Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis
Scientific and Practical, Medical Journal

Founders:
- State Institution «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine»
- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;
eISSN 2616-7352
Journal homepage: https://ukrjnd.com.ua

Research article

L.E. Tumanova[1], O.V. Kolomiiets[1], V.E. Driianska[2], T.V. Poroshina[2,3], O.V. Romaschenko[3], N.A. Kalinina[2,3], O.V. Trokhymovych[1], A.G. Kornatska[1], O.P. Ryabenko[4], O.O. Molchanova[4]

doi: 10.31450/ukrjnd.2(78).2023.09

Characteristics of T- and B-lymphocytes of blood at different stages of pregnancy and peculiarities of immunity in women with preeclampsia

[1]State Institution "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician O.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine
[2]State Institution "Institute of Nephrology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine
[3]State Institution "Academician O.F. Vozianov Institute of Urology" of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;
[4]Clinic of Reproductive Medicine "Nadiya", Kyiv, Ukraine

Citation: Tumanova LE, Kolomiiets OV, Driianska VE, Poroshina TV, Romaschenko OV, Kalinina NA, et al. Characteristics of T- and B-lymphocytes of blood at different stages of pregnancy and peculiarities of immunity in women with nephropathy. Ukr J Nephr Dial. 2023;2(78):81-90. doi: 10.31450/ukrjnd.2(78).2023.09.

Abstract. *The study of immune mechanisms during pregnancy is an important area of research aimed at understanding the immunogenesis of pregnancy and its complications. One such complication is nephropathy, which requires accurate prediction of its course and appropriate therapy.*

The present study aimed to assess the blood levels of T-lymphocytes (T-helper, T-suppressor/cytotoxic), B-lymphocytes, and markers of their activation in pregnant women, with a particular focus on patients with preeclampsia (PE).

Methods. Using a cellular cytofluorimeter and the corresponding test systems, we determined the relative levels of immunocompetent blood cells such as CD3+, CD4+, CD8+, CD19+-l with the expression of HLA-DR, CD25, CD5 activation markers in 436 non-pregnant women and 514 pregnant women. We analyzed the characteristics of these indicators at different stages of pregnancy, specifically before (1-4 groups) and after (5 group) 20 weeks. In the second stage, we performed an analysis of the indicators in 107 women with PE, 14 women after PE, and 54 pregnant women in the reference group without complications at 20+ weeks. This analysis included T- and B-cell studies of these patient groups under in vitro conditions with autoserum and inactivated serum.

Results. The first weeks of pregnancy were characterized by a high relative level (%) in the blood of T-l and subpopulations of T-h and Ts/c, as well as their activation according to the expression data of DR, CD25 (for CD4 +-l), and CD5 (for CD19 +-l). These indicators significantly decrease from 20 weeks of pregnancy and become comparable to the levels in non-pregnant women. The percentages of CD3+4+25 +-l and CD19+5 +-l are below the normal range, indicating a decrease in T-helper cell and B-cell activation during this period of pregnancy. In patients with PE after 20 weeks of pregnancy, the relative levels of T-l, B-l, T-h, and Ts/c did not differ from the reference group. Incubation of T- and B-l of women with PE with autoserum in vitro almost tripled the number of T- and B-l, and the blocking effect was greater than in women without PE, with a significant difference between them; the average ratio T-l/T-las exceeded the reference in the subgroup of active manifestations of PE.

Conclusion. Studying the relative levels of T-l, T-h, T-s/c, and B-l in the blood, as well as markers of their activation, at different stages of pregnancy with in vitro detection of features of the humoral immune response as predictors of NP allows determining individual components of immunogenetic and prognostic markers for personalized therapy during pregnancy.

Key words: *pregnancy, immunology, preeclampsia, T- and B-lymphocytes, markers, lymphocyte activation.*

Article history:
Received April 12, 2023
Received in revised form May 18, 2023
Accepted May 19, 2023

Conflict of interest statement. The authors declare no competing interest.

© L.E. Tumanova, O.V. Kolomiiets, V.E. Driianska, T.V. Poroshina, O.V. Romaschenko, N.A. Kalinina, O.V. Trokhymovych, A.G. Kornatska, O.P. Ryabenko, O.O. Molchanova. 2023.

Correspondence should be addressed to Victoriia Driianska: victoriadriyanskaya@gmail.com

(cc) BY-SA

© Туманова Л. Є., Коломієць О. В., Дріянська В. Є., Порошина Т. В., Ромащенко О. В., Калініна Н.А, Трохимович О. В., Корнацька А. Г., Рябенко О. П., Молчанова О. О., 2023.

УДК: 618.2:616.61-008.6]-07

Л.Є. Туманова[1], О.В. Коломієць[1], В.Є. Дріянська[2], Т.В. Порошина[2,3], О.В. Ромащенко[3], Н.А. Калініна[2,3], О.В. Трохимович[1], А.Г. Корнацька[1], О.П. Рябенко[4], О.О. Молчанова[4]

Характеристики Т- і В-лімфоцитів крові на різних термінах вагітності та особливості імунітету у жінок з прееклампсією

[1]ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України»,м. Київ,Україна
[2]ДУ «Інститут нефрології НАМН України», м. Київ, Україна
[3]ДУ «Інститут урології ім. акад. О.Ф.Возіанова НАМН України», м. Київ, Україна
[4]Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ, Україна.

Резюме. *Дослідження імунних механізмів перебігу вагітності є важливим напрямком визначення імуногенезу нормальної вагітності та її ускладнень, одним з яких є нефропатія, для прогнозування перебігу та своєчасної терапії.*

Мета роботи – визначення в крові рівнів Т- (з субпопуляціями Т-х, Т-с/ц) і В-лімфоцитів (л) крові з маркерами їх активації у вагітних жінок, особливостей імунітету у пацієнток з прееклампсією.

Матеріали і методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра і відповідних тест-систем визначали відносні рівні імунокомпетентних клітин крові - CD3+, CD4+, CD8+, CD19+-л з експресією маркерів активації HLA-DR, CD25 і CD5 у 436 невагітних (норма - н) та 514 вагітних жінок (ж). Аналізували особливості показників на різних строках вагітності, в тому числі до (1-4 гр) та після (5 гр) 20 тижнів вагітності. На другому етапі проведено аналіз показників 107 жінок з прееклампсією (ПЕ) (II гр), 14 – після перенесеної ПЕ (III гр) та 54 вагітних референтної групи (р) без ускладнень (I гр) на строках 20+ тижнів, в тому числі з дослідженнями Т- та В-кл пацієнток в умовах in vitro з аутосироваткой (ас) та інактивованою сироваткою (іс).

