

УДК 618.39-021.3: 571.27

DOI: 10.18413/2075-4728-2018-41-2-214-219

**CD4+ и CD8+ Т-ЛИМФОЦИТЫ В ЭНДОМЕТРИИ И ИХ РОЛЬ
В НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ РАННИХ СРОКОВ****CD4+ AND CD8+ T-LYMPHOCYTES IN ENDOMETRIUM AND THEIR ROLE
IN EARLY STAGE MISCARRIAGES****И.О. Жукова, О.П. Лебедева, О.Н. Ивашова, С.П. Пахомов, М.И. Чурносов
I.O. Zhukova, O.P. Lebedeva, O.N. Ivashova, S.P. Pakhomov, M.I. Churnosov**Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

Belgorod National Research University, 85 Pobeda St, Belgorod, 308015, Russia

E-mail: safonova2@yandex.ru

Аннотация

В статье рассматриваются особенности экспрессии мРНК кластеров дифференцировки Т-лимфоцитов CD4, CD8, CD25 в эндометрии пациенток с самопроизвольными выкидышами и неразвивающейся беременностью на сроке 6-10 недель. Обследованы 34 пациентки с неразвивающейся беременностью, 34 пациентки с самопроизвольным выкидышем и 57 пациенток с прогрессирующей беременностью, которым был произведен аборт на тех же сроках беременности (контрольная группа). Материалом являлась ткань эндометрия, полученная при выскабливании полости матки. Определение экспрессии мРНК CD4, CD8 и CD25 в эндометрии проводили методом количественной ПЦР. Не было выявлено достоверных различий экспрессии мРНК CD4 и CD8 у пациенток с неразвивающейся беременностью и группой контроля по сравнению с контрольной группой. Однако в группе женщин с неразвивающейся беременностью было установлено увеличение экспрессии мРНК CD25. Так как CD25 является маркером активированных лимфоцитов, можно предположить, что его увеличение способствует усилению клеточной цитотоксичности и гибели эмбриона.

Abstract

The article is devoted to expression of clusters differentiation of T-lymphocytes in endometrium of patients with spontaneous and missed abortions in 6-10 weeks of gestation. 34 patients with missed abortion, 34 – with miscarriages and 57 patients with progressive pregnancy of the same gestational age, admitted for medical abortion (control group) were studied. Endometrium was obtained during uterine abrasion. Expression of CD4, CD8 and CD25 mRNA was studied by quantitative PCR. Expression was counted as delta-delta cq. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney criteria. No significant differences of CD4 and CD8 expression was detected in patients with missed abortion and spontaneous miscarriages compared with control group. CD25 mRNA expression was significantly higher in patients with missed abortions. As CD25 is a marker of activated lymphocytes, it can be suggested, that this increase can stimulate reactions of cell cytotoxicity and therefore contribute to demise of embryo.

Ключевые слова: невынашивание, самопроизвольный выкидыш, неразвивающаяся беременность, эндометрий, CD4, CD8, CD25, Т-лимфоциты.

Keywords: miscarriages, spontaneous abortion, missed abortion, endometrium, CD4, CD8, CD25, T-lymphocytes.

Введение

Невынашивание беременности ранних сроков представляет собой одну из наиболее сложных проблем акушерства и гинекологии, так как его причины многообразны [Радзин-

ский, Соловьева, 2012]. Следует отметить, что в 80% необъяснимых репродуктивных потерь выявляются иммунологические нарушения.

Среди клеток системы приобретенного иммунитета на течение беременности в наибольшей степени влияют Т-лимфоциты [Racicot et al., 2014]. Принято считать, что ведущая роль отводится Т-хелперам (CD4+) [Lissauer et al., 2014]. Одной из причин невынашивания считают нарушение баланса субпопуляций Th1/Th2 CD4+ Т-лимфоцитов с преобладанием Th1, продуцирующих провоспалительные цитокины (Saito et al., 2010).

