

Н. А. Хонина, А. В. Дударева, М. А. Тихонова, О. Ю. Леплина, А. А. Останин,
Н. М. Пасман, Е. Р. Черных

НАРУШЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТОЗОМ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Муниципальная специализированная детская клиническая больница № 5, Новосибирск

В работе проведено сравнительное исследование биологической активности сыворотки крови и относительного содержания регуляторных CD4⁺CD25⁺Т-клеток в группах здоровых небеременных женщин, женщин с нормальной беременностью и беременных с гестозом. Показано, что течение физиологической беременности сопряжено с появлением в сыворотке крови супрессорной активности и двукратным увеличением относительного содержания CD4⁺CD25⁺Т-клеток. В то же время у беременных с гестозами наблюдается снижение/исчезновение супрессорной и появление воспалительной активности сыворотки крови. Причем между уровнем супрессорной и воспалительной активности выявлена обратная корреляционная связь. Относительное содержание CD4⁺CD25⁺ Т-клеток при гестозах было значимо ниже, чем при нормальной беременности, и соответствовало таковому у небеременных женщин. Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие гестоза сопряжено с нарушением механизмов активной иммуносупрессии на уровне цитокинов и регуляторных Т-клеток.

Ключевые слова: беременность, гестоз, цитокины, CD4⁺CD25⁺ Т-клетки

Согласно современным представлениям физиологическое течение беременности ассоциировано с формированием толерантности к аллоантигенам плода. Одним из механизмов индукции толерантности является активная иммуносупрессия, обусловленная изменением баланса цитокинов, продуцируемых различными типами Т-хелперных клеток (Th1, Th2, Th3). Так, установлено, что условием нормального развития беременности является переключение с Th1-клеток на Th2/Th3-клетки на местном (децидуальные лимфоциты) и системном (периферические лимфоциты) уровнях, что приводит к смещению цитокинового баланса в сторону иммуносупрессорных цитокинов (интерлейкин-4 [ИЛ-4], интерлейкин-10 [ИЛ-10], трансформирующий ростовой фактор-β [ТРФ-β]). Th2/Th3 цитокины ингибируют реакции клеточного иммунитета и стимулируют выработку антител, нейтрализующих циркулирующие аллоантигены, что способствует нормальному протеканию беременности [7, 10].

Нарушение Th1/Th2, Th3 переключения сопряжено с патологическим характером беременности. Наиболее четко это проявляется при привычном невынашивании, когда неблагоприятный исход беременности обусловлен доминированием Th1 цитокинов [7, 9]. Примером другой патологии, ассоциированной с цитокиновым дисбалансом, являются гестозы. В настоящее время осложнение беременности гестозом наблюдается в 38% случаев. Среди них у 15–25% беременных развивается преэклампсия, которая является прямой угрозой как для матери, так и для ребенка [2, 5, 14]. Однако данные, характеризующие закономерности про-

дукции Th1 и Th2/Th3 цитокинов при гестозах не столь однозначны [3, 4].

Исследованиями последних лет также продемонстрировано, что, наряду с цитокинами, посредниками активной иммуносупрессии могут выступать регуляторные Т-клетки с супрессорной активностью. В частности, важную роль в регуляции ответа на аллоантигены играют естественные супрессорные Т-клетки. Данная субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов представлена CD4⁺CD25⁺-лимфоцитами, которые характеризуются состоянием анергии и реализуют супрессор-

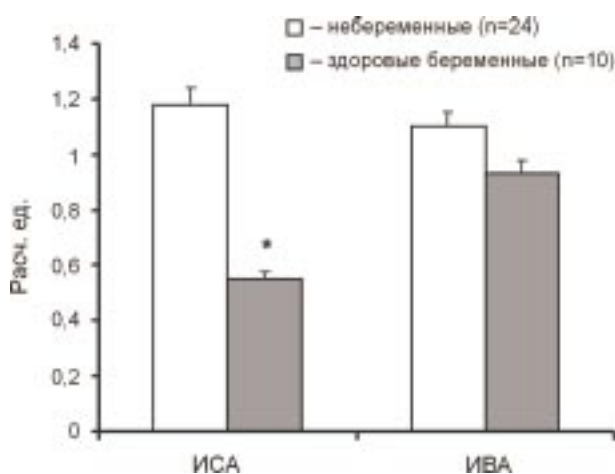


Рис 1. Показатели супрессорной и воспалительной активности (ИСА и ИВА) сыворотки крови у небеременных женщин и здоровых беременных.