Результати. Перші тижні у вагітних жінок характеризуються як високим відносним рівнем (%) в крові Т-л, їх субпопуляцій Т-х і Тс/ц, так і їх активацією за даними експресії DR і CD25 (для CD4+-л). Ці показники з 20 тиж вагітності достовірно знижувались і не відрізнялись від невагітних, а % CD3+4+25+-л, так само як і CD19+5+-л, були нижче норми та інших гр, що свідчить про зниження активації Т-х та В-кл в цей період.

У пацієнток з ПЕ після 20 тиж вагітності відносні рівні Т-л, В-л, Т-х і Т-с/ц не відрізнялися від референтної гр без цієї патології. Інкубація Т- та В-л жінок з ПЕ з аутосироваткой in vitro майже втричі знижувала кількість Т- (Т-лас) та В-л (В-лас), блокуючий ефект був більшим, ніж в р у жінок без ПЕ з достовірною різницею між ними; середнє співвідношення Т-л/Т-лас перевищувало референтне в підгрупі активних проявів ПЕ.

Заключення. Дослідження відносних рівнів Т-л, Т-х, Т-с/ц та В-л в крові, а також маркерів їх активації в різні терміни у вагітних жінок з виявленням in vitro особливостей гуморальної ланки імунітету як предикторів ПЕ дозволяють визначити окремі складові імуногенезу та прогностичні маркери перебігу вагітності для персоніфікованої терапії.

Ключові слова: *вагітність, імунологія, прееклампсія, Т- і В-лімфоцити, маркери, активація лімфоцитів.*

Вступ. Дослідження імунних механізмів перебігу вагітності та особливостей у разі її ускладнень, одним з яких є прееклампсія (ПЕ), є важливою складовою визначення підходів до підвищення народжуваності в нашій країні з метою вирішення актуальних соціально-економічних проблем.

Імунна система матері грає важливу роль протягом всього терміну вагітності, і можливі дві причини розвитку ускладнень та невиношування: дефект клітинного імунітету на рівні розпізнавання фетальних антигенів і підвищена імунологічна реактивність на них. При звичному невиношуванні порушується нормальний стан толерантності імунної системи матері до антигенів плода зі збільшенням титру антитіл до антигенів ембріона, плаценти та зниження рівня комплементу, що свідчить про важливу участь гуморального імунітету у компенсаторно-пристосувальних механізмах материнського організму [1].

В останні роки доведено, що основою проблем вагітності може бути генетично обумовлений дефект імунологічного контролю, який перешкоджає синтезу Т-супресорів/цитотоксичних (Т-с/ц), внаслідок чого неконтрольовано починають синтезуватися антитіла, в тому числі до власних тканин. У розпізнаванні та реагуванні на чужорідні антигени в імунній системі беруть участь кілька різних типів клітин, головними з яких є субпопуляції лімфоцитів (л), їх співвідношення та функціональна активність по продукції медіаторів імунітету [2-4].

Дріянська Вікторія Євгенівна
victoriadriyanskaya@gmail.com

Враховуючи особливості функціональної різноманітності, диференціації та активації лімфоцитів, важливою характеристикою слід вважати їх фенотип з різними кластерами диференціювання (CD), що дає найбільш повну інформацію про лімфоцитарні субпопуляції та їх активацію.

Т-л (CD3+) – ключові клітини адаптивної імунної відповіді, які в процесі розвитку перетворюються в Т-хелпери (Т-х) або Т-с/ц. Т-х (CD4+) зв язуються з молекулою головного комплексу II типу (MHC II) – HLA-DR на поверхні антиген-презентуючих клітин та індукують подальші реакції на чужорідний антиген. Т-с/ц (CD8+) взаємодіють з клітинами-мішенями через MHC I – HLA-A, B, C [5-6]. Дослідження експресії молекул DR на Т-л є однією з можливостей оцінки їх активації. HLA-DR-позитивні лімфоцити тривало циркулюють у крові, а експресія цього маркера найбільш повно відбиває активаційний стан Т-клітин (Т-кл) та їх субпопуляцій, що актуально для досліджень цих антигенів під час вагітності [7].

Так само, важливим кластером є CD25, який присутній на активованих CD4+Т-л, але інтенсивність його експресії на регуляторних клітинах (Т-рег) вище, ніж у інших субпопуляцій [8]. Біологічна функція CD4+CD25+Т-кл – підтримка клонального балансу серед лімфоїдних клітин та запобігання надмірній активації імунної системи, в тому числі через внутрішньоклітинні перфорини та гранзими [9].

Підвищення числа CD4+CD25+-кл може відбуватися при запальних процесах будь-якої етіології (інфекційного та неінфекційного генезу, аутоімунних захворюваннях та ін) [10]. Особливості рівнів цих клітин у разі нормальної та патологічної вагітності недостатньо з'ясовані.

В-лімфоцити (CD19+), які відповідають за реалізацію гуморальної імунної відповіді, можна розділити на підгрупи 1 і 2. Звичайні В-клітини (В2) походять в основному з кісткового мозку, активують та поляризують Т-л до клітин Т1 та Т2 і опосередковують презентацію антигенів з продукцією цитокінів та аутоантитіл [11, 12]. В1 походять з печінки плода і меншою мірою з кісткового мозку і мають дві основні підгрупи: В-1а, що експресують CD5 як загальний Т-клітинний маркер, і В-1b, які його не експресують [13]. CD19+CD5+ В-1а є основним джерелом природних і поліреактивних антитіл, які підвищені у разі аутоімунних захворювань (синдром Шегрена, ревматоїдний артрит, червоний вовчак і цукровий діабет 1 типу) [11, 14] і можуть бути спрямовані проти власних структур; ці аутоантитіла, так само як і підвищені рівні В-1а В-кл, виявляються у пацієнтів з ПЕ [15, 16], В-л з експресією CD5 також відіграють роль в імуногенезі IgA нефропатії з відкладенням IgA в нирках [17].

Аналіз вищенаведеного комплексу показників є важливим для подальшого визначення імуногенезу нормальної вагітності та її ускладнень для прогнозування перебігу та своєчасної терапії.

Мета роботи: визначення в крові рівнів Т- (з субпопуляціями Т-х, Т-с/ц) і В-лімфоцитів (л) крові з маркерами їх активації у вагітних жінок, особливостей імунітету у пацієнток з ПЕ.

