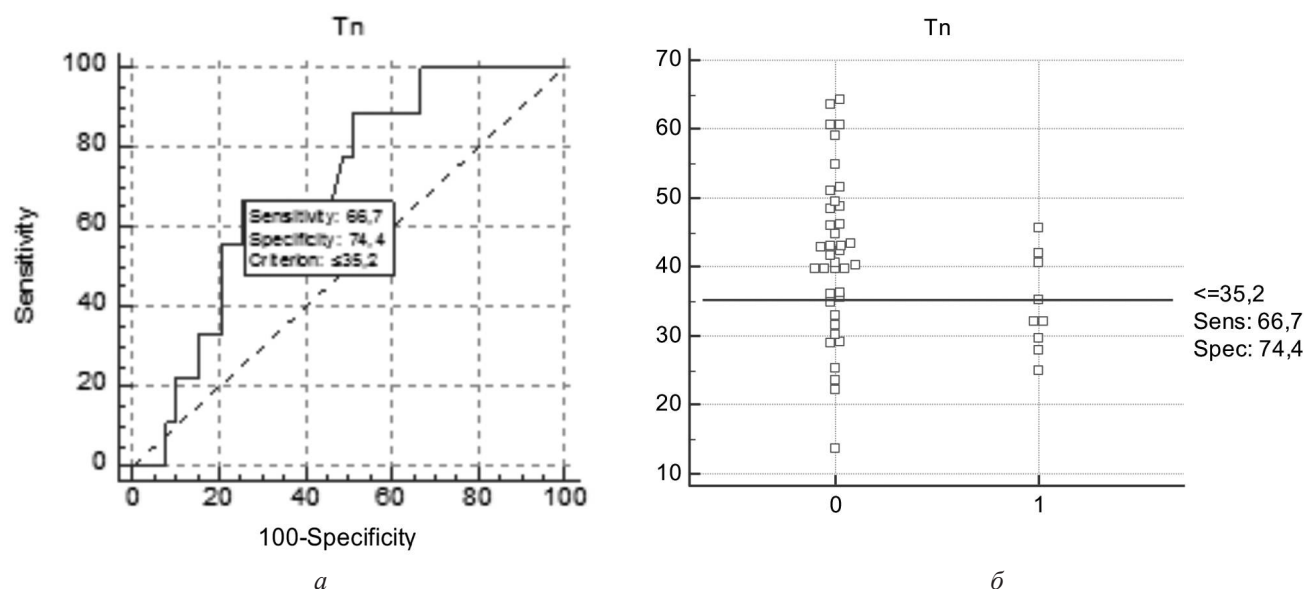


Рис. 2. ROC-анализ показателя наивных клеток в популяции периферических CD4⁺ лимфоцитов при самопроизвольном выкидыше у женщин с привычным невынашиванием. *a* - ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания CD4⁺Tn; *б* - относительный показатель CD4⁺Tn в периферической венозной крови у женщин с привычным невынашиванием со своевременными родами (0) и с преждевременными родами (1).

Так, при уровне CD8⁺Tn равном 34,2% и менее, прогнозируют ранний самопроизвольный выкидыш. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,769, чувствительность данного показателя 100,0%, специфичность 56,4% и точность 63,8% (рис. 1, *a, б*).

При значении CD4⁺Tn равном 35,2% и менее возможно прогнозирование преждевременных родов. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,705, чувствительность данного показателя 66,7%, специфичность 74,4 % и точность 72,9% (рис. 2).

Обсуждение. Резюмируя вышесказанное, можно сделать вывод, что в группе пациенток с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования, завершивших беременность ранним самопроизвольным выкидышем, происходили изменения в характере дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяции ЦТЛ, достоверно снижался пул Tn клеток на фоне роста пула Tem клеток памяти. В группе пациенток с преждевременными родами, достоверно повышалось процентное содержание клеток с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻ на фоне достоверного снижения уровня клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ в популяции периферических CD4⁺ лимфоцитов. Известно, что функциональная активность Т-клеток памяти в популяции CD8⁺ лимфоцитов нуждается в помощи CD4⁺ Т-клеток [8]. Одним из основных компонентов эффекторной стадии иммунного ответа являются ЦТЛ, которые способны осуществлять цитолитическое действие в отношении клетки-мишени за счет продукции различных цитокинов и функциональных молекул, а также запуская процесс апоптоза. Успешное проте-

кание беременности зависит от хорошей адаптации материнской иммунной системы в ответ на постоянную стимуляцию клетками плодового происхождения. Т-клетки памяти обладают способностью запоминать ранее встречавшиеся антигены, что при повторных неудачных беременностях позволяет им вызывать более быстрый, существенный и сфокусированный ответ иммунной системы в отношении отцовско-фетальных антиген-специфических клеток, что может приводить к гибели плода [9]. Согласно полученным данным можно предположить, что при завершении беременности самопроизвольным выкидышем в ранние сроки происходит более стремительный процесс развития цитотоксических реакций, направленных на отторжение плода (эмбриона), в то время, как при преждевременных родах, изменения происходят только в популяции Т-хелперов, что говорит о более низкой антигенной стимуляции иммунной системы матери плодовыми клетками, позволяя пролонгировать гестационный срок. Полученные данные, позволили разработать новые, дополнительные ранние прогностические критерии досрочного прерывания беременности.

