

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В., Таланова И.Е., Куст А.В., Козелкова Е.В.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

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

Проблеме привычной потери беременности в настоящее время посвящено множество исследований, и это внимание продиктовано сохраняющейся высокой частотой данного состояния. Патогенез привычного невынашивания беременности очень сложен и включает множество факторов, в настоящее время особо пристальное внимание уделяется иммунным аспектам. Существует мнение, что дисбаланс цитокинов может играть ключевую роль в патогенезе привычного невынашивания беременности. Проведено обследование 38 беременных женщин в сроке гестации 5-12 недель. Основную группу составили 17 женщин с привычным невынашиванием и угрозой прерывания на момент обследования, группу контроля – 21 женщина с неосложненным течением беременности и благоприятным анамнезом. Материалом исследования служила периферическая венозная кровь. Сывороточный уровень комплекса цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF определялся на мультиплексном флуоресцентном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США). Значимые различия отмечались в сывороточном содержании IL-1 β , IL-22, IL-23 и IL-27, уровень которых был выше в основной группе по сравнению с группой здоровых беременных. При оценке сывороточного уровня цитокинов в основной группе имелись достаточно высокие значения IL-27 (25%) ($p < 0,05$), а TNF α – в 18% случаев ($p > 0,05$), тогда как в группе контроля не регистрировались. Достоверных различий в сывороточном содержании IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 и IFN γ в сравниваемых группах не отмечалось ($p > 0,05$). Одновременное повышение сывороточного уровня про- и противовоспалительных цитокинов, наблюдавшееся нами, можно объяснить как усилением иммунного ответа, так и запуском механизмов фетопroteкции. Неадекватная цитокиновая регуляция может являться предпосылкой для возникновения условий развития угрозы прерывания настоящей беременности у женщин с привычным невынашиванием.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности; угроза прерывания; цитокины.

Для цитирования: Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В., Таланова И.Е., Куст А.В., Козелкова Е.В. Особенности содержания цитокинов периферической крови у беременных женщин с привычным невынашиванием беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 299-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-299-303>

Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Kroshkina N.V., Talanova I.E., Kust A.V., Kozelkova E.V.

PECULIARITIES OF THE CONTENT OF PERIPHERAL BLOOD CYTOKINES IN PREGNANT WOMEN WITH A HABITUAL MISCARRIAGE

V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ministry of Health of Russia, Ivanovo

A lot of research nowadays is dedicated to the problem of habitual pregnancy loss, and this attention is dictated by the continued high frequency of this condition. The pathogenesis of habitual pregnancy loss is very complicated and includes many factors, at present especially close attention is paid to immune aspects. It is considered, that cytokine imbalance might play a key role in the pathogenesis of habitual pregnancy loss. Examination of 38 pregnant women was carried out at 5-12 weeks of gestation. The main group consisted of 17 women with habitual miscarriage and the threat of interruption at the time of the examination, the control group consisted of 21 women with uncomplicated pregnancy and a favorable obstetric history. As the material for investigation peripheral blood was used. Serum level of a complex of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF was assessed on the Luminex 200 multiplex fluorescence analyzer (Luminex Corporation, USA). The significant differences in the serum level of IL-1 β , IL-22, IL-23 and IL-27 were observed between the groups, in the main group their level was higher comparing to that of healthy pregnant women. When evaluating the cytokines serum level, fairly high values of IL-27 (in 25% of cases) ($p < 0,05$), TNF α – (in 18% of cases) ($p > 0,05$) were found in the main group, while in the control group they were not registered. Significant differences in the serum level of IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 and IFN γ were not noted in the compared groups ($p > 0,05$). The simultaneous increase in the serum level of pro- and anti-inflammatory cytokines observed in our study can be explained by both an increase in the immune response and triggering of fetoprotection mechanisms. Inadequate cytokine regulation may be a prerequisite for the development of conditions for the development of a threat of termination of a real pregnancy in women with habitual miscarriage.

Key words: habitual miscarriage; threat of interruption; cytokines.