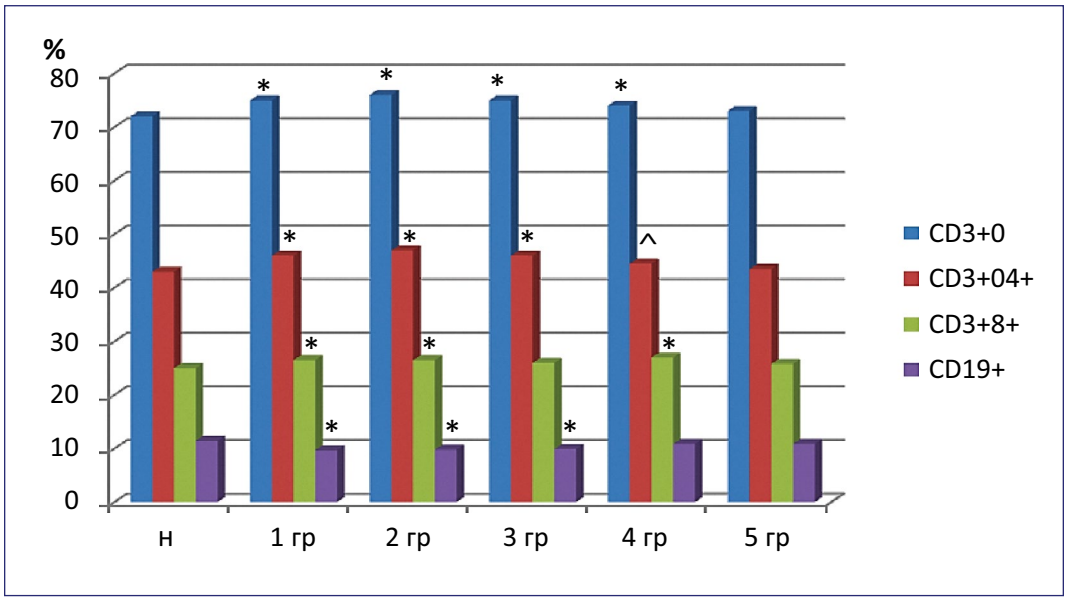
Матеріал та методи. За допомогою клітинного цитофлуориметра FACSCan (Becton Dickinson,США) і тест систем BectonDickinson (США) визначали з використанням моноклональних антитіл (МКА) до диференційованих антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD19 та маркерів активації HLA-DR iCD25у 436 невагітних (норма) та 514 вагітних жінок (ж) (із неплідністю в анамнезі). Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінгської Декларації (в рамках НДР №0121U110850, яка фінансована НАМН України), всі жінки були проінформовані та дали згоду. Протокол дослідження (№6 від 22.10.22) ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи (ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України»).

Аналізували особливості відносних рівнів імунокомпетентних клітин крові - Т-л з субпопуляціями Т-х та Т-с/ц, В-л у жінок: невагітних як норму (група н) та вагітних жінок (ж) в I-II триместрах на різних строках в групах (гр): 1 – 4-7 (140 ж), 2 – 8-9 (163 ж), 3 – 10-12 (133 ж), 4 – 13-19 (63 ж), 5 – 20-28 (15 ж) тижнів (тиж).

На другому етапі проведено аналіз показників 107 жінок з ПЕ (II гр), 14 – після перенесеної ПЕ без її клініко-лабораторних ознак (III гр) та референтна (р) гр 54 вагітних бех ускладнень на строках 20+ тижнів (I гр), в тому числі з дослідженнями Т- та В-кл цих груп пацієнток в умовах in vitro до та після інкубації з аутосироваткой (ас) та інактивованою сироваткою (іс).

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм "SPSS for Windows. Версія 11" та "MedStat". Для статистичної обробки використовували параметричні критерії статистики – тест Ст'юдента або непараметричні – критерій Уілкоксона; показники рангової кореляції Спірмена.

Результати. Обстеження вагітних проводилось на базі ІПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України та репродуктивної клініки «Надія»; в спеціально розробленій індивідуальній реєстраційній карті відмічались антропометричні і соціально-демографічні характеристики пацієнток (ріст, вага, вік, соціально-економічний статус з урахуванням анамнезу життя), акушерський анамнез, перебіг вагітності. Групи не відрізнялись між собою за цими характеристиками, а клініко-лабораторні ознаки (підвищений тиск, поява набряків, збільшення білка в сечі) надавали підставу виявити ПЕ. У вагітних жінок на тлі достовірного зниження відносної кількості лімфоцитів в усіх досліджених групах рівень Т-л (CD3+) вище норми в 1-4 гр – (1-3 гр $p<0,001$, в 4 гр $p=0,017$), тоді як в 5 гр кількість Т-клітин відповідає нормі ($p=0,349$) (див рис. 1).



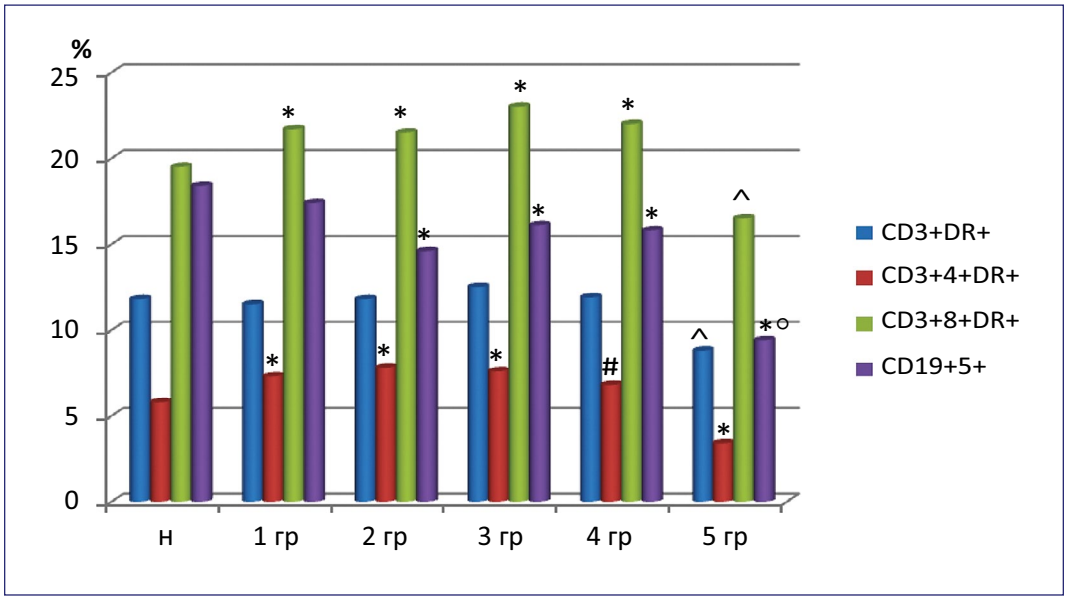
Примітки: порівняно з н: * - різниця достовірна , ^ - тенденція до підвищення

Рис. 1. Середні відносні рівні Т- і В-лімфоцитів у невагітних жінок (н) та пацієнток на різних строках вагітності (1-5 гр).

