

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

*На правах рукописи*

АРТЕМЬЕВА Ксения Александровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ  
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ПЛАЦЕНТЫ ПРИ СПОНТАННЫХ И  
МУРАМИЛДИПЕПТИД-ИНДУЦИРОВАННЫХ АБОРТАХ У МЫШЕЙ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

д.б.н., профессор М.Н. Болтовская,

д.м.н., профессор О.В. Калюжин

**Москва, 2017**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	10
1.1 Моделирование невынашивания беременности на экспериментальных животных	10
1.1.1 Структурно-функциональное сопоставление плаценты человека и мыши как обоснование для моделирования невынашивания беременности	10
1.1.2 Модели индуцированных аборт при сингенной и аллогенной беременности у мышей	18
1.1.3 Модель спонтанных аборт у мышей CBA/J x DBA/2 для исследования иммунологических механизмов невынашивания беременности	20
1.1.4 Использование модели спонтанных аборт у мышей CBA/J x DBA/2 для разработки новых подходов к профилактике и терапии иммунозависимого невынашивания беременности	26
1.2 Влияние беременности на морфофункциональное состояние органов иммунной системы у мышей	30
1.2.1 Структурно-функциональные изменения тимуса во время беременности	32
1.2.2 Структурно-функциональные изменения селезенки во время беременности	36
1.3. Роль цитокинов в развитии беременности у человека и экспериментальных животных	39
1.3.1 Баланс Th1/Th2/Th17 и T-регуляторных цитокинов в течение беременности	39
1.3.2 Цитокины с противовоспалительной активностью	42
1.3.3 Цитокины с провоспалительной активностью	48
1.4. Иммуномодуляторы-мурамилдипептиды	58
1.5. Заключение	62
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	67
2.1 Моделирование физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт	67
2.2 Гистологические и морфометрические методы	69
2.3 Культуральные методы	70
2.4 Радиоизотопный метод определения пролиферативной активности лимфоцитов селезенки <i>ex vivo</i>	70
2.5 Метод проточной цитофлюориметрии	71
2.6 Статистическая обработка результатов	71

<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	72
3.1 Частота резорбции эмбрионов при физиологической беременности, спонтанных абортах и после воздействия С7МДП в ранние сроки беременности	72
3.2 Структурно-функциональные изменения тимуса в течение беременности у мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт	76
3.3 Структурно-функциональные изменения селезенки в течение беременности у мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт	84
3.4 Спонтанная пролиферация лимфоцитов селезенки самок СВА ex vivo	90
3.5 Пролиферация лимфоцитов селезенки самок СВА в смешанной культуре лимфоцитов	91
3.6 Продукция цитокинов в течение беременности у мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт	94
3.7 Морфофункциональная характеристика плаценты у мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт	104
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	119
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	130
<b>ВЫВОДЫ</b>	132
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	133
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	134

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Беременность млекопитающих остается актуальной иммунологической проблемой, поскольку механизмы, обеспечивающие имплантацию, развитие и рост полуаллогенного эмбриона/плода, установлены далеко не полностью. Прогрессирующая беременность - сложный процесс, включающий синхронизированные молекулярные и клеточные взаимодействия между трофобластом, которые экспрессирует отцовские антигены, и иммунокомпетентными клетками матери. Материнский иммунный ответ является ключевой детерминантой успешного течения или прерывания беременности. Поскольку в норме материнская иммунная система не вызывает отторжения зародыша, беременность можно рассматривать как состояние иммунологической толерантности (иммунологическая пауза беременности). При этом материнские иммунные клетки не только не атакуют эмбрион, но даже кооперируются с трофобластом через продукцию ряда цитокинов и ростовых факторов, чтобы обеспечить уникальное иммунное окружение, которое позволяет плоду жить и развиваться в матке до момента родов. Существуют множественные системные и локальные механизмы иммунотолерантности к фетоплацентарному «трансплантату», реализующиеся в разные сроки беременности.

Однако репродуктивные возможности человека не являются высокоэффективными. По данным разных авторов, ранние потери беременности составляют от 12-15% до 20-27% клинически установленных беременностей, при этом 1-2% достигает частота привычного невынашивания (самопроизвольное прерывание беременности два и более раз подряд) [Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности (руководство для врачей) / Под ред. А.П.Милованова, О.Ф.Серовой, 2011; Kwak-Kim J. et al., 2010].

Своевременными родами без акушерской и перинатальной патологии заканчиваются меньше половины клинически установленных беременностей. Частота клинически распознаваемых спонтанных аборт в общей популяции достигает около 15-20%. Даже после успешной имплантации, в т.ч. при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, прерывается около 30% беременностей, при этом для значительной части потерь (до 40%) причина остается неустановленной. Многочисленные данные указывают на то, что ранние репродуктивные потери связаны с локальной или системной дисрегуляцией иммунной сети, в том числе с нарушением сложного специфического цитокинового равновесия, в котором соотношение Th1/Th2 цитокинов является одним из ведущих компонентов баланса [Kwak-Kim J. et al., 2010]. Главной концепцией терапии иммунозависимого невынашивания беременности является сохранение материнской

иммунотолерантности. Поиск оптимальной стратегии и тактики регуляции функциональной активности материнских иммунокомпетентных клеток, направленной на сохранение беременности, - актуальная проблема репродуктивной медицины [Zenclussen A. et al. 2005; Blois S.M., 2004; Zhou W.H. et al., 2008].

Изучение морфофункционального состояния органов иммунной системы в течение беременности у человека невозможно по этическим и медицинским причинам. Другим ограничением является отсутствие адекватных систем *in vitro*, позволяющих оценить сложные взаимодействия между трофобластом плаценты и основными типами материнских иммунных клеток. Поэтому в настоящее время для изучения физиологии беременности и патогенеза ее осложнений, разработки профилактических и терапевтических мер, направленных на сохранение беременности, широко используют экспериментальные модели *in vivo*. Функциональные исследования иммунологических аспектов репродукции часто выполняют на мышах, которые, несмотря на различия в способе имплантации бластоцисты, имеют сходные с человеком тип строения плаценты и маточно-плацентарной области, характер материнского и плодного кровообращения [Nayak N.R., Giudice L.C. 2003; Lee K.Y., DeMayo F.J., 2004]. На экспериментальных моделях показана роль материнских клеток врожденного и адаптивного иммунитета в развитии и прерывании беременности [Jin L.P. et al., 2004; Zenclussen A.C. et al., 2005; Blois S. M. et al., 2007 и др.], однако эти данные относятся, главным образом, к области иммунологии репродукции. Интерпретация результатов, полученных разными авторами, осложняется различием линий мышей и вариантов беременности (сингенная или аллогенная), объектов, методов и сроков исследования. Для дальнейшего изучения иммунологических механизмов ранних потерь беременности необходимо стандартизованное сравнительное исследование морфофункциональных изменений органов иммунной системы на моделях физиологически протекающей беременности, спонтанных аборт и иммунозависимого невынашивания, обусловленного четко определенным иммуномодулирующим триггером.

Известно, что компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий мурамилдипептид (МДП), связываясь с рецептором NOD2, запускает NF-κB сигнальный путь [Inohara N. et al., 2003; Athié-Morales V. et al., 2008] и стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов Th1-клетками и макрофагами [Калюжин О.В. с соавт., 2002, 2003, 2008]. Исходя из иммуномодулирующих свойств МДП и данных об индукции абортов после введения экзогенных цитокинов ИФН-γ и ФНО-α [Clark D. A. et al. 1998], мы предположили, что синтетический иммуномодулятор β-гептилгликозид мурамилдипептида (С7МДП) способен потенцировать резорбцию эмбрионов и, следовательно, может быть использован для моделирования иммунозависимого невынашивания беременности. Возможность модуляции

гликозидами МДП материнского иммунного ответа в направлении Th1 является перспективной для расшифровки иммунологических механизмов прерывания беременности.

### **Степень разработанности темы исследования**

На известных экспериментальных моделях аллогенной физиологической беременности, спонтанных и индуцированных абортс морфологическое исследование тимуса и селезенки у самок с низкой и высокой частотой резорбции эмбрионов не проводилось, а структура плаценты была охарактеризована фрагментарно лишь в отдельных работах [Boyson J.E. et al., 2006; Girardi G. et al., 2006; Redecha P. et al., 2009].

В связи с этим разработка оригинальной воспроизводимой модели иммунозависимого невынашивания беременности и исследование морфофункциональных изменений органов иммунной системы и плаценты, определяющих развитие или прерывание беременности являются актуальными научными задачами.

**Цель исследования** - изучение морфофункциональных изменений тимуса, селезенки и плаценты у самок мышей при физиологической беременности, высокой частоте спонтанных абортс и после воздействия иммуномодулятора  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на материнский организм в ранние сроки гестации.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить влияние  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на уровень эмбриональных потерь у самок мышей на моделях физиологической беременности ( $\text{♀СВА} \times \text{♂Valb/c}$ ) и спонтанных абортс ( $\text{♀СВА} \times \text{♂DBA/2}$ ).
2. Провести сравнительное исследование динамики морфологических изменений тимуса самок мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортс.
3. Сравнить динамику морфологических изменений селезенки самок мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортс.
4. Определить пролиферативную активность клеток селезенки самок СВА *ex vivo* и их реакцию на антигены аллогенных самцов Valb/c и DBA/2 в смешанной культуре лимфоцитов при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортс.
5. Оценить продукцию лимфоцитами селезенки самок СВА *ex vivo* цитокинов, характеризующих функцию Т-хелперов 1 типа (Th1), Th2, Th17, Т-регуляторных клеток и моноцитов/макрофагов, при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортс.

6. Охарактеризовать морфофункциональное состояние плаценты жизнеспособных плодов у самок мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортах.

**Объект и предмет исследования** – органы иммунной системы и плацента самок мышей со спонтанными и индуцированными абортами.

**Теоретической и методологической базой** диссертации послужили научные работы и методические рекомендации отечественных и зарубежных авторов в области иммунологии беременности, морфологии плаценты и органов иммунной системы экспериментальных животных.

**Информационной базой исследования** явились монографические научные источники, статьи в рецензируемых научных журналах, материалы конференций соответствующей научной тематики.

**Диссертация соответствует паспорту научной специальности** 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1,2,5,6,7.

**Научная новизна исследования:**

Впервые изучено влияние иммуномодулятора С7МДП на уровень эмбриональных потерь при физиологически протекающей аллогенной беременности (самки линии СВА, оплодотворенные самцами линии Valb/c) и беременности с высоким уровнем спонтанных аборт (самки СВА, оплодотворенные самцами DBA/2). Установлено, что введение иммуномодулятора в ранние сроки гестации втрое увеличивает частоту резорбции эмбрионов по сравнению с физиологической беременностью.

Показано, что у самок с индуцированными и потенцированными абортами по сравнению с физиологической беременностью и спонтанными абортами усиливается выраженность акцидентальной инволюции тимуса, в селезенке развивается гиперплазия Т-зависимой зоны, в плаценте жизнеспособных плодов выявляются морфологические признаки плацентарной недостаточности.

При спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах по сравнению с физиологической беременностью на 8-й день гестации ниже уровень продукции ИФН- $\gamma$  и выше - противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) и провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17). Интенсивная продукция широкого спектра провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17 ИФН- $\gamma$  ФНО- $\alpha$ ) сохраняется до 14-го дня беременности.

**Теоретическая и практическая значимость исследования:**

Полученные экспериментальные данные о морфофункциональных изменениях органов иммунной системы и продукции про- и противовоспалительных цитокинов при спонтанных,

индуцированных и потенцированных С7МДП абортах вносят существенный вклад в понимание механизмов иммунозависимого невынашивания беременности.

Разработанные оригинальные воспроизводимые модели индуцированных и потенцированных абортов могут найти применение в доклинической оценке безопасности и эффективности фармакологических средств, планируемых к применению во время беременности.

Экстраполяция на человека данных о морфофункциональном состоянии органов иммунной системы и плаценты при индуцированных абортах с учетом более длительной беременности представляет интерес для акушеров-гинекологов и аллергологов-иммунологов при выявлении иммунологических нарушений, являющихся причиной привычного невынашивания.

Данные об изменениях тимуса, селезенки и плаценты после иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности могут быть использованы в преподавании иммунологии репродукции, гистологии и цитологии в медицинских и биологических высших учебных заведениях, а также при проведении научных исследований.

#### **Методология и методы исследования:**

Методологическую и теоретическую основу исследования составили работы отечественных и зарубежных исследователей в области изучения иммунологии репродукции, вопросов функциональной морфологии органов иммунной системы и репродукции человека и животных. В работе были использованы теоретические и экспериментальные методы: общенаучные (описательный, сравнительный, моделирование, статистическая обработка), и специальные (цитологические, гистологические, морфометрические, культуральные, проточная цитофлуориметрия, радиоизотопный анализ).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Внутрибрюшинное введение иммуномодулятора  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) самкам мышей линии СВА, оплодотворенных самцами линии Balb/c, в ранние сроки гестации является воспроизводимым способом моделирования иммунозависимого невынашивания беременности с высоким уровнем эмбриональных потерь.

2. При индуцированных и потенцированных С7МДП абортах по сравнению с физиологически протекающей беременностью более выражены акцидентальная инволюция тимуса и гиперплазия Т-зависимой зоны селезенки, повышена пролиферативная активность лимфоцитов селезенки и снижена их реакция на отцовские антигены, длительно сохраняется интенсивная продукция провоспалительных цитокинов.

3. В плаценте жизнеспособных плодов у самок с абортами, индуцированными и потенцированными С7МДП, выявлены морфологические признаки плацентарной дисфункции:

истончение и прерывистость слоя гигантских клеток, снижение объемной доли плодных сосудов, увеличение трофобласта и дисциркуляторные нарушения в лабиринте.

#### **Степень достоверности и апробация работы:**

Достоверность полученных данных обусловлена достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой экспериментальной группы, воспроизводимостью результатов при повторении экспериментов, использованием адекватных методов исследования, современной приборной и программной базы, корректным статистическим анализом, критической оценкой результатов исследования в сравнении с данными современной научной литературы.

Материалы диссертации были доложены на Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2010, 2012 гг.), V Международной научно-практической конференции молодых ученых «SCIENCE4HEALTH 2013» (Москва, 2013), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014 г.), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016 г.) межлабораторной конференции ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (19 мая 2017 г.).

**Личное участие автора** заключалось в проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

#### **Публикации:**

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и 7 публикаций в сборниках и материалах конференций. Получен 1 патент на изобретение.

#### **Внедрение результатов работы:**

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры гистологии, эмбриологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Модели индуцированных и потенцированных С7МДП абортот используются в научных исследованиях лабораторий ФГБНУ «НИИ морфологии человека».

#### **Объём и структура работы:**

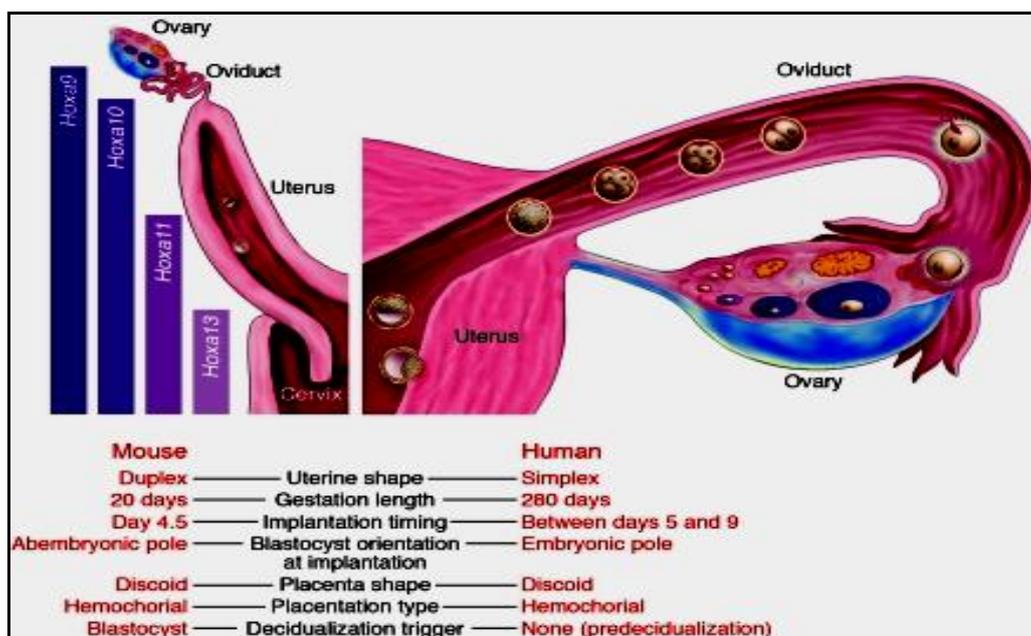
Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 226 источников, в том числе 29 российских и 197 зарубежных. Работа иллюстрирована 35 рисунками и 13 таблицами.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

#### 1.1.1 Структурно-функциональное сопоставление плаценты человека и мыши как обоснование для моделирования невынашивания беременности

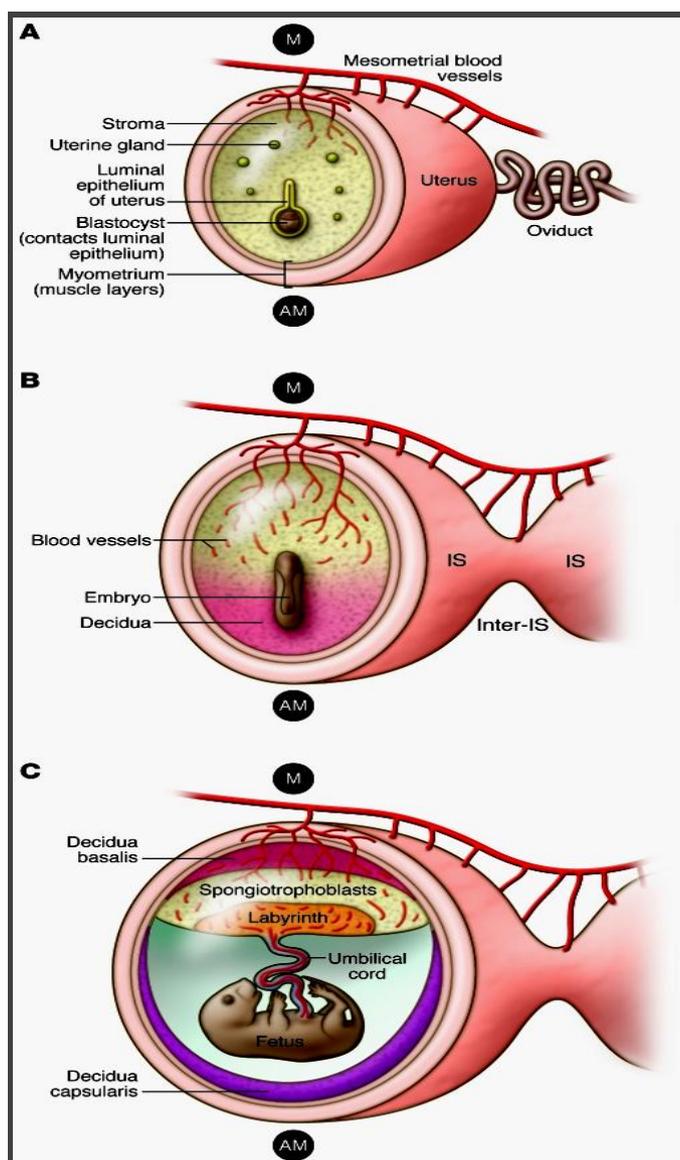
Важную роль в предупреждении материнской иммунной атаки на генетически отличный продукт зачатия играют локальные механизмы, реализующиеся на границе мать-плод, исследование которых у человека практически невозможно по этическим причинам. Исследования в области иммунологии беременности ограничивает также отсутствие адекватных систем *in vitro*, позволяющих оценить сложные взаимодействия между экстраэмбриональными структурами (трофобластом) и иммунными клетками, составляющими в I триместре беременности до 30-40% всех клеток децидуализированного эндометрия [Bulmer J. N. et al., 2010]. Поэтому для изучения физиологии беременности, патогенеза ее нарушений, разработки профилактических и терапевтических мер, направленных на сохранение беременности, широко используют экспериментальные модели на лабораторных животных. Наиболее распространенный вид млекопитающих для исследования иммунологических аспектов беременности - мышь, преимуществом которой является короткий срок гестации, многочисленное потомство, сходство с человеком механизмов развития и типа строения плаценты, возможность создания с помощью генных технологий сложных информативных моделей (трансгенные и нокаутные мыши), расширяющих знания о физиологии и патологии беременности [Malassine A. et al., 2003; Watson E.D., Cross J. C., 2005; Carter A.M., 2007; H. J. Lim, H. Wang., 2010; Giakoumopoulos M., Golos T. G., 2013]. Поскольку морфогенез плаценты и эмбриогенез человека подробно представлены в ряде монографий [Милованов А.П., 2006; Watson E.D. et al., 2005 и др.], было проведено морфофункциональное сопоставление плаценты человека и мыши как обоснование для моделирования невынашивания беременности. На рис.1 представлены сравнительные структурные и временные показатели, характеризующие беременность у человека и мыши.



**Рисунок 1. Сравнительные структурные и временные характеристики беременности у мыши и человека [по Н. J. Lim, Н. Wang, 2010]**

Топография децидуализации и плацентации у мыши представлена на рис. 2. Человек и мышь различаются по времени и механизму запуска децидуализации стромы эндометрия. У мыши децидуальная реакция инициируется имплантировавшимся эмбрионом, у человека предецидуальная реакция развивается в средней стадии секреторной фазы менструального цикла (19-23 дни) независимо от зачатия. У человека нередко наступает внематочная беременность, отсутствующая у мыши, что демонстрирует специфические различия механизмов имплантации [Н. J. Lim, Н. Wang, 2010].

Ультразвуковое исследование развития эмбриона и плаценты мыши показало, что на 5.5 день после оплодотворения (стадия эмбрионального развития E5.5) в матке выявляются ранние сайты имплантации в виде контактов трофобластической оболочки с поверхностным эпителием. На стадии E6.5 эмбрион визуализируется внутри децидуальной оболочки. На E8.5 обнаруживаются ранние признаки кардиоваскулярной активности, на E9.5 видны амниотическая оболочка, амниотическая полость и желточный мешок, мозг и сердце, на E10.5 – пуповина, хрусталик, сетчатка и стекловидное тело глаза, открытая нервная трубка, на E12.5 – структуры мозга. Длина мышинной плаценты увеличивается в период E9.5 - E16.5 в среднем с 2,85 до 6,65 мм, толщина – с 2,16 до 4,36 мм, копчиково-теменной размер эмбриона (E7.5- E14.5) – с 0,50 до 10,6 мм [Greco A., 2013].



**Рисунок 2. Схематическое изображение поперечного среза матки мыши через участок имплантации в динамике беременности**

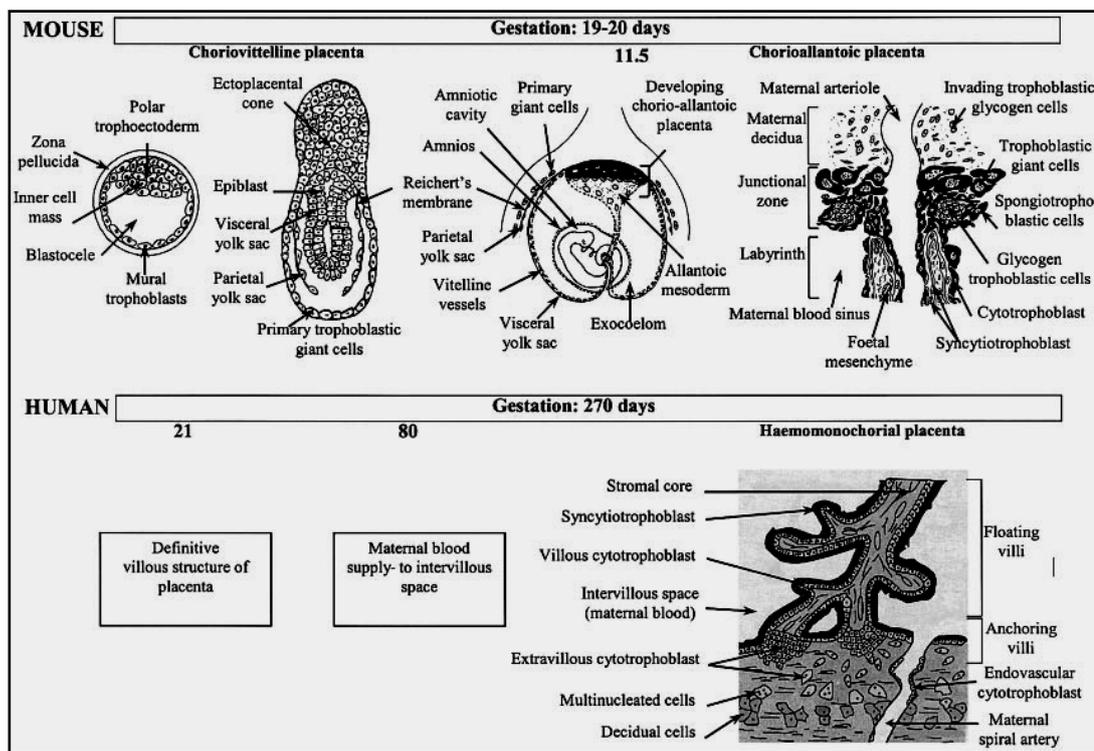
**[по Н. J. Lim, Н. Wang, J Clin Invest., 2010].**

А - 4-й день: люминальный эпителий слизистой оболочки матки окружает имплантировавшуюся бластоцисту. М – мезометриальная сторона, АМ - антимезометриальная сторона матки. Трофобласт контактирует с эпителием на антимезометриальной стороне матки, где начинается децидуальная реакция.

В - 7-ой день: эмбрион увеличивается в размерах, его эктоплацентарный конус проникает в мезометриальную зону decidua, обогащенную кровеносными сосудами. Дифференцированные децидуальные клетки располагаются в сайтах имплантации (IS), в строме между ними (Inter-IS) децидуальная реакция отсутствует.

С - 13-й день: плацента полностью сформирована, децидуальная оболочка регрессирует до тонких слоев, окружающих плаценту и эмбрион, decidua basalis и decidua capsularis, соответственно.

Плацента человека и мыши имеет дисковидную форму и гемохориальный тип строения. Увеличение площади контакта хориона с материнской кровью в плаценте человека достигается за счет разветвления ворсин (ворсинчатая гемохориальная плацента), у грызунов – путем формирования сложного лабиринта каналов (лабиринтная гемохориальная плацента) [Н. J. Lim, Н. Wang, 2010]. Схематично развитие гемохориальной плаценты человека и мыши представлено на рис. 3.



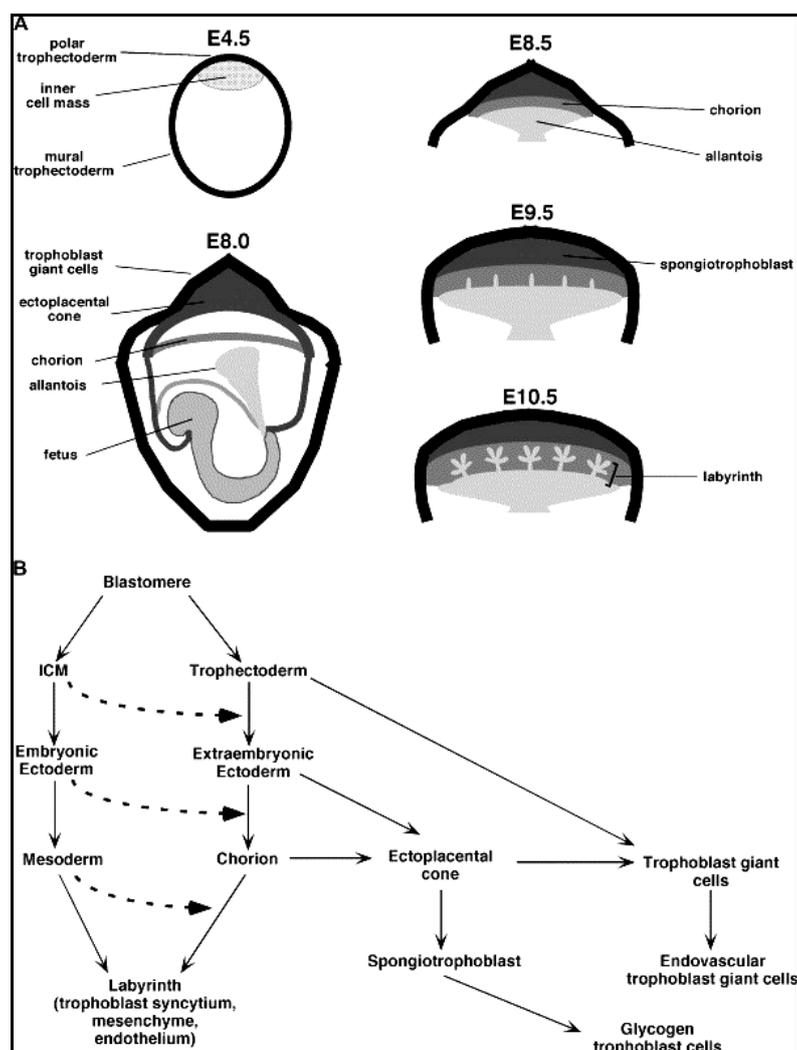
**Рисунок 3. Развитие плаценты у мыши и человека [по А. Malassine et al., Human Reproduction Update, 2003]**

У человека процесс плацентации начинается уже на 12-14 дни после оплодотворения, когда из трофобласта хориона образуются первичные ворсины. С начала 3-ей недели беременности начинают формироваться вторичные ворсины с вросшей соединительной тканью, в конце 3-й недели выявляются третичные ворсины, содержащие плодовые капилляры [А.П.Милованов, С.В.Савельев, 2006]. В отличие от человека дефинитивная структура плаценты у мыши формируется лишь к середине беременности. В течение всего срока беременности (19–20 дней) развивающаяся плацента эволюционирует от хориовителлиновой (E3.5-11.5) до хориоаллантаисной (E11.5-E20). Формирование структур плаценты начинается с 8-го дня после оплодотворения, ее развитие завершается на 11-е сутки гестации [Watson E.D., Cross J. C., 2005]. На 8-й ДГ мезодермальные клетки эмбриона мигрируют к внутренней поверхности висцеральной эндодермы и дают начало первым сосудистым клеткам, формируя примитивные вителлиновые сосуды (висцеральный желточный мешок), через который

осуществляется трофический обмен. Мезодермальные клетки образуют также аллантаоисную мезенхиму, которая развивается и начинает контактировать с хорионом эктоплацентарного конуса на 9-10 день. В хориоаллантаоисной плаценте аллантаоидная мезодерма постепенно внедряется между клетками трофобласта и превращается в сеть фетальных сосудов развивающейся лабиринтной зоны [Malassine A. et al., 2003]. В дефинитивной хориоаллантаоисной плаценте лабиринт образован трофобластическими септами, содержащими собственную пластинку, которая образуется из фетальной мезенхимы. На 12.5 день гестации дефинитивная плацента лабиринта состоит из хориальной пластинки, разветвленного лабиринта, контактной зоны (спонгиотрофобласт) и слоя гигантских клеток трофобласта (ГКТ), расположенного на границе с материнской *decidua basalis*. На 13-й день беременности начинается интерстициальная инвазия *decidua basalis* гликогеновыми клетками спонгиотрофобласта [Malassine A. et al., 2003].

В конце преимплантационного периода (E3.5) трофобласт, окружающая бластоцисту, дает начало различным типам трофобласта (рис. 4). Ко времени имплантации (E4.5) клетки наружной трофобласты, не контактирующие с внутренней клеточной массой, превращаются в ГКТ, которые прекращают деление, но сохраняют способность синтезировать ДНК (эндоредупликация) и становятся полиплоидными. ГКТ, несмотря на сходство названий, не являются аналогом многоядерных клеток трофобласта плаценты человека. Основные функции ГКТ заключаются в обеспечении процесса имплантации и инвазии эмбриона в слизистую матки, после имплантации их количество увеличивается более чем в 400 раз в течение нескольких следующих дней. Затем ГКТ становятся основными эндокринными клетками плаценты. Они начинают продуцировать цитокины, стероидные и пептидные гормоны, способствующие локальной и системной физиологической адаптации матери к состоянию беременности (регуляция материнского кровотока в сайтах имплантации, продукция прогестерона желтым телом яичников, лактогенез и гиперплазия островков поджелудочной железы) [Cross J.C., 2005; Hu D., Cross J.C., 2010].

Диплоидные клетки внутренней трофобласты, прилежащие к внутренней клеточной массе, дают начало экстраэмбриональной эктодерме, которая развивается в клетки трофобласта хориальной пластинки и лабиринта, и эктоплацентарному конусу (ЭПК), формирующему спонгиотрофобласт.



