

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Борзова Н.Ю., Раджабова Н.Р., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Малышкина А.И.

## НОВЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН С УГРОЖАЮЩИМИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

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

На основании исследования содержания и функциональной активности CD8<sup>+</sup> T-клеток памяти в субпопуляции цитотоксических T-лимфоцитов определить новый критерий прогнозирования исхода беременности у женщин с угрожающими преждевременными родами. Обследованы 56 женщин с угрожающими преждевременными родами (УПР) в сроке 22-34 нед беременности, которые вошли в основную группу. В зависимости от исхода беременности были выделены 2 подгруппы пациенток: в I подгруппу вошли 22 женщины, у которых беременность завершилась преждевременными родами; во 2-ю – 34 женщины со своевременными родами. Контрольную группу составили 56 женщин без признаков угрозы прерывания беременности на момент обследования и родившие своевременно. Методом проточной цитофлуориметрии в периферической венозной крови в субпопуляции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов определяли содержание Tcm, Tem и Temra клеток. Содержание CD8<sup>+</sup>клеток, продуцирующих GranzymeB, оценивали в субпопуляции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>GrB<sup>+</sup>), а также в пуле Tcm, Tem, Temra клеток. Статистический анализ осуществлялся в программах «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3». Для пациенток с угрозой преждевременных родов было характерно достоверное повышение относительного содержания CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов в периферической крови по сравнению с группой контроля ( $p=0,001$ ). При сравнении данного показателя в подгруппах женщин с угрозой преждевременных родов установлено, что преждевременные роды ассоциировались с достоверно более высокими показателями относительного содержания CD8<sup>+</sup> лимфоцитов ( $p=0,03$ ) по сравнению с показателями подгруппы женщин, родивших в срок. При проведении оценки полученных результатов установлено, что в группе пациенток с угрожающими преждевременными родами, чья беременность завершилась преждевременными родами, процентное содержание CD8<sup>+</sup> Temra GranzymeB-продуцирующих клеток было достоверно ниже, чем в группе женщин родивших своевременно ( $p=0,003$ ). Содержание Tcm, Tem клеток памяти, продуцирующих GranzymeB, в подгруппах женщин с исходом беременности своевременные и преждевременные роды не имело достоверных различий по сравнению с группой контроля. Таким образом, прогнозирование преждевременных родов возможно при значении GranzymeB-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Temra равном 8,2% и менее (чувствительность – 87,9%, специфичность – 85%, точность – 87,9%). Выявление нового критерия позволит своевременно прогнозировать преждевременные роды и способствовать выбору оптимальной тактики ведения беременности, обоснованному проведению профилактики респираторного дистресс-синдрома плода и перевода женщины в акушерский стационар, предназначенный для оказания высокотехнологической помощи недоношенным новорожденным.

**Ключевые слова:** преждевременные роды; функциональная активность T-лимфоцитов; адаптивный иммунитет; цитотоксичность.

**Для цитирования:** Борзова Н.Ю., Раджабова Н.Р., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Малышкина А.И. Новый прогностический критерий исхода беременности у пациенток с угрожающими преждевременными родами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 97-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-97-100>

**Для корреспонденции:** Раджабова Наиля Рустамовна, аспирант каф. акушерства и гинекологии, неонатологии, анестезиологии и реаниматологии; e-mail: [nailaradjabova@yandex.ru](mailto:nailaradjabova@yandex.ru)

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.08.2021

Принята к печати 25.12.2021

Опубликовано 23.02.2022

*Borzova N. Yu., Radjabova N. R., Sotnikova N. Yu., Kudryashova A. V., Malysheva A. I.*

### NEW PROGNOSTIC CRITERIA FOR PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH THREATENED PREMATURE LABOR

Ivanovo Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov of the Russian Ministry of health, Ivanovo, Russia

To identify new criteria for predicting the outcome of pregnancy in women with threatened preterm labor based on the establishment of the characteristics of differentiation and functional activity of memory T-cells in the population of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. The study involved 56 women with threatened preterm labor at 22-34 weeks of pregnancy. Depending on the outcome of pregnancy, patients were divided into 3 groups: Group I included 22 women by premature labor; group II – 34 women whose pregnancy ended by deliver at term. By tricolor flow cytofluorometry method the content of peripheral Tn, Tcm, Tem and Temra cells in CD8<sup>+</sup> population was studied. Statistical analysis was carried out using programs «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3».

