

УДК 618.36.396. 612.017

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТ ПОСЛЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ ОТСЛОЙКИ

О. С. Гребнева^{1*}, М. Ю. Зильбер²

¹ Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург,

² Медицинский центр сети «Медикал Консалтинг Групп», г. Москва, Российская Федерация

PECULIARITIES OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN PLACENTAS AFTER PREMATURE DETACHMENT

O. S. Grebneva^{1*}, M. Yu. Zilber²

¹ Ural State Medical University, Ekaterinburg,

² Medical Center "Medical Consulting Group", Moscow, Russian Federation

Цель. Оценить особенности экспрессии CD20+, CD4+, CD8+, CD56+ в плацентах после преждевременной отслойки.

Материалы и методы. Гистологический материал плацент был разделен на четыре группы. Первая группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 22 до 27 недель. Вторая группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 28 до 36 недель. Третья группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 37 до 42 недель. Четвертая группа, группа контроля ($n = 15$) – плаценты условно здоровых женщин, беременность и роды которых протекали без осложнений. Иммуногистохимическое исследование включало определение экспрессии CD20 (клон L26), CD56 (клон 123C3), CD 8 (клон LT8), CD 4 (клон W3/25).

Результаты. При анализе экспрессии кластера дифференцировки CD20+ (В-лимфоцитов) в плацентах после преждевременной отслойки достоверно чаще определяется увеличение их количества в первой и второй группах. В проведенном нами исследовании наблюдается статистически достоверное отличие экспрессии кластера дифференцировки CD4+ плацент женщин, беременность которых закончилась преждевременной отслойкой плаценты в срок гестации от 27 до 36 недель ($19,2 \pm 2,4$). В группе женщин, беременность которых закончилась преждевременной отслойкой плаценты в срок гестации от 37 недель и более, данный показатель равен $3,2 \pm 1,1$, что достоверно отличается от группы условно здоровых женщин. Обращает на себя внимание, что в плацентах после преждевременной отслойки в срок гестации от 28 до 36 недель значительно превышен индекс CD4/CD8 до 5,33 за счет увеличения Т-хелперов, тогда как в других случаях он составляет 0,75.

Выводы. Независимо от патогенетических аспектов, предрасполагающих к преждевременной отслойке плаценты, во всех плацентах женщин с данной патологией увеличивается число НК-клеток: $4,8 \pm 1,73$ в первой группе; $4,8 \pm 1,2$ – во второй; $6,4 \pm 1,4$ – в третьей; $1,4 \pm 0,6$ – в группе контроля. В первой и второй группах достоверно более усилена экспрессия CD20+: $3,6 \pm 1,73$ и $3,3 \pm 1,1$ соответственно ($1,0 \pm 0,66$ в третьей группе и $0,8 \pm 1,06$ в группе контроля). В плацентах второй группы статистически достоверно

© Гребнева О. С., Зильбер М. Ю., 2015

e-mail: aspirant-gkb24@mail.ru

тел. 8 922 218 34 28

[Гребнева О. С. (*контактное лицо) – аспирант кафедры акушерства и гинекологии; Зильбер М. Ю. – доктор медицинских наук, профессор].

усилена экспрессия кластера дифференцировки CD4+: $19,2 \pm 2,4$ по сравнению с первой, третьей и четвертой группами ($3,1 \pm 0,6$; $2,4 \pm 0,53$ и $4,6 \pm 1,7$ соответственно).

Ключевые слова. Плацента, отслойка плаценты, кластеры дифференцировки, CD20+, CD4+, CD 8+, CD56+.

Aim. To assess the peculiarities of CD20+, CD4+, CD8+, CD56+ expression in placentas after premature detachment.

Materials and methods. Histological material of placentas was divided into 4 groups. Group 1 ($n = 9$) – placentas after premature detachment in the gestation period from 22 to 27 weeks. Group 2 ($n = 9$) – placentas after premature detachment in the gestation period from 28 to 36 weeks. Group 3 ($n = 9$) – placentas after premature detachment in the gestation period from 37 to 42 weeks. Group 4 ($n = 15$), the control group – placentas of conditionally healthy women with uncomplicated pregnancy and labor. Immunohistochemical study included determination of CD20 (clone L26), CD56 (clone 123C3), CD8 (clone LT8), CD4 (clone W3/25) expression.

