

## Субпопуляции Т-лимфоцитов эндометрия в патогенезе невынашивания беременности ранних сроков

Д.м.н. О.П. ЛЕБЕДЕВА\*, И.О. ЖУКОВА, к.м.н. О.Н. ИВАШОВА, д.м.н. С.П. ПАХОМОВ,  
д.м.н. М.И. ЧУРНОСОВ

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, д. 85, Белгород, Россия, 308015

**Цель исследования** — установить роль Th1, Th17 и Treg-лимфоцитов в патогенезе неразвивающейся беременности и самопроизвольных выкидышей ранних сроков.

**Материал и методы.** Обследованы 22 пациентки с неразвивающейся беременностью, 22 пациентки с самопроизвольными выкидышами и 57 пациенток контрольной группы (поступивших для проведения медицинского аборта) на сроке беременности 6—10 нед. Ткань эндометрия получали путем выскабливания полости матки. Пациентки с тяжелыми экстрагенитальными заболеваниями, эндокринными нарушениями и антифосфолипидным синдромом были исключены из исследования. Экспрессию мРНК CD4, CD25, а также Tbet и STAT4 (маркеров Th1-лимфоцитов), FoxP3 (маркера Treg-лимфоцитов), STAT3 (маркера Th17-лимфоцитов) оценивали методом обратной транскриптазной количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР). Статистический анализ проводили с помощью критерия Манна—Уитни с использованием программы Statistica 13,2 («StatSoft», США).

**Результаты.** Экспрессия мРНК CD25 была выше в 5,6 раза ( $p<0,01$ ), а STAT4 (маркера Th1) — в 88,5 раза ( $p<0,05$ ) у пациенток с неразвивающейся беременностью по сравнению с контрольной группой (прогрессирующая беременность). У пациенток с неразвивающейся беременностью не обнаружено достоверных различий с группой контроля в экспрессии мРНК Tbet, FoxP3 и STAT3 в эндометрии. У пациенток с самопроизвольными выкидышами в эндометрии выявлено увеличение экспрессии мРНК Tbet (маркера Th1) в 2,8 раза ( $p<0,05$ ), а FoxP3 (маркера Treg) — в 2,5 раза ( $p<0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Экспрессия мРНК CD4 и STAT3 (маркера Th17) у пациенток с самопроизвольными выкидышами не имела достоверных различий с контролем.

**Заключение.** Полученные результаты подтверждают важную роль сдвига баланса Th1/Th2 в сторону Th1 в патогенезе и неразвивающейся беременности, и самопроизвольных выкидышей ранних сроков. Повышение содержания в эндометрии Treg у пациенток с самопроизвольными выкидышами может быть связано с увеличением уровня простагландинов.