**Рисунок 4. Схема дифференцировки трофобласта мышинной плаценты [по J.C. Cross, Placenta, 2005].**

А – морфологические стадии раннего развития. В – происхождение линий трофобластических клеток [пунктирные линии – сигнальные взаимодействия, определяющие специфические направления дифференцировки]

Спонгиотрофобласт образуется на E9.5 в результате экспансии и уплощения ЭПК, что подтверждается экспрессией ЭПК-специфических генов [El-Hashash A.H.K. et al., 2010]. Располагаясь между наружным слоем ГКТ и лабиринтом, он образует средний слой плаценты и рассматривается как аналог базальной пластины плаценты человека [Dawe G.S. et al., 2007]. Функция спонгиотрофобласта точно не установлена, но, помимо структурной роли, он может препятствовать прорастанию материнских сосудов в плаценту, продуцируя ряд специфических молекул, в т.ч. антиангиогенные факторы [Cross J.C., 2005] На E12.5 день эмбрионального развития в спонгиотрофобласте появляется специализированная клеточная субпопуляция - гликогеновые клетки, количество которых увеличивается до E16.5. Из слоя

спонгиотрофобласта гликогеновые клетки внедряются в материнскую децидуальную ткань [El-Nashash A.H.K. et al., 2010]. Специфическим маркером гликогеновых клеток является протокадхерин 12 (PCDH12). Клетки накапливают гликоген, начиная с E10.5, в конце беременности (E17.5) гликогеновые клетки вступают в литическую фазу и формируют крупные лакуны. Эти лакуны, наполненные гликогеном, очевидно, являются дополнительным источником питания плода перед родами [Bouillot S. et al., 2006]. Материнский кровоток пронизывает слой спонгиотрофобласта (контактную зону) через артериальные синусы, в которых эндотелиальные клетки замещены клетками спонгиотрофобласта.

Сосудистая часть плаценты происходит из экстраэмбриональной мезодермы (аллантаоиса). На E8.5 день происходит соединение аллантаоиса и хориона, после чего начинается морфогенез лабиринта с формированием и разветвлением ворсин, обеспечивающих материнско-плодный обмен. На E9.0 день хорион начинает образовывать складки, формируя первичные ворсины, а в межворсинчатое пространство из аллантаоиса прорастают кровеносные сосуды. После завершения ремоделирования сосудов на 10.5 день гестации начинается плацентарный кровоток. Таким образом, интервал E8.5 – 10.5 является ключевым периодом беременности, во время которого у мыши формируется морфологически и функционально зрелая плацента [Zhang J. et al., 2011]. Лабиринт плаценты представлен материнскими сосудистыми лакунами и фетальными капиллярами, которые разделяет межсосудистый барьер, образованный цитотрофобластом и двумя слоями синцитиотрофобласта. Плацента достигает максимального размера на E16.5, причем зона лабиринта увеличивается быстрее и в большей степени, чем контактная зона. В лабиринте объем и поверхность материнского сосудистого пространства возрастают до E16.5, рост фетальных капилляров продолжается до E18.5 [Mayhew T.M., 2009].

Начиная с E8.5 трофобласт внутри лабиринта дифференцируется в три слоя: два слоя многоядерного синцитиотрофобласта, контактирующего с фетальным эндотелием, и слой одноядерного трофобласта, окружающего материнские синусы. Таким образом, в лабиринте плаценты мыши, в отличие от плаценты человека, материнское и фетальное кровообращение разделены тремя слоями трофобласта, такой тип развития плаценты известен как гемотрихориальная плацентация. Через двуслойный синцитиотрофобласт, составляющий основной объем лабиринта, осуществляется фетально-материнское питание и газообмен [Malassine A. et al., 2003; Watson E.D., Cross J. C., 2005]. Синцитиотрофобласт формируется путем слияния клеток трофобласта, которые выходят из клеточного цикла, и в результате синцитиотрофобласт содержит многочисленные диплоидные ядра. Дифференцировка синцитиотрофобласта не начинается до тех пор, пока аллантаоис не соединяется с хорионом на сроке E8.5, следовательно, именно молекулярные сигналы аллантаоиса инициируют

формирование синцитиотрофобласта [Cross J.C., 2005]. Таким образом, в зрелой плаценте мыши трофобласт представлен многоядерным двухслойным (в отличие от однослойного в плаценте человека) синцитиотрофобластом и одноядерным трофобластом лабиринта, компактным слоем спонгиотрофобласта и наружным слоем ГКТ. Помимо обеспечения потребностей растущего плода, трофобласт является уникальным эндокринным органом, продуцирующим многочисленные белки (пролактин-связанные белки, пролиферин, плацентарный лактоген) и цитокины [Watson E.D., Cross J. C., 2005]. Однако следует отметить, что эндокринные функции структур плаценты человека и мыши весьма различаются, что необходимо учитывать при использовании мышиных моделей беременности. Так, у человека синцитиотрофобласт, через который осуществляется материнско-плодный обмен, обладает высокой эндокринной активностью, тогда как соответствующая структура в лабиринте мыши эндокринной функции не имеет [Malassine A. et al., 2003].

Существуют доказательства наличия интерстициальной и внутрисосудистой инвазии цитотрофобласта у грызунов. Инвазия направлена к мезометриальному треугольнику – богатой сосудами области матки, обеспечивающей питание плаценты и плода, или так называемой метриальной железе, для которой характерно скопление лимфоидных клеток. Среди потенциальных регуляторов цитотрофобластической инвазии рассматриваются натуральные киллерные клетки - доминирующая популяция иммунных клеток метриальной железы [Chakraborty D. et al., 2011]. Инвазивным потенциалом в плаценте мыши обладают гликогеновые клетки спонгиотрофобласта и ГКТ, которые соответствуют цитотрофобласту наружных колонн ворсин и вневорсинчатому цитотрофобласту у человека [Krishnan L. et al., 2013]. Способность гликогеновых клеток к миграции обусловлена тем, что в отличие от других клеток плаценты и децидуальной оболочки они не экспрессируют Р-кадхерин [Bouillot S. et al., 2006]. У человека инвазия цитотрофобласта достигает трети миометрия, у мыши инвазия поверхностная и ограничена *decidua basalis*. У человека ремоделирование спиральных артерий осуществляется инвазивным цитотрофобластом, у мыши ведущую роль в этом процессе играют натуральные киллеры [Dawe G.S. et al., 2007].

Таким образом, несмотря на определенные различия в развитии и архитектонике плаценты у человека и мыши, структурно-функциональные аналогии (гемохориальный тип строения, наличие инвазивного трофобласта, осуществление материнско-плодного обмена через синцитиотрофобласт) позволяют считать мышиные модели адекватными для изучения ряда аспектов физиологии и патологии беременности у человека.

### 1.1.2 Модели индуцированных аборт при сингенной и аллогенной беременности у мышей

Известны ряд сингенных и аллогенных моделей индуцированных абортов для изучения иммунологических механизмов невынашивания беременности. Резорбция как гистосовместимых, так и гистонесовместимых (полуаллогенных) эмбрионов может быть вызвана ультразвуковым стрессом [Knackstedt M.K. et al., 2003; Friebe A. et al., 2011], введением провоспалительных Th1 цитокинов: интерлейкинов (ИЛ) -2, -12, фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) [Chaouat G. et al., 1990.; Shiraishi H. et al., 1996; Knackstedt M.K. et al., 2003; Kwak-Kim J. et al., 2010], липополисахаридами (ЛПС) *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis*, имитирующими бактериальную инфекцию, [Clark D.A. et al., 2003; Robertson S.A. et al., 2007]; синтетической двухцепочечной РНК (poly I:C), активирующей макрофаги и натуральные киллеры (НК) через Toll-3 рецептор, имитируя вирусную инфекцию [Lin Y. et al., 2005];  $\alpha$ - галактозилцерамида, активирующего НК [Boyson J. E. et al., 2006], циклофосамида [Gorivodsky M. et al, 1998].

Частота резорбции (ЧР), определяемая, как правило, на 14 день беременности, на моделях индуцированных абортов варьировала в зависимости от линии мышей, гестационного срока (ранняя беременность - 4-7 дни гестации (ДГ), средняя - 8-13 ДГ, поздняя - 14-18-й ДГ), действующего фактора, его дозы и продолжительности воздействия. Так, по данным перечисленных выше авторов, после 24-часового воздействия ультразвукового стресса на 5.5 день беременности (начало плацентации) ЧР составляла 24-38%, после введения поли (I:C) – 29-55%. Исследование динамики резорбции плодов после внутрибрюшинного введения самкам линии СЗН 0.75 мкг ЛПС на 9-й день беременности показало, что через 3 ч ЧР составляла лишь 14%, незначительно превышая уровень спонтанной резорбции (8-12%). Затем ЧР продолжала возрастать, достигая 43% через 6 ч, 70% - через 24 ч и 100% - через 48 часов после воздействия ЛПС. Резорбированные плоды были окружены участками обширных кровоизлияний и выраженной лейкоцитарной инфильтрации [Savion S. et al., 2002]. На моделях цитокин-индуцированных абортов было показано, что ИЛ-2 увеличивал ЧР до 55-76%, ИЛ-12 - до 24%, ФНО- $\alpha$  (1000 ЕД) – до 47-89%, ИФН- $\gamma$  – до 44-85%. После однократного введения циклофосамида ЧР на 12-й ДГ составляла 32.3%, а на 19-й возрастала до 80%.

Исследование абортотропного воздействия стресса показало, что оно связано с усилением продукции Th1 цитокинов. Известно, что стресс усиливает трансмукозальную миграцию бактерий-комменсалов и увеличивает проницаемость слизистой оболочки кишечника для бактериальных продуктов, следовательно, бактериальный ЛПС может быть медиатором каскада иммунных реакций, индуцируемых стрессом. Для проверки этого предположения, у самок СВА/J, оплодотворенных самцами DBA/2J и подвергнутых воздействию ультразвукового

стресса на раннем сроке беременности, блокировали TLR4 или нейтрализовали эндогенный ЛПС. Это приводило к уменьшению ЧР, предотвращало развитие воспалительных реакций в децидуальной оболочке, увеличивало количество регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о роли ЛПС в механизмах влияния стресса на беременность [Friebe A. et al., 2011].

Высокая частота резорбции эмбрионов (до 40%) достигается при моделировании у мышей невынашивания беременности аутоиммунного генеза. Антифосфолипидный синдром, который является причиной более 40% случаев привычного невынашивания и в 80% случаев приводит с осложнениям беременности и родов у человека [А.П.Милованов, О.Ф.Серова, 2011], может быть индуцирован несколькими способами: путем иммунизации животных  $\beta$ 2-гликопротеином1 - основным аутоантигеном, который повышает уровень персистирующих антифосфолипидных (АФЛ) антител [Chapman J., Shoenfeld Y., 2002], введением человеческих АФЛ антител, выделенных из сыворотки крови беременных, или моноклональных мышинных АФЛ антител [Girardi G. et al., 2011]. В исследованиях Blank M. с соавторами (2012) на мышинной экспериментальной модели была установлена роль антител против гликанов, основных компонентов поверхности клеток млекопитающих, в механизмах потери беременности при антифосфолипидном синдроме. Введение самкам Balb/c на 4-й день сингенной беременности специфических антител против углевода GalNAc- $\beta$  увеличивало ЧР на 17-й ДГ с 2.2% в контроле до 39.8%. Эксперименты *in vitro* показали, что патогенный эффект анти-GalNAc- $\beta$  антител связан со снижением инвазивной активности клеток трофобласта и уменьшением секреции металлопротеиназ MMP2 и MMP9 [Blank M. et al., 2012]

Аутоиммунный тиреоидит при сингенной беременности развивался у самок C57BL/6 после иммунизации тиреопероксидазой [Lee Y.L. et al., 2009] и у самок Balb/c, иммунизированных человеческим тиреоглобулином [Matalon S.T. et al., 2003]. Результаты скрещивания самок CBA/J (H2-k), предварительно иммунизированных мышинным тиреоглобулином, с самцами разных линий, различающихся по антигенам главного комплекса гистосовместимости (CBA/J (k), Balb/c (d), CH3/He (k), C57BL/6 (b)), показали, что выраженная резорбция плодов при беременности на фоне аутоиммунного тиреоидита происходит только у самок CBA/J, оплодотворенных самцами Balb/c. Именно при этой комбинации линий лишь у 57% самок в конце беременности сохраняются жизнеспособные плоды, тогда как при других вариантах аллогенной беременности этот показатель превышает 85%. Авторы предполагают, что потеря беременности при экспериментальном аутоиммунном тиреоидите зависит от антигенов отца [Imaizumi M. et al., 2001].

Аутоиммунно-опосредованные ранние потери беременности ассоциированы также с высоким уровнем сывороточных IgG антител против ламинина – многофункционального гликопротеина базальной мембраны, играющего важную роль в эмбриогенезе, имплантации

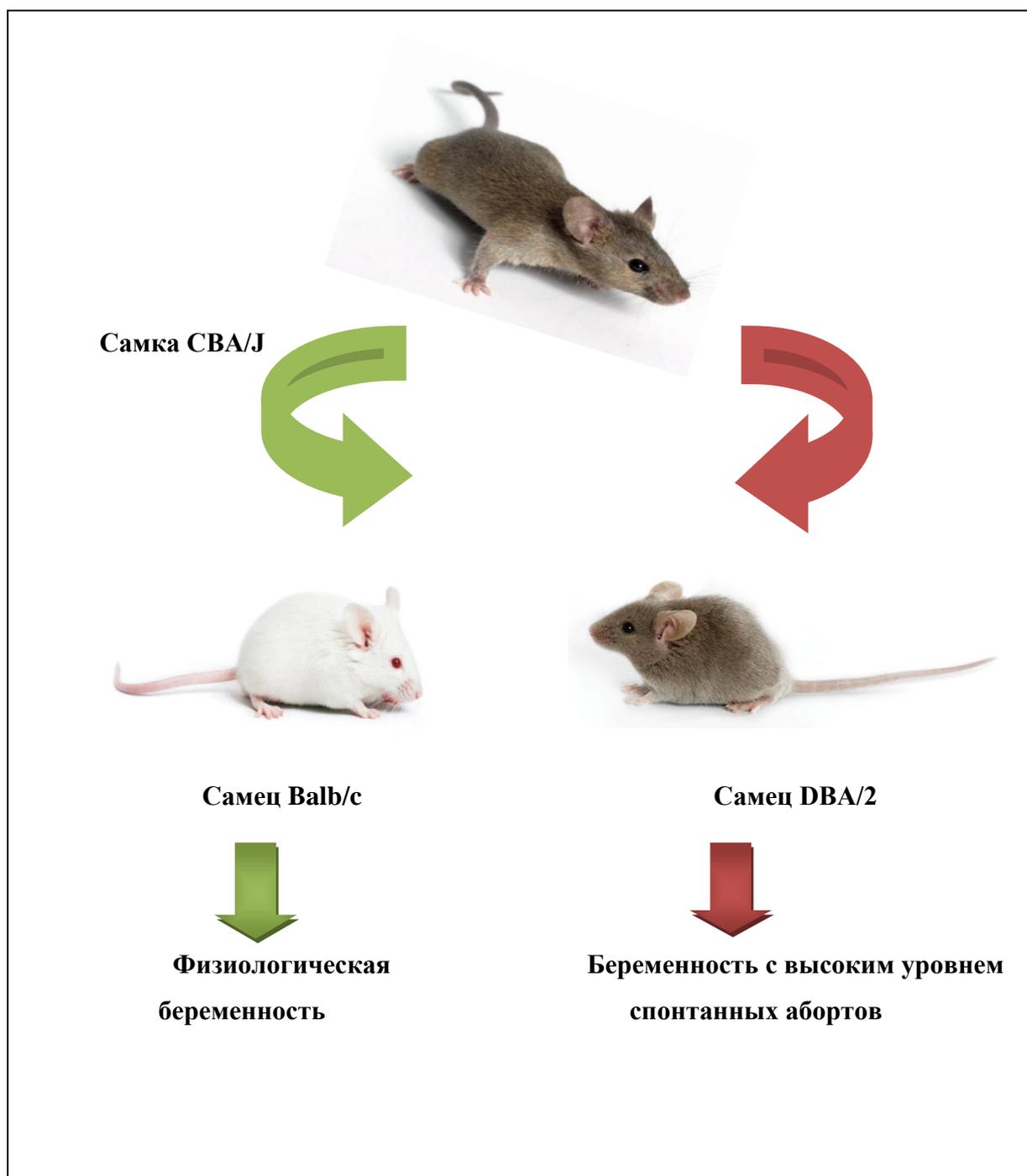
эмбриона и плацентации. На модели сингеной беременности у самок Balb/c была продемонстрирована роль антител к ламинину как причины невынашивания. Иммунизация мышинным ламинином-1 вызывала повышение титра анти-ламининовых антител, увеличивала частоту резорбции плодов до 23.8% (контроль -12.2%), уменьшала массу плаценты и плодов [Inagaki J. et al., 2005].

Несмотря на значимость экспериментальных моделей индуцированных абортс для изучения иммунологических механизмов невынашивания беременности, они не являются адекватными моделями привычной потери беременности (привычных самопроизвольных абортс) неустановленной этиологии у человека, частота которой составляет 40-60% случаев раннего прерывания гестационного процесса [А.П.Милованов, О.Ф.Серова, 2011; Kwak-Kim J. et al., 2010].

### **1.1.3 Модель спонтанных абортс у мышей CBA/J x DBA/2 для исследования иммунологических механизмов невынашивания беременности**

Наибольший интерес для изучения проблем иммунологии беременности представляет мышинная модель спонтанных абортс, наиболее близкая к привычному невынашиванию беременности неустановленной этиологии у человека [Jin L.P. et al., 2004; Redecha P. et al., 2009], в которой высокая частота эмбриональных потерь (около 30%) наблюдается при отсутствии внешних повреждающих факторс. Это достигается скрещиванием мышей-самок линии CBA/J (H-2k) с самцами линии DBA/2 (H-2d), различающимися по антигенам главного комплекса гистосовместимости (рис. 5). Именно данное сочетание линий мышей характеризуется высоким уровнем спонтанных абортс, так как при других сингенных (табл. 1) и аллогенных (табл. 2) комбинациях частота спонтанной резорбции эмбрионс, независимо от антигенс главного комплекса гистосовместимости самок и самцов, обычно не превышает 10%. Интересно отметить, что при реципрокном скрещивании самок DBA/2 с самцами CBA/J частота резорбции плодов составляет всего 6-8%, как и при других вариантах внутри- и межлинейного скрещивания [N. Kiger et al., 1985].

В качестве физиологического контроля в экспериментальных работах используются самки CBA/J, оплодотворенные самцами линии Balb/c (H-2d) с тем же антигеном главного комплекса гистосовместимости, что DBA/2 (рис. 5). В ряде исследований было установлено, что ЧР в фертильных комбинациях соответствует низкой частоте хромосомных аномалий у эмбрионс грызунов (около 6%) и, очевидно, обусловлена элиминацией плодов со структурными или количественными нарушениями хромосом [Clark D. A., et al., 1998, 2001].



**Рисунок 5. Линии мышей, используемые для моделирования физиологической беременности и беременности с высоким уровнем спонтанных аборт**

Спонтанные аборт у мышей CBA/J×DBA/2 имеют преимущественно иммунную этиологию, что показали эксперименты с иммуносупрессирующими препаратами (ципрофлоксацин, циклоспорин А), которые значительно уменьшали репродуктивные потери у мышей CBA/J×DBA/2, но не влияли на ЧР у мышей CBA× Balb/c [Savion S., et al., 2000; Du M.-R. et al., 2007].

**Таблица 1. Частота резорбции плодов при сингенной беременности у мышей линий CBA/J, DBA/2 и Balb/c**

Линии мышей (главные локусы комплекса гистосовместимости H-2)	Частота резорбции в %	Источник
Balb/c (d) x Balb/c (d)	5,8	Lin Y. et al., 2005
Balb/c (d) x Balb/c (d)	10,0	Bobé P., Kiger N., 1989
CBA/J (k) x CBA/J (k)	7,0	Imaizumi M. et al., 2001
DBA/2 (d) x DBA/2 (d)	8,5	Girardi G. et al., 2006

**Таблица 2. Частота резорбции плодов при аллогенной беременности у мышей линий CBA/J, DBA/2 и Balb/c**

Линии мышей (главные локусы комплекса гистосовместимости H-2)	Частота резорбции в %	Источник
DBA/2 (d) x CBA/J (k)	6-8	Kiger N. et al., 1985
CBA/J (k) x Balb/c (d)	13	Imaizumi M. et al., 2001
CBA/J (k) x Balb/c (d)	7	Chaouat G. et al., 1990
CBA/J (k) x CH3/He (k)	11	Imaizumi M. et al., 2001
CBA/J (k) x C57BL/6 (b)	0	Imaizumi M. et al., 2001
C3H (k) x DBA/2 (d)	5	Chaouat G. et al., 1990

Характеристика, практические и теоретические аспекты использования модели привычных спонтанных абортс у мышей CBA/J×DBA/2, широко известной за рубежом, перспективы дальнейших исследований представлены в обзоре [Bonney E.A., Brown S.A., 2014].

Исследование D. A. Clark с соавторами (1998 г.) показало, что спонтанные абортс (резорбция плодов) у мышей CBA/J x DBA/2 морфологически представляют собой отторжение полуаллогенной фетоплацентарной единицы с участием активированных НК и макрофагов, которые инфильтрируют материнскую децидуальную оболочку в участках имплантации. Выраженная лейкоцитарная инфильтрация проявлялась уже на 6.5 день беременности, т.е. спустя 2 дня после имплантации эмбрионов, на 8.5 день начиналась их резорбция. Количество зон имплантации с лейкоцитарной инфильтрацией было пропорционально проценту резорбированных эмбрионов. Резорбция характеризовалась фокальными некрозами в зонах контакта трофобласта и децидуа, инфильтрацией полиформноядерными лейкоцитами и небольшим количеством лимфоцитов в участках некроза и около крупных сосудов

децидуальной оболочки, тромбозом и геморрагией. Механизмы гибели плода до конца не выяснены. Ранее предполагалось, что клетки трофобласта, формирующие границу между эмбриональными и материнскими тканями, повреждаются или уничтожаются материнскими иммунными клетками. Однако в цитотоксических тестах *in vitro* было показано, что трофобласт устойчив к лизису при контакте с НК и макрофагами. Для уточнения механизмов резорбции имплантировавшегося эмбриона авторы использовали модель спонтанных абортс с предварительной инактивацией *in vivo* НК и макрофагов. Оказалось, что элиминация НК снижала спонтанную ЧР с 40% до 17%, инактивация макрофагов – до 25%. Однако введение самкам CBAxDBA/2 цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  или их комбинации увеличивали ЧР до уровня более 80% независимо от наличия или отсутствия функционально полноценных НК и макрофагов. Следовательно, гибель эмбриона не связана с непосредственным киллингом трофобласта НК или макрофагами, а опосредована продуцируемыми ими провоспалительными цитокинами. Было установлено, что Th1 цитокины усиливают прокоагулянтную активность эндотелия сосудов, стимулируя продукцию протромбиназы fg12, что приводит к тромбозам и ишемии плаценты. Роль fg12 как медиатора резорбции эмбрионов авторы продемонстрировали в экспериментах с ежедневным введением самкам CBAxDBA/2 нейтрализующих антител к мышьяной протромбиназе fg12, начиная с 3.5 ДГ (до начала имплантации эмбрионов). Это уменьшало спонтанную частоту резорбции с 38% до 4,5%, а ИФН- $\gamma$ + ФНО- $\alpha$ -стимулированную – с 87% до 13%. Таким образом, механизм гибели плода при спонтанных абортах сходен с механизмом ФНО- $\alpha$ -индуцированных ишемических некрозов в неантигенных опухолях [Clark D. A. et al., 1998].

Определенную роль в развитии абортс играли гранулоциты, обнаруживаемые в зонах резорбции. Введение анти-гранулоцитарных антител самкам на 6.5 день беременности уменьшало частоту спонтанной резорбции эмбрионов с 30% до 16%, а ФНО- $\alpha$ +ИФН- $\gamma$ -стимулированная резорбция уменьшалась с 86% до 14%. Предполагается, что гранулоциты участвуют в лизисе эндотелиальных клеток, активированных провоспалительными цитокинами [Clark D. A. et al., 1998].

Экспрессия эмбрионом отцовских антигенов позволяет рассматривать его как аллотрансплантат, в отторжении которого важную роль играют активированные Т- лимфоциты. Активация Т-клеток зависит от связывания Т-клеточного рецептора (TCR) со специфическим комплексом антиген-главный комплекс гистосовместимости (МНС) и костимулирующих сигналов, продуцируемых адгезионными молекулами Т-клеток и антиген-презентирующих клеток (АПК). Отсутствие костимулирующих сигналов переводит Т-клетки в состояние анергии. Наиболее важным костимулирующим путем, определяющим активированное или анергическое состояние Т клеток после стимуляции TCR, является взаимодействие молекул

CD28 и CTLA-4, экспрессированных на Т- клетках, с B7-1 и B7-2 молекулами на поверхности АПК. На модели спонтанных абортс было показано, что блокирование взаимодействия костимулирующих молекул специфическими антителами, введенными *in vivo* на 4-й день беременности, приводит к уменьшению частоты резорбции эмбрионов с 24.3% до 9.8%. Практически такое же снижение частоты резорбции (с 26.7% до 11.1%) наблюдалось после адоптивного переноса Т-лимфоцитов от беременных мышей, обработанных анти-B7 антителами, интактным беременным самкам CBAxDBA. Меченые донорские клетки обнаруживали в селезенке, дренирующих матку лимфоузлах и в маточно-плацентарной области самок-реципиентов. После адоптивного переноса у реципиентов снижалась пролиферация аллореактивных клеток, уменьшалось число ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$ -продуцирующих клеток и увеличивалось число ИЛ-10-продуцентов. Таким образом, гипореактивные к отцовским антигенам Т-лимфоциты, генерированные блокадой CD28/B7 сигнального пути, проявляли иммунорегуляторное действие на Т-клетки реципиента и предупреждали отторжение полуаллогенного плода. Авторы полагают, что данный подход может быть использован в клинике для иммунотерапии привычного невынашивания беременности [Jin L.P. et al., 2004]. Дальнейшие исследования механизмов иммунотолерантности, выполненные на данной модели той же группой авторов, показали, что уменьшение ЧР с 24 до 8 %, достигаемое блокированием CD80/CD86 костимулирующих сигнальных путей активации Т-лимфоцитов, связано с усилением функции регуляторных Т- клетки, сдвигом иммунного ответа в Th2 направлении, усилением продукции ТРФ- $\beta$  и ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1, ИАП-1) и уменьшением экспрессии MMP-9 [Jin L.P. et al., 2005; Zhao F.X. et al., 2007].

В последние годы появились многочисленные доказательства того, что ключевую роль в предупреждении иммунного отторжения плода играют регуляторные Т-клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, РТК), представляющие собой уникальную специализированную популяцию супрессорных Т-лимфоцитов, обеспечивающих периферическую толерантность. Основным органом генерации РТК является тимус, однако периферические наивные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-лимфоциты могут превращаться в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> РТК под действием ТРФ- $\beta$ . У человека в динамике беременности отмечается увеличение числа РТК в периферической крови, среди децидуальных Т-лимфоцитов РТК составляют около 14%, их число уменьшается при спонтанных абортах [Jasper M.J. et al., 2006]. У самок с высоким уровнем спонтанных абортс CBA/JxDBA/2J, в отличие от физиологической беременности у самок CBA/JxBalb/c не происходит увеличения популяции РТК в периферической крови, лимфоузлах, селезенке и тимусе, а в децидуальной оболочке количество РТК падает [Thuere C. et al., 2007]. В модельных экспериментах при сравнительном исследовании самок CBA/J x DBA/2J с высокой частотой спонтанных абортс ( $\geq 20$  %) и фертильного контроля CBA/J x Balb/c ( $\leq 1$ %) было установлено,

что физиологическая беременность характеризуется увеличением числа РТК в тимусе по сравнению с небеременными самками СВА/J, а у мышей с «невынашиванием» количество РТК в тимусе уменьшается. РТК, выделенные от небеременных самок СВА/J и самок СВА/J x Balb/c с физиологической беременностью, *in vitro* подавляли аллогенную пролиферацию лимфоцитов самок СВА/J x DBA/2J и уменьшали секрецию ИФН- $\gamma$ . Адоптивный перенос  $2 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> РТК, выделенных из тимуса и селезенки мышей СВА/J x Balb/c (фертильный контроль) на 14 день беременности, самкам СВА/J x DBA/2J на 0 и 2 дни беременности (до имплантации эмбрионов) снижал уровень спонтанных аборт. Однако введение РТК на 4-5 дни беременности (после имплантации) не уменьшало частоту резорбции, что свидетельствует о необходимости присутствия РТК в эндометрии для успешной имплантации. Адоптивный перенос РТК от небеременных самок СВА/J не влияли на спонтанную частоту резорбции, несмотря на то, что они, как и РТК самок с нормально развивающейся беременностью, накапливались в маточно-плацентарной области, о чем свидетельствовало усиление экспрессии ИЛ-10 и Foxp3. Следовательно, протективным регуляторным действием *in vivo* обладают только РТК, контактировавшие с отцовскими антигенами [Zenclussen A.C. et al., 2005].

Дальнейшее изучение механизмов действия донорских РТК на иммунную систему реципиентов показало, что после адоптивного переноса происходит увеличение популяции тимических и периферических РТК, но ожидаемого уменьшения децидуальной продукции Th1 цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  не происходит. Однако РТК от мышей с физиологической беременностью резко усиливали экспрессию молекул, необходимых для успешной имплантации эмбриона и прогрессирования беременности - фактора, ингибирующего лейкозы (leukemia inhibitory factor, LIF), ТРФ- $\beta$ , гемоксигеназы-1. Таким образом, снижение уровня резорбции эмбрионов обусловлено не уменьшением локальной продукции Th1 цитокинов, а индукцией привилегированного толерантного микроокружения на границе мать-плод [Zenclussen A.C. et al., 2006].

На данной модели установлена ранее неизвестная функция одного из основных белков беременности – хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). В экспериментах *in vitro* было показано, что ХГЧ, продуцируемый синцитиотрофобластом, является хемоаттрактантом для РТК. У женщин с привычным невынашиванием беременности обнаруживалось снижение продукции ХГЧ, ассоциированное с уменьшением числа РТК в маточно-плацентарной области [Schumacher A. et al., 2009]. Введение ХГЧ самкам СВАхDBA/2 увеличивало количество РТК *in vivo*, их иммуносупрессорную активность *in vitro* и снижало уровень спонтанных абортов. ХГЧ поддерживал толерогенный фенотип дендритных клеток. Таким образом, установлена новая роль ХГЧ как модулятора иммунотолерантности к плоду во время беременности [Schumacher A. et al., 2013].

Важную роль в наступлении и развитии беременности играют дендритные клетки (ДК) – наиболее мощные антиген-презентирующие клетки иммунной системы, необходимые как для инициации иммунного ответа, так и для индукции состояния иммунотолерантности. Было установлено, что у самок CBAxDBA децидуальные ДК обладают фенотипом зрелых ДК (высокий уровень экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II, костимулирующих молекул CD80 и ICAM1), тогда как ДК самок CBAxBalb/c с физиологической беременностью являются незрелыми. Следовательно, именно фенотипически незрелые ДК ответственны за подавление Т-клеточной реакции отторжения аллогенного плода [Blois S. M. et al., 2007]

Роль ДК в обеспечении защитного микроокружения плода была экспериментально доказана снижением высокого уровня спонтанных абортос после двукратного введения самкам CBA/J сингенных ДК, генерированных из костного мозга небеременных самок, до спаривания с самцами DBA/2J. После инокуляции интактных ДК частота резорбции уменьшалась с 24% до 2%, после введения ДК, предварительно иммунизированных клетками селезенки самцов DBA/2J, - до 5%. Терапевтический эффект ДК был обусловлен активацией иммунных клеток, обладающих регуляторной/протекторной функцией [Miranda S. et al., 2006].

#### **1.1.4 Использование модели спонтанных абортос у мышей CBA/J x DBA/2 для разработки новых подходов к профилактике и терапии иммунозависимого невынашивания беременности**

Модель спонтанных абортос у мышей CBA/J x DBA/2 в течение нескольких десятилетий используется для поиска стратегических направлений иммунотерапии раннего невынашивания беременности, потенциальных профилактических и терапевтических препаратов. Показателем эффективности воздействия, применяемого, как правило, в период имплантационного окна (4 сутки после оплодотворения) или формирования плаценты (7-9 сутки), является уменьшение частоты резорбции эмбрионов, оцениваемой на 13-14-е сутки беременности.