Середні % рівні Т-х (CD3+4+) підвищені у пацієнток 1-3 гр (відповідно, p=0,010; 0,001 та 0,002), так само як і Т-с/ц в 1, 2 і 4 гр (p=0,041; 0,039 та 0,039), а в 3 гр тенденція до підвищення (p=0,076) (рис. 1). З 20 тиж вагітності показники Т-л, Т-х та Т/с/ц не відрізняються від референтної групи (відповідно, p=0,349; 0,849; 0,295) (див. рис. 1).

Відносний рівень В-л (CD19+-кл) знижений в 1 і 3 гр (p=0,034; 0,013), в 2 гр – тенденція до зниження (p=0,060), тоді як в 5 гр, як і для Т-л (так само і для їх двох субпопуляцій), різниця з нормою недостовірна (p=0,667) (див. рис. 1).

Дослідження субпопуляцій Т клітин з різними додатковими CD на мембранах виявили нормальний відносний рівень Т-л з поверхневими маркерами активації, до яких відносяться антигени (аг) гістосумісності II класу –DR-аг (CD3+DR+), в усіх гр (p>0,05) з тенденцією до підвищення відносно норми у пацієнток 3 гр (p=0,055). Достовірної різниці між початком вагітності (1 гр) та іншими гр немає (p_{1-4}=0,728; 0,282; 0,122) з тенденцією до зниження в 5 гр порівняно з 1 гр (p=0,095). Звертають увагу достовірно знижені середні % показники CD3+DR+-клітин в 5 гр (8,87±0,94) порівняно з 3 (12,48±0,50) (p=0,003) та 4 (11,97±0,75) (p=0,015) групами (рис. 2). Тобто, з перебігом вагітності відбувається зниження середнього рівню активованих Т-л, експресуючих HLA-DR, достовірно виражене після 20 тижня.



Примітки: різниця достовірна : * – порівняно з н, ° – з 1-4 гр, ^ – з 3 і 4 гр, # – тенденція до підвищення від норми

Рис. 2. Середні відносні рівні лімфоцитів з експресією маркерів активації у невагітних жінок (н) та пацієнток на різних строках вагітності (1-5 гр).

Високий рівень CD3+4+DR+-л в перших 3-х групах (рн-1,2,3<0,001) демонстрував тенденцію до зниження порівняно з нормою в 4 гр (p=0,074) з достовірним зниженням в 5 гр (p=0,005) (див. рис. 2). Порівняльний аналіз показав, що % в кровіТ-х, експресуючих DR-аг, в 5 гр найнижчий серед всіх груп з достовірною різницею – відповідно, p<0,001 порівняно з 1-3 гр та p=0,001 – з 4 гр.

Середнє число активованих Т-с/ц зDR-аг на мембрані достовірно перевищує н в 1-4 гр (відповідно, p=0,027; 0,012;<0,001; 0,013) і не відрізняються у пацієнток 5 гр (p=0,498), яка характеризується більш низьким їх рівнем порівняно з 3 гр (p=0,041) та 4 гр (p=0,050) (див. рис. 2).

В-л (CD19+), відносний рівень яких знижений в порівнянні з н протягом перших 12 тижнів, демонструють достовірне зниження іх активованої фракції за даними CD5+-кл з 8 тиж та надалі (рис. 2). % кількість CD19+5+-л в 5 гр знижена порівняно не тільки з невагітними (p<0,001), але й 1-4 гр – відповідно, p<0,001; 0,015; 0,005 та 0,003 (див. рис. 2).

Середні показники Т-регуляторних клітин (Т-рег) – активованих Т-х, які експресують CD25, достовірно високі у пацієнток досліджених груп до 20 тиж вагітності (1-4 гр, відповідно,p=0,001; <0,001; 0,025; 0,024), а в 5 гр вони не відрізнялись від норми (p=0,482) і були достовірно нижче порівняно з 1 і 2 гр (p=0,018 та 0,003) з тенденцією до різниці з 3 і 4 гр (p=0,063 та p=0,074) (рис. 3–1), що корелює з іншим показником активації – високою експресією на цих клітинах антигенів гістосумісності II класу (DR) в перших 4 групах з їх достовірним зниженням в 5 гр порівняно з н (рис. 3–2). Активація Т-х за експресією на них DR-аг змінювалась так само як Т-л – з достовірною різницею 5 гр з 3 і 4 гр (p=0,03 та p=0,015) (рис. 3–3), а також і Т-с/ц (рис. 3–4).

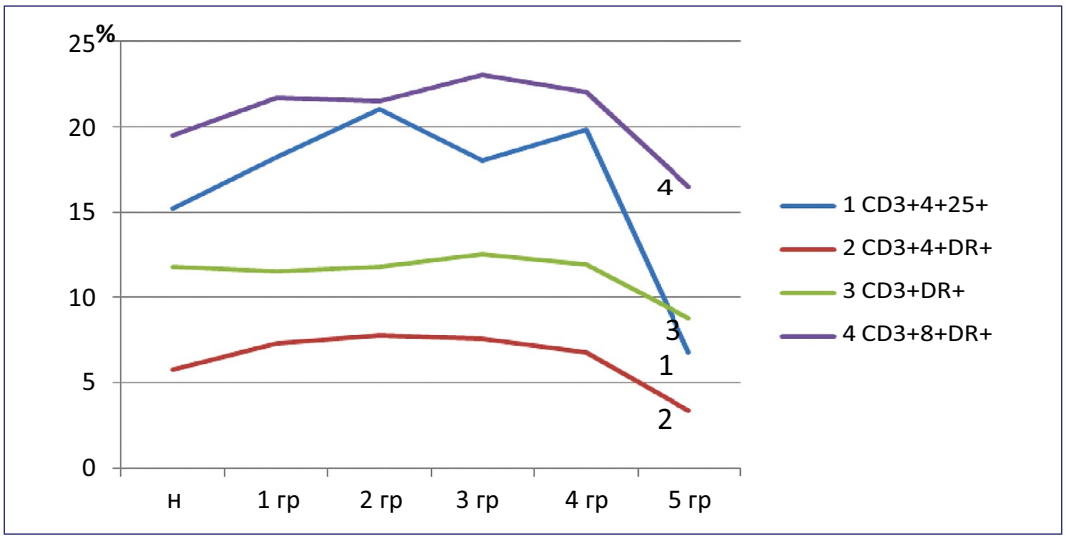


Рис. 3. Середні відносні рівні в крові Т-л та їх субпопуляцій з маркерами активації (DR+ та CD25+) у жінок на різних термінах вагітності.