**Ключевые слова:** невынашивание, неразвивающаяся беременность, самопроизвольный выкидыш, Treg, Th17, Th1.

## Subpopulations of T-lymphocytes of endometrium in pathogenesis of early miscarriages

O.P. LEBEDEVA, I.O. ZHUKOVA, O.N. IVASHOVA, S.P. PAKHOMOV, M.I. CHURNOSOV

Belgorod National Research University, Pobedy Str., 85, Belgorod, Russia, 308015

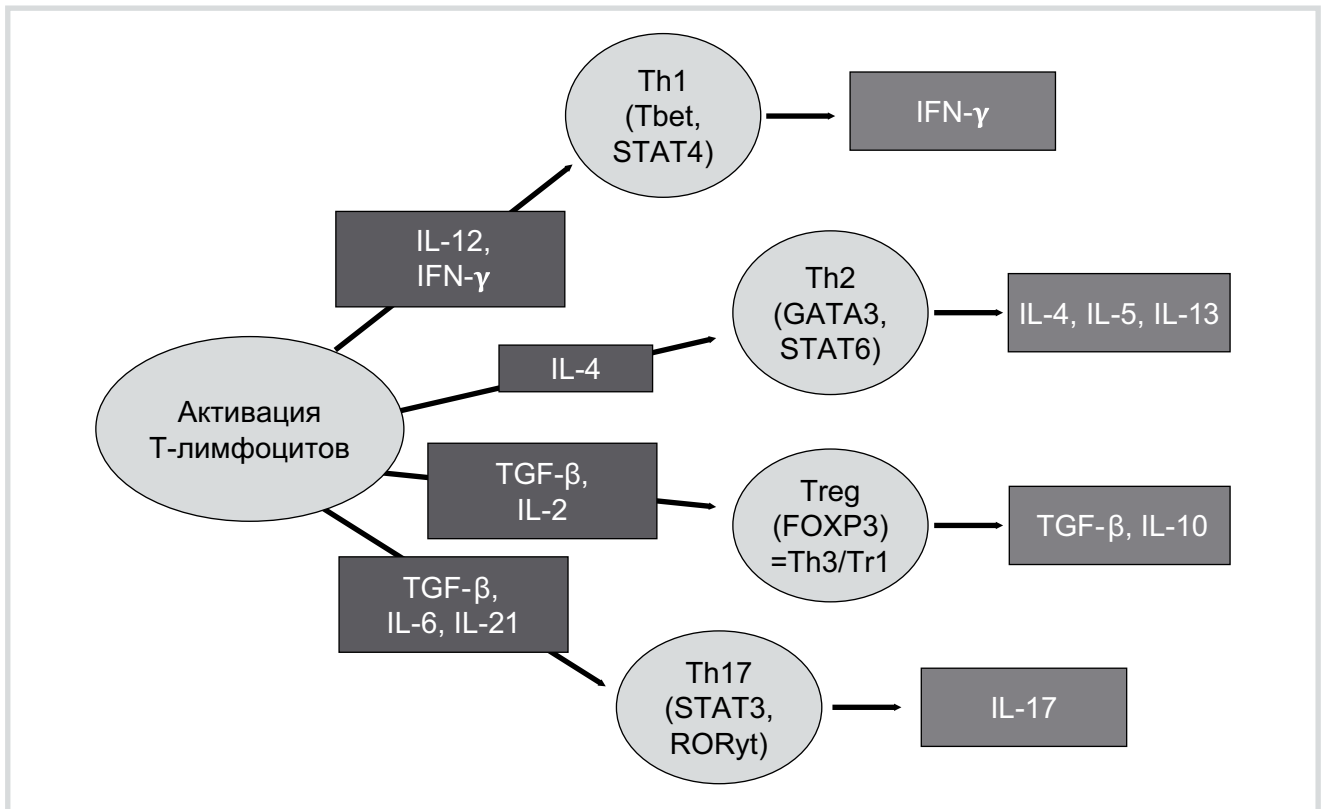
**Objective** — to estimate the role of Th1, Th17 and Treg of endometrium in pathogenesis of missed and spontaneous abortions.

**Material and methods.** Endometrial tissue of 22 patients with missed abortions, 22 patients with spontaneous abortions and 57 patients of control group (patients with progressive pregnancy, admitted for medical abortions) in 6—10 weeks of gestation was taken by uterine abrasion. Patients with severe extragenital diseases, endocrine disorders and aniphospholipid syndrome were excluded from research. Expression of mRNA of CD4, CD25, as well as Tbet and STAT4 (markers of Th1 lymphocytes), FoxP3 (marker of Treg lymphocytes), STAT3 (marker of Th17 lymphocytes) were estimated by quantitative PCR. Statistical analysis was performed by Mann—Whitney test using Statistica 13,2 («StatSoft», USA).

**Results.** Expression of mRNA of CD25 and STAT4 (marker of Th1) was significantly higher in patients with missed abortion (5,6-fold ( $p<0,01$ ) and 88,5-fold ( $p<0,05$ ) accordingly) compared with control group (progressive pregnancy of early stage). Patients with missed abortions had no differences of mRNA expression of Tbet, FoxP3 and STAT3 in endometrium compared with control group. Expression of mRNA of Tbet (marker of Th1 lymphocytes) in endometrium in patients with spontaneous miscarriages was 2,8-fold higher, than in control group ( $p<0,05$ ). FoxP3 (marker of Treg) in patients with spontaneous miscarriages was 2,5-fold higher, than in control group ( $p<0,01$ ). Expression of CD4 and STAT3 (marker of Th17 lymphocytes) had no differences in patients with missed and spontaneous abortions and control group.

**Conclusion.** Our data confirm an important role of Th1 shift in pathogenesis of missed and spontaneous abortions. Singnificantly higher levels of Treg markers in endometrium of patients with spontaneous abortions can be a result of prostaglandins production.

**Keywords:** miscarriage, missed abortion, spontaneous abortion, Treg, Th17, Th1.



Субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов (Р.М. Хаитов и соавт., 2011) [4].

Частота невынашивания беременности в мире составляет около 10–15% [1]. Представляет интерес изучение активации Т-лимфоцитов при невынашивании беременности, так как они участвуют в индукции реакции «хозяин против трансплантата», а эмбрион является наполовину генетически чужеродным для организма матери. Известно, что при невынашивании беременности ранних сроков происходит нарушение баланса Th1/Th2-лимфоцитов [2]. В норме доминирующей субпопуляцией Т-лимфоцитов на ранних сроках беременности являются Th2, в то время как количество Th1, обеспечивающих активацию клеточного иммунитета, снижается.