Patients with the threat of preterm birth were characterized by a significant increase in the relative content of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in the peripheral blood compared to the control group ( $p=0.001$ ). When comparing this indicator in the subgroups of women with the threat of preterm birth, it was found that preterm birth was associated with significantly higher relative CD8<sup>+</sup> lymphocyte counts ( $p=0.03$ ) compared to the indicators of the subgroup of women who gave birth on time. When evaluating the results obtained, it was found that the percentage of CD8<sup>+</sup> Temra GranzymeB-producing cells in the group of patients with threatened preterm birth, whose pregnancy ended in preterm birth, was significantly lower than in the group of women who gave birth on time ( $p=0.003$ ). The content of Tcm, Tem memory cells producing GranzymeB in the subgroups of women with pregnancy outcomes

*of timely and preterm birth did not have significant differences compared to the control group. Thus, the prediction of preterm birth is possible with a value of GranzymeB-producing CD8 + Tem equal to 8.2% or less (sensitivity-87.9%, specificity-85%, accuracy-87.9%).*

*Thus, the identification of a new criterion will make it possible to predict preterm birth in a timely manner and promote the choice of optimal pregnancy management tactics, reasonable prevention of fetal respiratory distress syndrome and transfer of a woman to an obstetric hospital designed to provide high-tech care to premature newborns.*

**Key words:** *preterm labor; differentiation of T cells; adaptive immunity; cytotoxicity.*

**For citation:** Borzova N.Yu., Radjabova N.R., Sotnikova N.Yu., Kudryashova A.V., Malyshkina A.I. New prognostic criterion for the outcome of pregnancy in patients with threatening preterm birth. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 97-100 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-97-100>

**For correspondence:** *Rajabova Naila Rustamovna*, post-graduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Resuscitation; e-mail: [nailaradjabova@yandex.ru](mailto:nailaradjabova@yandex.ru)

**Information about authors:**

Borzova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-2247-3963>;  
Radjabova N.R., <https://orcid.org/0000-0002-0726-1655>;  
Sotnikova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>;  
Kudryashova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-8501-1029>;  
Malyshkina A.I., <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 27.08.2021  
Accepted 25.12.2021  
Published 23.02.2022

**Введение.** Преждевременные роды (ПР) — одна из значимых проблем в охране здоровья матери и ребенка, в настоящее время не имеющая тенденции к снижению [1]. По данным ВОЗ, ежегодно 15 млн детей рождаются преждевременно.

В течение последних лет были достигнуты значительные успехи в выхаживании недоношенных новорожденных, однако, преждевременные роды до сих пор обуславливают преобладающую часть всей перинатальной смертности: являются причиной неонатальной смертности в 70%, младенческой смертности в 36% и отдаленных неврологических последствий у детей в 25-50% случаев [2]. Преждевременные роды являются «большим акушерским синдромом», характеризующимся множеством этиопатогенетических факторов. По данным литературы, важную роль в патогенезе преждевременных родов играют хронические воспалительные процессы [3]. Наряду с этим, причиной угрожающих преждевременных родов может быть и асептическое воспаление, связанное с неадекватной активацией Т-клеток на антигены плода. [4]. Эти данные позволяют предположить, что при преждевременных родах происходит избыточная стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Однако характер их функциональной активности при преждевременных родах недостаточно изучен.

Цель исследования: на основании исследования содержания и функциональной активности CD8+ Т-клеток памяти в субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) определить новый критерий прогнозирования исхода беременности у женщин с угрожающими преждевременными родами.