По мере пополнения знаний о клеточных и молекулярных механизмах иммунорегуляции беременности расширялся спектр подходов к экспериментальной иммунотерапии невынашивания. Так, в 1980-90-е годы в качестве иммуномодулирующих воздействий, уменьшавших ЧР, использовали неспецифическую иммуностимуляцию полным адьювантом Фрейнда или предварительную (до спаривания с самцами DBA/2) иммунизацию самок CBA/J лимфоцитами селезенки самцов линии Balb/c, при скрещивании с которыми наступает физиологическая беременность, [Clark D.A. et al., 1986; Toder V. et al., 1991; Baines M.G. et al., 1996].

Иммунизация отцовскими или донорскими лимфоцитами (лимфоцитоиммунотерапия) нашла клиническое применение в акушерско-гинекологической практике как

высокоэффективный метод предгравидарной подготовки и комплексного лечения привычного невынашивания, а также бесплодия, связанного с HLA-идентичностью супругов [Петросян Л.А., 2009; Велиева Э.Э., 2010].

На модели спонтанных абортов с дополнительным введением поли (I:C), повышающим частоту резорбции до 55%, была исследована возможность применения терапии высокими дозами иммуноглобулина (Ig), успешно используемой для лечения таких иммунообусловленных заболеваний как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, миастения гравис, болезнь Кавасаки, в случаях привычного невынашивания беременности неустановленной этиологии. Введение мышам препарата человеческого иммуноглобулина (Globenin-I) в режиме, близком к терапии иммуноглобулинами в клинической практике (0.8 г/кг в течение 7.5-9.5 ДГ), уменьшало экспрессию Th1 цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в плаценте и вызывало снижение ЧР до 10%. Адоптивный перенос на 7.5 день  $5 \times 10^7$  лимфоцитов селезенки от доноров - небеременных самок CBA/J, которым в течение 3 дней вводили Ig - уменьшал уровень фетальных потерь с 55% до 6%, тогда как введение лимфоцитов селезенки от интактных доноров не вызывало достоверного уменьшения ЧР (37 %). Флуоресцентно меченные донорские клетки были обнаружены как в селезенке, так и в популяции моноклеарных клеток плаценты самок-реципиентов. Авторы полагают, что эффект донорских лимфоцитов, обработанных Ig, может быть обусловлен их способностью модифицировать активность НК и макрофагов маточно-плацентарной области реципиентов [Takeda M. et al., 2007]

Ряд экспериментальных исследований был посвящен изучению эффекта и механизмов действия циклоспорина А, (ЦсА) - мощного иммуносупрессорного препарата, широко используемого в трансплантологии для предупреждения отторжения органов и для лечения ряда аутоиммунных заболеваний. Однократное введение ЦсА в дозе 5 мг/кг на 4 день беременности (период имплантации) уменьшало ЧР с 20.3 % до 2.9%. При этом ЦсА не влиял на низкую частоту резорбции у мышей CBAxValb/c, обусловленную элиминацией плодов с хромосомными аномалиями, что подтверждает иммунную этиологию резорбции эмбрионов у мышей CBA/J x DBA/2. Введение ЦсА уменьшало пролиферативный ответ спленоцитов беременных самок на отцовские клетки. Обнаружено уменьшение продукции ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$  и увеличение продукции ИЛ-4, ИЛ-10 и ТРФ- $\beta$ 2 в смешанной культуре плацентарных и децидуальных клеток, выделенных из эктоплацентарного конуса, и уменьшение продукции ИЛ-2 в селезенке. Однако при физиологической беременности у CBAxValb/c ЦсА не влиял на продукцию цитокинов. По сравнению с физиологической беременностью в селезенке самок, склонных к абортам, было меньше количество  $CD4^+CD25^+$  Т-клеток. После введения ЦсА у самок с высоким уровнем спонтанных абортов возросло количество  $CD4^+CD25^+$  Т-клеток, а

среди CD4<sup>+</sup> Т-клеточной популяции увеличивалось количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> клеток. Это указывает на то, что ЦсА вызывает экспансию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток, ответственных за формирование материнской иммунологической толерантности. Кроме того, в маточно-плацентарной области самок СВА/Ж, оплодотворенных самцами DBA/2, ЦсА снижал исходно высокую экспрессию костимулирующих молекул CD80/86 и CD28, играющих ключевую роль в антигенном и аллогенном Т-клеточном ответе, до уровня фертильного контроля СВА х Balb/c. Было также установлено, что ЦсА влияет на все типы нелимфоидных клеток тимуса, вызывая изменения микроокружения Т-клеток. ЦсА действует и на антиген-презентирующие дендритные клетки, подавляя их созревание и сохраняя толерогенный фенотип. Таким образом, терапевтический эффект ЦсА, предупреждающий материнскую иммунную атаку эмбриона, обусловлен его воздействием на клетки системы врожденного и адаптивного иммунитета, приводящим к коррекции Th1/Th2 дисбаланса, увеличению числа Т-регуляторных клеток, сохранению толерогенного фенотипа дендритных клеток, подавлению костимулирующих сигналов, вызывающих клеточный иммунный ответ. Помимо воздействия на иммунокомпетентные клетки, *in vitro* ЦсА усиливал пролиферацию и уменьшал уровень апоптоза клеток трофобласта, выделенных на 9 день беременности, что может быть еще одним механизмом протективного действия ЦсА. [Du M.-R. et al., 2007; Zhou W.-H. et al., 2008] Однако, следует отметить, что в высоких дозах 20 и 30 мг/кг ЦсА, вводимый в первые 3-7 дней беременности, увеличивал ЧР и вызывал задержку роста потомства в период полового созревания [Groth K. et al., 2010].

Существенно уменьшал уровень резорбции плодов антибиотик ципрофлоксацин, обладающий иммуномодулирующей активностью. Протективное действие может быть обусловлено усилением продукции лимфоцитами селезенки цитокинов семейства колониестимулирующих факторов - ИЛ-3 и ГМ-КСФ [Savion S. et al., 2000]. Ранее было показано, что введение ИЛ-3 и ГМ-КСФ снижало уровень резорбции в паре СВА/Ж х DBA/2 с 55% до 22% и с 47% до 8%, соответственно. Эти цитокины увеличивали массу плода и плаценты, а также зону спонгиозного трофобласта в плаценте [Chaouat G. et al., 1990].

Принципиальная возможность использования Т-регуляторных клеток для сохранения беременности была продемонстрирована в экспериментах А. Zenclussen с соавторами (2005). РТК выделяли методом магнитной иммуносепарации из смеси селезенки и тимуса небеременных самок СВА/Ж или самок СВА/Ж, оплодотворенных самцами Balb/c, на 14-день беременности, и вводили внутривенно в количестве  $2 \times 10^5$  мышам СВА/Ж × DBA/2Ж на 0, 2, 4 и 5 дни беременности. В группе СВА/Ж × DBA/2Ж ЧР составляла 18%, в группе фертильного контроля СВА/Ж × Balb/c – менее 1%. Адоптивный перенос РТК от самок с физиологической беременностью на 0 и 2 дни полностью отменял спонтанные аборт у мышей СВА/Ж × DBA/2Ж.

Однако введение РТК от самок с физиологической беременностью на 4 и 5 дни или РТК от небеременных самок не уменьшало частоту эмбриональных потерь. [Zenclussen A. C. et al., 2005].

Оригинальный подход к терапии невынашивания беременности, основанный на локальном рекрутировании РТК, был использован Clark D. A. с соавторами (2008). Ранее было установлено, что после спаривания мышей с интактными самцами в лимфоузлах, дренирующих матку, увеличивается популяция  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  РТК. Экспансии РТК не происходило после спаривания с самцами, подвергшимися вазэктомии или удалению семенных пузырьков.  $Foxp3^+$  РТК выявляли на 2-ой день беременности в лимфоузлах, а сразу после имплантации – в маточно-плацентарной области. Таким образом, контакт материнских иммунных клеток со сперматозоидами и семенной жидкостью вызывает генерацию РТК, специфичных к отцовским антигенам и обеспечивающих раннюю иммунотолерантность. [Robertson S.A. et al., 2009; Zenclussen M.L. et al, 2010].

Интравагинальное введение самкам СВА перед спариванием с самцами DBA/2 2 и 20 нг фармацевтического препарата ТРФ-β3 – одного из белков семенной жидкости, участвующего в дифференцировке  $CD4^+CD25^-$  Т-лимфоцитов в  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  РТК [Jasper M.J. et al., 2006] – достоверно уменьшало ЧР. Через 48 ч после воздействия ТРФ-beta3 возрастала клеточность вагинального экссудата, в стенке влагалища увеличивалось число  $CD11c$  дендритных клеток,  $CD3^+$  Т клеток,  $CD25^+$  и  $Foxp3^+$  Т-регуляторных клеток. Таким образом, ТРФ-β3, снижал уровень спонтанных аборт, усиливая регуляторный Т-клеточный ответ [Clark D.A. et al., 2008]. Данные указывают на перспективность использования ТРФ-β3 в клинической практике, поскольку спонтанные аборты и бесплодие неустановленной этиологии, проявляющееся как имплантационные потери и субклиническое прерывание беременности, ассоциированы с дефицитом Т-реггов в ткани эндометрия [Jasper M.J. et al., 2006].

Важную роль в формировании материнской толерантности играют дендритные клетки [ДК], присутствующие в эмбрионально-материнской области. Для оценки возможности использования ДК в терапии спонтанных аборт самкам СВА/J до спаривания дважды вводили интактные ДК, генерированные у небеременных самок, или ДК, преварительно иммунизированные лизатом клеток отцовский линии DBA/2J. Интактные ДК уменьшали ЧР с 23.8% до 2.2%, иммунные ДК – до 5%. Таким образом, сингенные ДК снижали уровень аборт, что авторы связывают с уменьшением продукции ИЛ-6 [Blois S. et al., 2004]. Эффективность терапии достоверно увеличивалась, если для адоптивного переноса использовали ДК, трансфицированные геном мембраносвязанного Fas-лиганда (mFasL), участвующего в запуске апоптоза [Zhao A. et al., 2010].

Потенциальной мишенью иммунотерапии невынашивания беременности являются селектины – адгезионные молекулы, контролирующие трансэндотелиальную миграцию Th1 клеток в очаги повреждения. На данной модели было показано, что моноклональные антитела против Р-селектина, введенные на 2 и 4 сутки беременности, уменьшают продукцию Th1 цитокинов децидуальными иммунными клетками и снижают ЧР. Данные свидетельствуют о важной роли Р-селектина в экстравазации Th1 клеток и открывают новые перспективы для терапии невынашивания беременности [Bertoja A.Z. et al., 2005].

На модели СВА x DBA/2 продемонстрирована также эффективность антиоксидантной и антикоагулянтной терапии с использованием витамина Е и низкомолекулярного гепарина (эноксапарина) [Junovich G. et al., 2010].

Потенциальными препаратами для терапии привычного невынашивания беременности могут оказаться статины, широко используемые в клинической практике для снижения уровня холестерина. Установлено, что статины подавляют активацию и пролиферацию Т-клеток и уменьшают цитотоксическую активность НК [Kwak-Kim J. et al., 2010]. На модели спонтанных абортс было показано, что внутривбрюшинные инъекции правастатина в дозе 5 мкг/мышь в течение 4-15 ДГ почти втрое снижают уровень резорбции плодов, увеличивают массу эмбрионов и новорожденных мышей [Redecha P. et al., 2009].

Таким образом, модель спонтанных абортс у мышей СВА/J x DBA/2J является чрезвычайно полезной для разработки новых направлений терапии невынашивания беременности, а также для оценки безопасности и эффективности препаратов, планируемых к использованию в течение беременности.

## **1.2 ВЛИЯНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У МЫШЕЙ**

### **1.2.1 Структурно-функциональные изменения тимуса во время беременности**

Одной из окончательно нерешенных проблем репродуктивной биологии остается вопрос, почему полуаллогенный плод не отторгается материнской иммунной системой. Предложены и проверены многочисленные объяснения этого иммунологического парадокса, включающие секвестрацию отцовских антигенов и уменьшение экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС), локальные иммунные изменения активности иммунных клеток эндометрия, сдвиг материнского иммунного ответа с Th1 к Th2. Очевидно, развитие беременности определяется множественными механизмами, реализующимися как системно, так и локально на границе мать-плод. Одной из наиболее выраженных реакций материнской иммунной системы на наступление беременности является инволюция тимуса – центрального органа иммунной системы. Инволюция тимуса во время беременности у разных видов

млекопитающих, в т.ч. у мыши, крысы и человека, давно известна и достаточно полно охарактеризована. У мышей прогрессирующее уменьшение массы и клеточности тимуса начинается с 5-го ДГ [Hegde U.C. et al., 2001]. На 18.5 ДГ масса тимуса составляет лишь 20% массы органа у небеременных самок. Инволюция имеет обратимый характер, тимус начинает увеличиваться через несколько дней после родов и восстанавливается до исходного состояния в течение 2-4 недель. Абсолютное число клеток тимуса резко уменьшается на 12.5 ДГ, продолжает снижаться до 6 суток после родов и начинает возрастать лишь с 8 дня post partum. На 14-й послеродовой день число тимоцитов достигает исходных показателей [Zoller A.L. et al., 2007]. В ряде исследований было показано, что уменьшение массы и общего числа клеток тимуса обусловлено потерей тимоцитов коркового вещества. Морфологически это проявляется в прогрессирующем сужении коркового вещества, уменьшением соотношения коркового и мозгового вещества и размыванием границы между ними. Сравнительное исследование инволюции тимуса при сингенной Balb/c x Balb/c (H-2d) и аллогенной беременности Balb/c (H-2d) x C3H/Вi (H-2k) не выявило принципиальных отличий, следовательно, инволюция тимуса не зависит от генотипа плода и не связана с иммунизацией матери отцовскими антигенами, а является ответом на само состояние беременности [Phuc L.H. et al., 1981; Maroni E.S., De Sousa M.A., 1973]. Поскольку на тимоцитах экспрессируются рецепторы эстрогена (ER), а на клетках стромы присутствуют как ER, так и рецепторы прогестерона (PR), логичным был поиск взаимосвязи между изменениями тимуса и половыми гормонами, ассоциированными с беременностью. Такие исследования выполняли на моделях с введением экзогенных эстрадиола, прогестерона или их сочетания самцам или овариоэктомизированным самкам. Было установлено, что овариоэктомия, приводящая к уменьшению концентрации эстрогенов в сыворотке крови, вызывает увеличение размеров тимуса, а после введения в течение 4-6 дней синтетического эстрогена 17 $\beta$ -эстрадиола наблюдаются морфофункциональные изменения тимуса, сходные с таковыми во время беременности. Анализ субпопуляций тимоцитов показал, что индуцированное эстрадиолом уменьшение клеточности тимуса на 80% по сравнению с контролем обусловлено истощением популяции предшественников тимоцитов в костном мозге, потерей ранних тимических прогениторных клеток в тимусе и подавлением пролиферации CD4/CD8 дважды позитивных тимоцитов. После 2- и 6-дневного введения эстрадиола, когда уровень гормона достигал физиологической концентрации во время беременности, а тимус подвергался выраженной атрофии, количество аннексин V-позитивных тимоцитов не увеличивалось, следовательно, усиления апоптотической гибели клеток не происходило. Повышения уровня апоптоза не наблюдали и после непосредственной экспозиции тимоцитов с эстрадиолом *in vitro*. Результаты свидетельствуют о том, что инволюция тимуса после действия эстрадиола не является следствием индуцированной клеточной гибели, а связана с угнетением

тимопоэза за счет специфической потери субпопуляции CD4+/CD8+ Т-клеток. Таким образом, эстроген-опосредованная инволюция тимуса обусловлена уменьшением численности тимоцитарных прогениторных клеток в костном мозге и ранних предшественников в тимусе, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов, находящихся на разных этапах селекции [Zoller A.L., Kersh G.J, 2006]. Длительное воздействие прогестерона *in vivo* также вызывало уменьшение тимуса, хотя при введении гормона самцам изменений уровня пролиферации тимоцитов и распределения их субпопуляций обнаружено не было [Zoller A.L. et al., 2007].

Для выяснения физиологического значения инволюции тимуса в адаптации материнской иммунной системы к состоянию беременности А. L. Zoller с соавторами (2007) провели детальное изучение судьбы тимоцитов в динамике сингенной беременности и в послеродовом периоде у мышей C57BL/6. Пролиферативная активность CD4/CD8 тимоцитов на всех стадиях перехода от двойных негативных к двойным позитивным уменьшалась в динамике беременности, что, очевидно, является ведущей причиной инволюции тимуса. Уже на 2-4 день после родов уровень пролиферации тимоцитов возвращался к показателям небеременных самок. Как и на модели эстрадиол-индуцированной инволюции, ни на одном сроке беременности не наблюдалось усиления процесса апоптоза в какой-либо субпопуляции CD4/CD8 тимоцитов по сравнению с небеременными самками, следовательно, инволюция тимуса не связана с клеточной гибелью. Исследование субпопуляций клеток тимуса с помощью маркеров дифференцировки, в т.ч. CD117 (c-Kit), идентифицированного как маркер наиболее ранних прогениторных клеток тимуса (earliest thymocyte progenitors, ETP), показало, что абсолютное число ETP последовательно уменьшается с 12.5 дня беременности до 6 суток после родов и начинает возрастать лишь с 8 дня. Следовательно, при наступлении беременности развитие Т-лимфоцитов в тимусе блокируется на самых ранних стадиях. ETP в тимусе пополняются циркулирующими клетками костномозгового происхождения, однако, в отличие от эстрадиол-индуцированной инволюции тимуса, состояние беременности не влияло на популяцию тимических предшественников в костном мозге. Вероятно, уменьшение количества ETP обусловлено процессами, развивающимися в самом тимусе. В то же время нельзя исключить, что при беременности нарушается хоуминг тимических костномозговых предшественников, поскольку этот процесс не изучен.

Исследование влияния беременности на процесс миграции тимоцитов в периферические лимфоидные органы показало, что тимоциты, меченные *in vivo* флуорохромом FITC, не теряли способности к хоумингу и спустя 24 ч обнаруживались в селезенке. Количественный анализ популяции меченых лимфоцитов селезенки показал, что на 18.5 день беременности их абсолютное количество уменьшается почти в 2 раза по сравнению с небеременными самками.

Подобное снижение уровня меченых лимфоцитов в селезенке наблюдалось и после 5-дневного введения экзогенного эстрадиола самцам. Таким образом, состояние беременности или эстрадиол-индуцированная инволюция тимуса уменьшают клеточную миграцию из тимуса и влияют тем самым на репертуар материнских периферических Т-лимфоцитов.

В связи с возрастающим интересом к роли Т-регуляторных клеток в репродукции была изучена взаимосвязь между изменениями тимопоэза и экспансии РТК во время беременности. На 18.5 ДГ в тимусе при уменьшении абсолютного числа  $CD4^+CD25^+$  лимфоцитов, обусловленном резким падением количества тимоцитов, наблюдалось увеличение доли  $CD4^+CD25^+$  лимфоцитов. После родов процент РТК постепенно уменьшался и возвращался к исходному уровню через 6-8 дней. Следовательно, в тимусе во время беременности увеличивается популяция РТК, ключевых участников формирования иммунотолерантности [Zoller A.L. et al., 2007].

Для изучения механизмов ингибирующего действия гормонов беременности на развитие Т-клеток было выполнено исследование на нокаутных мышах PRKO с отсутствием гена рецептора прогестерона (PR), в т.ч. в эпителиальных клетках стромы тимуса. Поскольку самки PRKO бесплодны, первоначально была исследована реакция тимуса на экзогенные половые гормоны. Овариоэктомированным мышам дикого типа и PRKO в течение 12 дней вводили эстрадиол (Эс), прогестерон (Пг) или их комбинацию. Введение Эс+Пг вызывало резкое уменьшение массы и числа клеток тимуса у нормальных мышей. У Эс+Пг-обработанных PRKO мышей масса тимуса уменьшалась только на 30%, как и при действии только Эс. Сравнительное исследование динамики возрастной инволюции тимуса у обоих типов мышей (3, 11 и 24 месяцев) не выявило существенных различий. Через 24 месяца постнатального развития тимус практически полностью атрофировался как у нормальных, так и у нокаутированных мышей, следовательно, возрастная инволюция тимуса не зависит от PR и по механизмам отличается от таковой при беременности. Изучение ранней Т-клеточной дифференцировки при PR-опосредованной потере тимоцитов показало, что у нокаутных мышей блокируется дифференцировка про-Т клеток в ранние пре-Т-клетки.

Для ответа на вопрос, каким образом связаны инволюция тимуса и фертильность, были проведены эксперименты с созданием химерных тимусов, состоящих из стромы нормальных или нокаутных мышей и нормальных тимоцитов. Химерные тимусы пересаживали тимэктомированным самкам дикого типа 129/C57 под капсулу почки. Спустя 6 недель, после заселения трансплантированной стромы тимоцитами реципиентов, самок подсаживали к вазэктомированным самцам для достижения ложной беременности, после чего в каждый рог матки переносили по 4 эмбриона мышей линии FVB, обеспечивая максимальные антигенные

различия между матерью и плодом. На 17-й ДГ определяли число живых и резорбированных эмбрионов.

Трансплантированные химерные тимусы с PR-дефицитной стромой не подвергались инволютивным изменениям в течение беременности, в отличие от тимусов с нормальной PR-экспрессирующей стромой. Частота резорбции плодов у самок с интактными и PRKO трансплантатами тимуса значительно различалась. У самок с PR-дефицитными тимусами было меньше живых плодов, больше резорбированных и не имплантировавшихся эмбрионов (доимплантационная гибель). Однако живые плоды и плаценты у обеих групп мышей гистологически не различались. Таким образом, мыши с отсутствием PR в эпителиальных клетках стромы тимуса, не чувствительного к действию прогестерона, обладали меньшей фертильностью, что доказывает физиологическую роль инволюции тимуса в сохранении беременности. [Tibbetts T. A. et al., 1999].

Тимус участвует в регуляции толерантности и предупреждении аутоиммунных реакций на нескольких уровнях.

В медуллярных эпителиальных клетках тимуса экспрессируется ген AIRE (аутоиммунный регулятор), вызывая появление широкого спектра органоспецифических антигенов нелимфоидных органов. Дифференцирующиеся Т-лимфоциты, распознающие эти антигены через Т-клеточные рецепторы, клонально элиминируются в процессе отрицательной селекции. Таким образом, еще до выхода на периферию в тимусе подвергаются гибели  $CD4^+$  и  $CD8^+T$  клетки, реактивные к собственным тканям. Ауто толерантность, обусловленную элиминацией клонов, распознающих собственные антигены, называют центральной.

Во-вторых, параллельно с развитием  $CD4^+$  и  $CD8^+$  эффекторных Т-клеток, в тимусе генерируются  $CD4^+CD25^+$  РТК. В отличие от эффекторных Т-клеток, при созревании в тимусе РТК после контакта с тканеспецифическими антигенами не элиминируются [Наkim F.T., Gress R.E., 2007]

Разнообразие периферического Т-клеточного репертуара, определяющее возможность иммунного ответа организма на нео-антигены, обеспечивается постоянным выходом из тимуса наивных Т-лимфоцитов. Острая транзиторная атрофия тимуса при беременности приводит к формированию менее разнообразного олигоклонального периферического репертуара Т-клеток и ограничивает иммунный ответ. Таким образом, гормонально-зависимое участие тимуса в формировании материнской толерантности к иммунологически чужеродному плоду проявляется в уменьшении уровня пролиферации тимоцитов, блокаде их дифференцировки на уровне ранних предшественников, подавлении миграции Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы и экспансии РТК.

Важным компонентом тимуса является ретикуло-эпителиальная строма. Эпителиальные ретикулярные клетки (ЭРК) тимуса функционально специализированы и составляют уникальную сеть, обеспечивающую иммунонейроэндокринную регуляцию тимопоэза. Помимо презентации органо- и тканеспецифических антигенов для негативной селекции тимоцитов, ЭРК секретируют тимические гормоны (тимулин, тимозин- альфа1, тимопоэтин, тимопентин), а также многочисленные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ), необходимые для разных стадий активации и дифференцировки Т-лимфоцитов. Выявлена способность ЭРК продуцировать ряд гормонов, ростовых факторов и нейропептидов. Таким образом, строма тимуса является оптимальным клеточным и гуморальным микроокружением для развития иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [Bodey B. et al., 2000].

Строма тимуса также реагирует на состояние беременности. Во время беременности у мышей наблюдаются пролиферация эпителиальных клеток мозгового слоя; усиление формирования эпителиально/timoцитарных розеток; образование эпителиальных колец, окружающих скопления тимоцитов; более выраженными становятся медуллярные интердигитирующие клетки, приобретающие фагоцитарную активность; эндоплазматический ретикулум эпителиальных клеток расширяется, что указывает на усиление секреторной активности. Эти данные опровергают общепринятое ранее представление о том, что тимус, подвергающийся инволюции во время беременности, не является активным органом иммунной системы [Kendall M.D, Clarke A.G., 2000]

Особой структурой тимуса являются тимические тельца или тельца Гассалья (ТГ) [Зайратьянц О. В., Берщанская А. М., 1998], образованные группами эпителиальных клеток в мозговом слое. Несмотря на данные об участии ТГ в созревании тимоцитов и элиминации тимоцитов, подвергшихся апоптозу, их функция долгое время оставалась неясной.

В составе ТГ обнаружены ЭРК, которые секретируют эндокринные пептиды, экспрессируют рецепторы к ТРФ-β и транскрипционные факторы, участвующие в процессах, связанных с гемопоэзом. При сканирующем электронно-микроскопическом исследовании ТГ наблюдали цитоплазматические отростки медуллярных ЭРК, непосредственно контактирующие с Т-лимфоцитами и антиген-презентирующими клетками (макрофагами, дендритными, интердигитирующими клетками). Это является доказательством того, что ТГ представляют собой важный функционально активный компонент ретикуло-эпителиальной сети тимуса, который участвует в физиологической деятельности тимуса, обеспечивая развивающиеся тимоциты паракринными и юкстакринными сигналами во время внутритимического лимфопоэза [Bodey B. et al., 2000].

В настоящее время установлено, что ТГ не только участвуют в индукции апоптоза и утилизации аутореактивных тимоцитов [Беловешкин А.Г, 2012; Douek D.C., Altmann D.M.,

2000], но играют важную роль в формировании иммунотолерантности и регуляции иммунного гомеостаза. ЭПК продуцируют тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), ИЛ-7-подобный цитокин, активирующий тимические дендритные клетки, которые, в свою очередь, индуцируют пролиферацию и дифференцировку  $CD4^+CD8^-CD25^-$  Т-клеток в  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-регуляторные клетки – уникальную специализированную популяцию Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в предупреждении иммунного отторжения плода [Калюжин О.В и др., 2003; Watanabe N. et al., 2005; Guerin L. R. et al., 2009; Hanabuchi S. et al., 2010, 2012]. Следовательно, ТГ обладают иммунорегуляторной функцией, обеспечивающей сохранение и развитие плода во время беременности.

**Заключение.** Физиологическое значение гормонально-зависимой инволюции тимуса в формировании материнской толерантности к полуаллогенному плоду заключается в уменьшении периферического репертуара Т-клеток и ограничении иммунного ответа. Это достигается за счет уменьшения численности тимических предшественников в костном мозге и ранних тимических прогениторных клеток в тимусе, снижения пролиферации тимоцитов, блокады их дифференцировки на уровне ранних предшественников, подавления миграции Т-лимфоцитов в периферические органы и экспансии Т-регуляторных клеток [Tibbetts T. A. et al., 1999; Nakim F.T., Gress R.E., 2007; Zoller A.L. et al., 2007].

Несмотря на то, что на модели спонтанных абортов при аллогенной беременности у самок СВА достаточно подробно исследованы иммунологические механизмы регулирования беременности, проведена оценка эффективности препаратов, потенциально полезных для профилактики и терапии невынашивания [Clark D.A. et al., 1998; Du M.R. et al., 2007; Redecha P. et al., 2009; Kwak-Kim J. et al., 2010], морфофункциональные особенности гестационных изменений тимуса у самок СВАхDBA/2 по сравнению с физиологической беременностью у самок СВАхBalb/c до сих пор изучены не были.

### **1.2.2 Структурно-функциональные изменения селезенки во время беременности**

Большинство исследователей, изучающей иммунорегуляторные механизмы беременности, фокусируют внимание либо на локальных иммунных процессах в матке, либо на изменениях тимуса. При этом реакция селезенки – важнейшего периферического органа иммунной системы - на состояние беременности остается мало изученной. При наступлении беременности наиболее выраженным ранним событием является инфильтрация слизистой оболочки матки макрофагами и  $\gamma\delta$ -Т клетками, что указывает на то, что материнская иммунная система прореагировала на наличие чужеродного отцовского антигена в репродуктивном тракте. Затем сенсibilизированные иммунные клетки мигрируют во вторичные лимфоидные органы, в т.ч. в селезенку. Микроокружение селезенки обеспечивает межклеточные контакты и

развитие иммунного ответа. Основными изменениями, которые происходят в селезенке беременных мышей, являются индукция Т-зависимого В-клеточного ответа на 1-й день после оплодотворения, генерация В-клеток, продуцирующих антитела (3-й ДГ), и пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, достигающая пика на 3-й день беременности. [Hegde U.C. et al., 2001]

Как сингенная, так и аллогенная беременность у мышей характеризуется транзиторной спленомегалией. Масса селезенки постепенно увеличивается и, по данным разных авторов, достигает пика на 10 - 13 дни беременности [Maroni E.S., De Sousa M.A., 1973, Hegde U.C. et al., 2001; Bustamante J.J. et al., 2008]. На 15-й день беременности отмечается максимальная численность клеток - около 300 млн, что в 2,6 раза превышает показатели вне беременности. Затем масса селезенки и количество лимфоцитов уменьшаются, и на 18-й ДГ эти показатели не отличаются от таковых у небеременных самок [Norton M.T. et al., 2009].

Детальный анализ динамики клеточных популяций селезенки при сингенной беременности у мышей C57BL/6 показал, что с 8-го ДГ начинала возрастать доля делящихся клеток, которая достигала максимума (45%) на 12-й день, сохранялась на высоком уровне до 15-го дня и снижалась до уровня контроля (небеременные одновозрастные самки) к 18-му ДГ. Усиление пролиферативной активности лимфоцитов сопровождалось снижением уровня апоптоза в сроках беременности 8-15 дней. Выявление маркера клеток эритроидного ряда (антиген TER-119, присутствующий в клетках на стадиях развития от ранних проэритробластов до зрелых эритроцитов) позволило установить, что увеличение числа клеток селезенки в первой половине беременности обусловлено резким усилением пролиферации и уменьшением клеточной гибели в популяции TER-119<sup>+</sup> клеток. Так, на 8-й ДГ доля клеток эритроидного ряда превышала показатели небеременных самок в 13 раз, уровень пролиферирующих TER-119<sup>+</sup>клеток составлял 85% на 10-й день и 72% на 18-й день беременности. На 10-18-е ДГ уровень апоптоза эритроидных клеток уменьшался в 4 раза по сравнению с контролем. Таким образом, гестационное изменение массы и клеточности селезенки происходит главным образом за счет экспансии эритроидных клеток.

На фоне увеличения эритроидного ростка на 10-й и 12-й ДГ в селезенке уменьшалось количество В-клеток с последующим восстановлением до уровня контроля (небеременные самки) на 15-й ДГ. Доля Т-клеток последовательно уменьшалась в течение ранней - средней беременности, составляя 50% контрольного уровня на 15-й день, на 18-й ДГ относительная численность популяции возвращалась к показателям небеременных самок. Для CD11b<sup>+</sup> макрофагов усиление пролиферации и уменьшение уровня апоптоза отмечали в середине беременности. В отличие от других популяций иммунокомпетентных клеток селезенки, усиление пролиферации НК наблюдалось только в ранние сроки беременности (5-й и 8-й ДГ), уровень апоптоза НК в течение беременности не менялся. Результаты показывают, что во время

беременности происходят изменения уровня пролиферации и апоптоза в популяциях клеток селезенки, динамика которых зависит от типа клеток. Экспериментальные данные о взаимодействии между популяциями лимфоцитов селезенки позволяют оценить иммунного компонента в регуляции беременности у человека. [Norton M.T. et al., 2009].

Во все сроки беременности в селезенке выявляются лимфоидные узелки с герминативными центрами, число которых варьирует [Maroni E.S., De Sousa M.A., 1973, Hegde U.C. et al., 2001]. Герминативный центр - зона, в которой зрелые В-лимфоциты, активированные антигеном, пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки или В-клетки памяти. Морфофункциональные изменения герминативных центров являются проявлением Т-зависимого В-клеточного ответа. Установлено, что РТК контролируют гомеостаз в герминативных центрах, определяя тем самым выраженность гуморального иммунного ответа. [Alexander C.M. et al., 2011].

Важной функцией лимфоцитов, связанной с развитием беременности, является продукция прогестерон-индуцируемого блокирующего фактора (PIBF) - 34-kDa белка, который подавляет активность НК и модифицирует цитокиновый баланс в сторону Th2. Введение беременным самкам Balb/c препарата RU486 (Мифепристон), блокирующего рецепторы прогестерона, приводило к увеличению частоты резорбции плодов, обусловленной неспособностью клеток селезенки продуцировать PIBF. Введение PIBF снижало высокий уровень эмбриональных потерь, индуцированный RU486 [Szekeres-Bartho J. et al. 2005].