* – достоверность различий; $p_{U} < 0,05$ (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни)

ное действие контакт-зависимым образом [6, 12]. CD4⁺CD25⁺T-лимфоциты активно обсуждаются в контексте ингибции трансплантационных реакций. Однако исследования их роли при нормальной и патологической беременности до сих пор не проводились.

На основании вышесказанного настоящая работа посвящена оценке баланса цитокинов и содержанию регуляторных CD4⁺CD25⁺T-клеток как эффекторных механизмов активной иммуносупрессии при физиологическом и осложненном гестозом течении беременности. Ранее нами было показано, что нарушение баланса между Th1/провоспалительными и Th2/противовоспалительными цитокинами при гнойно-септической патологии четко коррелирует с изменением биологической активности сыворотки крови. При этом интегральным показателем Th1/провоспалительных цитокинов является воспалительная активность сыворотки, которая определяется в тесте усиления продукции перекиси водорода лейкоцитами доноров, а показателем Th2/противовоспалительных цитокинов – супрессорная активность, идентифицируемая по способности сывороток ингибировать пролиферативный ответ мононуклеарных клеток доноров [1]. Данный подход в качестве простого скринингового теста планировалось использовать и для определения баланса цитокинов при беременности.

Методика. Исследования были проведены в двух группах беременных. Первую группу составили 10 женщин с нормально протекающей беременностью. Вторую группу – 16 пациенток, у которых течение беременности осложнилось развитием гестоза. У 9 из 16 беременных этой группы гестоз сочетался с урогенитальной инфекцией (УГИ). Исследуемые группы (с нормальной и осложненной гестозом беременностью) были сопоставимы по возрасту и срокам беременности

Таблица 1

Биологическая активность сыворотки крови при физиологической и осложненной гестозом беременности (M±m)

Группа	ИСА (расч. ед.)	ИВА (расч. ед.)
Здоровые беременные (n=10)	0,55±0,08	0,93±0,06
Беременные с гемостазами (n=16)	0,86±0,05*	1,23±0,11*
Гестоз УГИ (n=7)	1,02±0,17*	1,42±0,19*
Гестоз + УГИ (n=9)	0,69±0,06#	1,14±0,08

Примечание. ИСА – индекс супрессорной активности, ИВА – индекс воспалительной активности; в скобках – количество наблюдений; * – достоверность различий по сравнению со здоровыми беременными; # – достоверность различий между группами гестоз без УГИ и в сочетании с УГИ (p_u<0,05; U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

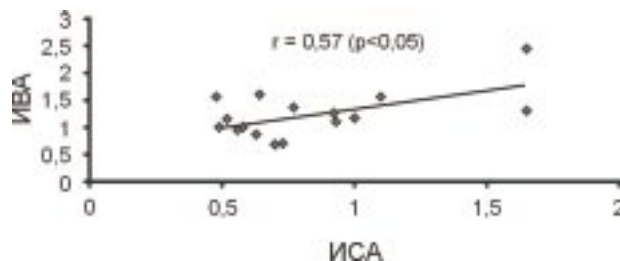


Рис. 2. Корреляционная взаимосвязь между уровнем ИСА и ИВА у беременных с гестозом. Коэффициент корреляции просчитан с помощью линейного регрессивного анализа

(возраст – 28,8 и 29,5 лет; срок беременности – 19,6 и 23,6 недель соответственно). Контрольную группу составили 24 небеременные женщины репродуктивного возраста. Забор крови для исследований у всех женщин производился после информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови стандартно в градиенте плотности фикола-верографина. Клетки в концентрации 1,0×10⁵/лунку культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы. Для стимуляции клеток использовали Конканавалин А (КонА, Sigma, США) в концентрации 15 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали радиометрически по включению 3Н-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Определение суб-

Таблица 2

CD25⁺CD4⁺ Т-клетки у здоровых небеременных женщин и при физиологическом и осложненном гестозом течении беременности (M±m)

Группы женщин	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)	Экспрессия CD25 на CD4 Т-клетках (y.e.)
Здоровые небеременные (n=24)	5,4±0,09	41,1±4,2
Здоровые беременные (n=10)	11,25±1,5#	40,9±12,5
Беременные с гестозом (n=16)	5,2±0,07*	26,6±3,9#