Заключение. Использование в качестве дополнительного раннего прогностического критерия самопроизвольного выкидыша у женщин с угрожающим и привычным выкидышем по уровню периферических CD8⁺Tn клеток и преждевременных родов по уровню CD4⁺Tn клеток, позволит своевременно выявить группы риска, назначить необходимую сохраняющую терапию, что позволит пролонгировать беременность до срока своевременных родов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7, 9 см. REFERENCES)

1. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Хачатрян Н.А., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Сухих Г.Т. Диагностическая значимость оценки фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным невынашиванием. *Акушерство и гинекология*. 2015; 1: 25-31.
2. Трифонова Е.А., Ганьжа О.А., Габидулина Т.В., Девятьрова Л.Л., Сотникова Л.С., Степанов В.А. Генетические факторы в развитии привычного невынашивания беременности: обзор данных мета-анализов. *Акушерство и гинекология*. 2017; 4: 14-20. doi.org/10.18565/aig.2017.4.14-20.
3. Иваненкова Н.И., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю. Дифференцировка периферических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности. *Медицинская Иммунология*. 2015; 17; 5: 267.
4. Кадырова Л.В., Борзова Н.Ю., Иваненкова Н.И. Особенности дифференцировки Т-лимфоцитов при невынашивании в ранние сроки гестации. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7; 16: 2.
5. Смирнова А.В., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И. Особенности содержания растворимой формы рецептора для конечных продуктов гликозилирования при очень ранних угрожающих преждевременных родах. *Акушерство и гинекология*. 2017; 10: 35-9. doi.org/10.18565/aig.2017.10.35-9
6. Колобова А.В., Сотникова Н.Ю., Борзова Н.Ю. Содержание SRAGE и белка S100B при угрожающих преждевременных родах в сроке 22-27 недель. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7; 2-3: 313.
8. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

REFERENCES

1. Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Khachatryan N.A., Vtorushina V.V., Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Sukhikh G.T. Diagnostic

- procedure for assessing the phenotype of peripheral blood lymphocytes in women with habitual miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2015; 1: 25-31. (in Russian)
2. Trifonova E.A., Gan'zha O.A., Gabidulina T.V., Devjat'jarova L.L., Sotnikova L.S., Stepanov V.A. Genetic factors in the development of habitual miscarriage: a review of meta-analyzes. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; 4: 14-20. doi.org/10.18565/aig.2017.4.14-20. (in Russian)
3. Ivanenkova N.I., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu. Differentiation of peripheral T-helpers and cytotoxic T-lymphocytes in women with habitual miscarriage depending on the outcome of pregnancy. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17; 5: 267. (in Russian)
4. Kadyrova L.V., Borzova N.Yu., Ivanenkova N.I. Features of differentiation of T-lymphocytes during miscarriage in the early stages of gestation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7; 16: 2. (in Russian)
5. Smirnova A.V., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu., Malysheva A.I. Features of the content of the soluble form of the receptor for the final glycosylation products in very early threatening preterm delivery. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; 10: 35-9. doi.org/10.18565/aig.2017.10.35-39. (in Russian)
6. Kolobova A.V., Sotnikova N.Yu., Borzova N.Yu. The content of SRAGE and protein S100B in threatening preterm birth in the period of 22-27 weeks. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7; 2-3: 313. (in Russian)
7. Kieffer T.E.C., Scherjon S.A., Faas M.M., Prins J.R. Lower activation of CD4⁺ memory T cells in preeclampsia compared to healthy pregnancies persists postpartum. *J. Reprod. Immunol.* 2019; 136: 102613. doi: 10.1016/J.Jri.2019.102613.
8. Yarin A. A. Immunologiya. [Immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
9. Kieffer T.E.C., Laskewitz A., Scherjon S.A., Faas M.M., Prins J.R. Memory T cells in pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10: 625. doi: 10.3389/Fimmu.2019.00625.

Поступила 01.03.20

Принята к печати 07.03.20