Вместе с тем роль цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов в патогенезе невынашивания беременности остается противоречивой. Есть данные о том, что для невынашивания беременности характерно увеличение CD4+ Т-лимфоцитов и снижение числа CD8+ Т-лимфоцитов, а также соотношения CD4/CD8 [Щербаков и др., 2008; Southcombe et al., 2017]. Это может объясняться тем, что на ранних сроках беременности прогестерон индуцирует синтез CD8+-клетками прогестерон-индуцированного блокирующего фактора (PIBF), который угнетает цитолитические клеточные реакции со стороны лимфоцитов матери, тем самым способствуя пролонгированию беременности [Чистякова, 2009]. Однако есть данные, что содержание как CD4+ Т-лимфоцитов, так и CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови у пациенток с привычным невынашиванием может значительно увеличиваться [Carbone et al., 2014].

Представляет интерес также изучение экспрессии CD25, который является маркером активации и CD4+, и СВ8+ Т-лимфоцитов [Naciute et al., 2017]. Известно, что дефицит CD25 приводит к повышенной восприимчивости к вирусным инфекциям [Caudy et al., 2007]. Клетки с фенотипом CD4+CD25+ относят к регуляторным Т-лимфоцитам, которые играют важную роль в прогрессировании беременности [Li et al., 2014].

Следует отметить, что большинство авторов изучали содержание CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у пациенток с невынашиванием в периферической крови, а не в эндометрии [Кречетова и др., 2017; Чугунова и др., 2011; Lissauer et al., 2014]. Поэтому полученные данные о содержании CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови, скорее, характеризуют системный иммунный ответ, а не местную иммунореактивность.

Целью работы было оценить особенности экспрессии мРНК кластеров дифференцировки Т-лимфоцитов CD4, CD8 и CD25 в эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами ранних сроков.

Объекты и методы исследования

Были обследованы 34 женщины с неразвивающейся беременностью (I группа) и 34 – с самопроизвольными выкидышами (II группа) на сроке 6-10 недель. Контрольную (III) группу составили 57 пациенток, которым был произведен медицинский аборт на том же сроке беременности.

Сбор материала производили с помощью выскабливания полости матки. Полученную ткань эндометрия помещали в консервирующий раствор RNAlater (“Ambion”, США). Выделение РНК, обратную транскрипцию и количественную полимеразную цепную реакцию проводили по ранее описанной методике [Лебедева О.П. с соавт., 2015]. Количественную ПЦР проводили согласно рекомендациям MIQE [Bustin et al., 2009].

Подбор праймеров генов осуществлялся с помощью базы данных BLAST. Была изучена экспрессия мРНК CD4, CD8, CD25 (IL-2RA). В качестве генов-нормировщиков были выбраны пептидилпролилизомераза А (PPIA) и β-актин. Температура отжига для амплификации указана в таблице 1.

Полученные результаты выражали в относительных единицах (relative units), вычисляя их по формуле:

$$R = 2 - (Cq \text{ target} - (Cq \text{ ref1} + Cq \text{ ref2})),$$

где R – нормализованная экспрессия мРНК исследованных генов, Cq target – Cq исследованного гена, Cq ref – Cq генов-нормировщиков [Pffafl, 2002]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 13.1 (Statsoft, США). Так как данные не подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни и представляли как медиану (нижний квартиль; верхний квартиль). Корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Таблица 1

Table 1

Праймеры для определения экспрессии мРНК CD4, CD8 и CD25 методом количественной ПЦР
Primers for detection of expression of CD4, CD8 and CD25 mRNA by quantitative PCR

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	T отжига, °C
CD4	ATGCTGGCTCTGGAAACCTC	GTGATTCGTGCAAGCTCCTG	57
CD8	ACGCTGTCAGATCCCCTTTG	GTGACAGAGTGGGTGAAGGG	59
CD25	GTGGTGGGGCAGATGGTTTA	TTGTGACGAGGCAGGAAGTC	55
PPIA	CCGCCGAGGAAAACCGTGTACT	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT	64
β-актин	CAGGCACCAGGGCGTGATGG	GATGGAGGGGCCGACTCGT	64

Результаты и их обсуждение

Было установлено, что у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК CD4 и CD8 в эндометрии достоверно не отличалась от группы контроля (табл. 2).