Таким образом, селезенка играет существенную роль в адаптации материнского организма к беременности. Несмотря на существование ряда экспериментальных работ, посвященных механизмам развития спленомегалии во время беременности, морфологические исследования немногочисленны и фрагментарны. Сравнительное изучение динамики морфофункциональных изменений селезенки на мышинных моделях физиологической аллогенной беременности ( $\text{♀СВА} \times \text{♂Valb/c}$ ) и спонтанных аборт ( $\text{♀СВА} \times \text{♂DBA}$ ) не проводили.

## **1.3 РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ У ЧЕЛОВЕКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

### **1.3.1 Баланс Th1/Th2/Th17 и T-регуляторных цитокинов в течение беременности**

Сложившаяся в течение эволюционного развития репродукция млекопитающих, при которой эмбрион имплантируется в слизистую оболочку матки, создала серьезную иммунологическую проблему. С одной стороны, материнский организм должен обеспечивать питание и защиту плода от неблагоприятных факторов внешней среды, в т.ч. инфекций, с другой - непосредственный контакт генетически различных тканей на границе мать-плод делает эмбрион и трофобласт плаценты потенциальными мишенями для иммунной системы матери. Начиная с 50-х годов прошлого века, в течение многих десятилетий иммунология беременности изучалась в парадигме классической модели трансплантационного иммунитета, в которой плод и плацента рассматривались как аллотрансплантат, сохраняющийся в течение беременности из-за подавления функциональной активности иммунной системы [Mor G., Cardenas I., 2010]. Однако дальнейшее изучение биологии плаценты и развитие иммунологии, позволяющее анализировать локальные и системные механизмы иммунного ответа, создало новые фундаментальные концепции состояния иммунной системы во время беременности. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что иммунный ответ матери на развивающийся плод гораздо сложнее, чем реакция на аллотрансплантат, и присутствующие в сайте имплантации иммунокомпетентные клетки не супрессированы, а, напротив, чрезвычайно активны, причем их функция связана с регуляцией ключевых процессов беременности - имплантации, децидуализации, трофобластической инвазии, ремоделирования сосудов [Chaouat G. et al., 2004; Lee J.Y. et al., 2011; Zhang J. et al., 2011].

Основным постулатом современных представлений о роли иммунной системы во время беременности является активное фетально-материнское взаимодействие, в котором ведущую роль играют цитокины [Murphy S.P. et al., 2009; Kwak-Kim J. et al., 2010; Saito S. et al., 2010; Mor G. et al., 2011; Chen S.-J. et al., 2012].

В 1980-1990-е годы материнскую толерантность к фетальным аллоантигенам объясняли преимущественным Th2 (гуморальным) типом иммунного ответа во время беременности и супрессией Th1 (клеточного) ответа. Сдвиг Th1/Th2 баланса был особенно очевидным на границе мать-плод за счет того, что в deciduas basalis выявляли преимущественно Th2 клетки, а дендритные клетки индуцировали дифференцировку наивных T-клеток в направлении Th2. Системные изменения типа иммунного ответа при беременности были выражены в меньшей степени [Saito S. et al., 2010]. Теория Th2 доминанты базировалась на многочисленных клинических данных, согласно которым для нарушений имплантации и ряда осложнений

беременности (спонтанные аборт, привычное невынашивание, внутриутробная задержка роста плода, преэклампсия) было характерно преобладание Th1 материнского иммунного ответа [Chen S.-J. et al., 2012]. То, что выраженное долговременное преобладание провоспалительного окружения неблагоприятно для прогрессирования беременности, было показано в экспериментальных исследованиях *in vitro*, в которых установлено, что Th1 цитокины подавляют инвазию цитотрофобласта и стимулируют апоптоз трофобластических клеток, усиливают цитотоксическую активность децидуальных макрофагов. На моделях беременности у лабораторных животных установлено отрицательное влияние Th1 цитокинов на жизнеспособность и рост плода, обусловленное активацией протромбиназы fgl2 (фиброблейкин/фибриноген-подобный белок 2) - сериновой протеазы, непосредственно расщепляющий протромбин до тромбина независимо от коагуляционного каскада. Образованием тромбина, формированием тромбов и массивное отложение фибрина приводят к нарушению кровоснабжения плаценты, ее ишемическому повреждению и гибели плода [Clark D.A. et al., 1998, Lee J.Y. et al., 2011]. Определение концентрации цитокинов в смешанной культуре материнских лимфоцитов и клеток плаценты, полученных у самок CBA/J × Balb/c с физиологической беременностью и CBA/J × DBA/2 с высоким уровнем спонтанных абортов показало, что при потере беременности лимфоциты селезенки продуцируют значительно больше провоспалительных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2), чем при нормальной комбинации [Tangri S et al., 1994].

В тоже время ряд исследований продемонстрировали, что Th2 доминанта материнского иммунного ответа не является обязательным условием нормального развития беременности. Так, известны случаи привычных спонтанных абортов у женщин на фоне преобладающего Th2 ответа [Chaouat G. et al., 2003]. У самок мышей, нокаутных по Th2 генам *ИЛ-4*, *ИЛ-5*, *ИЛ-9* и *ИЛ-13* с нарушением Th2 иммунного ответа не наблюдалось нарушений фертильности как при сингенной (оплодотворение Th2-нокаутными самцами), так и при аллогенной беременности. Количество новорожденных у нокаутных Th2-дефицитных самок не отличалось от такового у интактных мышей [Ingman W. V., Jones R. L., 2008]. Более того, ряд экспериментальных исследований продемонстрировали необходимость Th1 цитокинов для становления и прогрессирования беременности. Так, при физиологической беременности у мышей ИФН- $\gamma$  играет критическую роль, обеспечивая ремоделирование спиральных артерий эндометрия, ангиогенез в имплантационных сайтах и сохранение децидуального компонента [Murphy S.P. et al., 2009]. Провоспалительные цитокины ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 индуцировали экспрессию LIF в эпителиальных и стромальных клетках эндометрия, который через рецепторы LIF обеспечивает паракринные сигналы для развития эмбриона и гравидарной перестройки эпителия слизистой оболочки матки во время имплантации [Chen S.-J. et al., 2012].

Неоднозначность представлений о роли про- и противовоспалительных цитокинов в наступлении и прогрессировании беременности, основанная на результатах клинических исследований, выполненных в разные гестационные сроки, связана с излишне упрощенным взглядом на беременность как единое иммунологическое событие. На самом деле в течение беременности человека можно выделить три иммунологические фазы, которые характеризуют различные биологические процессы. Так, периоды имплантации, плацентации, первый и начало второго триместров беременности сходны с состоянием «открытой раны» (асептического воспаления), сопровождается выраженным провоспалительным ответом. В эти сроки бластоциста проникает через слой поверхностного эпителия матки, инвазивный трофобласт повреждает строму и железы эндометрия, замещает эндотелий и гладкомышечную оболочку сосудов, обеспечивая фетоплацентарное кровообращение. Воспалительное микроокружение обеспечивает элиминацию погибших клеток и репарацию тканей. Таким образом, первый триместр беременности у человека является провоспалительной фазой. Вторая иммунологическая фаза – период быстрого роста и развития плода. Мать, плацента и плод существуют в состоянии симбиоза, и особенность этого периода - индукция противовоспалительного состояния (переключение иммунного ответа с Th1 на Th2). Заключительная иммунологическая фаза беременности – ее завершение и роды с формированием провоспалительного окружения плода за счет притока иммунных клеток в миометрий, продукции Th1 цитокинов, которое обеспечивает сокращение матки, выход плода и отторжение плаценты. Таким образом, в течение беременности происходит смена про- и противовоспалительного состояния иммунной системы матери [Mor G. et al., 2011].

К настоящему времени стало ясно, что Th1/Th2 парадигма явно недостаточна для понимания механизмов защиты плода от атаки материнской иммунной системы. Открытие Th17 - новой субпопуляции Т-хелперных клеток, играющих важную роль в развитии хронических воспалительных и аутоиммунных процессов, и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-регуляторных клеток, которые обеспечивают иммунотолерантность, подавляя пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клеток и продукцию Th1 цитокинов, цитотоксическую активность НК клеток и созревание дендритных клеток, привело к формированию современного взгляда на иммунорегуляцию беременности, основанного на взаимодействии Th1/Th2/Th17 и регуляторных Т-клеток. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что избыток Th1 и/или Th17 ассоциирован с бесплодием и осложнениями беременности, тогда как Th2 и РТК необходимы для ее наступления и развития [Saito S. et al., 2010].

Одними из основных факторов поляризации CD4<sup>+</sup> Т клеток и регуляторами активности РТК и НК, локализованных в слизистой оболочке матки, являются гормоны беременности. Критическую роль играет прогестерон, который способствует развитию Th2 клеток и

продукции Th2 цитокинов, усиливает генерацию РТК и подавляет дифференцировку и функциональную активность Th1 и Th17. Роль эстрадиола в иммунорегуляции беременности не столь однозначна, поскольку, по данным разных авторов, он обладает стимулирующим эффектом как в отношении Th1, так и Th2, ингибирует продукцию ИЛ-17, способствует дифференцировке и повышает активность РТК. Очевидно, иммуномодулирующее влияние эстрадиола на Th1/Th2/Th17 и РТК во время беременности зависит от факторов микроокружения. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), который продуцируется доимплантационным эмбрионом на 8-клеточной стадии, помимо индукции морфофункциональной дифференцировки эндометрия и стимуляции ангиогенеза, обладает иммуномодулирующими функциями. ХГЧ стимулирует пролиферацию маточных НК, участвующих в ремоделировании спиральных артерий, подавляет активность Th1 лимфоцитов, усиливает миграцию РТК в маточно-плацентарную область, усиливает их супрессорную активность *in vitro*, поддерживает толерогенный фенотип дендритных клеток, т.е. действует на основные популяции иммунных клеток плаценты и эндометрия, которые обеспечивают толерантность к плоду и его жизнеобеспечению РТК [Polese B. et al., 2014].

### **1.3.2 Цитокины с противовоспалительной активностью**

#### **Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)**

Колониестимулирующие факторы, помимо регуляции дифференцировки и функции иммунных клеток, играют существенную роль в репродукции человека, в т.ч. в фолликулогенезе, овуляции, функции эндометрия и плаценты.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) - полипептид с молекулярной массой 15-29 кД, синтезируется разными типами клеток, в том числе эндотелиальными клетками, фибробластам, макрофагами и лимфоцитами.

ГМ-КСФ продуцируется также эпителиальными клетками женского репродуктивного тракта (матка, фаллопиевы трубы), его синтез индуцируется стероидными гормонами яичников и компонентами семенной плазмы. ГМ-КСФ обеспечивает рекрутирование лейкоцитов в эндометрий [Robertson S.A., et al., 2000]. Секретируемый в полость матки ГМ-КСФ может через паракринное действие увеличивать рецептивность поверхностного эпителия, а также непосредственно через рецепторы к ГМ-КСФ на клетках бластоцисты способствовать адгезии доимплантационной бластоцисты и последующему росту трофобласта и его инвазии путем повышения экспрессии адгезионных молекул, усиления продукции протеаз и других цитокинов [Paiva P., et al., 2011]. В экспериментах на мышах было показано, что этот цитокин усиливает метаболизм глюкозы, пролиферацию клеток бластоцисты и повышает жизнеспособность доимплантационного эмбриона [Robertson S.A. et al., 2001]. Самки мышей, нокаутных по гену

ГМ-КСФ, характеризовались вдвое большей частотой резорбции плодов, уменьшением на 25% величины помета с диспропорциональной гибелью новорожденных самцов и снижением массы потомства по сравнению с диким типом [Robertson S.A. et al., 1999].

У мышей СВА/JхDВА/2J с высоким уровнем спонтанных абортс уменьшение частоты резорбции эмбрионов после воздействия антибиотика ципрофлоксацина было связано с усилением продукции ГМ-КСФ лимфоцитами селезенки [Savion S. et al., 2000]. Эмбриопротекторный эффект ГМ-КСФ был доказан непосредственным введением цитокина мышам СВА/J × DВА/2, что привело к уменьшению частоты резорбции с 47% до 8 %, увеличению массы плода и плаценты и расширению зоны спонгиозотрофобласта [Chaouat G. et al., 1990].

Установлено, что при мышинной беременности, в т.ч. в условиях «абортсгенного» скрещивания СВА/J х DВА/2J, цитокин ГМ-КСФ играет существенную роль в формировании иммунотолерантности к плоду через модуляцию активности антигенпрезентирующих дендритных клеток и макрофагов, которые определяют выраженность Т-клеточного иммунного ответа. В присутствии ГМ-КСФ, а также ИЛ-4 моноциты, рекрутируемые в слизистую матки, дифференцируются в толерогенные дендритные клетки [Lee J.Y. et al., 2011]. Недостаточность продукции ГМ-КСФ может влиять на функцию дендритных клеток, сдвигая их фенотип от толерогенного к активирующему Th1-клетки, нарушая иммунотолерантность к плоду на ранних сроках беременности, что наблюдается при бесплодии, самопроизвольных абортс и преэклампсии [Moldenhauer L. M. et al., 2010]

При лечении супружеского бесплодия методами вспомогательной репродукции ГМ-КСФ используется для улучшения качества доимплантационных эмбрионов *in vitro* и повышения частоты наступления беременности [Siristatidis C. et al., 2013].

#### **Интерлейкин 4 (ИЛ-4)**

Интерлейкин-4 — регулятор роста и дифференцировки В-лимфоцитов и процесса синтеза антител. Продуцируется активированными CD4+ Т-лимфоцитами (Th2), тучными клетками, эозинофилами. Является антагонистом дифференцировки CD4+ Th1 типа и продукции Th1 цитокинов. Подавляет активность макрофагов и синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, то есть обладает противовоспалительным эффектом. Мощным индуктором ИЛ-4 и других Th2 цитокинов является прогестерон [Piccinni M.P., 2007]. В ряде исследований было установлено, что привычное невынашивание беременности и неудачные результаты вспомогательных репродуктивных технологий у человека, спонтанные и индуцированные абортс у экспериментальных животных (мышь, крыса) связаны с уменьшением продукции ИЛ-4 по сравнению с фертильными парами [Piccinni M.P., 2007; Gui J. et al., 2012; Persson M. et al., 2012]

Так, было показано, что высокий уровень спонтанных абортс у мышей CBA x DBA/2 ассоциирован с дефицитом продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в плаценте по сравнению с фертильным контролем CBAxBalb/c. Аллоиммунизация самок CBA x DBA/2 спленоцитами самцов Balb/c уменьшала частоту резорбции эмбрионов и усиливала синтез ИЛ-4 [Chaouat G. et al., 1995]. Продукция ИЛ-4 у самок CBA x DBA/2 повышалась также в результате действия циклоспорина А, существенно уменьшавшего частоту резорбции плодов [Du M.R. et al., 2007].

У крыс с нарушением имплантации, вызванном блокатором рецепторов прогестерона Мифепристоном, на 5-8 дни беременности в сыворотке крови и ткани эндометрия концентрация ИЛ-4 была значительно ниже, чем у животных контрольной группы. Акупунктурное воздействие приводило к возрастанию уровня ИЛ-4 и увеличению числа эмбрионов [Gui J. et al., 2012].

Один из механизмов положительного влияния ИЛ-4 на развитие беременности заключается в том, что наряду с КСФ-1 и ГМ-КСФ он обеспечивает рекрутирование моноцитов из периферической крови в эндометрий и их дифференцировку в толерогенные дендритные клетки, играющие важную роль в реализации репродуктивной функции [Lee J.Y. et al., 2011].

Результаты экспериментальных исследований на лабораторных мышах позволили полагать, что ИЛ-4, как и другие Th2 цитокины, необходим для выживания плода, генетически отличного от матери. Однако прямого доказательства того, что для сохранения и развития эмбрионов требуются высокие уровни продукции ИЛ-4 и/или ИЛ-10 в материнском организме, не существовало. Изучение моделей сингенной и аллогенной беременности у нокаутных самок C57BL/10, дефицитных по генам ИЛ-4 и ИЛ-10, спаренных с самцами, экспрессирующими эти гены, показало, что по количеству и качеству потомства они не отличаются от контрольных самок, обладающих генами данных противовоспалительных цитокинов. Таким образом, материнская и фетальная продукция противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 не является решающей для прогрессирования беременности и жизнеобеспечения плода [Svensson L. et al., 2001]. В тоже время в работе Catterjee P. с соавторами (2013), было показано, что у беременных ИЛ-4-дефицитных самок C57BL/6 изменялось соотношение субпопуляций иммунных клеток селезенки, увеличивалась продукция провоспалительных цитокинов, наблюдались очаги воспаления в плаценте, эндотелиальная дисфункция, протеинурия, умеренная гипертензия, т.е. признаки преэклампсии. Авторы заключают, что противовоспалительный эффект ИЛ-4 во время беременности играет важную роль в предупреждении гипертензии и развития синдрома преэклампсии [Chatterjee P. et al., 2013].

### **Интерлейкин 5 (ИЛ-5)**

ИЛ-5 принадлежит к семейству гемопоэтических цитокинов и секретируется преимущественно активированными Т-хелперами типа 2. У мыши ген ИЛ-5 локализован на хромосоме 11 в непосредственной близости к генам, кодирующим ИЛ-3, ИЛ-4 и ГМ-КСФ, которые часто коэкспрессируются в Th2-клетках. Играет ключевую роль в дифференцировке, активации и миграции эозинофилов, а также участвует в дифференцировке В-клеток. Помимо Th2 клеток, ИЛ-5 продуцируется цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК клетками, тучными клетками и эозинофилами [Мордвинов В.А., Фурман Д.П., 2009]. Прогестерон является мощным индуктором синтеза ИЛ-5 [Piccinni M.P., 2007].

Данные об участии ИЛ-5 в репродукции крайне немногочисленны. Так, исследования иммунологического статуса пациенток программ экстракорпорального оплодотворения через четыре недели после переноса эмбрионов показали, что концентрация ИЛ-5 в сыворотке крови, наряду с другими исследованными цитокинами (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ФНО- $\alpha$  и ГМ-КСФ), не имеет клинической значимости для прогнозирования результатов лечения бесплодия. Однако в случаях наступления беременности количество ИЛ-5-продуцирующих клеток периферической крови было больше, чем при неудачных попытках [Persson M. et. al, 2012].

У мышей СВА частота имплантации и последующее развитие эмбрионов у ИЛ-5-дефицитных и ИЛ-5-позитивных самок не отличались, независимо от того, была ли беременность сингенной или аллогенной (самцы СВА или Valb/c). Однако после оплодотворения самцами СВА на 17-й день беременности масса плаценты у ИЛ-5-дефицитных самок была на 10% больше, а отношение плацента/плод на 7% меньше, чем у самок дикого типа. У потомства ИЛ-5-нокаутных самок отмечали небольшое, но статистически значимое увеличение массы тела, более выраженное у F1 C57Bl/6 и СВА, которое сохранялось до полового созревания. Очевидно, влияние дефицита ИЛ-5 на рост и функции плаценты, массу потомства определяется генотипом самца [Ingman W. V., Jones R. L., 2008]

### **Интерлейкин 10 (ИЛ-10)**

ИЛ-10 является особым плейотропным типом цитокинов, поскольку обладает как стимулирующей, так иммуносупрессорной активностью, что не позволяет отнести его ни к Th1, ни к Th2 цитокинам. Однако первоначально ИЛ-10 был охарактеризован как Th2 цитокин из-за его выраженной противовоспалительной активности у грызунов. Секретируется лейкоцитами, макрофагами и другими соматическими клетками. ИЛ-10 подавляет пролиферацию Th1 лимфоцитов и синтез Th1 цитокинов, способствует дифференцировке и усилению функциональной активности субпопуляций Т-клеток, обеспечивающих иммунотолерантность – Т-регуляторных и внетимических Т-регуляторных клеток типа Th3. Кроме того, ИЛ-10

подавляет воспалительный ответ, ингибируя синтез ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 и других провоспалительных цитокинов и хемокинов моноцитами/макрофагами [Brogin Moreli J. et al., 2012]. ИЛ-10 является мощным индуктором активации макрофагов по M2 иммунорегуляторному (толерогенному) фенотипу. M2 макрофаги участвуют в ремоделировании тканей, обладают иммуносупрессорными свойствами, усиливают Th2 иммунный ответ, продуцируют ИЛ-10 и TRФ- $\beta$  [Brown M. V. et al., 2014].

В ряде работ представлены доказательства роли ИЛ-10 в наступлении и прогрессировании беременности у человека и экспериментальных животных. У женщин в первом и втором триместрах беременности цитокин экспрессируется клетками цитотрофобласта и плацентарными лейкоцитами. ИЛ-10 индуцирует экспрессию HLA-G и подавляет активность матриксной металлопротеиназы MMP-9, участвуя, таким образом, в предупреждении материнского иммунного ответа на антигены плода и модуляции дифференцировки и инвазии цитотрофобласта. У женщин с привычным невынашиванием беременности и преждевременными родами отмечали уменьшение продукции ИЛ-10 децидуальными Т-лимфоцитами. У мышей ИЛ-10 экспрессируется в матке, яичниках и яйцеводах в течение эстрального цикла, в течение всей беременности его продуцируют децидуальные клетки, а до середины беременности - плацента. Плацента-специфический гликопротеин 18, синтезируемый гигантскими клетками трофобласта, усиливает синтез ИЛ-10 в резидентных макрофагах. [White C.A. et al., 2004]. Исследование эндометриальной экспрессии провоспалительных, противовоспалительных и ассоциированных с ангиогенезом цитокинов, вазоактивных и ангиогенных факторов у женщин с идиопатическим привычным невынашиванием беременности выявило увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов и резкое уменьшение экспрессии ИЛ-10 и ангиогенных факторов в период имплантационного окна. ИЛ-10 наряду с VEGF и eNOS оцениваются как главные факторы, дефицит которых связан с дисфункцией сосудов эндометрия и нарушением его рецептивности, приводящих к ранней потере беременности [Banerjee P. et al., 2013]

ИЛ-10 рассматривается как ключевой цитокин ранней беременности, поскольку участвует в ряде важнейших событий, таких как формирование плаценты, плацентарный ангиогенез, регуляция трофобластической инвазии. Защитное действие ИЛ-10 на фетоплацентарную единицу обусловлено подавлением синтеза и секреции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ). Установлено, что при физиологической беременности уровень продукции ИЛ-10 превышает таковой у женщин с беременностью высокого риска. Дефицит плацентарной и децидуальной продукции ИЛ-10 ассоциирован с внутриутробной задержкой роста плода у женщин и лабораторных мышей. Резкое снижение уровня ИЛ-10 в

конце беременности, приводящее к изменению баланса цитокинов в сторону Th1, рассматривается как механизм подготовки к родам [Brogin Moreli J. et al., 2012].

Дефицит продукции ИЛ-10 связан с таким тяжелым осложнением беременности как преэклампсия. Ретроспективный анализ исходов беременности и цитокинового профиля в сыворотке крови нормотензивных женщин на 14-18 неделях гестации показал, что у пациенток с развившейся впоследствии преэклампсией концентрация ИЛ-10 была значимо ниже, чем при неосложненной беременности. Авторы рассматривают уровень ИЛ-10 в начале второго триместра беременности как один из биомаркеров ранней диагностики преэклампсии [Kumar A. et al., 2013]. На модели гипертензии у крыс было показано, что введение ИЛ-10 нормализует давление и функциональную активность эндотелия, что может быть одним из механизмов участия цитокина в нормальном развитии беременности [Brogin Moreli J. et al., 2012]. У нокаутных ИЛ-10-дефицитных мышей во время беременности наблюдали умеренное повышение систолического давления, дисфункцию эндотелия, увеличение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке по сравнению с самками дикого типа. По-видимому, продукция ИЛ-10 предупреждает развитие этого тяжелого осложнения беременности, и рекомбинантный ИЛ-10, по мнению авторов, может быть полезен в клинической практике [Chatterjee P. et al., 2011].

Физиологическая роль цитокина была убедительно продемонстрирована в сравнительных исследованиях моделей аллогенной беременности - физиологической и с высоким уровнем спонтанных аборт. У мышей с высоким уровнем спонтанных аборт СВА x DBA/2 в плаценте выявлялся меньший уровень ИЛ-10 по сравнению с фертильным контролем. Введение рекомбинантного ИЛ-10 уменьшало частоту резорбции эмбрионов, тогда как антитела, блокирующие ИЛ-10, увеличивали частоту резорбции. На основании этих данных авторы предположили важную роль цитокина в выживании полуаллогенного плода [Chaouat G. et al., 1995]. Исследование продукции ИЛ-10 тимоцитами, стимулированными *ex vivo*, показало, что количество ИЛ-10-продуцирующих Т-клеток у самок СВА x Balb/c с физиологической беременностью значительно больше, чем у самок СВА x DBA/2 с высоким спонтанным уровнем аборт. Кроме того, децидуальные лимфоциты самок СВА x DBA/2 продуцировали меньше ИЛ-10 по сравнению с высокофертильными самками [Zenclussen A.C. et al., 2005].

В тоже время существуют факты, не подтверждающие абсолютную необходимость Th2 цитокинов, в частности, ИЛ-10, для сохранения беременности. Так, Svensson L. с соавторами (2001), установили, что у мышей, дефицитных по генам ИЛ-10 и ИЛ-4, беременность не прерывается, а потомство не отличается от помета контрольной группы [Svensson L. et al., 2001]. Однако авторы оценивали лишь состояние новорожденных, но не анализировали уровень резорбции плодов, что не исключает вероятности спонтанных аборт. Дальнейшие

исследования показали, что у мутантных ИЛ-10<sup>-/-</sup> самок C57BL/6 число сайтов имплантации, исход беременности и жизнеспособность новорожденных не отличались от показателей ИЛ-10<sup>+/+</sup> самок, однако дефицит цитокина приводил к выраженному нарушению массы плода и диспропорциональному росту потомства, начиная с 8-го дня до 14 недель постнатального развития [White S.A. et al., 2004]. Суммируя, можно заключить, что ИЛ-10 является чрезвычайно важным для репродукции цитокином. Его иммуносупрессорное действие играет ключевую роль в регуляции баланса про- и противовоспалительных цитокинов, обеспечивающего прогрессирование беременности, а участие в формировании и ангиогенезе плаценты способствует благоприятному исходу беременности [Brogin Moreli J. et al., 2012].

### **1.3.3 Цитокины с провоспалительной активностью**

#### **Интерлейкин - 1альфа (ИЛ-1 α)**

ИЛ-1α - провоспалительный цитокин семейства интерлейкинов-1, к которому принадлежит также ИЛ-1β. Синтезируется в виде предшественника с М.м. 31kDa, после воздействия специфических протеаз становится зрелой формой с М.м. 18 Da, причем и предшественник, и зрелый ИЛ-1α биологически активны. Обладает метаболической, физиологической и гемопоэтической активностью, играет центральную роль в регуляции иммунного ответа. ИЛ-1α конститутивно продуцируется эпителиальными клетками, после стимуляции экспрессия гена *ИЛ-1α* и синтез цитокина наблюдаются во многих типах клеток, таких как макрофаги, фибробласты, гранулоциты, тучные клетки, эндотелиальные клетки, моноциты, Т- и В-лимфоциты, НК клетки, дендритные клетки, трофобласт плаценты. Биологические свойства ИЛ-1α и ИЛ-1β весьма сходны или идентичны. ИЛ-1α активирует преимущественно Т-лимфоциты, обладает аутокринным и паракринным действием, стимулирует пролиферацию лимфоцитов и продукцию фактора некроза опухоли-альфа, тогда как ИЛ-1β является многофункциональным цитокином с широким спектром действия, играющим ключевую роль в системе врожденного и приобретенного иммунитета.

В отличие от ИЛ-1β, секретируемого доимплантационным эмбрионом человека и клетками трофобласта, для которого установлена важная роль в имплантации и развитии беременности, участие ИЛ-1α в репродукции мало изучено. Установлено, что однократное введение высокой дозы (100 нг) рекомбинантного ИЛ-1α самкам мыши в первые сутки беременности вызывает 100%-ное нарушение имплантации blastocysts, подобно действию ЛПС. Авторы заключают, что повышение уровня ИЛ-1α может быть одной из причин потери беременности [Deb K. et al., 2004]. С другой стороны, известно, что в эндометрии с наступлением беременности резко увеличивается количество металлопротеиназы MMP-3, необходимой для ремоделирования стромы, а ИЛ-1α дозозависимым образом усиливает

продукцию ММР-3 в культивируемых стромальных клетках эндометрия матки. Следовательно, ИЛ-1 $\alpha$  может регулировать усиление экспрессии ММР-3 в периимплантационном периоде, обеспечивая прогрессирование беременности [Nishiura R. et al., 2005].

Обработка культивируемых клеток миометрия человека ИЛ-1 $\alpha$  уменьшает уровень мРНК рецептора окситоцина, что позволяет предположить роль цитокина в подготовке материнского организма к своевременным родам [Soloff M.S. et al., 2006].

### **Интерлейкин 2 (ИЛ-2)**

Один из первых охарактеризованных цитокинов, обнаруженный в культуральной среде антиген- и митоген-стимулированных Т-лимфоцитов, обеспечивающий их длительную пролиферацию *in vitro* [Morgan D.A. et al., 1976]. Основными продуцентами ИЛ-2 являются Т-хелперы, около 20 % цитотоксических Т-клеток также способны к продукции данного цитокина. Мишенями регуляторного действия ИЛ-2 являются различные субпопуляции Т-клеток, В-клетки, НК клетки, макрофаги, имеющие соответствующий рецептор для ИЛ-2. Главным результатом действия ИЛ-2 на покоящиеся или стимулированные антигеном или митогеном клетки является обеспечение их пролиферации. Именно эта биологическая активность ИЛ-2 определяет его в качестве ростового фактора клеток лимфомиелоидного ряда.

ИЛ-2 в сочетании с ТРФ- $\beta$  индуцирует дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Foxp3 Т-регуляторные клетки путем блокирования рецептора ИЛ-6 и ИЛ-6-сигнального пути, ответственных за генерацию Th17. Таким образом, комбинация ИЛ-2 и ТРФ- $\beta$  играет ведущую роль в поддержании иммунного гомеостаза, в т.ч. в условиях воспалительного микроокружения [Zheng S.G. et al., 2008]. У женщин с привычными спонтанными абортами выявлено уменьшение количества и функциональной активности РТК. Установлено, что причиной этого является снижение уровней ТРФ- $\beta$  и ИЛ-2, а также подавление сигнального пути ИЛ-2-STAT-5, приводящих к уменьшению супрессорной активности индуцибельных РТК [Arruvito L. et al., 2010]. Таким образом, дефицит ИЛ-2 может неблагоприятно влиять на течение беременности из-за нарушения дифференцировки РТК. В то же время известно, что у человека ИЛ-2 является ключевым цитокином, вызывающим превращение иммуносупрессорных РТК в провоспалительные Th17 [Saito S. et al., 2010].

У женщин с привычным невынашиванием беременности отмечено повышение продукции провоспалительных цитокинов, в т.ч. ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови в I триместре беременности [Rezaei A., Dabbagh A., 2002]. У пациенток программ вспомогательной репродукции синдром гиперстимуляции яичников – одно из наиболее тяжелых осложнений – сопровождался увеличением концентрации ИЛ-2 в смывах из полости матки и экспрессии ИЛ-2 в ткани эндометрия. Авторы полагают, что повышение эндометриального уровня ИЛ-2,

активирующего НК, макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты, может быть причиной низкой частоты имплантации эмбрионов в стимулированных циклах [Makkar G. et al., 2009].

Введение рекомбинантного ИЛ-2 беременным самкам CBA/J × Balb/c (фертильная комбинация) увеличивало частоту резорбции эмбрионов с 6% до 55%. У самок CBA/J × DBA/2 с высоким уровнем спонтанных аборт (38%) экзогенный ИЛ-2 повышал уровень резорбции до 76%, что демонстрирует его абортотропный эффект [Chaouat G. et al., 1990]. У самок мышей с ИЛ-2- индуцированными абортами отмечено усиление экспрессии гранзима В – эффекторной молекулы цитотоксических Т-лимфоцитов и повышение уровня апоптоза в трофобласте ворсин плаценты [Shiraishi H. et al., 1996].

Таким образом, локальная и системная избыточная продукция ИЛ-2, свидетельствующая о преобладании Th1 иммунного ответа, рассматривается как неблагоприятный фактор развития беременности.

### **Интерлейкин 6 (ИЛ-6)**

ИЛ-6 – многофункциональный цитокин, играющий ведущую роль в остром и хроническом воспалении и определяющий Т-клеточную дифференцировку в системе адаптивного иммунитета. Продуцируется рядом клеточных линий, включая дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты, кератиноциты, фибробласты, эпителиальные клетки, астроциты, трофобласт плаценты. ИЛ-6 является ключевым цитокином, направляющим дифференцировку наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в сторону Th17 и подавляющим генерацию РТК [Kimura A., Kishimoto T., 2010].