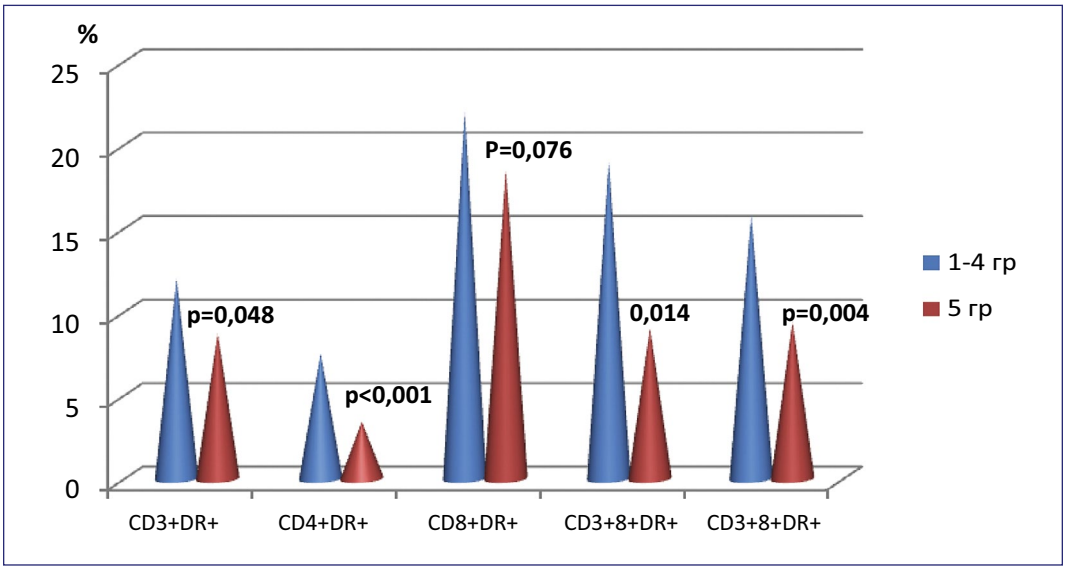


Рис. 4.Середні відносні рівні Т-л, Т-х, Т-с/цта В-л з експресією маркерів активації (DR+-, CD25+, CD5+-кл) до (1-4 гр) та після 20 (5 гр) тижнів вагітності.

Спираючись на отримані дані, вважали доцільним провести порівняльний аналіз показників 5 гр та попереднього терміну вагітності (з початку до 20 тижня) за даними середньої кількості Т- та В-л з маркерами їх активації (DR+- і CD5+-кл). Показано, що після 20 тиж спостерігаються більш низькі рівні CD3+DR+-,CD4+DR+- (з тенденцією до зниження CD8+DR+-л), а також CD19+5+-кл, загальний рівень В-л не відрізняється (рис. 4).

Достовірно зниженими в 5 гр порівняно з попереднім терміном вагітності (1-19 тиж) були показники активованих Т-х з експресією CD25 – 6,76 [5,43; 7,02] проти 19,3 [5,64; 28,84] (p=0,014) (рис. 4).

Дослідження клітин крові - Т-л, В-л, Т-х і Т-с у пацієнток окремої групи з ПЕ (II гр, 107 жінок) не виявило достовірної різниці цих показників порівняно з референтною групою (р) з нормальною вагітністю без ускладненого анамнезу (I гр, 54 жінки), відповідно, p=0,597; 0,697; 0,632; 0,902 (рис. 5), так само як і з даними у жінок без ПЕ в такому самому періоді (≥20 тиж, 5 гр), проаналізованими вище.

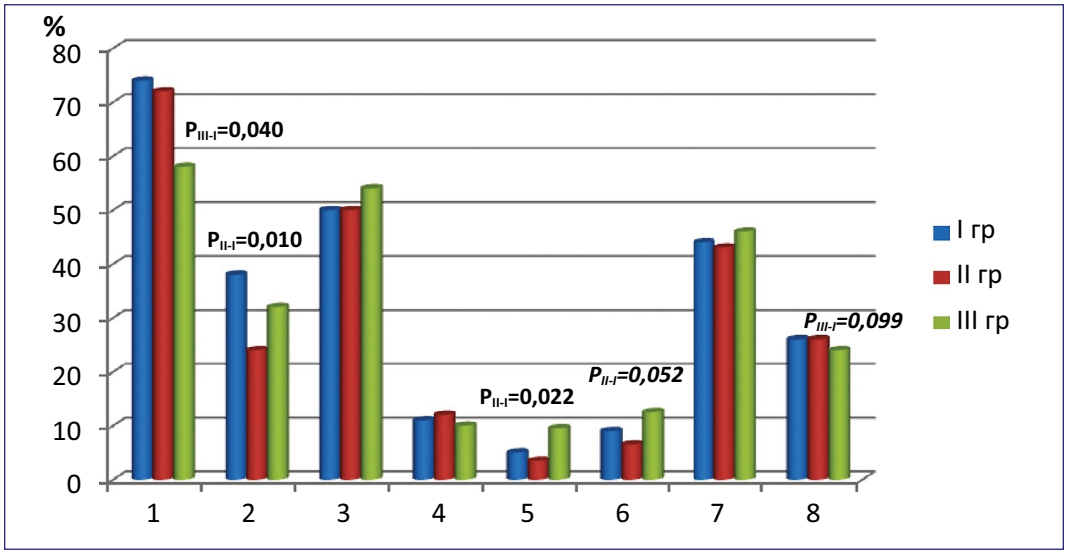


Рис. 5. Кількість (%) у вагітних без (I гр) та з ПЕ в різних періодах її перебігу (II та III гр) Т-х (7), Т-с/ц (8), а також Т- та В-л до (1 і 4) і після інкубації *in vitro* з аутосироваткою (відповідно, 2 і 5) та інактивованою сироваткою (3 і 6);

Дослідження Т- та В-кл жінок з ПЕ в умовах in vitro з аутосироваткой (ас) та інактивованою сироваткою (іс), показали достовірне зниження після інкубації з ас числа Т-(Т-лас) та В-л (В-лас) з тенденцією до зниження В-ліс (рис. 5); співвідношення Т-л/Т-лас демонструвало тенденцію до підвищення порівняно з групою вагітних без ПЕ (I гр) (p=0,095).

Співставлення показників підгруп жінок з ПЕ в період її маніфестації (II а гр, 46 ж) та остаточних явищ (II b гр, 61 ж) виявило зниження середніх рівнів Т-ласв обох групах з більш низькимв II а гр (p=0,046) з достовірно підвищеним співвідношенням Т-л/Т-лас порівняно як з II b (p=0,015), так і I (p=0,001) гр; середній показник В-л/Влас достовірно знижений лише в II а гр (рис. 6).