**Материал и методы.** На базе акушерской клиники ФГБОУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ были отобраны и обследованы 56 женщин с угрожающими преждевременными родами (УПР) на момент исследования (О47.0 по МКБ-10) в сроках 22-34 недель беременности, которую вошли в основную группу. Локальный этический комитет одобрил проведение данного исследования.

На участие в исследовании от каждой женщины было получено письменное информированное согласие. Путем ретроспективного анализа в зависимости от исхода беременности было выделено 2 подгруппы пациенток: в 1-ю подгруппу вошли 22 женщины, у которых беременность завершилась преждевременными родами (О60.0 по МКБ-10); во 2-ю подгруппу – 34 женщины со своевременными родами (О80.0 по МКБ-10). Контрольную группу составили 59 пациенток без признаков угрожающих преждевременных родов на момент обследования и родившие своевременно. Материалом для исследования служила венозная кровь из кубитальной вены. В субпопуляции ЦТЛ определяли содержание центральных клеток памяти – Tcm (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), претерминально-дифференцированных – Tem (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированных – Temra (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) клеток на проточном цитофлуориметре FACSCantoII в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США) методом проточной цитофлуориметрии. В работе использовали моноклональные антитела производства eBioscience (США). Исследовали содержание клеток, продуцирующих GranzymeB, в общем пуле CD8+ лимфоцитов (CD8+GrB+), а так же в пулах CD8+ Tcm (CD45RA-CD62L+GrB+), Tem (CD45RA-CD62L-GrB+), Temra (CD45RA+CD62L-GrB+).

Статистический анализ полученных результатов проводился после проверки рядов на нормальность распределения – по критериям Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка, по общепринятым методам вариационной статистики. 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 программам «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3».

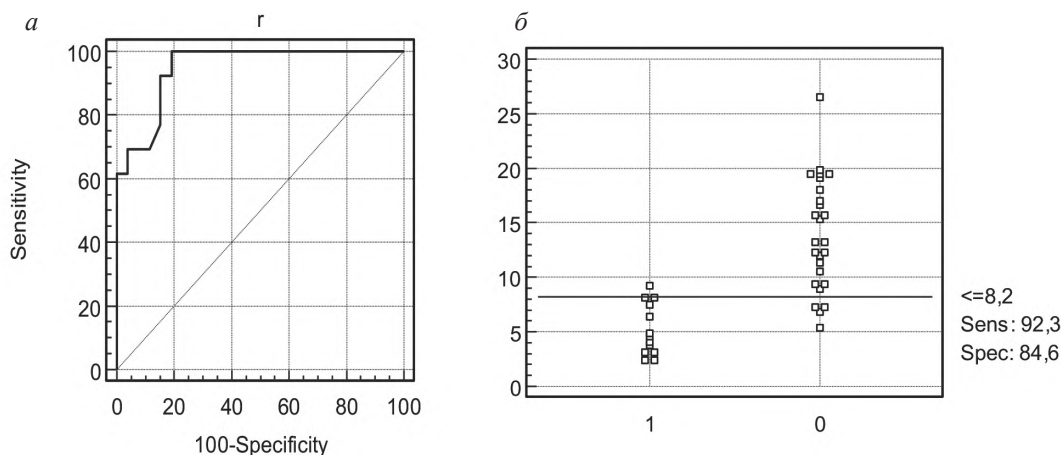
**Результаты.** Проведенный анализ полученных результатов показал, что для пациенток с угрозой преждевременных родов было характерно достоверное повышение относительного содержания CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в периферической венозной крови по сравнению с группой контроля (31,59±0,96 и 26,3±0,55;  $p=0,001$ ). При сравнении данного показателя в подгруппах женщин с УПР установлено, что преждевременные роды ассоциировались с достоверно более высокими показателями относительного содержания CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ( $p=0,03$ ) по сравнению с показателями подгруппы женщин, родивших в срок. Сравнительный анализ процентного содержания Tcm, Tem, Temra клеток, продуцирующих Granzyme B, в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов представлен в таблице. Установлено, что у женщин с исходом беременности преждевременными родами отмечалось снижение содержания GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток, по сравнению с группой женщин родивших своевременно, а так же по сравнению с группой контроля ( $p=0,003$  и  $p=0,006$ , соответственно). Статистически значимых различий в содержании CD8<sup>+</sup> Tcm и CD8<sup>+</sup> Tem клеток, продуцирующих Granzyme B между показателями 1 и 2 подгруппы выявлено не было ( $p>0,05$  во всех случаях). Сравнительный анализ относительного содержания CD8<sup>+</sup> Tcm, CD8<sup>+</sup> Tem и CD8<sup>+</sup> Temra клеток, продуцирующих Granzyme B, в подгруппе женщин с исходом беременности своевременными родами и