Цитокин широко представлен в женском репродуктивном тракте, участвует в регуляции имплантации и развитии плаценты. В эндометрии ИЛ-6 продуцируется покровным и железистым эпителием, максимальная экспрессия отмечается в середине секреторной фазы цикла, в период имплантационного окна. *In vitro* ИЛ-6 способствует развитию доимплантационных эмбрионов мыши и увеличивает клеточность бластоцисты. Однако ИЛ-6 может также ограничивать прикрепление бластоцисты к субстрату и подавлять рост клеток трофоэктодермы. Наряду с другими цитокинами и факторами роста контролирует морфогенез плаценты путем координации процессов пролиферации, миграции и дифференцировки трофобласта и регуляции его секреторной функции. Экспрессия ИЛ-6 уменьшается по мере дифференцировки цитотрофобласта в синцитиотрофобласт, в условиях *in vitro* трофобластическую продукцию ИЛ-6 подавляют эстрадиол, прогестерон и ХГЧ [Prins J.R. et al., 2012].

На модели спонтанных аборт у самок мышей CBAxDBA/2 было показано, что на 18-й день гестации уровень экспрессии ИЛ-6 в плаценте и децидуальной оболочке и количество ИЛ-6-положительных иммунных клеток были значительно выше, чем у самок с физиологической

беременностью CBAxBalb/c. Методом проточной флуориметрии было установлено, что основными продуцентами ИЛ-6 в маточно-плацентарной области являются макрофаги, количество которых резко увеличивается в участках резорбции плода. Авторы заключают, что ИЛ-6, продуцируемый трофобластом, децидуальными клетками и макрофагами, играет существенную роль в патогенезе прерывания беременности [Zenclussen A.C. et al., 2003]. Противоположная точка зрения на ИЛ-6 как фактор, благоприятный для развития беременности, была основана на данных о меньшей сывороточной концентрации ИЛ-6 и продукции цитокина *in vitro* фетоплацентарными клетками, выделенными на 9.5 ДГ, у самок с высоким уровнем спонтанных аборт по сравнению с фертильным контролем. Введение самкам CBAxDBA/2 рекомбинантного человеческого ИЛ-6 на 6.5-12.5 ДГ увеличивало продукцию ИЛ-6 фетоплацентарными клетками и снижало частоту эмбриональных потерь [Gutiérrez G. et al., 2004]. Снижение уровня спонтанных абортов после введения ИЛ-6 на данной модели отмечали также Dubinsky V. с соавт. (2008), объясняющие положительный эффект цитокина усилением продукции асимметричных антител, способствующих прогрессии беременности [Dubinsky V. et al., 2008]. До настоящего времени механизм, через который ИЛ-6 может уменьшать частоту резорбции эмбрионов, не установлен. Противоречивость результатов может быть связана с различием исследованных сроков беременности.

Результаты изучения роли ИЛ-6 в патогенезе привычного невынашивания беременности у человека весьма неоднозначны. В обзоре J. R. Prins с соавт. (2012) сообщается о более высоком уровне ИЛ-6 в сыворотке крови пациенток с привычным невынашиванием по сравнению с фертильным контролем, отмечаемом рядом исследователей. При положительном эффекте лимфоцитотерапии привычного невынашивания с использованием отцовских лимфоцитов наблюдали уменьшение концентрации ИЛ-6 в сыворотке и продукции цитокина моноцитами периферической крови. С другой стороны, существуют данные о снижении экспрессии ИЛ-6 в ткани эндометрия и его продукции мононуклеарами периферической крови в ответ на аутологичные клетки плаценты, а также об отсутствии повышения сывороточного уровня этого цитокина у женщин с привычными абортами. [Prins J.R. et al., 2012]. Очевидно, оценка роли ИЛ-6 в патогенезе привычного невынашивания беременности требует дальнейшего исследования.

### **Интерлейкин 17 (ИЛ-17)**

Более 10 лет назад была открыта новый, отличный от Th1 и Th2 тип хелперных CD4+ Т-клеток - Th17 клетки, непосредственно участвующие в индукции и развитии хронических воспалительных и аутоиммунных процессов. Ключевыми цитокинами для развития Th17 являются трансформирующий фактор роста (ТРФ-β) и ИЛ-6. ТРФ-β стимулирует дифференцировку наивных Т клеток в направлениях РТК и Th17, а ИЛ-6 подавляет

дифференцировку РТК, способствуя формированию Th17 [Saito S. et al., 2010]. Th17 секретируют цитокины семейства ИЛ-17 (А-Е). ИЛ-17А проявляет провоспалительную активность, подобно цитокинам системы врожденного иммунитета ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , участвует в развитии аутоиммунных реакций и росте опухолей, рекрутировании нейтрофилов в ткани, играет важную роль в защите от бактериальных и грибковых инфекций, активируя гранулоциты *in vivo*. ИЛ-17Е индуцирует продукцию Th2 цитокинов и эозинофилию. ИЛ-17 продуцируют также CD8+ Т клетки, обозначаемые как цитотоксические Т17 (Тс17) [Lee S.K. et al., 2011].

При физиологической беременности основными продуцентами ИЛ-17 являются CD4+ Т клетки периферической крови и децидуальной оболочки. Уровень периферических ИЛ-17-положительных лимфоцитов, очень низкий, как и у небеременных женщин (0.64-1.4% популяции CD4+ Т лимфоцитов), не меняется в течение физиологической беременности. В первом триместре доля ИЛ-17-положительных лимфоцитов в децидуальной оболочке намного больше, чем в периферической крови. [Nakashima A. et al., 2010]. При неосложненной беременности сывороточная концентрация ИЛ-17 увеличивается в III триместре, что предполагает участие этого цитокина в подготовке к родам [Fu B. et al., 2014].

В многочисленных исследованиях установлено, что у женщин с привычным невынашиванием беременности неустановленной этиологии в периферической крови и децидуальной оболочке увеличивается соотношение между ИЛ-17-положительными клетками и РТК [Wang W.J. et al., 2010, Lee S.K. et al., 2011, Fu B. et al., 2014]. При угрожающих абортах и абортах в ходу количество ИЛ-17-положительных клеток в децидуальной оболочке также увеличивается по сравнению с прогрессирующей беременностью. Однако при неразвивающейся беременности уровень Th17 не меняется, что позволяет предположить, что нарастание количества Th17 является следствием, а не причиной гибели плода [Nakashima A. et al., 2010]. У женщин с привычным невынашиванием беременности неустановленной этиологии выявлен более высокий сывороточный уровень ИЛ-17, а также других провоспалительных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6) в середине пролиферативной фазы цикла по сравнению с фертильными женщинами, что указывает на участие Th17 в патогенезе идиопатических репродуктивных потерь [Ozkan Z.S. et al., 2015]

Абортогенный эффект ИЛ-17 был продемонстрирован на модели аллогенной физиологической беременности у мышей. Трансвагинальное введение рекомбинантного ИЛ-17 в первые сутки беременности самкам СВА/Ж, оплодотворенных самцами Balb/c, приводило к трехкратному увеличению частоты резорбции на 14-й день гестации по сравнению с контролем. В децидуальной оболочке было выявлено уменьшение продукции противовоспалительных цитокинов TRF- $\beta$  и ИЛ-10 [Wang W.J. et al., 2014]. Роль ИЛ-17 как фактора риска фетальных потерь было подтверждена тем, что внутрибрюшинное введение рекомбинантного цитокина

самкам с физиологической беременностью увеличивало уровень резорбции эмбрионов, а воздействие антител против ИЛ-17 на самок CBA/Jx DBA/2J с высоким уровнем спонтанных абортс увеличивало число жизнеспособных плодов [Xu W.M. et al., 2016]. Количественный анализ мРНК для ИЛ-17А – продукта активированных Th17 лимфоцитов - в участках резорбции эмбрионов и зонах имплантации жизнеспособных плодов у самок со спонтанными абортами на 14.5 и 19.5 ДГ показал, что уровень экспрессии мРНК значительно выше в сайтах резорбции [Chung Y. et al., 2015].

Таким образом, увеличение системного и локального количества Th17 клеток и продуцируемого ими ИЛ-17 у человека и экспериментальных животных рассматривается как фактор, неблагоприятный для развития беременности.

С другой стороны, в экспериментах *in vitro* было установлено, что ИЛ-17 увеличивает миграционную активность трофобластических клеток линии JEG-3 [Pongcharoen S. et al., 2006] и усиливает продукцию и секрецию прогестерона [Pongcharoen S., Supalar K., 2009]. Эти данные свидетельствуют о возможности участия ИЛ-17 в регуляции трофобластической инвазии и эндокринной функции трофобласта.

### **Интерферон-гамма (ИФН- $\gamma$ )**

Интерферон-гамма (ИФН- $\gamma$ ) является одним из первых идентифицированных цитокинов, который подробно генетически, структурно и функционально охарактеризован у разных видов млекопитающих и человека. ИФН- $\gamma$  рассматривается как ключевая молекула клеточного иммунного ответа, и привлекает особое внимание исследователей физиологии и патологии беременности. Основные продуценты ИФН- $\gamma$  – НК-клетки и возникающие в тимусе НКТ-клетки, главные эффекторные лимфоциты системы врожденного иммунитета. В системе адаптивного иммунитета ИФН- $\gamma$  синтезируют и секретируют Th1 клетки. Вопрос о продукции или поглощении/сохранении ИФН- $\gamma$  *in vivo* клетками миелоидного происхождения (нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки) дебатруется до настоящего времени [Murphy S.P. et al., 2009].

Общей особенностью периимплантационного периода беременности у приматов, грызунов, домашних животных является продукция трофобластомой интерферонов типов I (ИФН- $\gamma$ ) и II (ИФН-А, ИФН-В, ИФН-Д, ИФН-Т, ИФН-В1). Интерфероны индуцируют/стимулируют клеточно-специфическую экспрессию ряда генов, определяющих рецептивность и децидуализацию стромы эндометрия, формирование и рост плаценты. У человека интерфероны, в частности, ИФН- $\gamma$ , экспрессируются в плаценте, децидуальной ткани и плодных оболочках [Bazer F.W et al., 2009].

Исследования экспрессии ИФН- $\gamma$  в репродуктивном тракте мышей показало, что в гомогенатах эндометрия небеременных самок разных линий концентрация ИФН- $\gamma$  была

ничтожно малой, при наступлении беременности цитокин в эндометрии выявлялся с 6.5 дня гестации, его концентрация ежедневно увеличивалась в 4-6 раз и достигала пика на 10-й ДГ, после чего уменьшалась. У эмбриона интерфероны экспрессировались, начиная с двухклеточной стадии до стадии преимплантационной бластоциты. В середине беременности ИФН- $\gamma$  выявлялся в гигантских клетках трофобласта, рецепторы интерферона IFN-gr1 и IFN-gr2 присутствовали в лабиринте и спонгиозотрофобласте, но отсутствовали в гигантских клетках трофобласта, прилежащих к материнской децидуальной ткани [Murphy S.P. et al., 2009].

Одной из важнейших функций маточных НК во время беременности у мышей является участие в ремоделировании артерий и обеспечении васкуляризации участков имплантации в интервале 8.5 – 10.5 дней беременности. В норме НК в децидуальной ткани и мезометриальных лимфоидных агрегатах (плотных лимфоидных структурах, которые обнаруживаются в стенке матки каждого имплантационного сайта, начиная с 8.5 дня гестации и до окончания беременности) продуцируют более 90% ИФН- $\gamma$ , выявляемого в маточно-плодовых единицах. У беременных самок мутантных НК-дефицитных мышей наблюдались нарушения децидуализации и отсутствие ремоделирования спиральных артерий. Введение рекомбинантного мышинового ИФН- $\gamma$  на 6-11 дни беременности инициировало перестройку спиральных артерий и децидуальную реакцию, характерные для физиологической беременности, и в отсутствие маточных НК клеток. Это подтверждает ведущую физиологическую роль ИФН- $\gamma$ , продуцируемого НК клетками, в активации генов, ответственных за гестационную перестройку стромы и спиральных артерий эндометрия [Murphy S.P. et al., 2009, Zhang J. et al., 2011].

Анализ ИФН- $\gamma$  – индуцируемых генов в клетках эндотелия микрососудов матки человека показал, что цитокин регулирует экспрессию генов, участвующих в рекрутировании НК клеток, миграции цитотрофобласта, децидуализации эндометрия, ангиогенезе, что определяет его значимость для реализации репродуктивной функции [Kitaya K. et al., 2007]. Исследование культивируемых клеток трофобласта мыши, полученных из эктоплацентарного конуса, показало, что ИФН- $\gamma$  усиливает фагоцитарную активность трофобласта. Авторы рассматривают ИФН- $\gamma$  -активированный фагоцитоз как механизм снабжения плода железом и питательными веществами до начала формирования и функционирования плаценты [Albieri A. et al., 2005].

В то же время существуют многочисленные доказательства того, что осложнения беременности, вплоть до гибели плода у человека и экспериментальных животных связаны с нарушением баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, в т.ч. с повышением уровня ИФН- $\gamma$ . Этот цитокин рассматривается как медиатор таких неблагоприятных исходов беременности у человека как невынашивание, внутриутробная

задержка развития плода, преждевременные роды, преэклампсия, синдром системного воспалительного ответа у плода [Murphy S.P. et al., 2009, Kwak-Kim J. et al., 2010] . Неблагоприятный для развития беременности эффект избытка ИФН- $\gamma$  может быть связан с нарушением функции плаценты. Так, было показано, что ИФН- $\gamma$  уменьшает инвазивную активность культивируемого трофобласта человека за счет усиления апоптоза и уменьшения продукции металлопротеиназ MMP2 и MMP9 [Lash G. E. et al., 2006]. Кроме того, ИФН- $\gamma$  дозозависимо подавляет эндометриальную продукцию VEGF, что может приводить к нарушениям ангиогенеза и дисфункции сосудов [Kawano Y. et al., 2000].

На моделях аллогенной беременности у мышей с физиологической беременностью (CBA/J  $\times$  Balb/c) и высоким уровнем спонтанных абортос (CBA/J  $\times$  DBA/2) был продемонстрирован негативный эффект избытка ИФН- $\gamma$ . Так, у самок с высоким спонтанным уровнем абортос в популяции децидуальных лимфоцитов присутствовало почти в три раза больше ИФН- $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток, специфичных к отцовским антигенам, чем при физиологической беременности [Zenclussen A.C. et al., 2005] . Определение концентрации цитокинов в смешанной культуре материнских лимфоцитов и клеток плаценты, полученных у самок CBA/J  $\times$  Balb/c с физиологической беременностью и CBA/J  $\times$  DBA/2 со спонтанными абортосами показало, что при невынашивании беременности лимфоциты продуцируют значительно больше ИФН- $\gamma$ , а также других провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2), чем при физиологической беременности [Tangri S. et al., 1994] . Введение высоких доз экзогенного ИФН- $\gamma$  индуцировало абортос у самок CBA/J  $\times$  Balb/c с физиологической беременностью (44%, контроль – 6%) и резко увеличивало частоту резорбции эмбрионов (с 40% до 68 -83%) у самок CBA/J  $\times$  DBA/2 с высоким уровнем спонтанных абортос, что свидетельствует об абортосгенном действии этого цитокина [Chaouat G. et al., 1990, Clark D.A. et al., 1998].

Таким образом, ИФН- $\gamma$  играет важную физиологическую роль в структурно-функциональной гестационной перестройке стромы и сосудов эндометрия, регуляции активности трофобласта. С другой стороны, ряд клинических и экспериментальных данных свидетельствуют о том, что избыток ИФН- $\gamma$  связан с осложнениями беременности вплоть до гибели плода у человека и животных.

#### **Фактор некроза опухоли (ФНО)**

Фактор некроза опухоли (ФНО, фактор некроза опухоли-альфа) - многофункциональный провоспалительный цитокин, продуцируемый в основном моноцитами и макрофагами. Синтезируется как трансмембранный белок про-ФНО с молекулярной массой 26 кДа. После протеолиза специфической металлопротеазой, (ФНО-конвертирующий фермент, ADAM17) образуется растворимый мономер ФНО с молекулярной массой 17 кДа. Мономеры ФНО

спонтанно полимеризуются в гомотример (М.м. 52 кДа), представляющий основную форму цитокина, взаимодействующую с рецептором. ФНО участвует в формировании основных местных и некоторых системных проявлений воспаления, активирует эндотелиальные клетки и лейкоциты, стимулирует ангиогенез, обладает активностью липопротеиновой липазы, ослабляя липогенез, повышает резистентность к инсулину. При избыточной локальной продукции вызывает повреждение тканей и развитие геморрагического некроза, резкое повышение уровня ФНО в циркуляции может привести к развитию септического шока [Ярилин А.А, 2010].

У человека ФНО экспрессируется в гладкомышечных клетках миометрия и различных типах клеток эндометрия – фибробластах, макрофагах, железистых эпителиальных клетках, эндотелии сосудов. В плаценте экспрессия ФНО меняется в течение беременности, что предполагает специфическую функцию цитокина в процессах ее морфогенеза. В первом триместре ФНО выявляется во всех клетках трофобластической линии, включая синцитиотрофобласт и ворсинчатый цитотрофобласт, пролиферирующий цитотрофобласт якорных ворсин, инвазивный трофобласт [Haider S., Knöfler M., 2009].

Существуют доказательства участия ФНО в патогенезе привычного невынашивания беременности. Так, у пациенток с повторными спонтанными абортами в анамнезе сывороточные уровни цитокина в середине пролиферативной фазы цикла и во время текущей беременности были на 40-70% выше по сравнению с фертильными женщинами [Haider S., Knöfler M., 2009; Ozkan Z.S. et al., 2015]. Мононуклеары периферической крови пациенток с нарушениями имплантации и привычным невынашиванием продуцировали больше ФНО, а также ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$ , чем клетки женщин с физиологической репродуктивной функцией [Kwak-Kim J. et al., 2010]. Негативный эффект избыточного уровня ФНО на течение беременности может быть обусловлен нарушением формирования синцитиотрофобласта, увеличением уровня апоптоза ворсинчатого трофобласта, уменьшением продукции  $\beta$ -ХГЧ и миграционной активности трофобласта, продемонстрированными в экспериментах *in vitro* [Haider S., Knöfler M., 2009]. Комплексная терапия привычного невынашивания беременности с использованием ингибиторов ФНО (Этанерцепт, Адалимумаб) увеличивала уровень живорождения до 71%, тогда как после применения иммуноглобулина G этот показатель составлял 54%, а антикоагулянтов - только 19% [Winger E.E., Reed J.L., 2008].

В экспериментальных исследованиях на моделях аллогенной физиологической беременности и спонтанных абортов у мышей (комбинации CBA/J  $\times$  Balb/c и CBA  $\times$  DBA/2, соответственно) было показано, что при невынашивании беременности увеличивается локальная экспрессия ФНО в эпителиальных и стромальных клетках децидуальной оболочки, гигантских клетках и спонгиозотрофобласте плаценты, инфильтрирующих лейкоцитах. Резкое усиление продукции ФНО в маточно-плацентарных единицах наблюдали также при

циклофосфамид-индуцированных абортах [Gorivodsky M. et al., 1998]. При высоком уровне спонтанных аборт на 13.5 день гестации отмечали увеличение количества ФНО- $\alpha$ +CD8+ децидуальных Т - клеток [Joachim R.A. et al., 2001]. В участках резорбции эмбрионов/плодов наблюдали ФНО- $\alpha$  – положительные клетки на границе трофобласта и децидуальной оболочки. Вероятно, увеличение уровня ФНО, связанное с повреждением фетоплацентарных единиц, было обусловлено макрофагальной инфильтрацией и/или активацией НК [Lea R.G. et al., 1998]. Усиление локальной децидуальной экспрессии ФНО у самок СВА/J  $\times$  DBA/2 сопровождалось выраженным нарастанием уровня ФНО в плазме крови с 4-го по 10-й дни беременности с сохранением высокой концентрации цитокина ( $340 \pm 35$  пг/мл) до 15-го ДГ. У самок СВА/J  $\times$  Balb/c с физиологической беременностью средний уровень ФНО был неизменно низким ( $73 \pm 9$  пг/мл) в течение всего срока гестации. Поскольку ингибиторы активации комплемента снижали концентрацию ФНО у самок со спонтанными абортами до уровня фертильного контроля, авторы предположили, что триггерным механизмом усиления продукции ФНО является активация комплемента [Girardi G. et al., 2006].

На модели спонтанных аборт у мышей было показано прямое участие ФНО в патогенезе потери беременности и гибели эмбрионов. Введение высоких доз цитокина самкам СВА  $\times$  DBA/2 дозозависимо повышало уровень резорбции с 41% до 89%. Оценка эмбриональных потерь после элиминации *in vivo* НК и макрофагов с последующим введением продуцируемых ими цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО, соответственно, или комбинации цитокинов, позволило авторам заключить, что резорбция эмбрионов обусловлена ФНО-индуцированной активацией НК, усилением продукции ИФН- $\gamma$  и Th1—зависимой протромбиназы *fgl2*, вызывающей тромбоз и ишемию плаценты [Clark D.A. et al., 1998].

С другой стороны, существуют данные о положительной роли ФНО во время беременности. Так, ФНО усиливал экспрессию металлопротеиназы 9 в трофобласте и децидуальных клетках плаценты I триместра беременности, что свидетельствует о его участии в регуляции трофобластической инвазии [Haider S., Knöfler M., 2009]. Исследование 18-дневных плодов нормальных и ФНО-нокаутных самок мышей, подвергшихся воздействию тератогена циклофосфамида во время беременности, показало, что у ФНО-/- самок доля плодов с выраженными аномалиями развития (черепно-лицевые нарушения, дефекты конечностей), была гораздо больше по сравнению с ФНО+/+ самками. Можно предположить, что в условиях эмбриопатического стресса ФНО препятствует развитию плодов с пороками развития и предупреждает появление потомства со структурными аномалиями [Torchinsky A. et al., 2003].

Таким образом, широкий спектр биоактивности ФНО и многочисленность реагирующих на него клеточных популяций (рецепторы ФНО экспрессируются в эпителиальных, эндотелиальных и стромальных клетках эндометрия, децидуальных НК, Т-клетках и

макрофагах, ворсинчатом и инвазивном цитотрофобласте) определяют положительный или отрицательный эффект цитокина. В физиологических условиях ФНО участвует в иммунной защите, поддержании клеточного гомеостаза, контроле пролиферации, миграции и дифференцировки клеток плаценты. Однако из-за мощной провоспалительной и иммуностимулирующей активности цитокин связан с рядом патологических состояний, в т.ч. такими осложнениями беременности как привычное невынашивание, внутриутробная задержка роста плода, преэклампсия, преждевременные роды. Развитие физиологических или патологических реакций определяется сложными взаимосвязями между концентраций ФНО, типом клеток и тканей, распределением ФНО-рецепторов, продолжительностью стимулирующего воздействия цитокина [Haider S., Knöfler M., 2009].

Таким образом, в многочисленных экспериментальных исследованиях, в т.ч. выполненных на классических моделях физиологической беременности и спонтанных аборт у самок мышей линии СВА, получены данные о роли про- и противовоспалительных цитокинов в становлении и прогрессировании беременности, но зачастую неоднозначные или противоречивые. Сравнение имеющихся результатов затрудняется различием объектов для определения продукции цитокина (сыворотка крови, плацента, эндометрий, фетоплацентарный комплекс, иммунные клетки децидуальной оболочки), сроков исследования, набором определяемых цитокинов. Для уточнения роли цитокинов с про- и противовоспалительной активностью в эксперименте требуется стандартизация моделей беременности, объекта, метода и сроков исследования продукции цитокинов и расширение их комплекса.

#### **1.4 ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ-МУРАМИЛДИПЕПТИДЫ**

История исследований иммуномодуляторов-мурамилдипептидов началась с наблюдения Дж. Фрейнда, относящегося к 50-ым годам прошлого века, об активации неспецифического иммунного ответа у высших животных убитыми нагреванием бактериями *Mycobacteria tuberculosis*, что привело к созданию адьюванта Фрейнда (1965 г.), широко используемого для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном. Дальнейшие работы позволили установить, что способностью стимулировать иммунные реакции обладают не только *Mycobacteria*, но все бактерий. Это свойство бактерий было названо иммуноадьювантной или адьювантной активностью. В начале 1970-х годов было показано, что основными компонентами бактерий, ответственными за иммуностимулирующий эффект, являются пептидогликаны (ПГН) клеточной стенки и липополисахарид (ЛПС). ПГН являются структурным элементом наружной мембраны всех типов бактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных, в отличие от ЛПС – компонента мембраны грамотрицательных бактерий. Бактериальные ПГН расщепляются в лизосомах организма хозяина с образованием

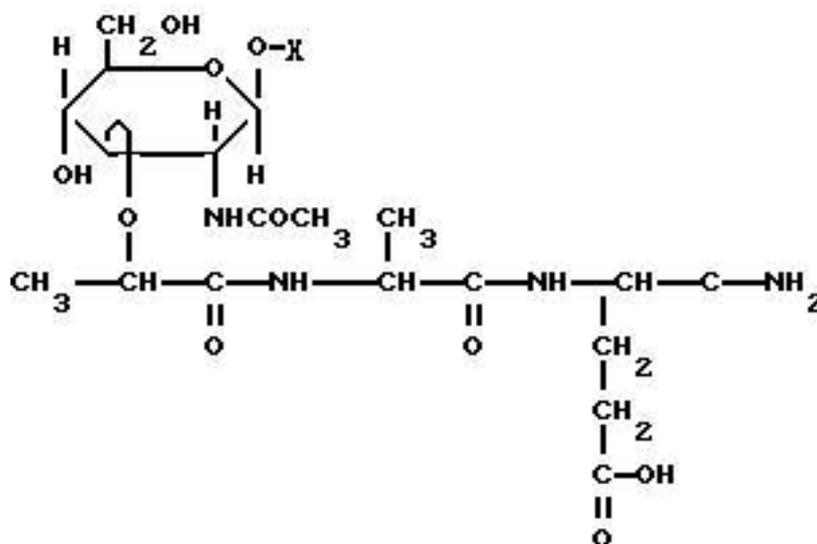
муропептидов, которые превращаются в мурамилдипептиды (МДП) под действием бактериальных и хозяйских амидаз. В 1970-е годы химический синтез структурных элементов ПГН и исследование их иммуностимулирующего действия показали, что минимальной структурой, ответственной за адьювантную активность бактериальной стенки, является N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (мурамилдипептид, МДП) [Ellouz F. et al., 1974; Athié-Morales V. et al., 2008; Kusumoto S. et al., 2010].

Согласно ранним данным Kotani S. с соавторами, биологическая активность МДП *in vitro* проявляется в стимуляции клеток, участвующих в иммунном ответе. Для моноцитов/макрофагов - это усиление хемотаксиса, стимуляция дифференцировки и фагоцитарной активности, увеличение продукции монокинов. В-клетки отвечают на действие МДП поликлональной активацией, модуляцией антителообразования. МДП стимулирует дифференцировку Т-клеток, активирует Т-хелперную функцию, индуцирует цитотоксические Т-клетки, повышает активность НК клеток, усиливает фагоцитоз нейтрофилов и освобождение гистамина тучными клетками. На моделях *in vivo* установлено, что МДП усиливает гуморальный и клеточный иммунный ответ, регулирует баланс Th1/Th2 [Klein T. et al., 1983, Kotani S. et al., 1983, 1986].

Большой вклад в исследование синтетических иммуномодуляторов-мурамилдипептидов внесли отечественные ученые. Ими были синтезированы и изучены иммуотропные свойства более тридцати оригинальных производных МДП, в т.ч.  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидов с алифатической, циклической, адамантильной и фенольной структурой агликона, различающихся по гидро- и липофильности, полимерные производные на базе полиакриламида и декстранальдегида и др. (рис. 6).

Выявление химических и физико-химические особенностей мурамилпептидов, обладающих выраженным биологическим действием на клетки иммунной системы, послужило основой для направленного синтеза целого ряда новых амфифильных гликозидных производных МДП с различными по структуре гликозидными (адамантильными, фенильными, циклическими, линейными) структурами [Калюжин О.В. с соавт., 2002, 2008; Земляков А.Е. с соавт., 2003, 2005].

Установлено, что амфифильные  $\beta$ -гликозиды мурамилдипептида (МДП) в модельных тест-системах *in vitro* и *in vivo* существенно превосходят по биологической активности соответствующие  $\alpha$ -гликозиды, а также более гидрофильные и гидрофобные  $\beta$ -гликозиды МДП и немодифицированный МДП. Амфифильные  $\beta$ -гликозиды МДП эффективнее стимулируют спонтанную и митоген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов, продукцию макрофагами ИЛ-1 и ФНО, продукцию ИЛ-2 лимфоцитами [Калюжин О.В. с соавт., 2002, 2008].



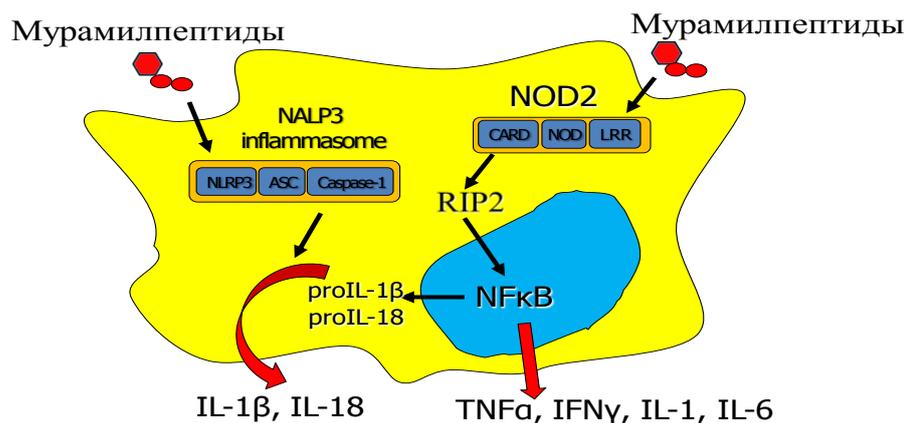
X – С4-алкил ( $\beta$ -бутилгликозид-МДП,  $\beta$ -С4МДП),  
 или С6-алкил ( $\beta$ -гексилгликозид-МДП,  $\beta$ -С6МДП),  
 или С7-алкил ( $\beta$ -гептилгликозид-МДП,  $\beta$ -С7МДП),  
 или С8-алкил ( $\beta$ -октилгликозид-МДП,  $\beta$ -С8МДП),  
 или адамантил ( $\beta$ -адамантилМДП),  
 или фенил ( $\beta$ -фенилМДП),  
 или фенэтил ( $\beta$ -фенэтилМДП),  
 или нафтил ( $\beta$ -нафтилМДП).

**Рисунок 6. Структура  $\beta$ -гликозидов МДП [Калюжин О.В., 2002].**

Следует отметить, что, несмотря на искусственное происхождение, эффекты синтетических мурамилпептидов физиологичны, так как их природные аналоги постоянно обнаруживаются в низких концентрациях в крови и тканях человека, и, воздействуя на специфические рецепторы, выполняют функции эндогенных иммуномодуляторов, факторов сна и нейромедиаторов [Adam A., Lederer E., 1984].

Следующий этап изучения мурамилдипептидов начался с раскрытия молекулярных механизмов их действия. В работах Inohara N. с соавторами (2003, 2005) было установлено, что МДП распознается специфическим внутриклеточным NOD2 рецептором. NOD-рецепторы относят к группе образ-распознающих рецепторов, посредством которых передаются активирующие сигналы для компонентов врожденного иммунитета. NODs – цитозольные белки, содержащие нуклеотид-связывающий домен олигомеризации [NOD]. Эти белки являются ключевыми регуляторами апоптоза и резистентности к патогенам у животных и растений. Наряду с Toll-like-рецепторами, NOD1 и NOD2 у человека и Naip5 у мыши играют важную роль во врожденном и приобретенном иммунитете как сенсоры бактериальных компонентов. NOD1 и NOD2 участвуют в сигнальных путях, обеспечивающих распознавание организмом хозяина специфических мотивов бактериальных пептидогликанов, и после

активации индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов [Inohara N. et al., 2003, 2005]. Проникнув внутрь клетки, МДП связывается с NOD2 и вызывает его олигомеризацию с последующим рекрутированием адаптерного белка Rip2, что приводит к запуску NF-κB сигнального пути и синтезу ключевых цитокинов первой фазы иммунного ответа (рис. 7) [Athié-Morales V. et al., 2008]. NOD1 и NOD2 обнаружены в моноцитах/макрофагах, дендритных, эпителиальных и эндотелиальных клетках [King A.E. et al., 2009, Manni M. et al., 2011].