Примечание. Относительное количество CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и уровень экспрессии CD25 оценивали методом проточной цитометрии в популяции свежевыделенных МНК. * – достоверность различий по сравнению со здоровыми беременными; # – достоверность различий по сравнению со здоровыми небеременными (p_u<0,05; U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

популяции CD4⁺CD25⁺ Т-клеток проводили методом проточной цитометрии (FACScan, Becton Dickinson) с использованием FITS-меченных анти-CD4 антител и PE-меченных анти-CD25 антител (PharMingen, San Diego, CA). Супрессорную активность сывороток крови оценивали по их влиянию на КонА-стимулированный пролиферативный ответ МНК здоровых доноров. Индекс супрессорной активности (ИСА) рассчитывали как соотношение уровней КонА-индуцированного ответа МНК доноров в присутствии сывороток пациенток и в присутствии пулированных сывороток доноров. Воспалительную активность сывороток крови измеряли по их влиянию на уровень продукции перекиси водорода нейтрофилами здоровых доноров. Индекс воспалительной активности (ИВА) оценивали по соотношению между показателями продукции перекиси водорода в культурах клеток лейкоцитами, инкубированной с сывороткой пациенток и пулированной сывороткой доноров. ИСА ниже 1,0 и ИВА более 1,0 свидетельствовали, соответственно, о наличии супрессорной или воспалительной активности.

Результаты. Исследования, выполненные в контрольной группе, показали, что у здоровых небеременных женщин супрессорная и воспалительная активность в сыворотках крови не выявлялась (рис.1). Так, ИСА в среднем по группе составил 1,18 с диапазоном квартильных значений от 0,85 до 1,3. Аналогичным образом ИВА варьировал от 0,94 до 1,25, составляя в среднем 1,1. В отличие от контрольной группы женщины с нормально протекающей беременностью характеризовались выраженной супрессорной активностью сыворотки (ИСА $0,55 \pm 0,08$). Показатели ИСА в этой группе варьировали от 0,3 до 0,84 и не превышали нижнего порога значений, характерных для небеременных женщин. Воспалительная активность в сыворотках крови здоровых беременных подобно небеременным женщинам не выявлялась (ИВА $0,93 \pm 0,06$). Более того, у 50% беременных женщин сыворотки крови подавляли продукцию перекиси водорода, и в этом случае значения ИВА выходили за нижнюю границу нормативного диапазона небеременных женщин. Таким образом, выявленные изменения биоактивности сыворотки при физиологической беременности свидетельствуют о смещении баланса сывороточных факторов в сторону цитокинов с супрессорной активностью. Поскольку указанный факт согласуется с данными литературы о повышенном уровне в сыворотке крови беременных женщин ИЛ-10 и ТРФ- β , обладающих ингибирующим действием на митоген-индуцированную пролиферацию Т-клеток [2], можно также заключить, что оценка биологической активности сыворотки крови адекватно отражает феномен Th1/Th2,3 переключения и может быть использована в качестве скринингового метода оценки баланса цитокинов при беременности.

Исследования биоактивности сыворотки при гестозах выявили выраженное ослабление супрессорной активности по сравнению с нормальной беременностью (табл. 1). При этом у 6 из 16 женщин (37,5%) супрессорная активность вообще не регистрировалась (ИСА $0,92 - 1,65$ расч. ед.), а в оставшихся 10 случаях ИСА варьировал от 0,52 до 0,77. Наряду со снижением супрессорной активности, у 44% обследуемых женщин (7/16) отмечалось появление в сыворотке воспалительной активности (ИВА $1,25 - 2,45$ расч. ед.). В результате в целом по группе беременных с гестозом ИВА значительно превышал аналогичный показатель при нормальной беременности.

Следует отметить, что 9 из 16 обследованных женщин с гестозом имели урогенитальную инфекцию. Поскольку наличие инфекции может способствовать активации Th1/провоспалительных цитокинов, оставалось неясным, чем в большей степени обусловлено изменение цитокинового баланса – гестозом или сопутствующей инфекцией. Анализ пациенток с гестозом без сопутствующей УГИ показал, что их сыворотки характеризуются достоверным ослаблением супрессорной и усилением воспалительной активности. В то же время в подгруппе женщин с УГИ супрессорная активность сохранялась, хотя была выражена в несколько меньшей степени, чем при нормальной беременности. Следовательно, сдвиг баланса в сторону Th1/провоспалительных цитокинов при осложненной беременности в большей степени обусловлен наличием гестоза, чем сопутствующей инфекцией.