контролем, показал, что достоверных различий в группах нет ( $p>0,05$  во всех случаях).

В результате исследования были получены данные, позволившие разработать прогностический критерий преждевременных родов у женщин с угрозой прерывания беременности в сроках 22-34 недель на момент исследования. С этой целью был проведен ROC-анализ в сравниваемых группах, который позволил выявить пограничные значения исследуемого критерия, классифицировать истинно положительные и истинно отрицательные результаты, определить чувствительность и специфичность прогностической модели. Количественную интерпретацию ROC-анализа даёт показатель AUC (area under ROC curve) – площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных значений.

По нашим данным, при относительном содержании GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, равном 8,2% или менее, прогнозируют преждевременные роды. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,956 (см. рисунок).

По экспертной шкале значения показателей AUC в интервале 0,9–1,0 свидетельствуют об «отличном» качестве критерия, что определило его высокий уровень чувствительности 92%, специфичности 85% и точности 87,9% [6].



ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания GranzymeB-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Temra в периферической венозной крови у женщин с исходом беременности своевременные роды (0) и преждевременные роды (1). *a* – показатель относительного содержания GranzymeB-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Temra; *b* – относительный показатель GranzymeB-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Temra в периферической венозной крови у женщин контрольной группы (0) и преждевременными родами (1).

**Сравнительный анализ процентного содержания GranzymeB-продуцирующих Tcm, Tem, Temra клеток в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, %**

Показатели	Основная группа(УПР), n=56		Контроль, n = 59
	1 подгруппа (преждевременные роды), n = 22	2 подгруппа (своевременные роды), n = 34	
CD45RA-CD62L+GrB+ (Tcm)	3,83±0,91	2,77±0,56	2,39±0,33
CD45RA-CD62L-GrB+ (Tem)	7,69±2,3	7,54±1,0	10,1±1,1
CD45RA+CD62L-GrB+ (Temra)	6,75±0,8 $p_1=0,006$ $p_2=0,003$	11,6±1,1	11,91±1,7

Примечание.  $p_1$  – уровень статистической значимости по сравнению с контролем;  $p_2$  – уровень статистической значимости между 1 и 2 подгруппами.

**Обсуждение.** Можно предположить, что отмеченная нами избыточная стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов является одним из патогенетических механизмов угрожающих преждевременных родов. Однако, характер изменений в функциональном состоянии цитотоксических Т-лимфоцитов имеет значительные различия и зависит от степени выраженности патологического процесса. Беременность женщин, имевших достоверно более низкие показатели относительного содержания GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток (GrB+CD62L-CD45RA+) в популяции CD8+ лимфоцитов при поступлении в стационар, несмотря на проводимую сохраняющую терапию, завершилась преждевременно. Традиционно считается, что CD8+Т-лимфоциты являются субпопуляцией Т-лимфоцитов, обладающей высокой цитотоксической активностью, что имеет чрезвычайное значение в условиях инвазии полуаллогенных плодовых клеток в эндометрий при беременности. Ранее было показано, что у женщин с привычным выкидышем и угрозой невынашивания на момент обследования в 5-10 недель в периферической крови повышен уровень GranzymeB-продуцирующих клеток в популяции терминально-дифференцированных CD8+ лимфоцитов, независимо от последующего исхода беременности (самопроизвольный выкидыш, преждевременные и своевременные роды) [5]. Выявленное нами снижение содержания эффекторных GranzymeB-продуцирующих клеток CD8+ лимфоцитов в периферической крови при угрожающих преждевременных родах может быть обусловлено их миграцией в зону плацентации [6]. В работе М. Arenas-Hernandez и соавт. [7] отмечалось повышение уровня терминально-дифференцированных GranzymeB-продуцирующих CD8+ клеток на границе «мать-плод» (в базальной децидуальной оболочке) при спонтанных преждевременных родах. Одной из причин данного явления может быть субклинический хориоамнионит, который является важным фактором развития преждевременных родов и характеризуется инфильтрацией материнских CD8+ Т-клеток в хориоамниотические мембраны [6,7]. Эти цитотоксические Т-клетки могут индуцировать апоптоз трофобласта и повреждать плодовые структуры, что может вести к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов, которые не только усиливают родовую активность, но и ведут к активации клеток врожденного иммунитета, принимающих непосредственное участие в развязывании родовой деятельности. В настоящее время считается, что хронические воспалительные поражения плаценты представляют собой материнское антифетальное отторжение, и этот процесс может быть связан с развитием новой формы синдрома системного воспалительного ответа плода, характеризующегося повышением уровня хемокина для Т-клеток плазмы плода (CXCL10) [8, 9].