Results. While analyzing the expression of CD20+ (B-lymphocytes) differentiation cluster in placentas after premature detachment, increase in their quantity is reliably more often assessed in groups 1 and 2. In the study conducted by us, there is statistically reliable difference in the expression of CD4+ differentiation cluster in placentas of women with premature detachment of placenta in the gestation period from 27 to 36 weeks, $19,2 \pm 2,4$. In the group of women, whose pregnancy resulted in premature detachment of placenta in the gestation period beginning from 37 weeks, this parameter is equal to $3,2 \pm 1,1$ that significantly differs from the group of conditionally healthy women. It is evident that premature detachment of placentas in the gestation period from 28 to 36 weeks CD4/CD8 index is significantly elevated till 5,33 at the expense of increased T-helpers, whereas in the other cases it is 0,75.

Conclusions. 1. Irrespective of pathogenetic aspects predisposing to premature detachment of placenta, the number of NK-cells is growing in all placentas of women with this pathology: group 1 – $4,8 \pm 1,73$, group 2 – $4,8 \pm 1,2$, group 3 – $6,4 \pm 1,4$, vs control – $1,4 \pm 0,6$. In groups 1 and 2, CD20+ expression is reliably more marked: $3,6 \pm 1,73$ and $3,3 \pm 1,1$, respectively, vs $1,0 \pm 0,66$ in group 3 and $0,8 \pm 1,06$ in the control group. In placentas of group 2, expression of CD4+ differentiation cluster is statistically significantly strengthened: $19 \pm 2,4$, vs $3,1 \pm 0,6$; $2,4 \pm 0,53$ and $4,6 \pm 1,7$ in groups 1, 3 and 4, respectively.

Key words. Placenta, placental detachment, differentiation clusters, CD20+, CD4+, CD8+, CD56+.

ВВЕДЕНИЕ

Частота акушерских кровотечений колеблется от 3,5 до 13,8 % и в среднем составляет 8,5 % [3–5]. Кровотечения во время беременности возникают у 2–3 % женщин. Наиболее частые причины данного осложнения – предлежание и преждевременная отслойка плаценты [3]. По данным отечественных и зарубежных авторов, частота преждевременной отслойки плаценты различной степени тяжести колеблется от 0,05 до 3 %, данная патология является существенным фактором материнской и перинатальной заболеваемости и смертности во всем мире [4, 5, 13, 14]. Проблема патогенеза преждевременной отслойки плаценты не

может считаться окончательно решенной. В настоящее время известно, что иммунные механизмы играют крайне важную роль в развитии беременности, определяя формирование маточно-плацентарного комплекса и обеспечивая сосуществование двух семиаллогенных организмов [8]. Нарушение тех или иных звеньев в сложной цепочке иммунорегуляции ведет к возникновению патологических процессов в системе мать–плацента–плод [6]. В связи с этим вопрос об изменении иммунологического статуса в плаценте при преждевременной отслойке является актуальным.

Цель исследования – оценить особенности экспрессии CD20+, CD4+, CD8+, CD56+ в плацентах после преждевременной отслойки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногистохимическое исследование включало определение экспрессии CD20 (клон L26), CD56 (клон 123C3), CD8 (клон LT8), CD4 (клон W3/25). Для иммунологического исследования брали 6 кусочков: из центральной, парацентральной зон плаценты, а также из участка, непосредственно отслоившегося во время беременности. Размер вырезанных кусочков составлял 1,5–2,0 см³. Предварительно гистологические срезы обрабатывались в барокамере «Paskal DAKO Cytomation» в течение 10 минут при давлении 22 Па и температуре 127 °С. Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе Zeiss Ymager M (Германия). Парафиновые срезы оценивались при увеличении в 400 раз в 30 полях зрения. Количественная оценка проводилась по системе Автандолова. Полученные данные заносились в таблицу формата Microsoft Excel, Version 2003 (Microsoft Software, USA). Для статистического анализа использовалась демоверсия MedCalc. Сравнительный анализ параметрических данных между группами проводился с помощью критерия Стьюдента, непараметрических данных – Манна–Уитни. Для трех групп использовалась поправка Бонферрони.