Характерно, что между ИСА и ИВА в группе женщин с гестозом выявлялась прямая корреляционная связь (рис. 2). Так, именно у пациенток с отсутствием супрессорной активности воспалительная активность наиболее выражена. Поскольку Th1/провоспалительные и Th2, 3/противовоспалительные цитокины относятся к функционально оппозитным группам медиаторов, полученный факт еще раз доказывает адекватность определения показателей биологической активности сыворотки крови для оценки баланса цитокинов при нормальной и патологической беременности.

Важно отметить, что, наряду с цитокинами, активная иммуносупрессия может опосредоваться регуляторными Т-клетками с супрессорной активностью. Поэтому на следующем этапе было проанализировано количество CD4⁺CD25⁺Т-клеток и уровень экспрессии CD25 на CD4⁺Т-клетках. Как следует из данных табл. 2, у здоровых небеременных женщин относительное содержание CD4⁺CD25⁺ Т-клеток варьировало от 2 до 9% и составляло в среднем $5,4 \pm 0,09\%$, что согласно данным литературы соответствует уровню этих клеток в периферической крови здоровых доноров [6]. При физиологической беременности содержание CD4⁺CD25⁺Т-клеток увеличивалось более чем в два раза. Причем у 9 из 10 женщин относительное

содержание CD4⁺CD25⁺T-клеток превышало верхнюю границу нормативных значений в группе небеременных женщин. В противоположность физиологической беременности при гестозах увеличения CD4⁺CD25⁺ T-клеток не наблюдалось. Поэтому относительное содержание регуляторных клеток в этой группе было достоверно ниже, чем у женщин с нормальной беременностью. Кроме того, при гестозах отмечались тенденция к снижению уровня экспрессии CD25 молекул на CD4⁺T-клетках по сравнению с физиологической беременностью и достоверное снижение этого показателя по сравнению с небеременными женщинами. Таким образом, нами впервые показано, что физиологическая беременность сопряжена не только с изменением баланса цитокинов, но и с увеличением в циркуляции регуляторных T-клеток с супрессорной активностью. Причем возрастание численности CD4⁺CD25⁺T-клеток характерно именно для физиологической беременности и не регистрируется при беременности, осложненной гестозом как в изолированном виде, так и в сочетании с УГИ (данные не представлены). Известно, что генерация регуляторных T-клеток усиливается под действием иммуносупрессорных цитокинов [15]. Следовательно, смещение баланса в сторону Th2/Th3 цитокинов при нормальной беременности может быть одним из факторов, способствующих генерации CD4⁺CD25⁺T-клеток. Действительно, между уровнем супрессорной активности сыворотки крови и относительным содержанием CD4⁺CD25⁺T-клеток при нормальной беременности выявлялась прямая корреляционная связь ($r=0,59$).

Суммируя полученные в целом данные, можно заключить, что выявленные нами изменения биоактивности сыворотки крови при нормальной беременности являются отражением изменения цитокинового баланса и, соответственно, определение интегральных индексов супрессорной и воспалительной активности может использоваться в качестве дополнительного скринингового теста при оценке характера течения беременности. Исследования при гестозах свидетельствуют о существенном нарушении баланса цитокинов, характерного для физиологической беременности. В большинстве случаев отмечается доминирование Th1 цитокинов [3]. В то же время имеются указания на сопряженность гипертензии и преэклампсии с повышенным уровнем как Th1, так и Th2 [11], а также чрезмерной продукцией Th2/Th3 цитокинов [4]. Проведенные нами исследования показали, что в целом по группе у беременных с гестозом происходит резкое ослабление супрессорной активности и у половины женщин в сыворотке крови появляется воспалительная активность, что косвенно указы-

вает на доминирование Th1-клеток. При этом нами установлено, что именно гестоз, а не сопутствующая УГИ является причиной снижения супрессорной активности сыворотки крови. В то же время при УГИ супрессорная активность сыворотки крови сохраняется, хотя выражена в меньшей степени. Вероятно, присутствие «латентной» урогенитальной инфекции является одним из факторов, который объясняет разнонаправленный характер данных в отношении уровня цитокинов при гестозах в исследованиях других авторов.