**Рисунок 7. Молекулярные механизмы действия мурамилпептидов – фрагментов клеточной стенки бактерий.**

Особый интерес для иммунологии репродукции представляет присутствие NOD1 и NOD2 рецепторов в цитотрофобласте и синцитиотрофобласте плаценты в первом триместре беременности и NOD1 в зрелой плаценте человека [Abrahams V.M., 2011]. Экспрессия NOD1 и NOD2 усиливается при действии липополисахарида, активирующего TLR4 [Mulla M.J. et al., 2009]. Клетки трофобласта *in vitro* отвечают на экспозицию с МДП продукцией провоспалительных цитокинов. Реакция является специфичной, поскольку NOD2-дефицитные линии клеток трофобласта на МДП не отвечают [Costello M.J. et al., 2007]. Предполагается, что различная, зависящая от сроков беременности, экспрессия NOD1 и NOD2 рецепторов связана как с противоифекционной защитой плода от патогенов, так и с индукцией преждевременных родов из-за изменения баланса цитокинов на границе мать-плод [Abrahams V.M., 2011].

NODs обнаружены также в эпителии, строме и эндотелии эндометрия, причем экспрессия NOD2 повышается в секреторной фазе цикла. МДП как специфический лиганд NOD2 усиливает продукцию мРНК ингибитора NFκB – IκBα, ИЛ-8 и ФНО-α. Предполагаемая функция NODs в эндометрии - противоифекционная защита слизистой оболочки матки за счет усиления продукции молекул врожденного иммунного ответа [King A.E. et al., 2009].

Наиболее изученным отечественным синтетическим гликозидным дериватом МДП на сегодняшний день является С7-алкил -  $\beta$ -гептилгликозид-МДП ( $\beta$ -гептилгликозид-МДП, С7МДП). В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показана способность  $\beta$ -гептилгликозида МДП стимулировать основные звенья противоопухолевого и противоинфекционного, в том числе противовирусного иммунного ответа [Калюжин О.В., 2002; Лобанов Д.С., 2009]. Получены данные о выраженной иммуностимулирующей и терапевтической активности препарата при хронических неспецифических заболеваниях легких, мочеполовых инфекциях [Караулов А.В. и др., 2002; Калюжин О.В. и др., 2003; Калюжин О.В., 2010].

Эффективность С7МДП изучена на моделях сальмонеллезной септикотоксемии [Калюжин О.В., 2002], мышинных опухолей различного гистогенеза [Калюжин О.В., 2002], сепсиса [Калюжин О.В. и др., 2003], туберкулеза [Михайлова Л.П., 2006]. Однако в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют фундаментальные экспериментальные исследования, посвященные воздействию С7МДП во время беременности.

### 1.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важную роль в предупреждении материнской иммунной атаки на генетически отличный эмбрион играют локальные механизмы, реализующиеся на границе мать-плод, исследование которых у человека практически невозможно по этическим причинам. Исследования в области иммунологии беременности ограничивает также отсутствие адекватных систем *in vitro*, позволяющих оценить сложные взаимодействия между экстраэмбриональными структурами (трофобластом) и иммунными клетками, составляющими в I триместре беременности до 30-40% всех клеток децидуализированного эндометрия [Bulmer J. N. et al., 2010]. Поэтому для изучения физиологии беременности, патогенеза ее нарушений, разработки профилактических и терапевтических мер, направленных на сохранение беременности, широко используют экспериментальные модели на лабораторных животных. Наиболее распространенным видом млекопитающих для исследования физиологии и патологии репродукции является мышь, преимуществом которой как экспериментальной модели является короткий срок гестации, многочисленное потомство, сходство с человеком механизмов развития и типа строения плаценты, возможность создания с помощью генных технологий новых информативных моделей (трансгенные и нокаутные мыши) [Malassine A. et al., 2003; Watson E.D., Cross J. C., 2005; Carter A.M, 2007; Lim H. J., Wang H., 2010; Giakoumopoulos M., Golos T. G., 2013].

Морфофункциональное сопоставление плаценты человека и мыши как обоснование для моделирования невынашивания беременности, несмотря на определенные различия, продемонстрировало принципиальные черты сходства. Плацента человека и мыши имеет дисковидную форму и гемохориальный тип строения. Увеличение площади контакта хориона с материнской кровью в плаценте человека достигается за счет разветвления ворсин (ворсинчатая

гемохориальная плацента), у грызунов – путем формирования сложного лабиринта каналов (лабиринтная гемохориальная плацента) [H. J. Lim, H. Wang, 2010]. В мышинной плаценте материнско-плодное питание и газообмен осуществляются через двуслойный синцитиотрофобласт, составляющий основной объем лабиринта [Malassine A. et al., 2003; Watson E.D., Cross J. C., 2005]. Плацента обладает эндокринной функцией, которую обеспечивают гигантские клетки трофобласта, а не синцитотрофобласт [Cross J.C., 2005; Hu D., Cross J.C., 2010]. Получены доказательства наличия интерстициальной и внутрисосудистой инвазии цитотрофобласта. Инвазивным потенциалом в плаценте мыши обладают гликогеновые клетки спонгиотрофобласта и гигантские клетки, которые соответствуют цитотрофобласту наружных колонн ворсин и вневорсинчатому цитотрофобласту у человека [Krishnan L. et al., 2013]. Таким образом, несмотря на различия в динамике развития плаценты у человека и мыши, структурно-функциональные аналогии (гемохориальный тип строения, наличие трофобласта с инвазивным потенциалом, осуществление материнско-плодного обмена через синцитиотрофобласт) позволяют считать мышинные модели адекватными для изучения ряда аспектов физиологии и патологии беременности у человека.

Известны ряд сингенных и аллогенных моделей индуцированных абортотворения для изучения механизмов невынашивания беременности. Резорбция как гистосовместимых, так и гистонесовместимых (полуаллогенных) эмбрионов может быть вызвана ультразвуковым стрессом [Knackstedt M.K. et al., 2003; Friebe A. et al., 2011], введением провоспалительных Th1 цитокинов ИЛ-2, ИЛ-12, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , [Chaouat G. et al., 1990; Shiraishi H. et al., 1996; Knackstedt M.K. et al., 2003.; Kwak-Kim J. et al., 2010], липополисахаридом *E. coli*, имитирующим бактериальную инфекцию, [Clark D.A. et al., 2003; Robertson S.A. et al., 2007]; синтетической двухцепочечной РНК (poly I:C), активирующей макрофаги и натуральные киллеры через Toll-3 рецептор, подобно вирусной инфекции [Lin Y. et al., 2005];  $\alpha$ -галактозилцерамида, активирующего НК [Boyson J. E. et al., 2006] и другие.

Высокая частота резорбции эмбрионов (до 40%) достигается при моделировании у мышей невынашивания беременности аутоиммунного генеза - антифосфолипидного синдрома [Girardi G. et al., 2011; Blank M. et al., 2012], аутоиммунного тиреоидита [Lee Y.L. et al., 2009]. Наибольший интерес для изучения проблем иммунологии беременности представляет мышинная модель спонтанных абортотворения, наиболее близкая к привычному невынашиванию беременности неустановленной этиологии у человека [Jin L.P. et al., 2004; Redecha P. et al., 2009], в которой высокая частота эмбриональных потерь (около 30%) наблюдается при отсутствии внешних повреждающих факторов. Это достигается скрещиванием мышей-самок линии CBA/J (H-2k) с самцами линии DBA/2 (H-2d), различающимися по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Именно данное сочетание линий мышей характеризуется высоким

уровнем спонтанных аборт, так как при других сингенных и аллогенных комбинациях частота спонтанной резорбции эмбрионов, независимо от антигенов главного комплекса гистосовместимости самок и самцов, обычно не превышает 10%.

В качестве нормального высокофертильного контроля в экспериментальных работах используются самки CBA/J, оплодотворенные самцами линии Balb/c (H-2d) с тем же антигеном главного комплекса гистосовместимости, что DBA/2. В ряде исследований было установлено, что ЧР в фертильных комбинациях соответствует низкой частоте хромосомных аномалий у эмбрионов грызунов (около 6%) и, очевидно, обусловлена элиминацией плодов со структурными или количественными нарушениями хромосом [Clark D. A., et al., 1998, 2001].

Характеристика, практические и теоретические аспекты использования модели привычных спонтанных аборт у мышей CBAxDBA/2, широко известной за рубежом, перспективы дальнейших исследований представлены в обзоре [Bonney E.A., Brown S.A., 2014]. На данной модели проведены исследования иммунологических механизмов невынашивания, установлена роль клеток системы врожденного и адаптивного иммунитета в развитии и прерывании беременности. Использование модели спонтанных аборт у мышей CBA x DBA/2 позволило оценить эффективность ряда препаратов (иммуносупрессор циклоспорин А, статины, ципрофлоксацин и др.) и методов (лимфоцитотерапия, адаптивный перенос Т-регуляторных клеток), которые могут быть использованы для разработки новых подходов к профилактике и терапии иммунозависимого невынашивания беременности.

Одной из наиболее выраженных реакций материнской иммунной системы на наступление беременности является инволюция тимуса – центрального органа иммунной системы. Инволюция тимуса во время беременности у разных видов млекопитающих, в т.ч. у мыши, крысы и человека, давно известна и достаточно полно охарактеризована.

Проведены ряд иммунологических исследований для выяснения физиологического значения инволюции тимуса в адаптации материнской иммунной системы к состоянию беременности и формировании толерантности к полуаллогенному плоду. Установлено, что острая транзиторная атрофия тимуса при беременности уменьшает разнообразие периферического репертуара Т-клеток и ограничивает иммунный ответ. Это достигается за счет уменьшения численности тимических предшественников в костном мозге и ранних тимических прогениторных клеток в тимусе, снижения пролиферативной активности тимоцитов, блокады их дифференцировки на уровне ранних предшественников, экспансии Т-регуляторных клеток и уменьшении миграции Т-лимфоцитов в периферические органы. Установлена роль гормонов беременности и клеток стромы в инволюции тимуса [Tibbetts T. A. et al., 1999; Bodey B. et al., 2000; Zoller A.L., Kersh G.J, 2006; Nakim F.T., Gress R.E., 2007; Zoller A.L. et al., 2007]. Однако морфофункциональные особенности гестационных изменений тимуса на классических моделях

физиологической беременности ( $\text{♀СВА} \times \text{♂Valb/c}$ ) и спонтанных аборт ( $\text{♀СВА} \times \text{♂DBA}$ ) до настоящего времени изучены не были.

Как сингенная, так и аллогенная беременность у мышей характеризуется транзиторной спленомегалией [Bustamante J.J. et al., 2008]. Показано, что гестационное изменение массы и клеточности селезенки происходит главным образом за счет экспансии эритроидных клеток. На фоне увеличения эритроидного ростка в середине беременности в селезенке уменьшается количество В-клеток с последующим восстановлением до уровня контроля (небеременные самки) на 15-й ДГ. Доля Т-клеток последовательно сокращалась в течение ранней - средней беременности до 50% контрольного уровня, на 18-й ДГ относительная численность популяции возвращалась к показателям небеременных самок [Norton M.T. et al., 2009].

Важной функцией лимфоцитов, связанной с развитием беременности, является продукция прогестерон-индуцируемого блокирующего фактора (PIBF) - 34-kDa белка, который подавляет активность НК и модифицирует цитокиновый баланс в сторону Th2. Введение беременным самкам Valb/c препарата RU486 (Мифепристон), блокирующего рецепторы прогестерона, приводило к увеличению частоты резорбции плодов, обусловленной неспособностью клеток селезенки продуцировать PIBF. Введение PIBF снижало высокий уровень эмбриональных потерь, индуцированный RU486 [Szekeres-Bartho J. et al. 2005]. Таким образом, селезенка играет существенную роль в адаптации иммунной системы материнского организма к беременности. Несмотря на существование ряда экспериментальных работ, посвященных механизмам развития спленомегалии во время беременности, морфологические исследования немногочисленны и фрагментарны. Сравнительное изучение динамики морфофункциональных изменений селезенки на мышинных моделях физиологической аллогенной беременности ( $\text{♀СВА} \times \text{♂Valb/c}$ ) и спонтанных аборт ( $\text{♀СВА} \times \text{♂DBA}$ ) не проводили.

Данные о структуре мышинной плаценты при моделировании физиологической аллогенной беременности и спонтанных аборт единичны, с преимущественной характеристикой гигантских клеток трофобласта [Girardi et al., 2006]. Сравнительная комплексная морфологическая и морфометрическая характеристика структурных элементов плаценты (слой гигантских клеток трофобласта, спонгиозного трофобласта, лабиринта, доли материнских лакун и плодных сосудов и трофобласта) у самок ( $\text{♀СВА} \times \text{♂Valb/c}$ ) и ( $\text{♀СВА} \times \text{♂DBA}$ ) в отечественной и зарубежной литературе не представлена.

В многочисленных экспериментальных исследованиях, в т.ч. выполненных на классических моделях физиологической беременности и спонтанных аборт у самок мышей линии СВА, получены данные о роли отдельных про- и противовоспалительных цитокинов в становлении и прогрессировании беременности, но зачастую неоднозначные или

противоречивые. Сравнение имеющихся результатов затрудняется различием объектов для определения продукции цитокина (сыворотка крови, плацента, эндометрий, фетоплацентарный комплекс, иммунные клетки децидуальной оболочки), сроков исследования, набором определяемых цитокинов. Для уточнения роли цитокинов с про- и противовоспалительной активностью требуется стандартизация моделей беременности, объекта, метода и сроков исследования продукции цитокинов, расширение их комплекса.

Ряд данных указывает на то, что ранние репродуктивные потери связаны с изменениями функциональной активности материнской иммунной системы, приводящими к дисбалансу Th1/Th2/ Th17 и T-регуляторных клеток [Kwak-Kim J. et al., 2010; Ozkan Z.S. et al., 2015]. Одними из основных регуляторов гуморального и клеточного иммунного ответа, баланса Th1/Th2 клеток являются иммуномодуляторы-мурамилдипептиды [Kotani S. et al., 1986; Калюжин О.В. с соавт., 2008, 2009]. Однако в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют фундаментальные экспериментальные исследования, посвященные влиянию мурамилдипептидов на течение и исход беременности, морфофункциональное состояние органов иммунной системы и плаценты.

Таким образом, сравнительное изучение морфофункциональных изменений тимуса, селезенки и плаценты у самок мышей при физиологически протекающей беременности, спонтанных абортах и после воздействия иммуномодулятора β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на материнский организм в ранние сроки гестации являются актуальной научной задачей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 8-10-недельных мышей инбредных линий СВА, DBA/2, Balb/c массой тела 23-25 г, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Животные содержались в стандартных условиях вивария, имели свободный доступ к лабораторному корму и воде. Эксперименты осуществляли в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года, законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г. и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 №267). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человек (протокол № 6 А от 19 октября 2009 г.)

### **2.1 Моделирование физиологической беременности, спонтанных и мурамилпептид-индуцированных аборт**

Для моделирования аллогенной физиологической беременности использовали комбинацию мышей СВА× Balb/c, высокий уровень спонтанных аборт воспроизводили при скрещивании самок СВА с самцами DBA/2 [Kwak-Kim J. et al., 2010]. Для получения датированной беременности самок в стадии проэструс-эструс подсаживали на ночь к самцам в отношении 3-4:1. День появления копулятивной пробки обозначали как 1-й день гестации (ДГ). Для воспроизведения модели индуцированного невынашивания беременным самкам высоко фертильной комбинации СВА×Balb/c вводили внутривбрюшинно С7МДП на 5-й ДГ (завершение имплантации) и 7-ой ДГ (до начала формирования плаценты) в дозе 20 мкг в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl на 1 животное ( $\approx 1$  мг/кг). Потенцированное невынашивание беременности моделировали путем введения С7МДП самкам с исходно высоким уровнем спонтанных аборт (СВА×DBA/2) по описанной выше схеме. Небеременным самкам С7МДП вводили двукратно с суточным интервалом. Выбранная доза С7МДП соответствовала ED<sub>50</sub>, определенной в предварительной серии экспериментов на септических моделях *in vivo* [Калюжин О.В. и соавт., 2009]. Беременным и небеременным самкам контрольных групп внутривбрюшинно вводили по 100 мкл 0,9% раствора NaCl в том же режиме. Выведение мышей из эксперимента проводилось путем цервикальной дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом на 8, 9 и 14-й ДГ. Схема эксперимента представлена на рис. 8.

Для проведения исследования были сформированы шесть экспериментальных групп животных (табл.3).

Таблица 3. Характеристика экспериментальных групп животных

Экспериментальные группы	Количество животных			
	Дни гестации			
	0	8	9	14
Небеременные самки СВА	13	—		
Небеременные самки СВА после введения С7МДП	13	—		
Самки с физиологической беременностью	—	10	5	10
Самки с высоким уровнем спонтанных аборт	—	10	5	10
Самки с физиологической беременностью и введением С7МДП (моделирование индуцированных аборт)	—	10	5	10
Самки с исходно высоким уровнем спонтанных аборт и введением С7МДП (моделирование потенцированных аборт)	—	10	5	10



Рисунок 8. Схема эксперимента.

## 2.2 Гистологические и морфометрические методы

После выведения животных из эксперимента осуществляли забор тимуса, селезенки, матки и плаценты на 8-й ДГ (начало формирования плаценты) и 14-й ДГ (зрелая плацента). Тимус и селезенку небеременных самок выделяли через 7 суток после второго введения препарата. Забор селезенки для оценки спонтанной пролиферации лимфоцитов и постановки смешанной культуры лимфоцитов проводили на 9-й ДГ и через двое суток дня после второго введения С7МДП у небеременных самок. Проводили макроскопическое определение уровня частоты резорбции эмбрионов на 14-й ДГ по формуле:  $R = \frac{Re}{Re + F} \times 100\%$ , где R - доля резорбированных эмбрионов/плодов по отношению к общему числу плодов, Re – количество резорбированных эмбрионов и F – количество жизнеспособных эмбрионов [Du M.-R. et al., 2007]. После продольного вскрытия рогов матки на 14-й ДГ выделяли цельные плаценты жизнеспособных плодов и определяли их массу, взвешивая на весах Sartorius (Германия). В каждой экспериментальной группе взвешивали по 10 плацент из разных пометов. Массу плаценты определяли на 14-й ДГ. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Кусочки тканей проводили по спиртам восходящей крепости (70°, 80°, 96°, 100°), заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином.

**Морфометрическое исследование** выполняли на микроскопе Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой при помощи графического планшета и программы ImageScopeM (Leica Microsystems GmbH, Германия). Измеряли стереологические параметры гистоструктуры методом точечного счета с применением 100-узловой тест-сетки Г.Г. Автандилова (1973). В препаратах тимуса методом точечного счета определяли объемные доли структурно-функциональных зон - коркового и мозгового вещества (КВ и МВ) - и вычисляли индекс отношения объемной плотности КВ к МВ в условных единицах. Ширину субкапсулярной зоны тимуса измеряли с помощью программы Image Pro. В селезенке определяли индекс соотношения белой (БП) и красной пульпы (КП) в условных единицах, объемные доли лимфоидных узелков (ЛУ) и ПАЛМ в процентах от площади БП. Ширину слоев плаценты измеряли с помощью программы Image Pro. Для определения объемной плотности структур лабиринта плаценты на тотальных поперечных срезах при увеличении 200 учитывали точки по трем компонентам: материнские лакуны, трофобласт, плодные сосуды. В каждом случае исследовали по 10 полей зрения.

## 2.3 Культуральные методы

### Выделение и культивирование клеток селезенки для определения продукции цитокинов *ex vivo*

Клетки, выделенные из селезенки мышей контрольных и опытных групп с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера, отмывали в среде 199 путем двукратного центрифугирования в течение 3 мин при 1000 G. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации  $5 \times 10^6$  /мл культивировали 24 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением конканавалина А (5 мкг/мл) в 24-луночных культуральных планшетах при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среда для культивирования спленоцитов состояла из RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. По окончании инкубации собирали надосадочную жидкость, которую хранили не более 3-х месяцев при температуре –37 °С.

### 2.4 Радиоизотопный метод определения пролиферативной активности лимфоцитов селезенки *ex vivo*

Реактивность Т-лимфоцитов селезенки самок против отцовских антигенов оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) по методу Jin et al. (2004). В качестве стимуляторов использовали лимфоциты селезенки самцов Balb/c и DBA/2, обработанные митомицином С. Клетки-стимуляторы вносили в 96-луночные круглодонные планшеты (Nunc, Дания) в количестве  $2 \times 10^5$  на лунку в объеме 100 мкл полной культуральной среды. Отвечающими клетками (респондерами) в СКЛ являлись лимфоциты, выделенные из селезенки небеременных самок и самок на 9-й ДГ при физиологической беременности, спонтанных и индуцированных и потенцированными абортах, введения, которые добавляли к стимуляторам в соотношении 1:1. Контролем служили клетки-респондеры без добавления стимуляторов, культивируемые в 200 мкл полной среды. После инкубации культур в течение 4-х суток (37° С, 5% CO<sub>2</sub>) в лунки на 6 часов добавляли [3H]тимидин (0.5 мКи/лунку, удельная активность 24 Ки/моль, ОАО «Изотоп»), затем клетки переносили на стекловолоконные фильтры и определяли включение [3H]тимидина в импульсах в минуту (имп/мин) с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика 1209 RACKBETA (LKB, Швеция). Для оценки пролиферативного ответа рассчитывали индекс стимуляции (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{(\text{имп/мин стимулированных культур} - \text{имп/мин контрольных культур})}{\text{имп/мин контрольных культур}}$$

Каждый вариант постановки реакции анализировали в трех пробах. Для функциональной характеристики клеток селезенки небеременных самок и самок на 9-й ДГ в контрольной и опытных группах, определяли уровень их спонтанной пролиферативной активности *ex tempore*

по включению [3H]тимидина после 6-часовой экспозиции с изотопом в соответствии с методикой, описанной для СКЛ.

### **2.5 Метод проточной цитофлуориметрии**

Концентрацию цитокинов - интерлейкинов (ИЛ) -1 $\alpha$ , 2, 5, 6, 10, 4, 17, интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) определяли в культуральной жидкости активированных конканавалином А лимфоцитов селезенки, выделенных на 8ДГ и 14-й ДГ, с использованием набора Mouse Th1/Th2 10plex (BenderMedSystems, Австрия) на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Концентрацию цитокинов вычисляли с помощью программы FlowCytomix Pro (Beckman Coulter, США).

### **2.6 Статистическая обработка результатов**

Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc.). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова - Смирнова. В случае нормально распределенных показателей использовали t-тест для парных сравнений средних и z-тест с коррекцией Йейтса для сравнения долей, для распределений, отличных от нормального, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты представляли в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего/стандартное отклонение, медианы и квартилей. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

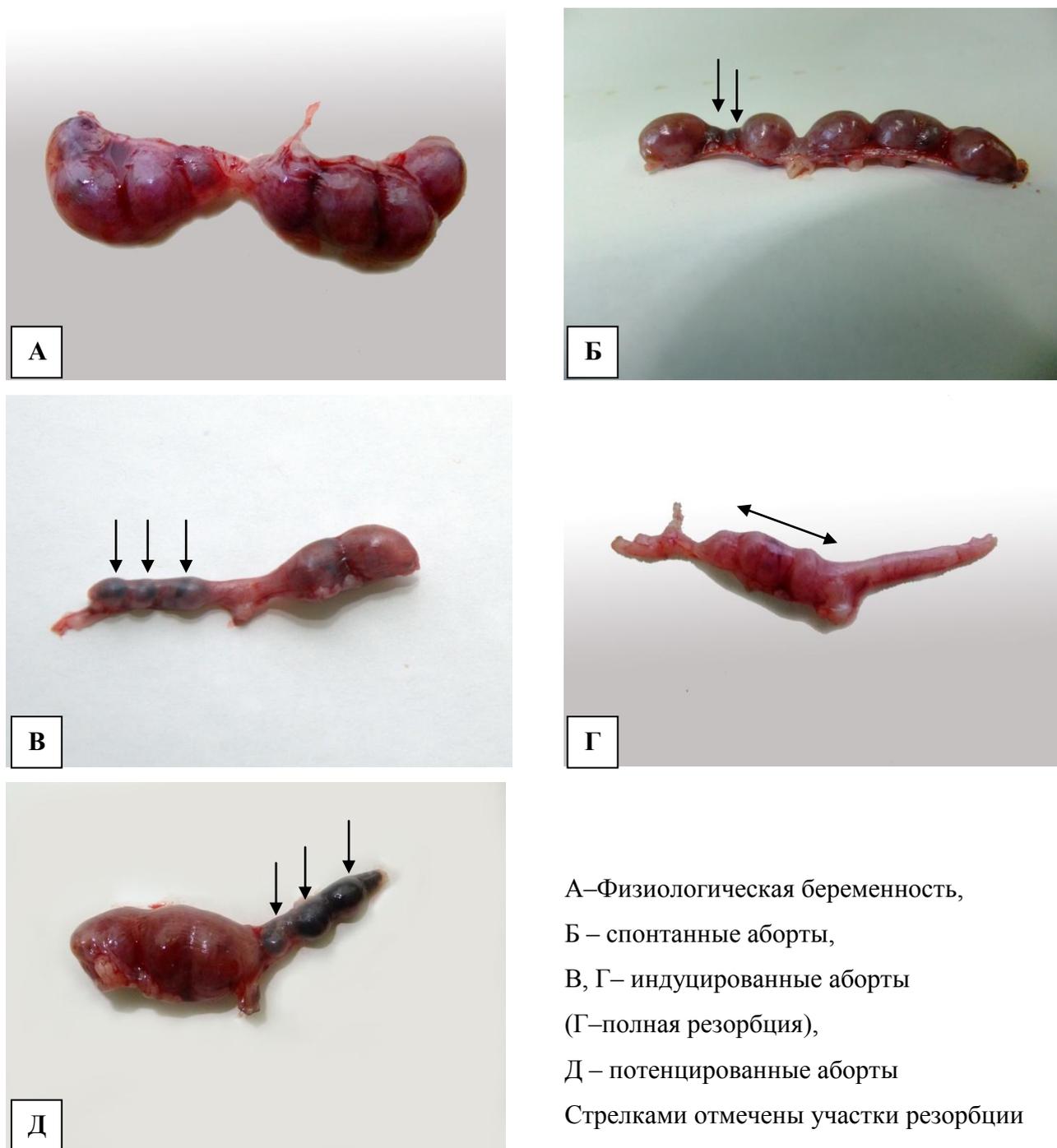
#### 3.1 ЧАСТОТА РЕЗОРБЦИИ ЭМБРИОНОВ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ, СПОНТАННЫХ АБОРТАХ И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ С7МДП В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ

Для определения частоты резорбции плодов проводили макроскопическое исследование маток у самок с различными вариантами беременности на 14-й ДГ. На этом сроке явно различались нормальные и резорбированные фетоплацентарные единицы (рис. 9).. Развивающиеся плоды были крупными, розовыми, внутри амниотического мешка выявлялась дисковидная плацента (рис. 9 А, Б, В, Д). Резорбирующиеся фетоплацентарные единицы были небольшого размера, темными, плотными, плод и плацента не визуализировались (рис. 9 Б, В, Д). Такую же макроскопическую структуру матки описали F. Lv с соавторами, которые исследовали репродуктивные потери у мышей Balb/c, вызванные препаратом RU 486 - блокатором рецепторов прогестерона и характеризовали ее как неполный аборт, поскольку в полости матки сохранялись остатки эмбриона [Lv F. et al., 2012].

В группе самок с ♀СВА×♂ Balb/c после воздействия С7МДП в некоторых случаях отмечали полное отсутствие фетоплацентарных единиц в рогах матки. Матка была разделена на амниотические мешки, элементы плода и плаценты не идентифицировались (рис. 9 Г). При последующем гистологическом исследовании таких маток наблюдалась полная резорбция плода и плаценты, истончение слоя эндометрия, расширение полости матки, трактуемые Lv F. с соавторами (2012) как полный аборт с формированием водянки матки.

**Таблица 4. Резорбция эмбрионов в условиях физиологической беременности, беременности с высоким уровнем спонтанных аборт, моделей индуцированных и потенцированных аборт**

Группы	Общее число эмбрионов	Число резорбированных эмбрионов	Частота резорбции %	Статистическая значимость различий
1. Физиологическая беременность (n=10)	54	8	14,8	p1-2=0,043 p1-3=0,017 p1-4=0,01 p2-4=0,07 p3-4=0,745
2. Спонтанные аборты (n=10)	68	22	32,3	
3. Индуцированные аборты (n=10)	66	30	45,4	
4. Потенцированные аборты (n=10)	56	28	50,0	



А–Физиологическая беременность,  
 Б – спонтанные аборт,  
 В, Г– индуцированные аборт  
 (Г–полная резорбция),  
 Д – потенцированные аборт  
 Стрелками отмечены участки резорбции

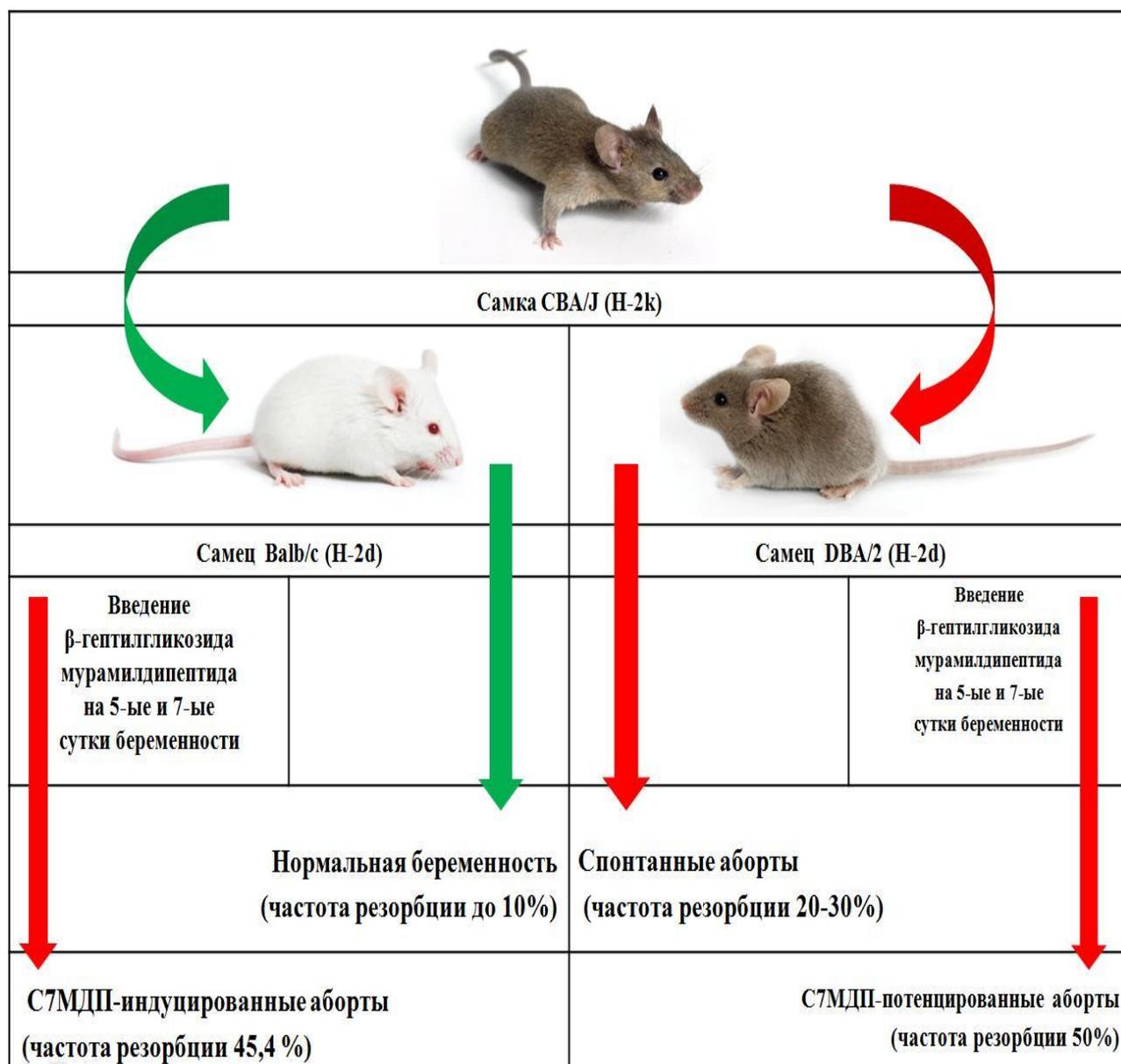
### Рисунок 9. Макропрепараты матки мыши СВА, 14-й день гестации

В группе самок СВА с физиологической беременностью частота резорбции эмбрионов на 14-й ДГ составляла 14,8 % , в группе самок со спонтанными абортами – 32,3% (табл. 4). Двукратное внутрибрюшинное введение С7МДП самкам ♀СВА×♂Valb/c (группа индуцированных аборт) увеличивало частоту резорбций эмбрионов в среднем до 45,4 %, что в три раза превышало показатели фертильного контроля ( $p=0,017$ ) (табл. 4). В некоторых случаях наблюдалась 100%-ная резорбция плодов. Этот факт представляет интерес с точки

зрения возможности использования данной модели для оценки эффективности изучаемых методов и средств терапии и профилактики иммуноопосредованного невынашивания беременности.