Гистологический материал плацент был разделен на четыре группы. Первая группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 22 до 27 недель. Вторая группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 28 до 36 недель. Третья группа ($n = 9$) – плаценты после преждевременной отслойки в сроки гестации от 37 до 42 недель. Четвертая группа, группа контроля ($n = 15$) – плаценты условно здоровых женщин, беременность и роды которых протекали без осложнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе экспрессии кластера дифференцировки CD20+ (В-лимфоцитов) в плацентах после преждевременной отслойки достоверно чаще определяется увеличение их количества в первой и второй группах. В первой группе этот показатель составил $3,6 \pm 1,73$, во второй $3,3 \pm 1,1$, тогда как в третьей и четвертой группах $1,0 \pm 0,66$ и $0,8 \pm 1,06$ соответственно. По некоторым данным, В-лимфоциты в плаценте практически отсутствуют. Это связывают с синтезом ИЛ-10 тканью плаценты, оказывающим супрессорное действие на данную группу клеток. В норме число В-лимфоцитов плаценты на протяжении беременности не меняется [1, 2]. Увеличение их количества связано с антителообразующей функцией. Активация В-лимфоцитов может осуществляться двумя сигналами: связывание антигена с рецепторами В-лимфоцитов (Т-независимый ответ) и связывание В-лимфоцитов с Т-лимфоцитами (Т-зависимый ответ). К Т-независимым антигенам относят многие компоненты бактериальных патогенных микроорганизмов. Тимусзависимыми антигенами являются экзогенные и эндогенные антигены. Эндогенные антигены образуются клетками организма в ходе естественного метаболизма или в результате вирусной или внутриклеточной бактериальной инфекции, аутоантигены. Экзогенные антигены: неинфекционные чужеродные белки и белоксодержащие соединения (например, клетки плода, которые выступают в роли аллоантигена [10]), антигены и гаптены в составе пыли, пищевых продуктов, пыльцы растений, ряда лекарственных средств [8].

В проведенном нами исследовании наблюдается статистически достоверное отличие экспрессии кластера дифференцировки CD4+ плацент женщин, беременность которых закончилась преждевременной отслойкой плаценты в срок гестации от 27 до 36 недель ($19,2 \pm 2,4$). В то же время для первой

группы этот показатель равен $3,1 \pm 0,6$, для третьей – $2,4 \pm 0,53$, для группы контроля – $4,6 \pm 1,7$. Статистически достоверной разницы в экспрессии кластера дифференцировки CD8+ в первой ($3,6 \pm 1,13$) и второй ($4,1 \pm 0,7$) группах, группе контроля ($6,4 \pm 1,1$) нет. В группе женщин, беременность которых закончилась преждевременной отслойкой плаценты в срок гестации от 37 недель и более, данный показатель равен $3,2 \pm 1,1$, что достоверно отличается от группы условно здоровых женщин. Обращает на себя внимание, что в плацентах после преждевременной отслойки в срок гестации от 28 до 36 недель значительно превышен индекс CD4/CD8 до 5,33 за счет увеличения Т-хелперов, тогда как в других случаях он составляет 0,75. В норме соотношение CD4+/CD8+ составляет 0,32–1,1 [2, 7, 9, 11].