For citation: Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Kroshkina N.V., Talanova I.E., Kust A.V., Kozelkova E.V. Peculiarities of the content of peripheral blood cytokines in pregnant women with a habitual miscarriage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 299-303 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-299-303>

For correspondence: Kozelkova Elena Vladimirovna, graduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Intensive Care; e-mail: niimid.immune@mail.ru

Information about authors:

Malyshkina A.I. <http://orcid.org/0000-0002-1145-0563>

Sotnikova N.Y. <http://orcid.org/0000-0002-0608-0692>

Kroshkina N.V. <http://orcid.org/0000-0002-0428-6945>

Talanova I.E. <http://orcid.org/0000-0003-4950-8174>

Kust A.V. <http://orcid.org/0000-0002-1355-7225>

Kozelkova E.V. <http://orcid.org/0000-0003-4593-3771>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 01.03.2020
Accepted 07.03.2020

Введение. Привычная потеря беременности – самопроизвольное прерывание двух и более беременностей (по данным ВОЗ трех и более) – полиэтиологическое состояние, пусковым механизмом которого являются нарушения в репродуктивной системе [6, 7, 9, 14]. Этиология привычного невынашивания беременности различна [2, 6]. Среди причин преобладают материнские, такие как пороки развития матки (16%), генетические аномалии эмбриона (15%), перенесенные инфекционные заболевания матери во время беременности, аутоиммунные состояния, гормональные нарушения, хронический эндометрит [1, 2, 5]. В последние годы пристальное внимание уделяется иммунным аспектам данного осложнения [6, 11]. Любая успешная беременность является результатом сложной координации взаимодействия между иммунными клетками, которое опосредовано продуцируемыми ими цитокинами [3, 4, 11]. Изменения в этой сложной регуляторной сети во многом определяют развитие той или иной акушерской патологии. Существует мнение, что дисбаланс цитокинов может играть ключевую роль в патогенезе привычного невынашивания беременности [12, 13].

Цель данной работы – изучить клинические особенности, а также установить изменения содержания цитокинов в периферической крови, определяющих дифференцировку клеток иммунной системы и их функциональную активность, у беременных женщин с угрозой прерывания в ранние сроки и привычным невынашиванием.

Материал и методы. Для достижения поставленной цели на базе Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова было проведено обследование 38 женщин в сроке гестации 5-12 нед: 17 из них имели установленный диагноз привычное невынашивание и угрожающий выкидыш на момент обследования (основная группа) и 21 женщина имела неосложненное течение беременности и неотягощенный акушерский анамнез (группа контроля). Основным критерием отбора в программу исследования являлись пациентки с диагнозом привычный выкидыш (имеющие в анамнезе 2 и более ранние потери беременности), прогрессирующая одноплодная маточная беременность в сроке 5 – 12 нед, наступившая в естественном цикле, информированное согласие пациентки на участие в исследовании. Критерии исключения:

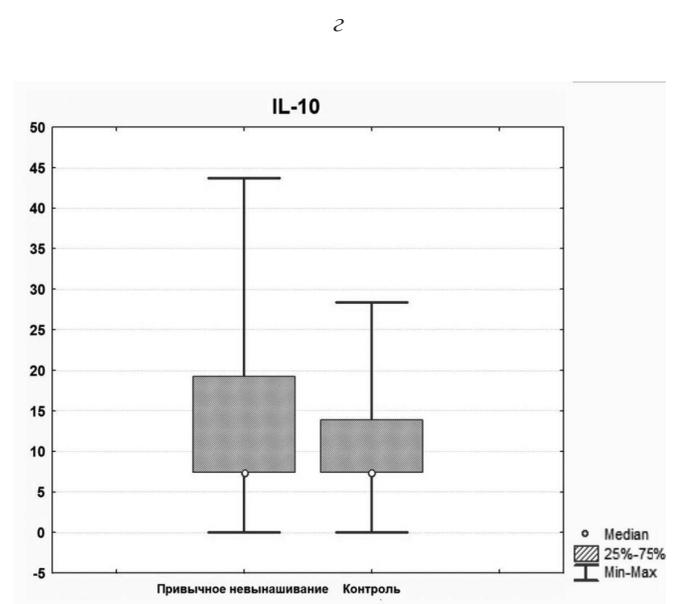
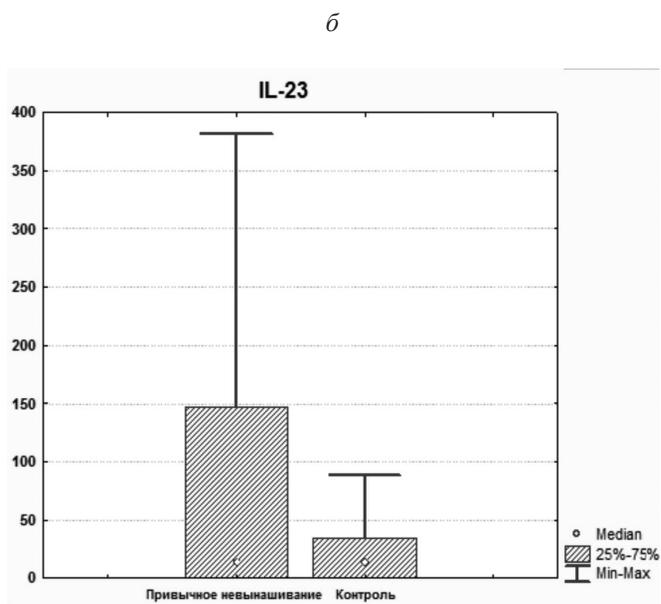
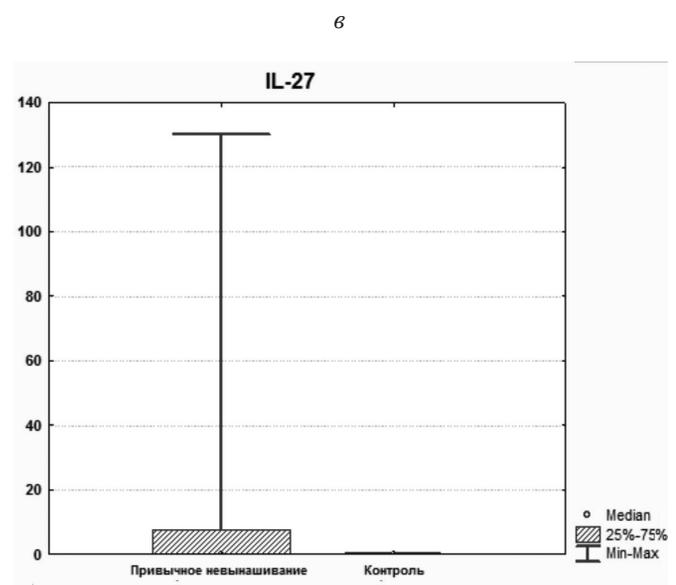
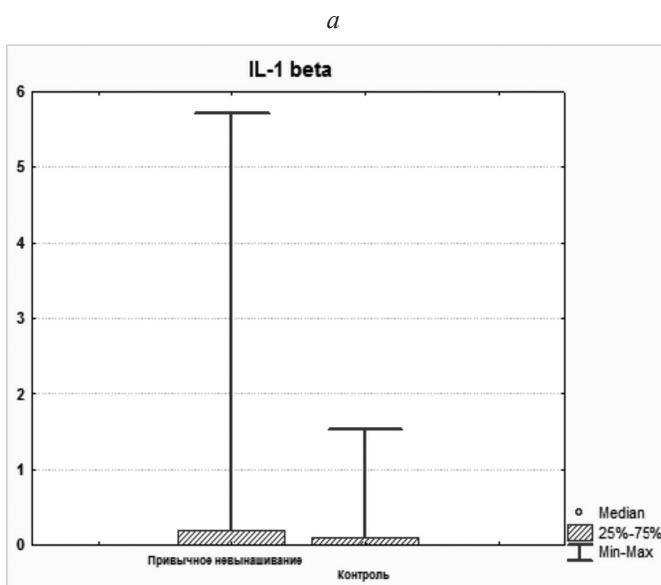
самопроизвольный выкидыш в ходу, беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий, анэмбриония или другие достоверные признаки нежизнеспособной маточной беременности, многоплодная беременность, аномалии развития половой системы пациентки, соматические заболевания в стадии декомпенсации, структурные перестройки кариотипов супругов, установленные на предгравидарном этапе, тромбофилия, женщины с активной инфекцией и проявлением выраженных аллергических реакций на момент обследования. Материалом исследования являлась венозная периферическая кровь. Сывороточный уровень комплекса цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF определялся на мультиплексном флуоресцентном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США). Полученные результаты обрабатывались традиционными методами статистического анализа в пакете прикладных лицензионных программ «Microsoft Office 2010» и «Statistica 13.0». Различия между группами определены при помощи критериев t Стьюдента и Манна-Уитни, между относительными показателями по критерию Хи-квадрат. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. С учетом нормальности распределения данные оценивались или в виде медианы с указанием 25-го и 75-го перцентилей (Me (Q25%–Q75%)), или как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты. Статистический анализ показал, что количество беременностей в анамнезе достоверно выше в группе с привычным невынашиванием по сравнению с группой контроля: $3,91 \pm 0,32$ и $2,0 \pm 0,25$ ($p < 0,05$). Количество выкидышей в анамнезе в основной группе также достоверно выше по сравнению с беременными группы контроля, и составляет $2,3 \pm 0,2$ и $0,08 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,001$). Достоверно чаще выявлено количество неразвивающихся беременностей в анамнезе в основной группе $1,29 \pm 0,2$, тогда как в контрольной группе данные осложнения не встречались ($p < 0,001$). Женщины основной группы достоверно чаще указывали на бактериальную и вирусную инфекцию в анамнезе ($p < 0,004$), по поводу которой проводилось этиологическое и противовоспалительное лечение. Также в основной группе