Под влиянием иммуномодулятора уровень ЧР эмбрионов у мышей ♀СВА×♂DBA/2 с исходно высоким уровнем спонтанных абортс увеличивался в среднем до 50,0% (табл. 4) (группа потенцированных абортс), не отличаясь значимо от ЧР при спонтанных абортс, но существенно превышая показатель ЧР при нормальной беременности.

Следует отметить, что достигнутый благодаря применению С7МДП уровень резорбции эмбрионов придал известной модели спонтанного абортс максимальную чувствительность для оценки разнонаправленных воздействий на иммунозависимое невынашивание беременности. Это очень важно с позиции сокращения времени исследования и числа используемых экспериментальных животных для решения практических задач и проверки научных гипотез, связанных как с разработкой подходов к предотвращению/лечению спонтанных абортс, так и с изучением безопасности средств и методов, которые предполагается использовать при беременности. Таким образом, воздействие С7МДП на самок СВА×Balb/c с физиологической беременностью с достоверно увеличивал частоту резорбций эмбрионов у мышей. Возможность повышения уровня спонтанных абортс у самок СВА/×DBA/2 гликозидным производным С7МДП показана впервые. Два варианта аллогенного скрещивания мышей СВА× Balb/c и СВА×DBA/2 с введением на 5-е и 7-е сутки гестации гликозидного деривата С7МДП, усиливающего продукцию Th1-цитокинов, можно рассматривать как новые высокочувствительные модели иммунозависимого невынашивания беременности (рис. 10).



**Рисунок 10. Схема моделирования физиологической беременности и беременности с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов.**

### **3.2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА У МЫШЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ, СПОНТАННЫМИ, ИНДУЦИРОВАННЫМИ И ПОТЕНЦИРОВАННЫМИ АБОРТАМИ**

По данным морфологического исследования в тимусе небеременных самок СВА преобладало корковое вещество, состоящее из плотно упакованных лимфоцитов. Границы между корковым и мозговым веществом были четко очерчены (рис.11 А). Немногочисленные тимические тельца (ТТ) 1-2 фаз развития были образованы 4-5 эпителиальными ретикулярными клетками (ЭРК) (рис.11 Б). Введение иммуномодулятора С7МДП небеременным самкам вызвало увеличение коркового вещества и уменьшение ширины субкапсулярного слоя (табл. 5), границы между корковым и мозговым веществом стали очагово нечеткими. В корковом веществе наблюдали появление макрофагов. На границе коркового и мозгового вещества присутствовали множественные ТТ в виде кистоподобных полостей, что характеризует состояние тимуса как акцидентальную инволюцию I-II стадии (рис.11 В, Г).

У самок с физиологической беременностью на 8-й ДГ также отмечалось преобладание объемной доли коркового вещества. Ширина субкапсулярного слоя по сравнению с небеременными самками (табл.5) была больше, границы между корковым и мозговым веществом - четкими (рис. 12 А). В мозговом веществе преобладали ЭРК, наблюдались многочисленные ТТ 1-2 стадий развития, состоящие из 4-12 ЭРК, единичные в виде кистоподобных полостей (рис. 12 Б). Картина соответствовала акцидентальной инволюции I. На 14-й ДГ в тимусе преобладало мозговое вещество (рис. 12 В). Объем коркового вещества достоверно уменьшался по сравнению с 8-м ДГ (табл. 5). На границе коркового и мозгового вещества присутствовали ТТ в виде кистоподобных полостей. Наблюдались очаговое опустошение коркового вещества, появление ТТ с началом отложения кератогиалина – признаки акцидентальной инволюции II стадии (рис. 12 Г).

В тимусе самок с высоким уровнем спонтанных аборттов на 8-й ДГ преобладало корковое вещество, однако его объемная доля не отличалась от показателя у небеременных самок и самок в соответствующий срок физиологической беременности (табл. 5). В корковом веществе наблюдали макрофаги (т. н. картину «звездного неба») (рис. 13 А). В мозговом веществе отмечались многочисленные ТТ 1-2 фаз развития, состоящие из 5-10 ЭРК (рис. 13 Б). Картина соответствовала акцидентальной инволюции II стадии. На 14-й ДГ в тимусе самок этой группы отмечалось значительное преобладание мозгового слоя, резко суживался СС по сравнению с 8-м ДГ (рис. 13 В). Отмечалась очаговая инверсия слоев, в мозговом веществе и на границе его с корковым обнаруживались ТТ в виде гигантских кистоподобных полостей (рис. 13 Г). Акцидентальная инволюция соответствовала II-III стадии. У самок с высоким уровнем

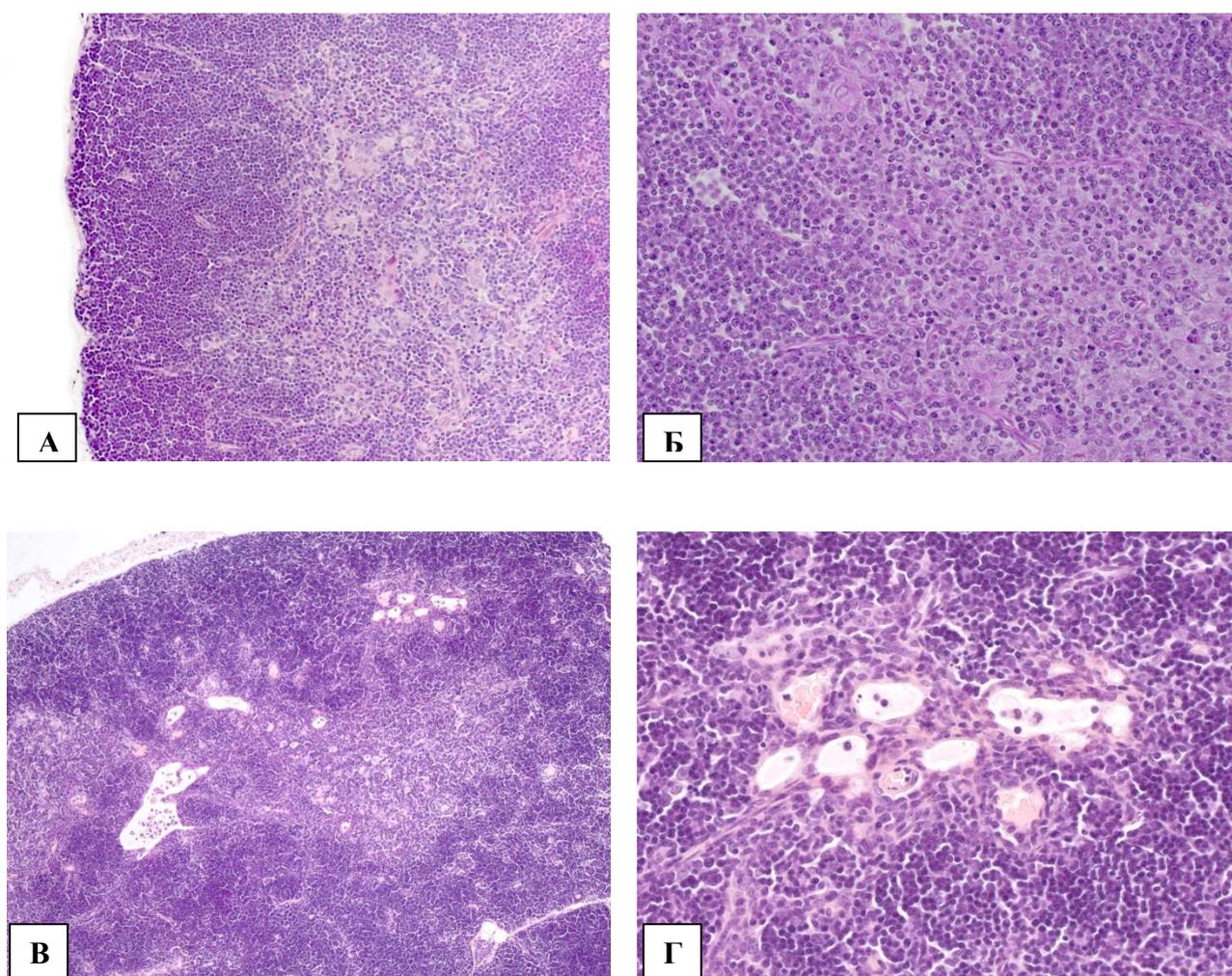
спонтанных абортс были более выражены инволютивные изменения тимуса по сравнению с физиологической беременностью тех же сроков. Так, у самок с физиологической беременностью на 8-й ДГ акцидентальная инволюция соответствовала I стадии, и лишь на 14-й ДГ – II, тогда как у самок со спонтанными абортами уже на 8-й ДГ наблюдалась инволюция тимуса II стадии.

В группе индуцированных абортс у самок СВА на 8-й ДГ в тимусе отмечали усиление инволютивных изменений по сравнению с физиологической беременностью. Границы между очагово разреженным корковым и мозговым веществом были нечеткими. В корковом веществе присутствовало большое количество макрофагов (рис. 14 А), на границе коркового и мозгового вещества – ТТ в виде кистоподобных полостей (рис. 14 Б). В мозговом веществе встречались ТТ с отложениями кератогиалина, которые у самок с физиологической беременностью появлялись лишь на 14-й ДГ. Картина соответствовала акцидентальной инволюции II стадии. На 14-й ДГ у самок, которым был введен гликопептид, отмечалось преобладание мозгового слоя. Отмечалось сужение субкапсулярного слоя (табл. 5), макрофаги в корковом веществе (рис. 14 В). На границе коркового и мозгового вещества наблюдали ТТ в виде кистоподобных полостей (рис. 14 Г). В 2-х наблюдаемых случаях кистоподобные полости частично располагались в корковом веществе. Акцидентальная инволюция тимуса соответствовала II-III стадии.

В группе потенцированных абортс у самок СВА также наблюдали усиление акцидентальной инволюции тимуса, которая на 8-й ДГ соответствовала II-III стадии, тогда как у самок при спонтанных абортах наблюдалась II стадия инволюции. В этой группе наблюдали появление в корковом веществе большого количества макрофагов, как и в группе индуцированных абортс (рис. 15 А). В мозговом веществе присутствовали ТТ в виде крупных кистоподобных полостей (рис. 15 Б). На 14-й ДГ в тимусе преобладало мозговое вещество, отличавшееся пониженной клеточностью вследствие усиления инволютивных изменений (рис. 15 В). Слой коркового вещества был истончен. По сравнению с небеременными самками и физиологической беременностью соответствующего срока уменьшалась ширина субкапсулярного слоя (табл. 5). В то же время отмечалось наличие ТТ в виде гигантских кистоподобных полостей как на границе коркового и мозгового вещества, так частично и в корковом веществе (рис. 15 Г). Это позволяет отнести наблюдаемые изменения тимуса к акцидентальной инволюции II - III стадии.

Таблица 5. Морфометрические показатели тимуса самок небеременных и беременных самок экспериментальных групп

Показатели Группа	Срок беременности	Индекс отношения коркового вещества к мозговому, усл. ед, (M±SE)	Ширина субкапсулярной зоны, мкм (M±SE)
1. Небеременные без С7МДП		1,05±0,06	24,68±1,29
2. Небеременные с С7МДП		1,37±0,1*	19,36±1,78*
Физиологическая беременность	3. 8-й ДГ	1,08±0,11	28,18±0,60*
	4. 14-й ДГ	0,51±0,06*^	22,66±0,56^
Спонтанные аборт	5. 8-й ДГ	1,18±0,16	26,12±0,72#
	6. 14-й ДГ	0,74±0,06*#^	21,81±0,68*^
Индукцированные аборт	7. 8-й ДГ	1,15±0,02	23,85±1,31#
	8. 14-й ДГ	0,77±0,07#^	19,14±0,63#^
Потенцированные аборт	9. 8-й ДГ	1,31±0,17	22,93±1,47
	10. 14-й ДГ	0,89±0,06^	17,24±0,74#^◆
<b>Статистически значимые отличия</b>  * – от небеременных # – от физиологической беременности ^ – между сроками 8 и 14 ~ – индуцированных от потенцированных абортов ◆ – от спонтанных абортов		p1–2 = 0,038 p1–4 <0,001 p1–6 = 0,002 p3–4 = 0,003 p4–6 = 0,020 p4–8 = 0,033 p5–6 = 0,005 p7–8 = 0,016 p9–10 = 0,023	p1–2 = 0,032 p1–3 = 0,05 p1–6 = 0,045 p3–4 = 0,001 p3–5 = 0,05 p3–7 = 0,017 p4–8 = 0,003 p4–10 <0,001 p5–6 = 0,003 p6–10 = 0,003 p7–8 = 0,01 p9–10 = 0,008



**Рисунок 11. Тимус небеременных мышей**

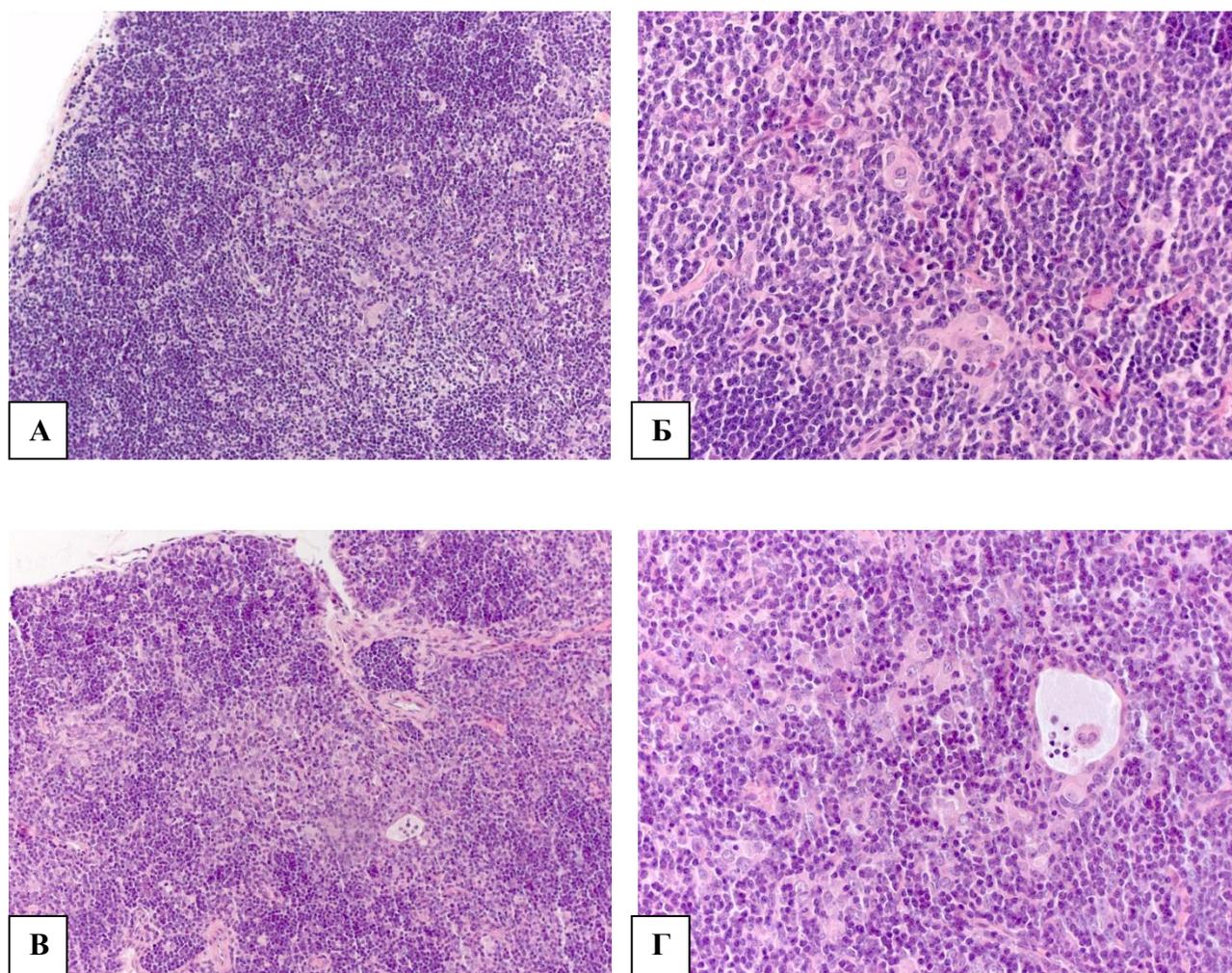
А. Структура тимуса интактных самок - преобладает корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четко очерчены.

Б. Строение мозгового вещества тимуса интактных самок. Немногочисленные тимические тельца 1-2 фаз развития.

В. Структура тимуса самок после введения С7МДП - преобладание коркового вещества, границы между корковым и мозговым веществом четкие. Множественные тимические тельца в виде кистоподобных полостей на границе коркового и мозгового вещества;

Г. Строение мозгового вещества тимуса самок после введения С7МДП - тимические тельца в виде многочисленных кистоподобных полостей.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 400.



**Рисунок 12. Тимус беременных мышей СВА группы с физиологической беременностью**

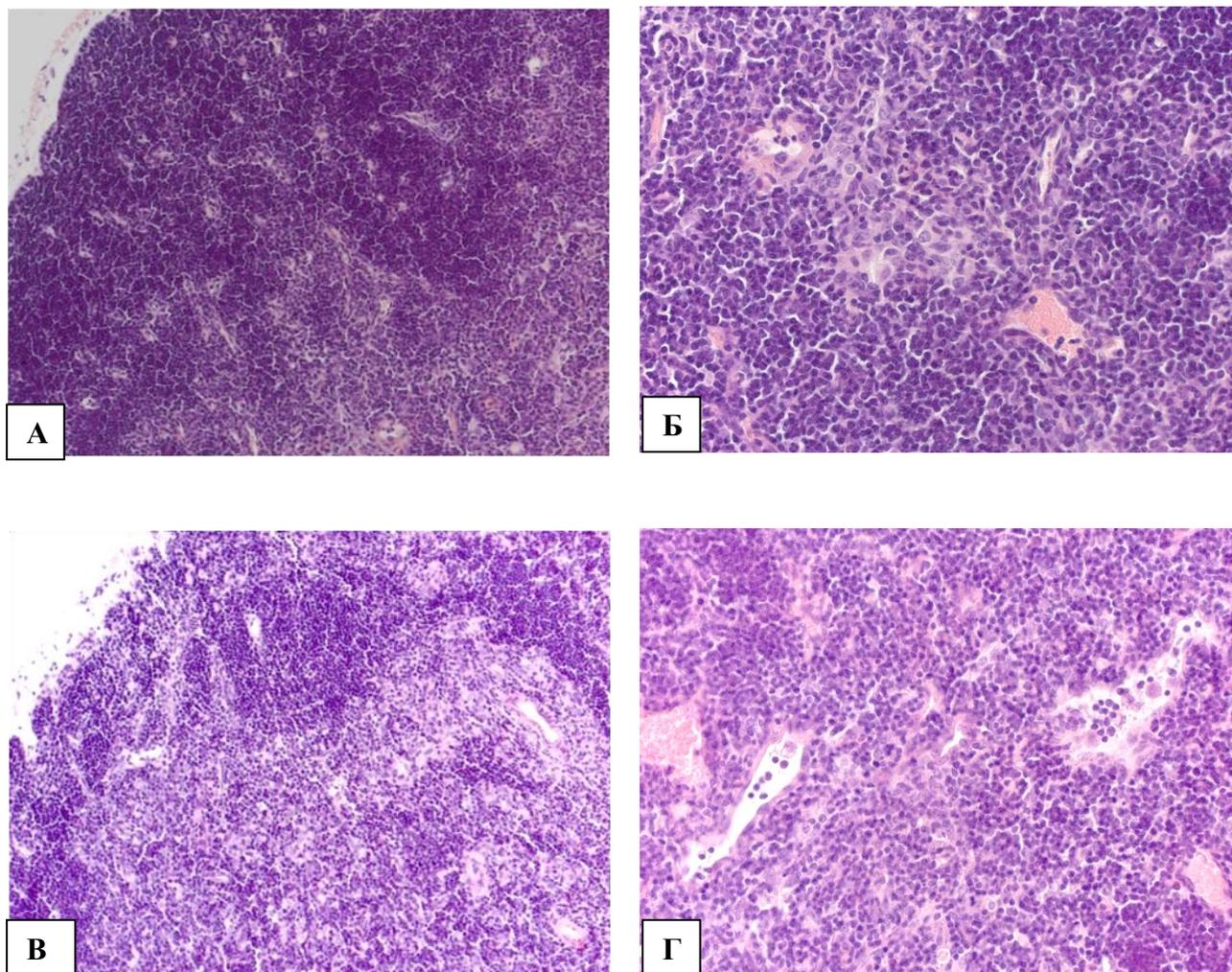
А. Структура тимуса на 8-й ДГ - преобладание коркового слоя, границы между корковым мозговым веществом четкие.

Б. Строение мозгового вещества тимуса на 8-й ДГ - преобладают эпителиальные ретикулярные клетки, многочисленные тимические тельца 1-2 стадий развития.

В. Структура тимуса на 14-й ДГ - преобладание мозгового вещества, очаговая инверсия слоев, макрофаги в корковом слое.

Г. Строение мозгового вещества тимуса на 14-й ДГ - преобладание лимфоцитов, многочисленные тимические тельца 1-2 стадий развития, единичные тимические тельца в виде кистоподобных полостей.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 400



**Рисунок 13. Тимус беременных мышей СВА группы спонтанных аборт**

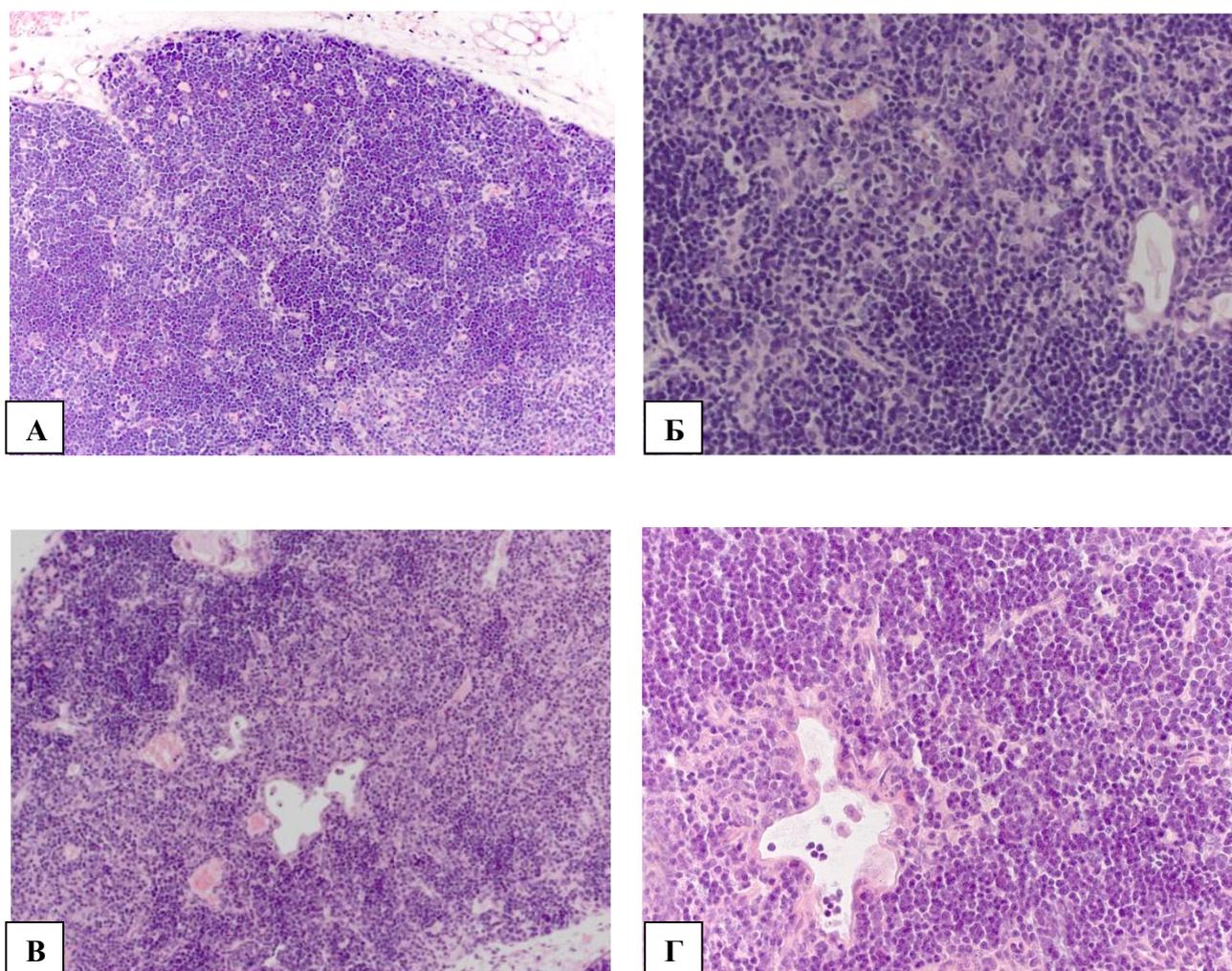
А. Структура тимуса на 8-й ДГ. Преобладание коркового вещества. Граница между корковым и мозговым слоем очагово нечеткая. В корковом слое присутствуют макрофаги.

Б. Строение мозгового вещества тимуса на 8-й ДГ. Множественные тимические тельца 1-2 фаз развития.

В. Структура тимуса на 14-й ДГ. Значительное преобладание мозгового вещества, уменьшение клеточности органа, умеренная инверсия слоев.

Г. Строение мозгового вещества тимуса на 14-й ДГ. В мозговом веществе и на границе коркового и мозгового слоев - тимические тельца в виде гигантских кистоподобных полостей.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 400



**Рисунок 14. Тимус беременных мышей СВА группы индуцированных аборт**

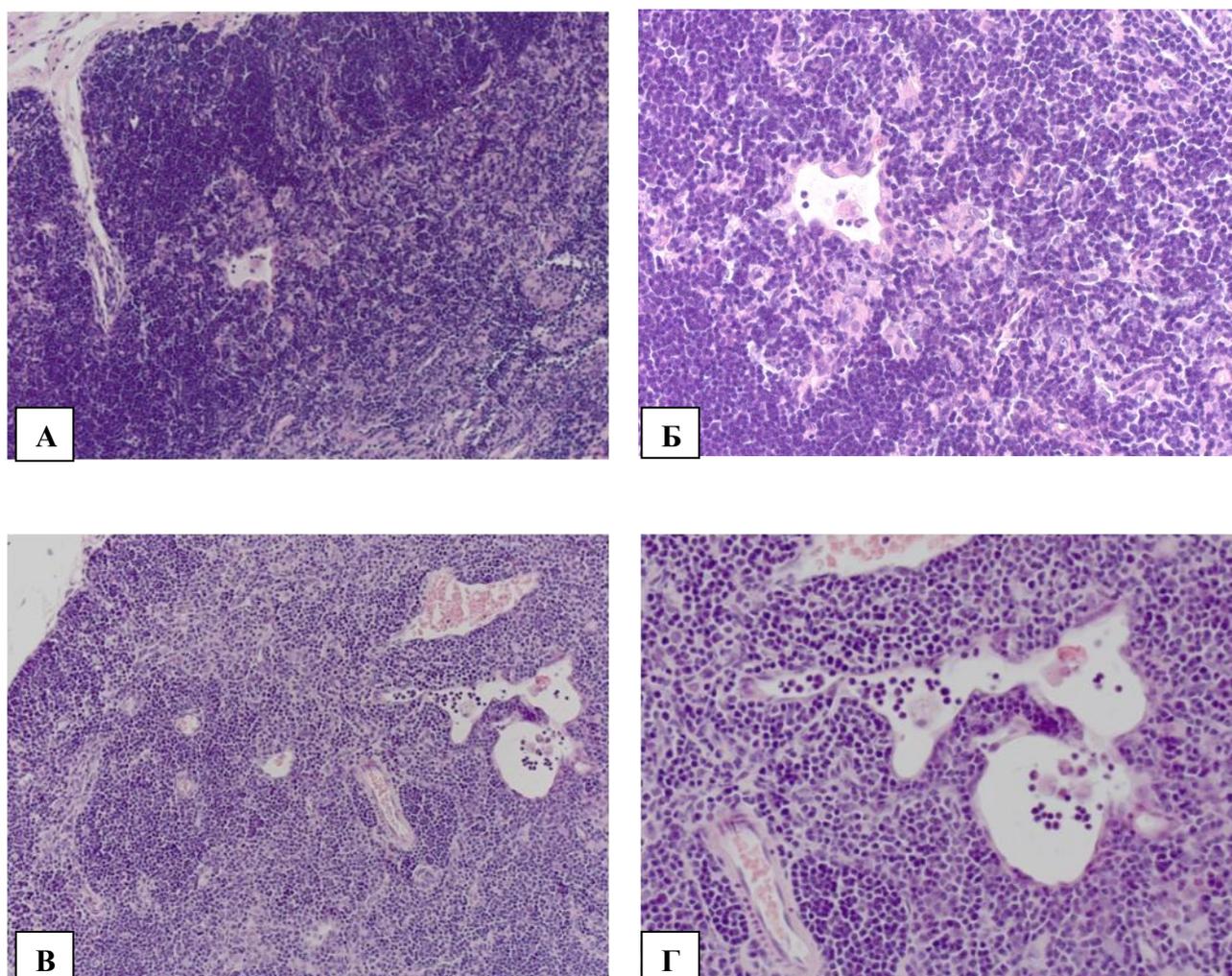
А. Структура тимуса на 8-й ДГ. Преобладание коркового вещества. В коре присутствуют макрофаги (картина «звездного неба»).

Б. Строение мозгового вещества тимуса на 8-й ДГ. Множественные тимические тельца 1-2 фаз развития. На границе коркового и мозгового вещества - тимическое тельце в виде кистоподобной полости.

В. Структура тимуса на 14-й ДГ. Преобладание мозгового вещества. Макрофаги в корковом веществе (картина «звездного неба»). Тимические тельца в виде гигантских кистоподобных полостей как на границе коркового и мозгового вещества, так и в корковом веществе.

Г. Строение мозгового вещества тимуса на 14-й ДГ. Тимическое тельце в виде кистоподобной полости.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 400



**Рисунок 15. Тимус беременных мышей СВА группы потенцированных аборттов.**

А. Структура тимуса на 8-й ДГ. Преобладание коркового вещества. Граница между корковым и мозговым слоем четкая. В корковом веществе присутствуют макрофаги (картина «звездного неба»).

Б. Строение мозгового вещества тимуса на 8-й ДГ. Множественные тимические тельца 1-2 фаз развития. На границе коркового и мозгового вещества - тимическое тельце в виде кистоподобной полости.

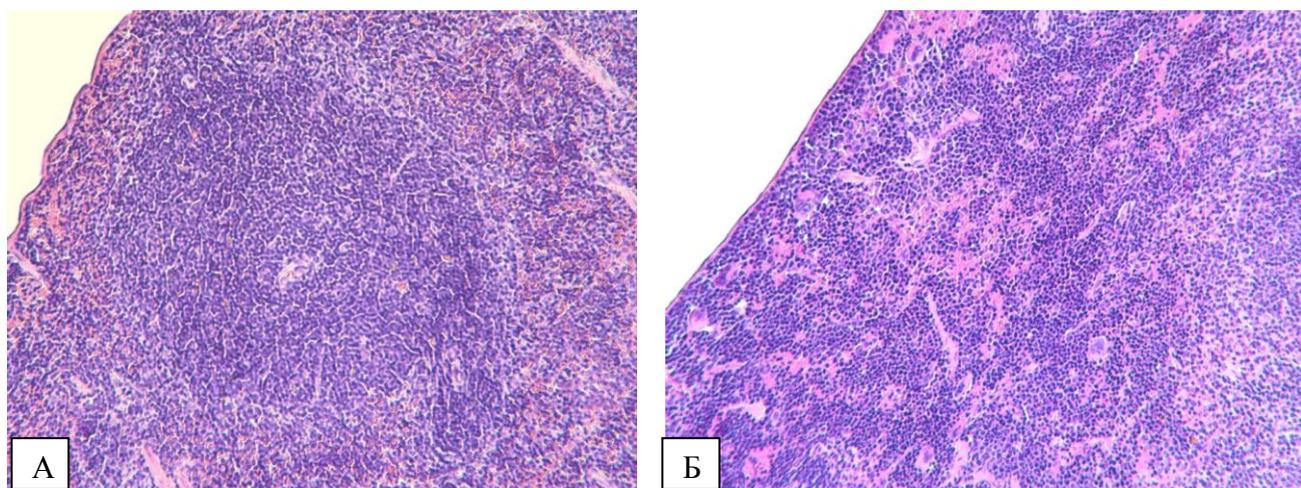
В. Структура тимуса на 14-й ДГ. Граница между корковым и мозговым слоем четкая, значительное преобладание мозгового слоя, уменьшение клеточности коркового и мозгового вещества, очаговая инверсия слоев;

Г. Строение мозгового вещества тимуса на 14-й ДГ. В мозговом веществе и на границе коркового и мозгового вещества присутствуют тимические тельца в виде гигантских кистоподобных полостей.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, Б 100; В, Г 400

### 3.3 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕЗЁНКИ У МЫШЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ, СПОНТАННЫМИ, ИНДУЦИРОВАННЫМИ И ПОТЕНЦИРОВАННЫМИ АБОРТАМИ

Морфологическое и морфометрическое исследование морфофункциональных зон селезёнки небеременных самок СВА выявило равное соотношение белой и красной пульпы, в белой пульпе наблюдали преобладание лимфоидных узелков, не имеющих светлых центров (табл. 6, рис.16 А, рис.21). Двукратное введение С7МДП увеличивало долю белой пульпы и зоны ПАЛМ (табл. 6, рис.16 Б, рис.21), маргинальная зона, как и у интактных самок, была умеренно выражена.