Основной функцией CD8 (цитотоксических лимфоцитов) является распознавание пептидных фрагментов чужеродных белков, встроенных в аутологичные молекулы гистосовместимости, т.е. Т-лимфоциты распознают не чужеродные клетки, а измененные клетки собственного организма [1]. Т-хелперы (CD4) распознают чужеродные антигены при их взаимодействии, в том числе антигены плода. Этот специфический иммунный ответ на отцовские антигены приводит к пролиферации и накоплению определенных клонов Т-лимфоцитов [7, 8]. Учитывая повышение экспрессии CD20 в первой группе наряду с сохранением нормального соотношения CD8/CD4, можно предположить возможность активации иммунной реакции в ответ на бактериальную инфекцию. В плацентах женщин, беременность которых прервалась в результате преждевременной отслойки плаценты в срок гестации 28–36 недель, мы видим повышение как CD20, так и CD4-лимфоцитов. Данные изменения могут свидетельствовать о срыве иммунологической толерантности матери по отношению к плоду. Эта толерантность обусловлена рядом факторов. Большую роль

играют гормоны и специфические белки плаценты. Выраженными иммунодепрессивными свойствами обладает хорионический гонадотропин, плацентарный лактоген, глюкокортикоиды, прогестерон и эстрогены, которые в возрастающем количестве вырабатываются плацентой на протяжении беременности. Кроме гормонов, подавлению реакций иммунитета материнского организма способствуют альфа-фетопротеин – белок, продуцируемый эмбриональными клетками печени, а также некоторые белки плаценты зоны беременности (альфа-2-гликопротеин и трофобластический бета-1-гликопротеид). Наличие трофобластического, а затем и плацентарного барьеров, разделяющих организм матери и плода, обуславливает выраженные защитные функции. Кроме того, трофобласт со всех сторон окружен слоем аморфного фибриноидного вещества, состоящего из мукополисахаридов. Этот слой надежно защищает плод от иммунологической агрессии организма матери [6, 9, 10, 11, 13].

Также в данном исследовании нами были проанализированы наиболее многочисленные иммунокомпетентные клетки в плаценте – NK-киллеры (CD56+). В основной группе, независимо от триместра, в котором произошла преждевременная отслойка плаценты, экспрессия CD56+ (NK-киллеры) преобладает. Так, в первой подгруппе этот показатель составил $4,8 \pm 1,73$; во второй – $4,8 \pm 1,2$; в третьей – $6,4 \pm 1,4$; в группе контроля – $1,4 \pm 0,6$. NK-клетки участвуют в имплантации, в децидуализации и признаются в качестве важных регуляторов ремоделирования спиральных артерий и поддержания децидуальной целостности. С развитием беременности они постепенно теряют цитотоксическую активность. При патологическом течении беременности они способны активно продуцировать интерферон-альфа, интерферон-гамма, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-альфа, ФНО-бета и другие медиаторы. Рядом авторов показано, что высокий уровень

ФНО-альфа и INF-гамма в зоне плацентарного ложа коррелирует с высокой частотой случаев прерывания беременности. Данные цитокины активизируют и свертывающий процесс, способствуя образованию локальных тромбов, инфарктов и некрозов. Так, некоторые авторы проводят связь между увеличением количества НК-клеток в слизистой оболочке матки и недостаточной выработкой природных стероидов. НК-клетки могут быть использованы в качестве индикатора стероидной недостаточности [10, 12].

Активизация иммунологического ответа любой этиологии (инфекционной, аутоиммунной, тромбообразование) может привести к увеличению производства провоспалительных цитокинов, которые могут стимулировать производство матричной металлопротеиназы путем активизации трофобласта и других типов клеток. Увеличение производства матричной металлопротеиназы может привести к разрушению внеклеточного матрикса и межклеточных взаимодействий, которые приводят к нарушению целостности тканей плаценты и, как результат, к преждевременной отслойке [12–14]. Полученные результаты занесены в таблицу.

Первичные иммуногистохимические данные со средними ошибками

Показатель	1-я группа (n = 9)	2-я группа (n = 9)	3-я группа (n = 9)	4-я группа (n = 15)	Достоверность p
CD20	3,6 ± ± 1,73	3,3 ± ± 1,1	1,0 ± ± 0,66	0,8 ± ± 1,06	$p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,67$
CD56	4,8 ± ± 1,73	4,8 ± ± 1,2	6,4 ± ± 1,4	1,4 ± ± 0,6	$p_{1-4} = 0,027$ $p_{2-4} = 0,014$ $p_{3-4} < 0,001$
CD8	3,6 ± ± 1,13	4,1 ± ± 0,7	3,2 ± ± 1,1	6,4 ± ± 1,1	$p_{1-4} = 0,16$ $p_{2-4} = 0,27$ $p_{3-4} = 0,036$
CD4	3,1 ± ± 0,6	19,2 ± ± 2,4	2,4 ± ± 0,53	4,6 ± ± 1,7	$p_{1-4} = 0,39$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,091$
CD4/CD8	0,75	5,33	0,75	0,7	–