Это подтверждается данными литературы, согласно которым в децидуальной ткани пациенток с неразвивающейся беременностью концентрация CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов не отличалась от группы контроля [Nakashima et al., 2010].

Однако у пациенток с неразвивающейся беременностью экспрессия мРНК CD25 в эндометрии была в 4.6 раза выше, чем у пациенток с прогрессирующей беременностью ($p < 0.001$).

Таблица 2

Table 2

Экспрессия мРНК CD4, CD8, CD25 в эндометрии у пациенток с невынашиванием беременности и в контрольной группе, Me (25%; 75%)
mRNA expression of CD4, CD8, CD25 in endometrium of patients with miscarriages and in the control group, Me (25%; 75%)

Ген	Пациентки с неразвивающейся беременностью (I группа)	Пациентки с самопроизвольными выкидышами (II группа)	Пациентки с прогрессирующей беременностью (III группа)	P 1-3	P 2-3	P 1-2
CD4	0.09 (0.02; 0.73)	0.10 (0.008; 0.41)	0.04 (0.01; 0.20)	>0.05	>0.05	>0.05
CD8	1.27 (0.58; 2.93)	1.24 (0.42; 3.41)	1.35 (0.49; 2.28)	>0.05	>0.05	>0.05
CD25	0.14 (0.03; 0.44)	0.06 (0.005; 1.77)	0.03 (0.005; 0.08)	<0.01	>0.05	>0.05

У пациенток с самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК CD25 не отличалась от группы контроля ($p < 0.001$). Различия в экспрессии мРНК CD4, CD8 и CD25 между группой пациенток с неразвивающейся беременностью и группой с самопроизвольными выкидышами не были достоверными ($p > 0.05$).

У пациенток с неразвивающейся беременностью уровень мРНК CD25 имел среднюю достоверную корреляционную связь с экспрессией мРНК CD4 ($R=0.66$; $p=0.0005$) и CD8 ($R=0.56$; $p=0.004$). В этой группе также наблюдалась достоверная средняя корреляционная связь между экспрессией CD4 и CD8 ($R=0.66$; $p=0.0006$).

У пациенток с самопроизвольными выкидышами уровень экспрессии мРНК CD25 имел сильную достоверную корреляционную связь с CD4 ($R=0.88$; $p=0.0000001$) и CD8 ($R=0.75$; $p=0.000068$). Также сильная корреляционная связь наблюдалась между экспрессией мРНК CD4 и CD8 ($R=0.69$; $p=0.0004$).

У пациенток с прогрессирующей беременностью (группа контроля) была выявлена достоверная умеренная корреляционная связь только с экспрессией CD4 ($R=0.36$; $p=0.02$). Достоверной корреляционной связи между CD25 и CD8 выявлено не было. Наблюдалась умеренная достоверная корреляционная связь между экспрессией CD4 и CD8 ($R=0.46$; $p=0.003$).

Известно, что CD25 является маркером активированных лимфоцитов [Хаитов и др., 2011]. В частности, фенотип CD4+CD25+ относят к регуляторным Т-лимфоцитам [Li et al., 2014]. Данные литературы об экспрессии CD25 в эндометрии и его влиянии на течение беременности являются противоречивыми. Так, снижение уровня CD4+CD25+ в эндометрии в экспериментах на мышах приводило к увеличению невынашивания беременности [Darrasse-Jeze et al., 2006]. Однако в культуре клеток было показано, что хорионический гонадотропин подавляет экспрессию активационного иммунного маркера CD25 в наивных Т-клетках и Т-клетках иммунной памяти [Заморина и др., 2017]. Это позволяет предположить, что у пациенток с прогрессирующей беременностью, характеризующейся нормальным содержанием хорионического гонадотропина, экспрессия CD25 будет ниже, чем у пациенток с прерывающейся беременностью. Это подтверждают полученные нами результаты.