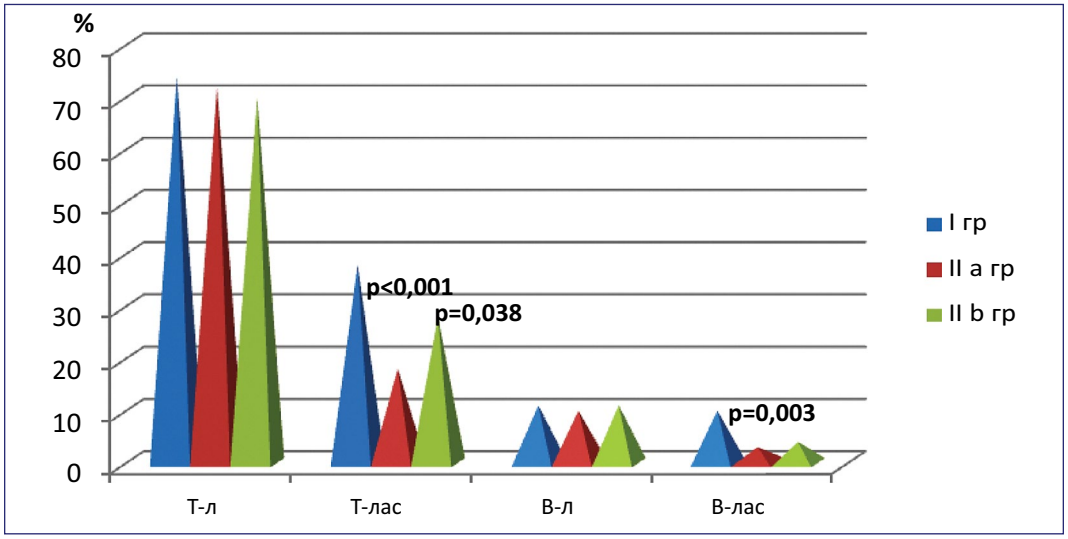


Рис. 6. Показники (%) Т- та В-л до та після інкубації in vitro з аутосироваткой (Т-лас, В-лас) у разі нормальної вагітності (I гр) та в підгрупах жінок з ПЕ (II а та II b гр).

Кореляційний аналіз показників у жінок з ПЕ, так само як і у вагітних без неї, виявив прямий зв»язок між рівнями Т-л і Т-лас (0,245 та 0,841), В-л і В-лас (0,355 та 0,629) та зворотній зв»язок між показниками Т-х та Т-с/ц (-0,338та -0,367); в той же час, в II гр існує позитивний зв»язок між Т-лас і Т-ліс (0,573), тоді як в I гр він зворотній (-0,271).

Після перенесеної ПЕ у вагітних в задовільному стані і без її клініко-лабораторних ознак (III гр, 14 ж) відмічені більш низькі рівні Т-л порівняно як з I (p=0,040), так і II гр (p=0,043); показники кількості В-л після інкубації з аутологічною сироваткою, навпаки, вище – відповідно, p=0,010 та <0,001 (див. рис. 5). Виявлені зміни імунітету вже після перенесеної ПЕ потребують індивідуалізованого підходу до спостереження таких пацієнток та продовження досліджень імуногенезу патології нирок у вагітних.

Показники Т- (p=1,000; 0,569) і В-кл (p=0,052; 0,172) після інкубації з інактивованою сироваткою в групах II і III не відрізнялись від таких у разі нормальної вагітності (I гр).

Відсутність достовірної різниці відносної кількості Т-л, їх субпопуляцій Т-х, Т-с/ц та В-л з нормою (здорові невагітні жінки) з достовірними змінами за даними досліджень in vitro (Т-лас, В-лас, Т-л/Т-лас) після інкубації з аутологічною (на відміну від інактивованої) сироваткою свідчить про важливу роль гуморальних факторів крові в розвитку ПЕ.

Обговорення. Дослідження кількісних характеристик клітин імунної системи у вагітних в різні періоди виявили їх певні особливості. Так, у жінок після 20 тижня вагітності (5 гр) не виявлено (на відміну груп з іншими термінами) різниці з нормою за даними відносної кількості Т-л, Т-х, Т-с/ц та В-л, спостерігається тенденція до зниження кількості CD3+DR+-л (p=0,095) порівняно з початковим періодом (4-7 тиж) і достовірне їх зменшення порівняно з такими на 10-19 тижнях вагітності (p=0,023).

Виявили високий відносний рівень Т-л, Т-хі Т-с/ц з поверхневими маркерами тривалої активації лімфоцитів HLA-DR в кожній з груп до 20 тиж вагітності (p<0,001); цей відсоток порівняно з н для Т-л та Т-с/ц після 20 тиж в 5 гр не відрізнявся, а Т-х був нижче (p=0,005). Таким чином, починаючи з 20 тижня вагітності простежується зниження в крові рівнів активованих Т-л, а також їх субпопуляцій CD4+ та CD8+-кл з експресією DRяк антигенів участі в регуляції імунної відповіді з розпізнаванням антигенів як свій-чужий [7], що можна вважати позитивним для перебігу вагітності.

Важливою ланкою імунної відповіді є цитокінова для забезпечення кооперативної взаємодії клітин, а також їх зв»язку з ендокринною та нервовою системами. Тому доцільним є визначення стану Т-х та їх субпопуляції Т-рег (CD4+CD25+), які впливають через продукцію відповідних медіаторів як на перебіг нормальної вагітності, так і фетоплацентарну дисфункцію з перинатальними ускладненнями [6, 18].

Виявлене нами на перших тижнях вагітності підвищення відносного рівню CD4+-л з експресією CD25 свідчить про їх активацію протягом 4-12 тиж. В той же час, материнські регуляторні Т-кл мають важливе значення для встановлення імунної толерантності, під час вагітності CD4+CD25+FOXP3+ (Т-рег) виявляються у високих рівнях в децидуальній тканині і мають здатність пригнічувати специфічні та неспецифічні реакції плода [19]. Поступове зниження з 13 тижня високих до того % рівнів CD4+CD25+-кл до норми та достовірно нижчого порівняно з першими 9 тижнями на строках 20-28 тиж оцінюємо як нормальну захисну реакцію організма жінки зі зменшенням активації Т-х. На тлі цього виникає інтерес до подальшого вивчення функціональної активності цих клітин, продукуючих протизапальні цитокіни як прогнозопозитивні фактори для розвитку плода.

Аналіз показників 5 гр (20-28 тиж) порівняно з всім попереднім строком вагітності (1-19 тиж) підтвердив достовірне зниження активації клітин імунної системи за даними експресії, відповідно, CD25 для Т-х та DR-аг для Т-л та Т-х.