Бесспорно, новым фактом, полученным в настоящей работе, являются данные о том, что течение физиологической беременности сопряжено с увеличением в циркуляции относительного содержания регуляторных CD4⁺CD25⁺T-клеток. Учитывая важную роль естественных супрессорных T-клеток в регуляции ответа на аллоантигены, можно полагать, что увеличение их количества является отражением еще одного механизма индукции толерантности при физиологической беременности. Характерно, что при беременности, осложненной гестозом, количество CD4⁺CD25⁺T-клеток существенно ниже, чем при нормальной беременности. Следовательно, иммунные дисфункции при гестозах проявляются не только дисбалансом цитокинов, но и недостаточностью на уровне супрессорных CD4⁺CD25⁺ T-клеток.

Согласно данным литературы преобладание активности Th1/провоспалительных цитокинов предшествует клинической манифестации гестоза. Так, Nakabayshi M. с соавторами показали, что у женщин с повышенным во втором триместре уровнем провоспалительных цитокинов впоследствии развивается преэклампсия [8]. Таким образом, изменения в цитокиновом балансе предшествуют развитию преэклампсии и могут служить прогностическим критерием. Что касается прогностической значимости регуляторных T-клеток – этот вопрос требует дальнейших исследований. Имеющиеся на сегодняшний день данные о регуляции и генерации CD4⁺CD25⁺T-клеток позволяют рассматривать их как потенциальные эффекторные клетки для проведения адоптивной иммунотерапии, направленной на регуляцию трансплантационных реакций [13]. С этих позиций исследование CD4⁺CD25⁺T-клеток при беременности может представлять большой интерес в плане обоснования новых стратегий иммунотерапии при патологии беременности.

DEFECT OF ACTIVE IMMUNOSUPPRESSION IN PREGNANCY-INDUCED HYPERTENSION

N.A. Honina, A.V. Dudareva, M.A. Tichonova,
O.Yu. Leplina, A.A. Ostanin, N.M. Pasman, E.R. Chernykh

* Работа поддержана РГНФ. Грант - 01-06-66004а/Т

The serum bioactivity and amount of CD4⁺CD25⁺T-cells in non-pregnancy women and in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension have been investigated. The normal pregnancy was shown to accompanied with appearance of serum suppressive activity and 2-fold increase of CD4⁺CD25⁺T-cells. At the same time the development of pregnancy-induced hypertension resulted in decrease/disappearance of suppressive and increases of inflammatory serum activity. Moreover the reverse correlation between the serum suppressive and inflammatory activity was revealed. The percentage of CD4⁺CD25⁺T-cells in pregnancy-induced hypertension was decreased in compare with normal pregnancy and did not differ from the that in non-pregnancy women. The data received indicate the development of pregnancy-induced hypertension is associated with defect of active immunosuppression, mediated by cytokines and regulatory T cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Останин А.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1. № 1. С. 38–45.
2. Пасман Н.М., Бородин Ю.И., Черных Е.Р. и др. // Бюл. СО РАМН. 1998. № 2. С. 54–56.
3. Darmochwal-Kolarz D., Leszczynska-Gorzelak B., Rolinski J., Oleszczuk J. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1999. Vol. 86. P. 165–170.
4. Del Gobbo V., Giganti M.G., Zenobi R., Villani V., Premrov M.G. // Am. J. Reprod. Immunol. 2000. Vol. 44. P. 214–221.
5. Gaunt G., Ramin K. // Am. J. Perinatol. 2001. Vol. 18. P. 299–312.
6. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M. et al. // J. Exp. Med. 2001. Vol. 193. P. 1285–1294.
7. Makhseed M., Raghupathy R., Azizieh F. et al. // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. P. 2011–2017.
8. Nakabayashi M., Sakura M., Takeda Y., Sato K. // Am. J. Reprod. Immunol. 1998. Vol. 39. P. 329–334.
9. Raghupathy R., Makhseed M., Azizieh F. et al. // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. P. 713–718.
10. Raghupathy R. // Semin. Immunol. 2001. Vol. 13. P. 219–227.
11. Rinehart B. K., Terrone D.A., Lagoo-Deenadayalan S. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. 1999. Vol. 181. P. 915–920.
12. Taylor P.A., Noelle R.J., Blazar B.R. // J. Exp. Med. 2001. Vol. 193. P. 1311–1317.
13. Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R. // Blood. 2002. Vol. 99. P. 3493–3499.
14. Wilery A., Ski J.R., Tcharzewski H., Owaska E. // Mediators Inflamm. 2002. Vol. 11. P. 105–111.
15. Yamagiwa S., Gray J.D., Hashimoto S., Horwitz D.A. // J. Immunol. 2001. Vol. 166. P. 7282–7289.