Заключение

Таким образом, у пациенток с неразвивающейся беременностью наблюдается увеличение экспрессии мРНК CD25 в эндометрии. И у пациенток с самопроизвольными выкидышами и с неразвивающейся беременностью наблюдалась достоверная корреляционная связь экспрессии CD25 с экспрессией маркеров CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. У женщин с прогрессирующей беременностью не наблюдалось взаимосвязи CD25 с экспрессией CD8 (рецептором цитотоксических лимфоцитов).

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ МД-2326.2017.7.

Список литературы References

1. Доброхотова Ю.Э., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Свитич О.А., Малушенко С.В., Магомедова А.М. 2016. Роль иммунных механизмов в патогенезе невынашивания беременности. *Акушерство и гинекология*, 7: 5–10.

Dobrokhotova Yu.E., Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Svitich O.A., Malushenko S.V., Magomedova A.M. 2016. Rol' immunnyh mehanizmov v patogeneze nevnashivaniya beremennosti [Role of immune mechanisms in pathogenesis of miscarriage]. *Akusherstvo i ginekologiya*, 7: 5–10. (in Russian)

2. Заморина С.А., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмцов П.В., Раев М.Б. 2017. Роль хорионического гонадотропина в модуляции функциональной активности наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти. В сб.: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей Международной конференции*. Пуццано, РАН: 721–725.

Zamorina S.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Dunets N.A., Haziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Raev M.B. 2017. Rol' horionicheskogo gonadotropina v moduljácii funkcional'noj aktivnosti naivnyh T-kletok i T-kletok immunnoj pamjati [The role of chorionic gonadotropin in modulation of functional acidity of naïve T-cells and immune memory T-cells]. In: Receptory i vnutrikletochnaja signalizacija: sbornik statej Mezhdunarodnoj konferencii [Receptors and intracellular signaling: proceedings of the international conference]. Pushchino, Russian Academy of Sciences: 721–725. (in Russian)

3. Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Голубева Е.Л., Сарибегова В.А., Хачатрян Н.А., Агаджанова А.А., Тетруашвили Н.К. 2017. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в предгестационной подготовке женщин с привычным выкидышем. Акушерство и гинекология, 6: 55–63.

Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Golubeva E.L., Saribegova V.A., Nachatryan N.A., Agadzhanova A.A., Tetrushvili N.K. 2017. Dinamika subpopulacionnogo sostava limfocitov perifericheskoj krovi v predgestacionnoj podgotovke zhenshin s privychnym vykidyshe[m] [Time course of changes in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in the pregravid preparation of women with recurrent miscarriage]. Akusherstvo i ginekologija, 6: 55–63. (in Russian)

4. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Ивашова О.Н., Старцева Н.Ю., Чурносоев М.И. 2015. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета в индукции апоптоза при невынашивании беременности ранних сроков. Акушерство и гинекология, 2: 39–43.

Lebedeva O.P., Pahomov S.P., Ivashova O.N., Starceva N.Yu., Churnosov M.I. 2015. Signal'nye receptory vrozhdennogo immuniteta v indukcii apoptoza pri nevnashivanii beremennosti rannih srokov [Innate immunity signaling receptors in the induction of apoptosis in early miscarriage]. Akusherstvo i ginekologija, 2: 39–43. (in Russian)

5. Радзинский В.Е., Соловьева А.В. 2012. Невынашивание: что в перспективе? Медицинский совет, 7: 37–39.

Radzinskij V.E., Soloveva A.V. 2012. Nevynashivanie: chto v perspektive? [The prospect after miscarriage]. Medicinskij sovet, 7: 37–39. (in Russian)

6. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. 2011. Иммунология: атлас. М., ГЭОТАР-Медиа: 237–259. Khaitov R.M., Yarilin A.A., Pinegin B.V. 2011. Immunologia: atlas [Immunology: an atlas]. Moscow, GEOTAR-Media: 237–259. (in Russian)

7. Чистякова Г.Н. 2009. Иммунологические аспекты взаимоотношений организмов матери и плода при физиологически и патологически протекающей беременности. Вестник Уральской медицинской академической науки, 4: 59–62.