Также в эндометрии присутствуют регуляторные Т-лимфоциты (Treg, Th3), которые поддерживают толерантность к собственным антигенам организма и ингибируют избыточный воспалительный ответ. Th17-лимфоциты (Th17) играют важную роль в удалении патогенов с поверхности слизистых оболочек, но также могут играть ведущую роль в развитии аутоиммунных реакций [3]. Дифференцировка субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов показана на **рисунке** [4].

Однако роль Treg и Th17 в патогенезе невынашивания беременности изучена недостаточно.

Цель исследования — установить роль Th1, Th17 и Treg-лимфоцитов в патогенезе невынашивания беременности и самопроизвольных выкидышей ранних сроков.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 22 пациентки с неразвивающейся беременностью, 22 женщины с самопроизвольными выкидышами ранних сроков и 57 пациенток, поступивших для проведения медицинского аборта (группа контроля). Срок беременности во всех случаях составил 6–10 нед. Из исследования были исключены пациентки с эндокринными нарушениями, тяжелыми экстрагенитальными заболеваниями, антифосфолипидным синдромом, а также отказавшиеся от участия в исследовании.

Для оценки экспрессии мРНК CD4+ Т-лимфоцитов (CD4, CD25), Tbet (маркера Th1-лимфоцитов), FoxP3 (маркера Treg-лимфоцитов), STAT3 (маркера Th17-лимфоцитов) использовали метод обратной транскриптазной количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

Ткань эндометрия получали путем выскабливания полости матки. Полученную децидуальную ткань помещали в консервант RNAlater («Ambion», США). Выделение РНК методом фенол-хлороформной экстракции и обратную транскрипцию выполняли по описанной ранее методике [5].

Дизайн праймеров выполнен в базе данных BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (**табл. 1**). В качестве генов-нормировщиков служили пептидилпролил-изомераза А и β-актин. Для проведения кПЦР ис-

Таблица 1. Праймеры для ПЦР

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'	T, °C
CD4	ATGCTGGCTCTGGAAACCTC	GTGATTTTCGTGCAAGCTCCTG	57
CD25	GTGGTGGGGCAGATGGTTTA	TTGTGACGAGGCAGGAAGTC	55
FoxP3	TGACAGTTTCCCACAAGCCA	CACCATGACTAGGGGCAGTG	56
STAT4	ATAGAGTGGGTGGGAACCTGAC	CGCCATCATCAGTAGGGGAT	63
Tbet	CAGGGACGGCGGATGTTC	RGCCCCCTGTGTGTTTGTGAG	56
STAT3	GAAAACATGGCTGGCAAGGG	TACCTGGGTGAGCTTCA GGA	57
β-Actin	CAGGCACCAGGGCGTGATGG	GATGGAGGGGCCGACTCGT	64
PPIA	CCGCCGAGGAAAACCGTGTACT	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT	64

Таблица 2. Экспрессия мРНК субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов у пациенток с невынашиванием беременности, Me (25%; 75%), отн. ед.

Ген	Пациентки с неразвивающейся беременностью (n=22)	Пациентки с самопроизвольными выкидышами (n=22)	Контрольная группа (n=57)	$P_{1-3}$	$P_{2-3}$	$P_{1-2}$
CD4	0,09 (0,02; 0,74)	0,10 (0,007; 0,41)	0,04 (0,01; 0,20)	0,11	0,69	0,41
CD25	0,14 (0,03; 0,44)	0,06 (0,005; 1,77)	0,026 (0,005; 0,08)	0,003	0,10	0,58
Tbet (Th1)	0,06 (0,006; 0,23)	0,11 (0,008; 0,33)	0,04 (0,002; 0,09)	0,14	0,04	0,52
STAT4 (Th1)	0,85 (0,002; 2,99)	0,40 (0,006; 1,30)	0,01 (0,0001; 0,49)	0,049	0,059	0,84
FOXP3 (Treg)	1,08 (0,32; 3,43)	1,48 (0,74; 2,68)	0,59 (0,21; 1,34)	0,07	0,008	0,54
STAT3 (Th17)	0,06 (0,0003; 0,14)	0,01 (0,0003; 0,10)	0,006 (0,0002; 0,03)	0,12	0,36	0,75