Выводы

1. Независимо от патогенетических аспектов, предрасполагающих к преждевременной отслойке плаценты, во всех плацентах женщин с данной патологией увеличивается число НК-клеток: $4,8 \pm 1,73$ в первой группе, $4,8 \pm 1,2$ во второй; $6,4 \pm 1,4$ – в третьей; $1,4 \pm 0,6$ в группе контроля.

2. В первой и второй группах достоверно более усилена экспрессия CD20+: $3,6 \pm 1,73$ и $3,3 \pm 1,1$ соответственно, $1,0 \pm 0,66$ в третьей группе и $0,8 \pm 1,06$ в группе контроля.

3. В плацентах второй группы статистически достоверно усилена экспрессия кластера дифференцировки CD4+: $19,2 \pm 2,4$ против $3,1 \pm 0,6$; $2,4 \pm 0,53$ и $4,6 \pm 1,7$ в первой, третьей и четвертой группах соответственно.

Библиографический список

1. Айламазян Э.К., Полякова В.О., Кветной И.М. Функциональная морфология плаценты человека в норме и при патологии (нейроиммуноэндокринологические аспекты). СПб.: Н-Л 2012; 176.
2. Аleshкин В.А., Ложкина А.Н. Иммунология репродукции: пособие для врачей, ординаторов и научных работников. Чита 2004; 79.
3. Женская консультация: руководство / под ред. В. Е. Радзинского. 3-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа 2010; 482.
4. Жилин А.В., Слабинская Т.В., Беломестнов С.Р., Ильиных В.В. Органосохраняющая тактика при аномалиях плацентации // Здоровье женщины – здоровье нации: тезисы докладов III общероссийского научно-образовательного семинара «Репродуктивный потенциал России»: казанские чтения 2013; 128–131.
5. Замалеева Р.С., Букатина С.В., Черепанова Н.А. Новое в оценке риска развития

- кровотечений в родах. Практическая медицина 2010; 4 (43): 79–82.
6. *Иваненкова Н.И., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В.* Особенности дифференцировки Т-лимфоцитов при угрозе прерывания беременности. Мать и дитя в Кузбассе 2014; 2: 43–46.
7. *Линькова Н.С., Костылев А.В., Костючек И.Н., Полякова В.О.* Экспрессия CD8 как маркера риска невынашивания беременности у женщин с гестозом. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. Акушерство и гинекология 2009; 6: 326–331.
8. *Мешкова Р.Я.* Руководство по иммунопрофилактике для врачей: учебное пособие. Смоленск: ГМА 1998; 133.
9. *Парфенова Е.В., Камзалакова Н.И.* Иммунология беременности: методические рекомендации для обучающихся к внеаудиторной (самостоятельной) работе. Красноярск 2013; 13.
10. *Сидельникова В.М.* Эндокринология беременности в норме и при патологии. 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ 2009; 352.
11. *Соколов Д.И., Сельков С.А., Полякова В.О., Полянин А.А., Лапина Е.А., Колобов А.В., Пальцев М.А., Кветной И.М.* Нейроиммуноэндокринология плаценты: руководство по нейроиммуноэндокринологии. 2-е изд. М.: Медицина 2008; 417–442.
12. *Сухих Г.Т.* Преэклампсия. М.: ГЭОТАР-Медиа 2010; 576.
13. *Lockwood C.J., Murk W.* Progesterin and thrombin regulate tissue factor expression in human term decidua cells. The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism. 2009; 94 (6): 2164–2170.
14. *Stafford I, Michael A.* Etiology and management of hemorrhage critical care obstetrics. 1 ed. 2011; 1.6 (14): 308–326.

Материал поступил в редакцию 10.12.2014