Таким чином, аналіз стану клітинної ланки імунітету в різні терміни вагітності для уявлення про особливості в період розвитку ПЕ (після 20 тиж) показав, що в цій групі (5 гр) виявлено більш низькі рівні активованих Т-л (CD3+DR+) і Т-х - CD4+-л (за даними експресії маркерів CDDR та CD25)з тенденцією до зниження Т-с/ц (CD8+DR+), а також активованих В-кл (CD19+5+).

Динамічне спостереження за вагітними жінками за даними визначених показників може бути інформативним для прогнозування ризиків та своєчасної медичної тактики втручання. Особливо це стосується жінок з такою важкою патологією як ПЕ, обумовленою аутоантитілами проти рецептора ангіотензину 1 типу II [20]. Але недостатньо даних щодо участі як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету в цій патології.

Відомо, що рівень CD19+CD5+-В-л в периферичній крові пацієнтів з ПЕ різко підвищується порівняно з іншими вагітними жінками, і це корелює з високими рівнями хоріонічного гонадотропіну людини в сироватці крові та супернатанті плаценти; 95% CD19+CD5+-кл експресують рецептор хоріонічного гонадотропіну людини [20, 21]. Дослідження показали, що ізольовані CD19+CD5+-л виробляють аутоантитіла проти рецептора ангіотензину 1 типу II, це призводить до вивільнення антиангіогенних факторів з плаценти; клітини CD19+CD5+ були додатково виявлені в плаценті прееклямптичної, але не нормальної вагітності [22], що корелює з отриманими нами результатами про низький рівень цих клітин в крові у жінок з нормальним перебігом вагітності.

Для наших досліджень привертають увагу отримані останнім часом дані щодо експресії на CD19+CD5+-В-кл маркеру Т-регуляторних Foxp3, який може виступати і як фактор транскрипції В-регуляторних, тому що CD5-В-л не експресують Foxp3 [23-25]. Подальші дослідження співвідношень CD19+CD5+-В-л як активованих клітин та В-л з маркерами регуляторних, а також Tim-1 дуже важливі та доцільні для жінок з ПЕ в зв»язку з даними про те, що Tim-1+IL-10+- В-кл пригнічують певні аутоімунні реакції [26], а тому і мають імуносупресивний потенціал для вагітних.

В цьому аспекті важливими є дослідження ролі не тільки лімфоцитів з еспресією відповідних маркерів, але й антитіл як до антигенів чоловіка, так і аутоантитіл [27, 28]. Аутоантитіла здатні не тільки фіксуватися на плацентарній тканині, але й обумовлювати її структурні зміни, що підтверджено морфологічними, гістохімічними, електронно-мікроскопічними дослідженнями. Є докази того, що імунологічна ареактивність матерії по відношенню до плоду пов язана з розвитком феномена «імунологічного посилення», тому існує зацікавленість у вивченні гуморальної складової імунної реакції вагітних, особливо у разі такого серйозного ускладнення як ПЕ.

Дослідження сироватки крові вагітних, особливо з ускладненнями, важливі, тому що гуморальні фактори проти лейкоцитарних антигенів чоловіка мають як цитотоксичний, так і блокуючий потенціал, і специфічна супресія імунної відповіді матері проти антигенів плода може бути зумовлена комплексом антиген-антитіло [29]. Ось чому вважаємо цікавими отримані нами дані щодо змін кількості Т- і В-л після їх інкубації з аутологічною сироваткою in vitro-зниження числа Т-лас у жінок з ПЕ, і особливо в період гостро виражених симптомів - співвідношення Т-л/Т-лас. Можемо припустити, що за ряд обставин антитіла сироватки вагітної можуть не тільки блокувати рецептори для зниження реакції на чужорідні антигени, але й обумовлювати негативні аутоімунні реакції.

Отримані нами дані про імунологічні показники на різних етапах вагітності з акцентом на її термін після 20 тижня та виявлені в ці терміни особливості у пацієнток з ПЕ дозволяють формувати сучасні імунологічні концепції перебігу як нормальної вагітності, так і її патології, в тому числі пов'язаної з нирками.

Висновки:

1. Виявлені з перших тижнів вагітності високі відносні рівні CD3+ та CD3+ DR+ Т-л після 20 тиж відповідають такій нормі (у невагітних жінок) (відповідно, p=0,349 та p=0,113) з достовірно більш низькою від попереднього періоду активацією за даними експресії на мембрані HLA-DR (p<0,05).

2. Високі на початку вагітності % в крові Т-х і Т-с/ц та їх активація за даними CD3+4+DR+-, CD3+4+CD25+-л і CD3+8+DR+-л поступово знижуються в групах 1-4 з достовірною різницею порівняно з кожною з груп та усім попереднім періодом після 20 тиж (p<0,05), коли показники числа CD4+ та CD8+-кл (p=0,849; 0,295) та їх активації (p=0,197; 0,482; 0,498) не відрізнялись від норми.

3. Відносний рівень В-лімфоцитів (CD19+) знижений лише в перші 12 тиж вагітності, тоді як їх активація за даними експресії CD5 знижена порівняно з нормою починаючи з 8 тижня, а після 20 тиж - не тільки з нормою (p<0,001), але й з кожною іншою групою (1, 2, 3, 4), а тому й усім попереднім періодом (1-4 гр) (p=0,004).

4. У пацієнток з ПЕ відносний рівень Т-л, В-л, Т-х і Т-с/ц не відрізнявся від середніх показників нормальної вагітності (p=0,597; 0,697; 0,632; 0,902) в такому періоді (≥20 тиж).

5. Дослідження Т- та В-кл жінок з ПЕ в умовах in vitro показали достовірне зниження після інкубації з аутосироваткой (на відміну від інактивованою) % Т- та В-л майже втричі; виявлена достовірна різниця порівняно з вагітними без ПЕ, показники яких після інкубації були більшими (p=0,010 та 0,022); підрозділ на підгрупи виявив достовірне підвищення В-л/ас (p=0,003) та Т-л/Т-лас (p=0,001) лише в підгрупі активних проявів ПЕ порівняно з залишковими.

6. У жінок після перенесеної ПЕ більш низькі % рівні Т-л порівняно з групою її клініко-лабораторних ознак та референтною (p=0,040; 0,043), а В-лас, навпаки, вище (p<0,001; 0,010), що свідчить про зміни імунітету, які потребують динамічного спостереження.

7. Описані показники імунітету в різні терміни вагітності з особливостями у разі ПЕ дозволяють визначити окремі складові імуногенезу та прогностичні маркери перебігу.