женщин достоверно чаще выявлялся хронический эндометрит ($p < 0,02$). Среди пациенток с привычным невынашиванием достоверно чаще отмечались внутриматочные вмешательства – выскабливание полости матки ($p < 0,001$). При обследовании женщин основной группы достоверно чаще выявлялся риск тромбофилии – в 67% случаев, в отличие от женщин контрольной группы, где данная патология не встречалась ($p < 0,001$).

При оценке сывороточного уровня цитокинов было выявлено, что достаточно высокие значения концентрации IL-27 (15–130 пкг/мл) отмечались в 25%

случаев в группе с привычным невынашиванием беременности ($p < 0,002$), в то время как в контрольной группе данный цитокин не определялся. Наиболее значимые различия отмечались в частоте выявления IL-1 β , IL-22 и IL-23, уровень которых достоверно повышался в группе с привычным невынашиванием по сравнению с группой здоровых беременных ($p = 0,044$, $p = 0,018$ и $p = 0,002$, соответственно). Содержание IL-21 в сыворотке крови в группе женщин с привычным невынашиванием в 2,3 раза был выше, чем в контрольной группе (32% и 14%, соответственно), однако достоверные различия по данному показателю



Сывороточный уровень цитокинов в сравниваемых группах. *a* – сывороточный уровень IL-1beta в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p = 0,044$); *б* – сывороточный уровень IL-27 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p = 0,002$); *в* – сывороточный уровень IL-23 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p < 0,002$); *г* – сывороточный уровень IL-10 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p < 0,05$).

в группах отсутствовали ($p>0,05$). В основной группе в 18% случаев в незначительных концентрациях (1–14 пкг/мл) выявлялся TNF α ($p>0,05$), тогда как в контрольной группе он не регистрировался. Также, в группе с привычным невынашиванием в сыворотке крови уровень IL-10 достоверно превышал показатели в контрольной группе ($p<0,05$) (см. рисунок).

В основной группе имела тенденция к повышению уровня IL-13 ($p>0,05$). При оценке сыровоточного содержания цитокинов было выявлено, что уровень IL-5, IL-6, IL-17A и GM-CSF был ниже детектируемых значений у женщин с неосложненным течением беременности и, лишь в единичных случаях, регистрировался у женщин основной группы ($p>0,05$ во всех случаях). Достоверных различий в сыровоточном содержании IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 и IFN γ в сравниваемых группах не отмечалось ($p>0,05$).

Обсуждение. Установлено, что для женщин с привычным невынашиванием в отличие от пациенток с неосложненным течением беременности наиболее характерно наличие в анамнезе внутриматочных вмешательств, хронического эндометрита, бактериальной и вирусной инфекции генитального тракта, риска тромбофилии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при привычном невынашивании беременности на системном уровне невозможно четко определить доминирующее влияние Th1 или Th2 клеток. Высокий сыровоточный уровень IL-1 β , наряду с тенденцией к повышению содержания TNF α при привычном невынашивании беременности создают условия для дифференцировки клеток макрофагального ряда в сторону M1 подтипа и выработки ими провоспалительных цитокинов, в том числе IL-23. Выявленное нами повышение сыровоточного уровня IL-21 позволяет предположить участие В-лимфоцитов в данном процессе при привычном невынашивании беременности. IL-21, активируя фолликулярные Tfh, поддерживает дифференцировку В-клеток в плазмобласты и в долгоживущие В-клетки памяти. IL-27 играет двойственную роль. С одной стороны, высокие концентрации IL-27 активируют цитотоксические Т-лимфоциты и натуральные киллеры, что способствует развитию воспалительной реакции. С другой стороны, IL-27 подавляет продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами, и индуцирует продукцию IL-10 инвариантными регуляторными Т-лимфоцитами. IL-10 создает условия для дифференцировки клеток макрофагального ряда в сторону M2 подтипа, что включает протективные механизмы.