**Заключение.** Таким образом, выявление нового критерия позволит своевременно прогнозировать преждевременные роды и способствовать выбору оптимальной тактики ведения беременности, обоснованному проведению профилактики респираторного дистресс-синдрома плода и перевода женщины в акушерский стационар, предназначенный для оказания высокотехнологической помощи недоношенным новорожденным.

ЛИТЕРАТУРА ( пп. 2, 4, 7–9 см. REFERENCES )

1. Информационный бюллетень ВОЗ «Новорожденные: снижение смертности» 19.11.2019 г.
3. Ходжаева З.С., Шмаков Р.Г., Адамян Л.В., Артымук Н.В., Башмакова Н.В., Беженарь В.Ф. и др. Преждевременные роды. Клинические рекомендации. М.; 2020.
5. 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: 267.
6. Борзова Н.Ю., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Раджабова Н.Р. Способ прогнозирования исхода беременности при угрожающих преждевременных родах. Патент РФ № 2741500; 2021.

REFERENCES

1. WHO Newsletter “Newborns: reducing mortality”. 19 September 2019.
2. Davey M.A., Watson L., Rayner J.A., Rowlands S. Risk scoring systems for predicting preterm birth with the aim of reducing associated adverse outcomes. *Cochrane database Syst. Rev.* 2011; 9:11.
3. Khodzhayeva Z.S., Shmakov R.G., Adamyan L.V. et al., eds. Clinical recommendations. Premature birth. Moscow; 2020. (in Russian)
4. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13:23–33.
5. Ivanenkova N. I., Borzova, N. Yu. Sotnikova N. Yu. Differentiation of peripheral t-helper cells and cytotoxic T-lymphocytes in women with habitual miscarriage, depending on the outcome of pregnancy. *Meditinskaya immunologiya* . 2015; 17:267. (in Russian)
6. Borzova N. Yu., Malysheva A. I., Sotnikova N. Yu., Kudryashova A.V., Radzhabova N. R. A method for predicting the outcome of pregnancy in threatened premature birth. Patent RF No. 2741500; 2021.
7. Arenas-Hernandez M., Romero R., Xu Y, Panaitescu B, Garcia-Flores V, Miller D. et al. Effector and activated T cells induce preterm labor and birth that is prevented by treatment with progesterone. *The Journal of Immunology* 2019; 202.9: 2585-2608.
8. Labarrere CA, Hardin JW, Haas DM, Kassab GS. Chronic villitis of unknown etiology and massive chronic intervillitis have similar immune cell composition. *Placenta*. 2015; 36(6): 681-6.
9. Romero R., Chaemsaitong P., Chaiyasit N., Docheva N., Dong Z., Kim C. J. et al. CXCL10 and IL-6: Markers of two different forms of intra-amniotic inflammation in preterm labor. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 2017; 78(1):e12685.