Chistyakova G.N. 2009. Immunologicheskie aspekty vzaimootnoshenij organizmov materi i ploda pri fiziologicheski i patologicheski protekajushhej beremennosti [The immunology aspects of relationships of mother and fetus organisms at physiological and pathological pregnancy]. Vestnik ural'skoj meditsinskoj akademicheskoj nauki, 4: 59–62. (in Russian)

8. Чугунова А.А., Зайнулина М.С., Селютин А.В., Сельков, С.А. 2011. Влияние иммуномодулирующей терапии на клинико-лабораторные показатели беременных с невынашиванием и антифосфолипидным синдромом. Журнал акушерства и женских болезней, 60 (3): 152–160.

Chugunova A.A., Zainulina M.S., Selutin A.V., Selkov, S.A. 2011. Vlijanie immunomodulirujushhej terapii na kliniko-laboratornye pokazateli beremennyh s nevnashivaniem i antifosfolipidnym sindromom [The influence of immunomodulating therapy on clinical and laboratory results in pregnant women with antiphospholipid syndrome and recurrent pregnancy loss]. Journal of Obstetrics and women's diseases, 60 (3): 152–160. (in Russian)

9. Щербakov А.Ю., Шуй Ч., Щербakov В.Ю. 2008. Патогенетические особенности невынашивания беременности с исходом в неразвивающуюся беременность. Международный медицинский журнал, 3: 49–51.

Scherbakov A.Yu., Shui Ch., Scherbakov V.Yu. 2008. Patogeneticheskie osobennosti nevnashivaniya beremennosti s ishomom v nerazvivajushhujusja beremennost' [Pathogenetic peculiarities of pregnancy miscarriage with the outcome to non-developing pregnancy]. Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal, 3: 49–51. (in Russian)

10. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4): 611–622.
11. Carbone J., Sarmiento E., Gallego A., Lanio N., Navarro J., García S., Fernandez-Cruz E. 2016. Peripheral blood T-and B-cell immunophenotypic abnormalities in selected women with unexplained recurrent miscarriage. *Journal of reproductive immunology*, 113: 50–53.
12. Caudy A.A., Reddy S.T., Chatila T., Atkinson J.P., Verbsky J.W. 2007. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked–like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (2): 482–487.
13. Darrasse-Jeze G., Klatzmann D., Charlotte F., Salomon B.L., Cohen J.L. 2006. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett.*, 102:106.10.1016/j.imlet.2005.12.001.
14. Li M.Q., Wang Y., Chang K.K., Meng Y.H., Liu L.B., Mei J., Wang Y., Wang X-Q., Jin J.-P., Li D.J. 2014. CD4+ Foxp3+ regulatory T cell differentiation mediated by endometrial stromal cell-derived TECK promotes the growth and invasion of endometriotic lesions. *Cell death & disease*, 5 (10): p. 1436.
15. Lissauer D., Goodyear O., Khanum R., Moss P.A., Kilby M.D. 2014. Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage. *Clinical Science*, 126 (5): 347–354.
16. Naciute M., Maciunaite G., Mieliauskaite D., Ruginiene R., Zinkeviciene A., Mauricas M., Murovska M., Girkontaite I. 2017. Increased Numbers of CD4+ CD25+ and CD8+ CD25+ T-Cells in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis with Parvovirus B19 Infection. *In vivo*, 31(2): 181–185.
17. Nakashima A., Ito M., Shima T., Bac N.D., Hidaka T., Saito S. 2010. Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases. *American journal of reproductive immunology*, 64 (1): 4–11.
18. Pfaffl M.V. 2002. Relative quantification. In: *Real Time PCR*. Int. University Line: 63–82.
19. Racicot K., Kwon J.Y., Aldo P., Silasi M., Mor G. 2014. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72 (2): 107–116.
20. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. 2010. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. of Reproductive Immunology*, 3: 601–610.
21. Southcombe J.H., Mounce G., McGee K., Elghajji A., Brosens J., Quenby S., Child T., Granne I. 2017. An altered endometrial CD8 tissue resident memory T cell population in recurrent miscarriage. *Scientific reports*, 7: 41335.