Заключение. Одновременное повышение сыровоточного уровня про- и противовоспалительных цитокинов можно объяснить как усилением иммунного ответа, так и запуском механизмов фетопротекции. Неадекватная цитокиновая регуляция может являться предпосылкой для возникновения условий развития угрозы прерывания настоящей беременности у женщин с привычным невынашиванием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao X., Jiang Y., Wang L., Li Z., Li Q., Feng X. Advances in understanding the immune imbalance between T-lymphocyte subsets and NK cells in recurrent spontaneous abortion. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2018; 78(7): 677–83.
2. modulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20245.
3. Zotos D., Coquet J. M., Zhang Y., Light A., D'Costa K., Kallies A. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 2010; 207(2): 365–78.
4. Caprioli F., Sarra M., Caruso R., Stolfi C., Fina D., Sica G. et al. Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 2008; 180(3): 1800–7.
5. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(1): 17–21.
6. Батрак Н.В., Малышкина А.И., Крошкина Н.В. Иммунологические аспекты привычного невынашивания беременности. *Акушерство и гинекология.* 2014; 12: 10–4.
7. Савельева Г.М., Сухих Г.Т., Серов В.Н., Радзинский В.Е., ред. Акушерство. Национальное руководство. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
8. Копобаева И. Л. Привычное невынашивание беременности. *Journal Medicine.* 2015; 8 (158): 57–62.
9. Сарибегова В.А., Тетруашвили Н.К., Кречетова Л.В., Агаджанова А.А., Вторушина В.В. Течение и исходы беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем при использовании иммуноцитотерапии. *Акушерство и гинекология.* 2017; 8: 68–73.
10. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012; 98 (5): 1103–11.
11. Левкович М.А., Нефедова Д.Д., Цатурян Л.Д., Бердичевская Е.М. Иммунологические аспекты проблемы невынашивания беременности. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 3: 186.
12. Малышев И.Ю. Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2015; 59(2): 99–111.
13. Fang-Yu Tsao, Ming-Yih Wu, Yih-Leong Chang, Chen-Tu Wu, Hong-Nerng Ho. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2018; 117: 204–11.
14. Савельева Г.М., Аксененко В.А., Андреева М.Д. и др. Терапия привычного выкидыша микронизированным прогестероном (результаты многоцентрового исследования ТРИСТАН-1). *Акушерство и гинекология.* 2017; 11: 44–55.

REFERENCES

1. Zhao X., Jiang Y., Wang L., Li Z., Li Q., Feng X. Advances in understanding the immune imbalance between T-lymphocyte subsets and NK cells in recurrent spontaneous abortion. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2018; 78(7): 677–83.
2. Southcombe J., Tannetta D., Redman C., Sargent I. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20245.
3. Zotos D., Coquet J. M., Zhang Y., Light A., D'Costa K., Kallies A. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 2010; 207(2): 365–78.
4. Caprioli F., Sarra M., Caruso R., Stolfi C., Fina D., Sica G. et al.

- Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 2008; 180(3): 1800–7.
5. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(1): 17-21.
 6. Batrak N.V., Malysheva A.I., Kroshkina N.V. Immunological aspects of habitual miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2014; 12: 10-4. (in Russian)
 7. Savel'eva G.M., Suhih G.T., Serov V.N., Radzinskiy V.E., eds. Obstetrics. [Natsional'noe rukovodstvo]. 2nd ed. Moscow:GEOTAR-Media; 2015: 189-98. (in Russian)
 8. Kopobaeva I. L. Habitual miscarriage. *Journal Medicine.* 2015; 8 (158): 57–62. (in Russian)
 9. Saribegova V.A., Tetrushvili N.K., Krechetova L.V., Agadzhanova A.A., Vtorushina V.V. The course and outcomes of pregnancy in women with the usual idiopathic miscarriage when using immunocytotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2017; 8: 68-73. (in Russian)
 10. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012; 98 (5): 1103-11.
 11. Levkovich M.A., Nefedova D.D., Caturyan L.D., Berdichevskaya E.M. Immunological aspects of the problem of miscarriage. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; 3: 186. (in Russian)
 12. Malyshev I.Yu. Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2015; 59 (3): 99-111. (in Russian)
 13. Fang-Yu Tsao, Ming-Yih Wu, Yih-Leong Chang, Chen-Tu Wu, Hong-Nerng Ho. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2018; 117: 204-11.
 14. Savel'eva G.M., Aksenenko V.A., Andreeva M.D. et al. Therapy of habitual miscarriage with micronized progesterone (results of a multicenter study TRISTAN-1). *Akusherstvo i ginekologiya.* 2017; 11: 44-55. (in Russian)

Поступила 01.03.20

Принята к печати 07.03.20