Інформація про внесок кожного учасника:

Лариса Туманова: концепція дослідження, узагальнення клінічних результатів;

Олена Коломієць: відбір пацієнток для обстеження,формування бази вагітних та інтерпретація клінічних даних;

Вікторія Дріянська: аналіз результатів імунологічних досліджень, написання частини статті;

Тетяна Порошина: дослідження in vitro та написання частини статті;

Оксана Ромащенко: аналіз частини клінічних даних, редакція статті;

Наталія Калініна: імунологічні дослідження in vitro та статистичний аналіз отриманих результатів;

Трохимович Ольга: відбір пацієнток для досліджень імунітету, аналіз клінічних даних;

Корнацька Алла: огляд та подальше спостереження жінок, діагностика їх стану, підбір літературних джерел;

Рябенко Олена: огляд та консультації вагітних в динаміці, відбір до дослідження;

Молчанова Олена: спостереження та терапія вагітних, аналіз клінічних даних в динаміці.

Література (References):

1. *Aplin JD.* The cell biology of human implantation. Placenta. 1996;17(5):269–275. doi: 10.1016/s0143-4004(96)90050-8.
2. *Yu L, Zhang Y, Xiong J, Liu J, Zha Y, Kang Q, et al.* Activated γδ T Cells With Higher CD107a Expression and Inflammatory Potential During Early Pregnancy in Patients With Recurrent Spontaneous Abortion. Front Immunol. 2021;12:724662. doi: 10.3389/fimmu.2021.724662.
3. *Li D, Zheng L, Zhao D, Xu Y, Wang Y.* The Role of Immune Cells in Recurrent Spontaneous Abortion. Reprod Sci. 2021; 28(12):3303-3315. doi: 10.1007/s43032-021-00599-y.
4. *Terzieva A, Dimitrova V, Djerov L, Dimitrova P, Zapryanova S, Hristova I, et al.* Early Pregnancy Human Decidua Is Enriched With Activated, Fully Differentiated and Pro-Inflammatory Gamma/Delta T Cells With Diverse TCR Repertoires. Int J Mol Sci.2019;20(3):687. doi: 10.3390/ijms20030687.
5. *Zhu X, Zhu J.* CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. Int. J. Mol. Sci. 2020;21:8011. doi: 10.3390/ijms21218011.
6. *Piccinni MP, Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, Romagnani S, Le Bouteiller P.* T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. Clin Mol Allergy. 2015;13:9. doi: 10.1186/s12948-015-0015-y.
7. *Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzelak B, et al.* Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2007;58(1):39-45. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00489.x.
8. *Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA.* D4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J. Immunol. 2001;167(3):1245-53. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.
9. *Saraiva M, Vieira P, O'Garra A.* Biology and therapeutic potential of interleukin-10. J Exp Med. 2020;217(1). doi: 10.1084/jem.20190418.
10. *Chatila TA.* Role of regulatory T cells in human diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 2005;116(5):949-59. doi: 10.1016/j.jaci.2005.08.047.
11. *Duan B, Morel L.* Role of B-1a cells in autoimmunity. Autoimmun Rev. 2006;5(6):403-8. doi:10.1016/j.autrev.2005.10.007.
12. *Wanleenuwat P, Iwanowski P.* Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord. 2019;36:101416. doi: 10.1016/j.msard.2019.101416.
13. *Hippen KL, Tze LE, Behrens TW.* CD5 maintains tolerance in anergic B cells. J Exp Med. 2000;191(5):883-90. doi:10.1084/jem.191.5.883.
14. *Ishida D, Su L, Tamura A, Katayama Y, Kawai Y, Wang SF, et al.* Rap1 signal controls B cell receptor repertoire and generation of self-reactive B-1a ce lls. Immunity.2006;24:417-27. doi: 10.1016/j.immuni.2006.02.007.
15. *Nor Azlin M, Bakin YD, Mustafa N, Wahab NA, Johari MJ, Kamarudin NA, et al.* Thyroid autoantibodies and associated complications during pregnancy. J Obstet Gynaecol. 2010;30:675-78. doi: 10.3109/01443615.2010.503908.
16. *Do Prado AD, Piovesan DM, Staub HL, Horta BL.* Association of anticardiolipin antibodies with preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2010;116:1433-43. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181fe02ec.
17. *Yuling H, Ruijing X, Xiang J, Yanping J, Lang C, Li L, et al.* CD19+CD5+ Bcells in primary IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2008; 19(11):2130-9. doi: 10.1681/ASN.2007121303.
18. *Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J.* T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. Front Immunol. 2020;11:2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
19. *Salvany-Celades M, van der Zwan A, Benner M, Setrajcic-Dragos V, Bougleux Gomes HA, Iyer V, et al.* Three types of functional regulatory T cells control T cell responses at the human maternal-fetal interface. Cell Reports. 2019;27:2537-47. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.109.
20. *Zhou CC, Irani RA, Zhang Y, Blackwell SC, Mi T, Wen J, et al.* Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor-α induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. Circulation. 2010;121:436-44. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902890.
21. *Berland R, Wortis HH.* Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. Annu Rev Immunol. 2002;20:253-300. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833.
22. *Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, El-Mousleh T, Costa SD, et al.* CD19+CD5+ Cells as Indicators of Hypertension. Hypertension. 2012;59:861-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188276.
23. *Noh J, Noh G, Kim HS, Kim AR, Choi WS.* Allergen-Specific Responses ofCD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cell (Tregs) in Immune Tolerance of Cow Milk Allergy of Late Eczematous Reactions. Cell Immunol. 2012;274(1-2):109-14. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.005.

24. *Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E.* The Expansion of CD25 High IL-10 High FoxP3 High B Regulatory Cells Is in Association With SLE Disease Activity. J Immunol Res. 2015:254245. doi: 10.1155/2015/254245.

25. *Park MK, Jung YO, Lee SY, Lee SH, Heo YJ, Kim EK, et al.* Amelioration of Autoimmune Arthritis by Adoptive Transfer of Foxp3-Expressing egulatory B Cells Is Associated With the Treg/Th17 Cell Balance. J Transl Med. 2016;14(1):191. doi: 10.1186/s12967-016-0940-7.

26. *Ma L, Liu B, Jiang Z, Jiang Y.* Reduced Numbers of Regulatory B Cells are Negatively Correlated With Disease Activity in Patients With New-Onset rheumatoid Arthritis. Clin Rheumatol. 2014;33(2):187-95. doi: 10.1007/s10067-013-2359-3.

27. *Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS.* Comparative T-Cell Responses During Pregnancy in Large Animals and Humans. Am J Reprod Immunol. 2001; 46(2):169-79. doi:10.1111/j.8755-8920.2001.460208.x.

28. *Talukdar A, Rai R, Aparna Sharma K, Rao DN, Sharma A.* Peripheral Gamma Delta T Cells Secrete Inflammatory Cytokinesin Women With Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. Cytokine. 2018;102(2):117-22. doi: 10.1016/j.cyto.2017.07.018.

29. *Стукалова О. М.* Погляди на імунологію фізіологічної вагітності та звичного невиношування. ПАГ. 2006;6:109-114.