пользовали смесь qPCRmix-HS SYBR («Evrogen», Россия). Амплификацию выполняли на амплификаторе CFX96 («BioRad», США). Для приготовления смеси на одну пробирку вносили 2 мкл кДНК, по 2 мкл прямого и обратного праймера, 5 мкл qPCRmix-HS SYBR, 14 мкл стерильной воды. Амплификацию осуществляли в следующем режиме: предварительная денатурация — 1 цикл 95 °C 5 мин, денатурация — 1 цикл 95 °C 30 с; отжиг при соответствующей каждому праймеру температуре (см. табл. 1) — 30 с; элонгация при 68 °C — 30 с. Количество циклов — 45. Результаты выражали в относительных единицах (отн. ед.) и вычисляли по формуле:

$$R = 2^{-(Cq_{target} - (Cq_{ref1} + Cq_{ref2})/2)},$$

где  $R$  — нормализованная экспрессия изучаемого гена,  $Cq_{target}$  —  $Cq$  изучаемого гена,  $Cq_{ref1}$  и  $Cq_{ref2}$  —  $Cq$  генов-нормировщиков [5].

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена в программе Statistica 13.2 («StatSoft», США). Нормальность распределения признаков оценивали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Так как полученные данные не подчинялись нормальному распределению, результаты представляли как медиану (нижний квартиль; верхний квартиль). Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия мРНК CD4 у пациенток с неразвивающейся беременностью не имела достоверных различий с группой контроля (табл. 2). Однако в этой группе наблюдалось увеличение экспрессии мРНК CD25 (рецептора активированных Т-лимфоцитов) в 5,6 раза, а STAT4 (рецептора Th1-лимфоцитов) в 88,5 раза по сравнению с контрольной группой.

У пациенток с самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК Tbet (маркера Th1) была выше в 2,8 раза, а FoxP3 (маркера Treg) — в 2,5 раза в сравнении с группой контроля.

Экспрессия мРНК STAT3 (маркера Th17) в эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью не имела достоверных различий с группой контроля.

Согласно данным литературы [7], у пациенток с неразвивающейся беременностью было выявлено увеличение экспрессии CD25, который является маркером активированных Т-лимфоцитов, и уровня интерлейкина-12, который важен для дифференцировки Th1-лимфоцитов по сравнению с группой пациенток с угрожающим выкидышем и пациентками с прогрессирующей беременностью [7].

Также показано, что количество Th1 и соотношение Th1/Th2 в эндометрии увеличиваются у па-

циенток с самопроизвольными выкидышами неустановленного генеза по сравнению с пациентками с нормальной прогрессирующей беременностью [8].

В нашем исследовании выявлено увеличение экспрессии мРНК FoxP3, маркера регуляторных Т-лимфоцитов. Наши результаты не подтверждают данные других исследований, в которых показано, что содержание Treg в децидуальной ткани и периферической крови пациенток с привычным невынашиванием неустановленного генеза было достоверно ниже, чем в группе контроля [9, 10]. Однако известно, что дифференцировка, увеличение локального пула и пролиферация Treg происходят под влиянием простагландина E2 [11]. Поэтому увеличение содержания Treg у пациенток с самопроизвольными выкидышами, при которых сокращения матки возникают из-за выработки простагландинов, может быть результатом такого увеличения уровня простагландинов. Данный факт также объясняет, почему в нашем исследовании количество Treg было нормальным в группе пациенток с неразвивающейся беременностью, у которых не наблюдалось сокращений матки и отторжения плодного яйца.

Мы не нашли достоверных различий в экспрессии мРНК STAT3 (маркера Th17) в эндометрии пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами ранних сроков по сравнению с группой контроля, в то время как W. Wang и соавт. [12] показали, что в случае неразвивающейся беременности процент Th17 в периферической крови и эндометрии был выше, чем при прогрессирующей беременности. Авторы также выявили увеличение уровня интерлейкина-17 и интерлейкина-23, вырабатываемых Th17, в сыворотке крови и децидуальной ткани. В другом исследовании [2] не было отмечено изменений количества Th17 в эндометрии при неразвивающейся беременности, если в клинической картине не наблюдалось кровяных выделений из половых путей и структурных изменений шейки матки. Авторы полагают, что увеличение количества Th17 в случае неразвивающейся беременности является последствием отторжения плодного яйца, а не причиной гибели эмбриона.

Роль Th17/Treg в патогенезе неразвивающейся беременности и самопроизвольных выкидышей ран-

них сроков остается противоречивой, а ее дальнейшее изучение позволит выявить иммунные маркеры невынашивания беременности ранних сроков [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациенток с неразвивающейся беременностью в эндометрии было выявлено увеличение экспрессии мРНК CD25+ (маркера активированных CD4+ Т-лимфоцитов) и STAT4 (маркера Th1). У пациенток с самопроизвольными выкидышами наблюдалось увеличение в эндометрии экспрессии мРНК Tbet (маркера Th1) и FoxP3 (маркера Treg).

Это подтверждает, что сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону Th1 играет важную роль в патогенезе неразвивающейся беременности и самопроизвольных выкидышей ранних сроков. Пока неясно, почему в эндометрии пациенток с самопроизвольными выкидышами выявлено увеличение экспрессии регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Мы предполагаем, что это может быть результатом повышения уровня простагландинов, которые известны как индукторы дифференцировки и пролиферации Treg. Это предположение также объясняет, почему в группе пациенток с неразвивающейся беременностью, у которых отсутствовали сокращения матки и отторжение плодного яйца, уровень Treg не отличался от такового в контрольной группе. Экспрессия STAT3 (маркера Th17) у пациенток с невынашиванием беременности не имела достоверных различий с группой контроля.

## Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ МД-2326.2017.7.

## Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — О.Л.

Сбор и обработка материала — И.Ж., О.Н., О.Л.

Статистическая обработка — О.Л., С.П.

Написание текста — О.Л.

Редактирование — О.Л.

Обеспечение работы оборудования лаборатории — М.Ч.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Carp H.J.A. Systematic review of dydrogesterone for treatment of threatened miscarriage. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28:938-990. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.702875>
2. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology.* 2010;63(6):601-610. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>
3. Figueiredo AS, Schumacher A. The T-helper type 17/regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Immunology.* 2016;148(1):13-21. <https://doi.org/10.1111/imm.1259>
4. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. *Иммунология: атлас.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. [Khaitov RM, Yarilin AA, Pinegin BV. *Immunology: an atlas.* Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (In Russ.)].
5. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Ивашова О.Н., Старцева Н.Ю., Чурносков М.И. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета в индукции апоптоза при невынашивании беременности ранних сроков. *Акушерство и гинекология.*

- 2015;2:39-43. [Lebedeva OP, Pakhomov SP, Ivashova ON, Starceva NYu, Churnosov MI. Innate immunity signaling receptors in the induction of apoptosis in early miscarriages. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2015;2:39-43 (In Russ.)].
6. Pfaffl MV. Relative quantification. In book: Real Time PCR. *Int University Line*. 2002;63-82.
  7. Paradisi R, Porcu E, Venturoli S, Maldini-Casadei M, Boni P. Maternal serum levels of pro-inflammatory cytokines in missed and threatened abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2003;50(4):302-308. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00065.x>
  8. Gao Y, Wang PL. Increased CD56 (+) NK-cells and enhanced Th1 responses in human unexplained recurrent spontaneous abortion. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):18103-18109. <https://doi.org/10.4238/2015.December.22.36>
  9. Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. *Journal of reproductive immunology*. 2013;97(1):104-111. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.12.001>
  10. Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lu C, Lin Q. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T-cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*. 2008;89:656-661. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.037>
  11. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*. 2012;188(1):21-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
  12. Wang WJ, Hao CF, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Journal of reproductive immunology*. 2010;84(2):164-170. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.12.003>
  13. Sharma S. Natural killer cells and regulatory T-cells in early pregnancy loss. *The International journal of developmental biology*. 2014;58:219. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140109ss>

Поступила 09.12.17

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Лебедева Ольга Петровна** (Lebedeva Olga Petrovna) — д.м.н., доц., проф. каф. акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, ул. Победы, д. 85, Россия, 308015; тел. +7(4722)268591; ORCID 0000-0002-7188-6780; e-mail: safonova2@yandex.ru

**Жукова Ирина Олеговна** (Zhukova Irina Olegovna) — без степени, без звания, ординатор кафедры акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, ул. Победы, д. 85, Россия, 308015; тел. +7(4722)268591; ORCID 0000-0002-8393-2852; e-mail: ronny413@mail.ru

**Ивашова Олеся Николаевна** (Ivashova Olesya Nikolaevna) — к.м.н., асс. каф. акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, ул. Победы, д. 85, Россия, 308015; тел. +7(4722)268591, ORCID 0000-0003-1480-2234, e-mail: ivashovao2@yandex.ru

**Пахомов Сергей Петрович** (Pakhomov Sergey Petrovich) — д.м.н., проф., зав. каф. акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, ул. Победы, д. 85, Россия, 308015; тел. +7(4722)268557, ORCID 0000-0001-8113-4788; e-mail: pachomw@yandex.ru

**Чурносов Михаил Иванович** (Churnosov Mikhail Ivanovich) — д.м.н., проф., зав. каф. медико-биологических дисциплин ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, ул. Победы, д. 85, Россия, 308015; тел. +7(4722)301403, ORCID 0000-0003-1254-6134; e-mail: churnosov@bsu.edu.ru