**Рисунок 16. Селезенка небеременных самок мышей СВА.**

А. Интактные самки. В белой пульпе преобладают лимфоидные узелки, не имеющие светлых центров. Маргинальная зона умеренно выражена.

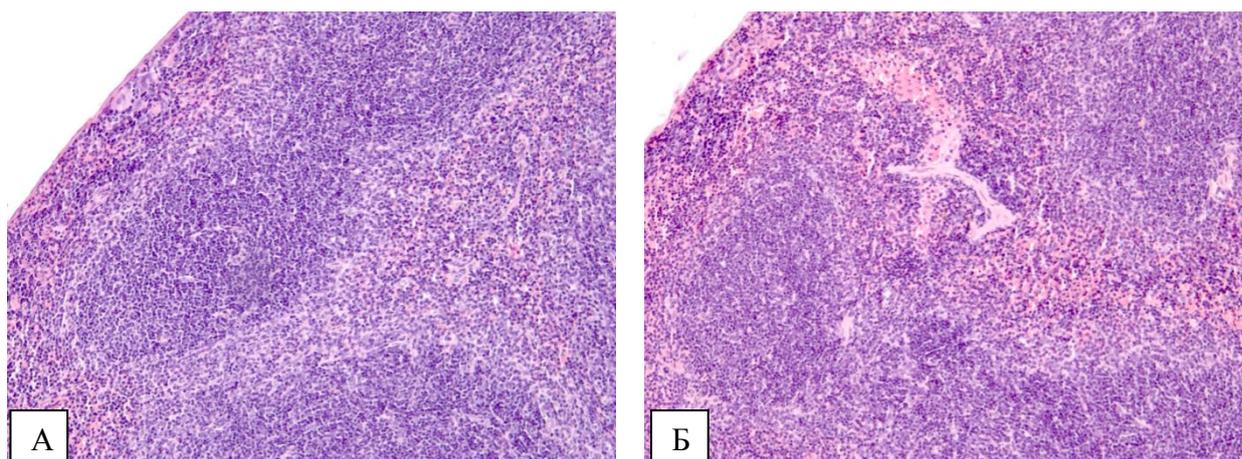
Б. После введения С7МДП. Увеличение зоны периартериолярных лимфоидных муфт (ПАЛМ-зоны). Появление мегакариоцитов.

Окрасивание гематоксилином и эозином. Ув. 100.

**Таблица 6. Морфометрические показатели селезёнки небеременных самок мышей СВА и беременных самок СВА в группах физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортс.**

Морфометрические показатели Группа наблюдений	Срок беременности	Объемная плотность, % от белой пульпы		Индекс отношения объемной плотности белой пульпы к красной, усл. ед
		Лимфоидные узелки	ПАЛМ	
1. Небеременные		75,46± 10,9	24,54± 10,9	0,93±0,13
2. Небеременные с С7МДП		39,62± 7,67*	60,38± 7,67*	1,38± 0,42*
Физиологическая беременность	3. 8-й ДГ	53,54± 5,62*	46,46± 5,62*	1,19± 0,13*
	4. 14-й ДГ	50,26± 8,28*	49,74± 8,28*	1,5± 0,12*^
Спонтанные аборты	5. 8-й ДГ	60,46± 6,17*	39,55± 6,17*	1,03±0,26#
	6. 14-й ДГ	46,34± 7,47*^	53,66± 7,47*^	1,46±0,28*^
Индуцированные аборты	7. 8-й ДГ	17,90± 3,02*#	82,1± 3,02*#	1,8± 0,36*#
	8. 14-й ДГ	30,4± 5,47*#^	69,60± 5,47*#^	1,81± 0,14*#
Потенцированные аборты	9. 8-й ДГ	38,21±4,95*#~♦	61,79± 4,95*#~	1,44±0,33*#♦
	10. 14-й ДГ	40,16± 5,66~	59,84± 5,66~	1,8±0,15#^♦
<b>Статистически значимые отличия</b> * – от небеременных # – от физиологической беременности ^ – между сроками 8 и 14 ~ – индуцированных от потенцированных абортов ♦ – от спонтанных абортов		p1–2=0,008 p1–3=0,008 p1–4=0,008 p1–5=0,032 p1–6=0,008 p1–7=0,016 p1–8= 0,016 p1–9= 0,016 p3–7 =0,036 p3–9=0,016 p4–8=0,008 p5–6=0,032 p5–9=0,029 p7–8=0,036 p7–9=0,029 p8–10=0,032		p1–2=0,01 p1–3=0,004 p1–4<0,001 p1–6=0,002 p1–7= 0,001 p1–9= 0,001 p3–4=0,001 p3–5=0,013 p3–7=0,002 p3–9=0,013 p4–8 <0,001 p4–10<0,001 p5–6=0,013 p5–9=0,005 p6–10=0,008 p9–10=0,022

При физиологической беременности селезёнка самок на 8-й ДГ характеризовалась почти двукратным увеличением доли белой пульпы по сравнению с небеременными самками, Т- и В-зоны были выражены в равной степени (табл. 6, рис.17 А, рис.21). На 14-й ДГ доля белой пульпы была больше, чем в предыдущий срок беременности, при этом сохранялось равное соотношение долей ЛУ и ПАЛМ (табл. 6, рис.17 Б, рис. 21). В оба срока беременности в белой пульпе наблюдали одиночные ЛУ со светлыми центрами, маргинальная зона была выражена незначительно на 8-й ДГ, умеренно – на 14-й ДГ.



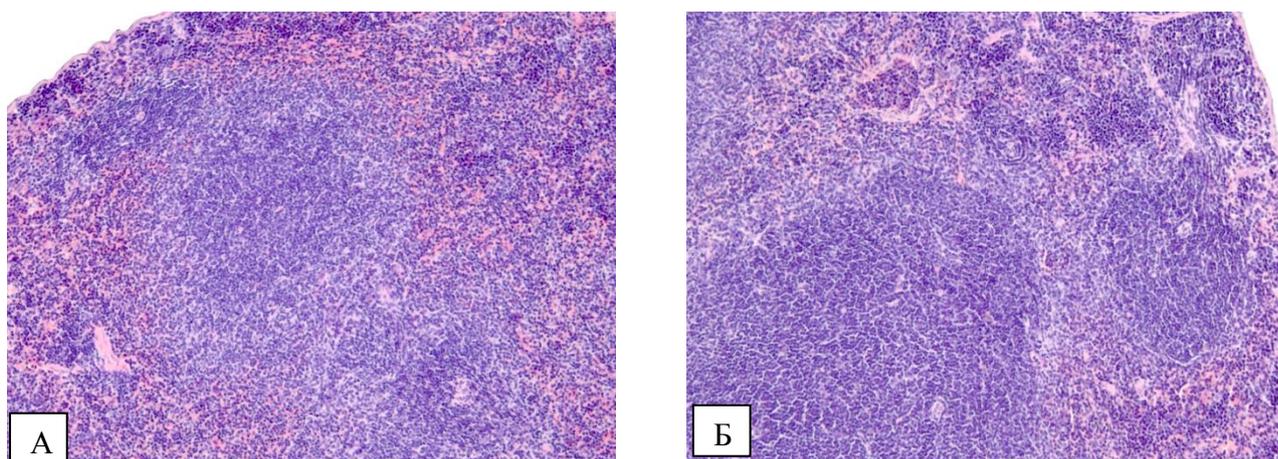
**Рисунок 17. Селезёнка самок СВА при физиологической беременности.**

А. 8-й ДГ. Преобладание доли белой пульпы. Т - и В-зоны выражены в равной степени. Маргинальная зона умеренно выражена.

Б. 14-й ДГ. Преобладание доли белой пульпы. Маргинальная зона хорошо выражена.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

При скрещивании линий, дающем высокий уровень спонтанных аборт, в селезёнке самок на 8-й ДГ доля белой пульпы была значительно меньше, чем у самок с физиологической беременностью, не отличаясь в то же время от данного показателя у небеременных самок. В-зона преобладала и была более выражена, чем у самок СВАхBalb/c, но занимала меньшую площадь по сравнению с небеременными самками (табл. 6, рис. 18А, рис. 21). В белой пульпе присутствовали ЛУ со светлыми центрами и хорошо выраженной маргинальной зоной. На 14-й ДГ морфометрические показатели селезёнки у самок СВАхDBA/2 и СВАхBalb/c не различались (табл. 6, рис. 18 Б, рис. 21).



**Рисунок 18. Селезенка самок СВА при спонтанных абортах.**

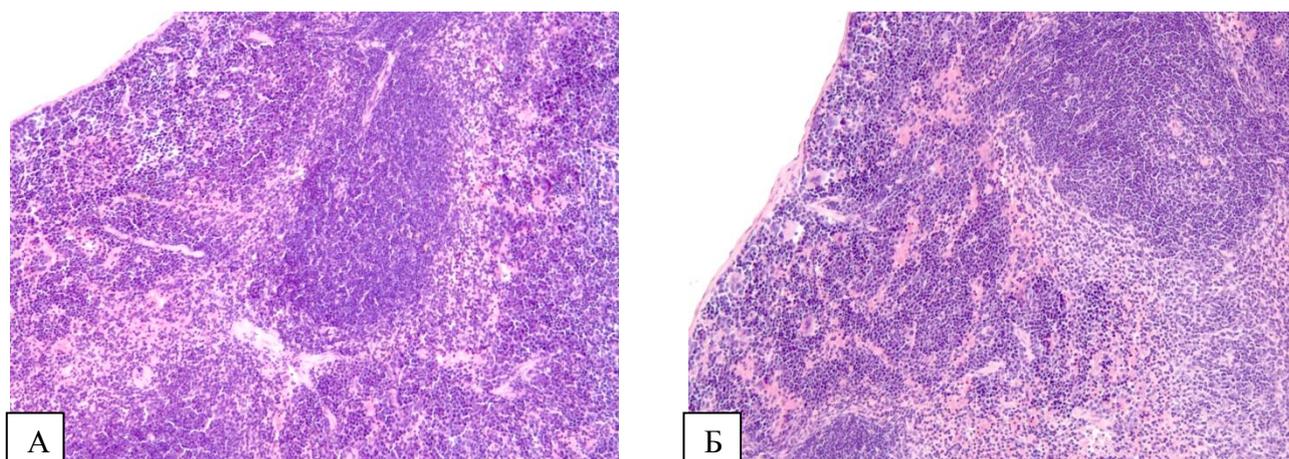
А. 8-й ДГ. Красная и белая пульпа выражены в равной степени. Лимфоидные узелки преобладают над ПАЛМ-зоной. Маргинальная зона хорошо выражена.

Б. 14-й ДГ. Преобладание доли белой пульпы. Т-и В-зоны одинаково выражены.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.

Таким образом, сравнение морфометрических показателей функциональных зон селезёнки самок показало, что беременность с высоким уровнем спонтанных аборт, в отличие от физиологической беременности, характеризуется меньшей объемной долей белой пульпы с тенденцией к преобладанию В-зоны на 8-й ДГ. На 14-й ДГ морфометрические показатели селезёнки у самок СВАхDBA/2 и СВАхBalb/c не различались.

Группа индуцированных аборт характеризовалась увеличением объемных долей белой пульпы преимущественно за счет ПАЛМ-зоны селезёнки на 8-й ДГ (табл. 6, рис. 19 А, рис. 21). Эти показатели превышали аналогичные как у самок СВА х Balb/c, так и у небеременных самок после введения С7МДП (в 1,8 и 1,4 раза, соответственно). На 14-й ДГ наблюдалась хорошо выраженная маргинальная зона, сохранялось значительное преобладание белой пульпы за счет ПАЛМ-зоны, однако объемная доля ПАЛМ уменьшалась по сравнению с 8-м ДГ (табл. 6, рис. 19 Б, рис. 21).



**Рисунок 19. Селезенка самок СВА при индуцированных абортах.**

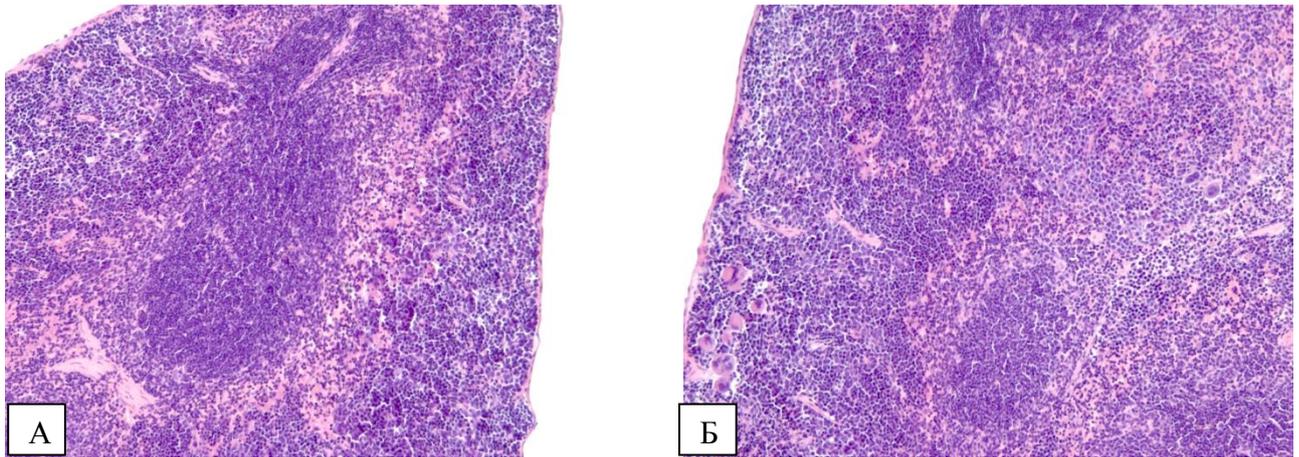
А. 8-й ДГ. Увеличение объемных долей белой пульпы и ПАЛМ-зоны. Маргинальная зона выражена незначительна. Появление мегакариоцитов.

Б. 14-й ДГ. Преобладание белой пульпы и ПАЛМ-зоны, умеренно выраженная маргинальная зона. Появление мегакариоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.

При изучении группы потенцированных абортотворов на 8-й ДГ в селезенке наблюдали увеличение белой пульпы за счет ПАЛМ-зоны по сравнению с показателями у самок СВАхДВА/2, но менее выраженное, чем у самок с индуцированными абортами. Показатели соотношения белой и красной пульпы, объемной плотности ЛУ и ПАЛМ не отличались от соответствующих показателей морфофункциональных зон селезенки небеременных самок после двукратного введения С7МДП (табл. 6, рис. 20 А, рис. 21). На 14-ый ДГ объемная доля белой пульпы возрастала по сравнению как с 8-ым ДГ в данной группе, так и с 14-ым ДГ у самок СВАхДВА/2 без введения иммуномодулятора (табл. 6, рис. 20 Б, рис. 21). Показатели объемных долей ЛУ и ПАЛМ не отличались ни от показателей предыдущего срока беременности, ни от показателей селезенки самок СВАхДВА/2 на 14-й ДГ без введения иммуномодулятора.

Иммуномодулятор С7МДП, индуцирующий абортотворы у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c, и повышающий уровень спонтанных абортотворов у самок СВА, оплодотворенных самцами ДВА/2 вызывал увеличение объемных долей белой пульпы и Т-зависимой ПАЛМ-зоны. В условиях воздействия С7МДП при фертильном сочетании линий СВА х Balb/c, когда частота резорбции эмбрионов возрастала почти втрое (до 100%, в среднем  $45,4 \pm 6,31\%$ ), изменения показателей проявлялись уже на 8-й ДГ и были более выражены, чем при сочетании линий СВАхДВА/2, при котором частота резорбции под влиянием С7МДП увеличивалась в среднем лишь на 20%.

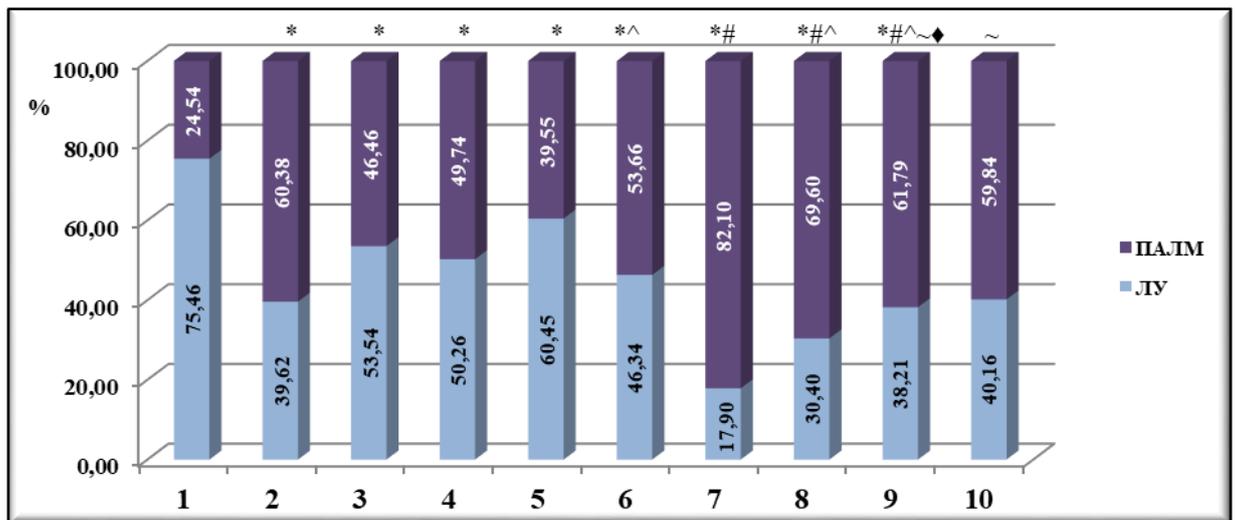


**Рисунок 20. Селезенка самок СВА при потенцированных абортах**

А. 8-й ДГ. Преобладание доли белой пульпы. Значительное преобладание ПАЛМ-зоны. Маргинальная зона выражена умеренно. Появление мегакариоцитов.

Б. 14-й ДГ. Преобладание доли белой пульпы. ПАЛМ-зона ярко выражена. Незначительно выраженная маргинальная зона. Появление мегакариоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.



**Рисунок 21. Объемная плотность ПАЛМ-зоны и лимфоидных узлов (ЛУ) (в % от белой пульпы) селезенки при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах.**

1– небеременные; 2– небеременные+С7МДП; 3– физиологическая беременность 8-й ДГ; 4– нормальная беременность 14-й ДГ; 5– спонтанные аборт 8-й ДГ; 6– спонтанные аборт 14-й ДГ; 7– индуцированные аборт 8-й ДГ; 8– индуцированные аборт 14-й ДГ; 9– потенцированные аборт 8-й ДГ; 10– потенцированные аборт 14-й ДГ

Статистически значимые отличия,  $p \leq 0,05$ : \* – от небеременных, # – от физиологической беременности, ^ – между сроками 8-й ДГ и 14-й ДГ, ~ – индуцированных от потенцированных аборт, ♦ – от спонтанных аборт.

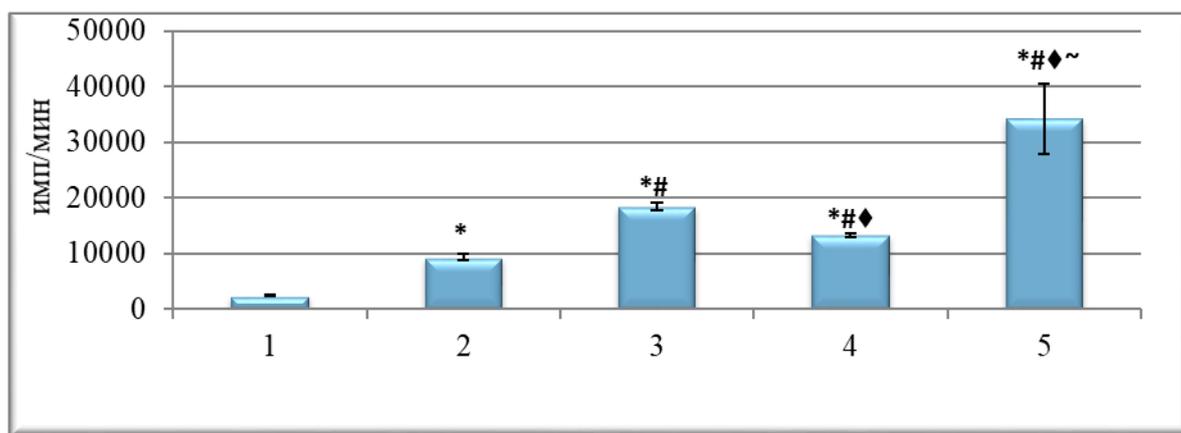
### 3.4 Спонтанная пролиферация лимфоцитов селезенки самок СВА

Определение уровня спонтанной пролиферации лимфоцитов селезенки самок СВА показало, что на 9-й ДГ пролиферативная активность резко возрастает по сравнению с небеременными самками как при физиологической беременности, так и в комбинации с высоким уровнем спонтанных аборт (табл. 7, рис. 22). У самок группы спонтанных абортов пролиферативная активность лимфоцитов селезенки превышала уровень пролиферации лимфоцитов селезенки небеременных самок в 7,41 раза, а самок с физиологической беременностью – в 1,97 раза, что свидетельствует о том, что при беременности с высоким уровнем спонтанных абортов лимфоциты селезенки самок активированы в значительно большей степени, чем при физиологической беременности.

В группе индуцированного невынашивания беременности уровень пролиферации лимфоцитов селезенки был в 1,42 раза выше, чем при физиологической беременности, а в группе потенцированного невынашивания – 1,86 раза выше, чем при спонтанных абортах (табл. 7, рис. 22). Таким образом, повышение уровня эмбриональных потерь при мурамилдипептид-зависимых абортах происходит на фоне усиления пролиферативной активности лимфоцитов селезенки беременных самок, значительно превышающей показатели пролиферации при физиологической беременности и спонтанных абортах.

**Таблица 7. Спонтанная пролиферация лимфоцитов селезенки самок СВА**

Пролиферирующие клетки	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в имп/мин, $M \pm SE$	
СВА♀ небеременные	2488,67±65,97 1	
Физиологическая беременность	9373±136,83 2	
Спонтанные аборты	18447±252,49 3	
Индуцированные аборты	13315±215,83 4	
Потенцированные аборты	34239±3614,79 5	
Статистически значимые отличия	p1–2=0,008 p1–3=0,016 p1–4=0,016 p1–5=0,016 p2–3=0,016	p2–4=0,016 p2–5=0,036 p3–4=0,029 p3–5=0,029 p4–5=0,029



**Рисунок 22. Уровень пролиферации лимфоцитов селезенки мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах**

1– небеременные, 2– группа физиологической беременности, 3– группа спонтанных аборт, 4– группа индуцированных аборт, 5– группа потенцированных аборт

Статистически значимые отличия,  $p \leq 0,05$ : \* – от небеременных, # – от физиологической беременности, ^ – между сроками 8–й ДГ и 14–й ДГ, ~ индуцированных от потенцированных аборт, ♦ – от спонтанных аборт

### 3.5. Пролиферация лимфоцитов селезенки самок СВА в смешанной культуре лимфоцитов

Анализ реакции лимфоцитов селезенки небеременных самок СВА (Н-2k) на лимфоциты самцов Balb/c и DBA/2 в смешанной культуре выявил более выраженный пролиферативный ответ на антигены DBA/2 по сравнению с Balb/c, проявляющийся как в уровне включения ЗН-Т, так и в индексе стимуляции (ИС), несмотря на одинаковый гаплотип (Н-2d) главного комплекса гистосовместимости самцов (табл. 8).

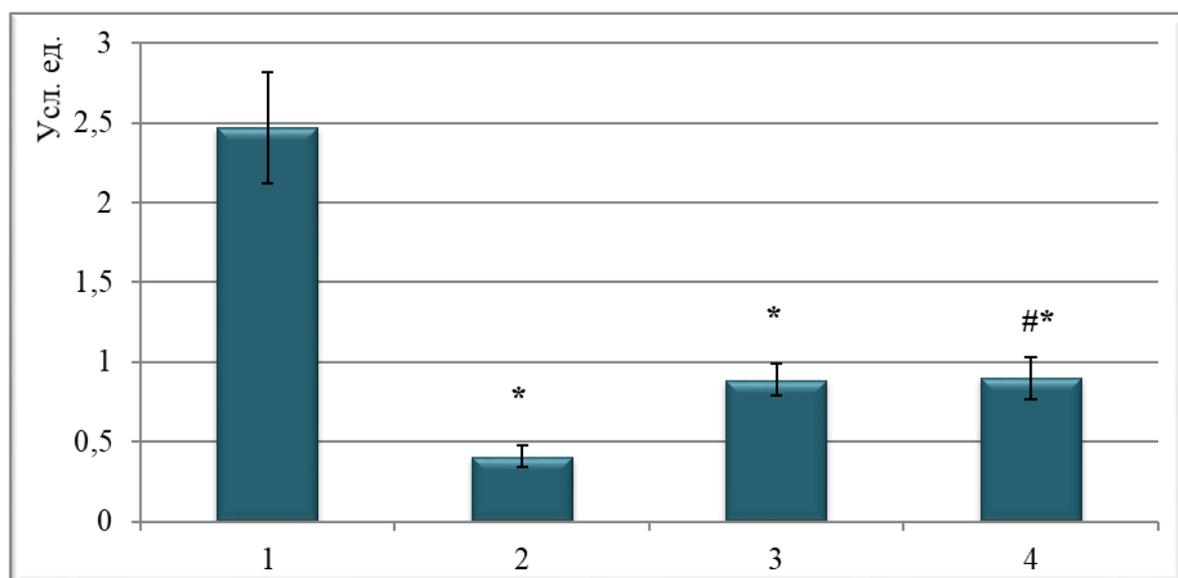
У беременных самок ИС клеток селезенки лимфоцитами самцов на 9-й ДГ уменьшался по сравнению небеременными как при фертильной (с 10, 61 до 2,47), так и при «абортотенной» (с 30,46 до 0,89) комбинации линий. Из-за высокого уровня пролиферации в контрольных (нестимулированных) культурах лимфоцитов селезенки мышей со спонтанными абортами, вдвое превышающего показатель контроля для физиологической беременности, при практически одинаковом включении ЗН-Т в стимулированные отцовскими лимфоцитами клетки (табл. 2, рис. 23), ИС лимфоцитов селезенки самок с высоким уровнем спонтанных аборт был достоверно меньше, чем ИС у фертильных самок (табл. 8, рис. 23). При индуцированных абортах ИС был почти в 6 раз меньше, чем в группе без введения иммуномодулятора (0,42 и 2,47, соответственно) за счет уменьшения включения ЗН-Т в

лимфоциты стимулированных культур и увеличения включения  $^3\text{H-T}$  в контроле (нестимулированные культуры лимфоцитов самок группы индуцированных аборт) (табл. 2, рис. 23). В варианте потенцированных аборт включение  $^3\text{H-T}$  в лимфоциты селезенки самок возрастало почти вдвое как в стимулированных отцовскими лимфоцитами, так и в контрольных (нестимулированных) культурах по сравнению с группой спонтанных аборт. Поэтому ИС лимфоцитов селезенки самок группы потенцированных аборт, рассчитанный по формуле, учитывающей уровень пролиферации контрольных культур, был таким же, как у самок в группе спонтанных аборт (табл. 8, рис. 23).

**Таблица 8. Проллиферация лимфоцитов селезенки самок СВА в смешанной культуре лимфоцитов**

Стимуляторы в СКЛ	Проллиферирующие клетки	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в имп/мин, $M \pm SE$	Индекс стимуляции, $M \pm SE$
♂Balb/c	СВА♀ небеременные	28886,75±2102,31 1	10,61±0,85 7
♂Balb/c	Физиологическая беременность	32547±3244,68 2	2,47±0,35 8
♂Balb/c	Индукцированные аборт	18741,6±921,96 3	0,41±0,07 9
♂DBA/2	СВА♀ небеременные	78295±6431,68 4	30,46±2,58 10
♂DBA/2	Спонтанные аборт	34842,17±1904,33 5	0,89±0,1 11
♂DBA/2	Потенцированные аборт	65207,88±4527,05 6	0,90±0,13 12
Статистически значимые отличия		p1-3=0,036 p1-4=0,012 p2-3=0,016 p3-6=0,002 p4-5<0,001 p5-6<0,001	p7-8= 0,029 p7-9= 0,016 p7-10= 0,004 p8-9= 0,016 p8-11= 0,010 p9-12= 0,020 p10-11<0,001 p10-12<0,001

Примечание. Контроль – показатели включения  $^3\text{H}$ -тимидина ( $^3\text{H-T}$ ) в клетки-респондеры без добавления стимуляторов (см. табл. 7).



**Рисунок 23. Проллиферативный ответ лимфоцитов селезенки беременных самок СВА на лимфоциты самцов в смешанной культуре (индекс стимуляции, усл. ед.)**

1– физиологическая беременность, ♂Balb/c; 2– индуцированные аборт, ♂Balb/c; 3– спонтанные аборт, ♂DBA/2; – потенцированные аборт, ♂DBA/2

Статистически значимые отличия  $p \leq 0,05$  \*– от физиологической беременности, # – от спонтанных абортов

Очевидно, низкий индекс стимуляции (меньше 1), характеризует группы с неблагоприятным течением беременности, что говорит о супрессии иммунного ответа материнскими клетками селезенки на отцовские антигены.

### **3.6 ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ У МЫШЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ, ВЫСОКИМ УРОВНЕМ СПОНТАННЫХ, ИНДУЦИРОВАННЫХ И ПОТЕНЦИРОВАННЫХ АБОРТОВ**

#### **Изменение продукции цитокинов при наступлении и в динамике беременности.**

У небеременных самок мышей СВА/Ж исследуемые цитокины в культуральной жидкости клеток селезенки либо не определялись в пределах чувствительности метода, либо выявляли их низкие уровни продукции за исключением ИЛ-6, ИЛ-10 и ИФН- $\gamma$  (391,24, 219,84, 309,32 пг/мл, соответственно) (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

В группе с физиологической беременностью по сравнению с небеременными мышами на 8-й ДГ отмечался рост уровня цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-17, ГМ-КСФ, ФНО- $\alpha$ , а на 14-й ДГ - достоверное снижение их уровня в супернатантах. Уровень ИФН- $\gamma$  на 8-й ДГ достоверно повышался. Показатели концентрации других цитокинов достоверно не изменялись с течением беременности (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

В группе с высокой частотой спонтанных абортс на 8-й ДГ по сравнению с небеременными мышами наблюдали усиление продукции следующих цитокинов: ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-5, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ГМ-КСФ, ИЛ-17, ИЛ-4. На сроке 14-й ДГ отмечалось достоверное снижение уровня ФНО- $\alpha$  (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

В группе беременных мышей с индуцированными и потенцированными абортс на 8-й ДГ уровни продукции всех изученных цитокинов достоверно повышались, однако к 14 дню отмечалось достоверное повышение лишь уровня ИЛ-5 (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

По сравнению с небеременными самками СВА/Ж на 8-й день беременности (начало развития плаценты, морфогенез лабиринта, обеспечивающего материнско-плодный обмен) в группе физиологической беременности усиливалась продукция противовоспалительного (ИЛ-4), колониестимулирующего (ГМ-КСФ) и провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ) цитокинов. У самок с высоким уровнем спонтанных резорбций эмбрионов усиливалась продукция всех исследованных цитокинов, за исключением ИЛ-10. Анализ профиля провоспалительных цитокинов показал, что на данном сроке беременности у самок с физиологической беременностью уровень ИФН- $\gamma$  (20000 пг/мл) превышал в 3,4 раза таковой в группе со спонтанными абортс, в 2,2 раза – с индуцированными репродуктивными потерями. У самок с физиологически протекающей беременностью продукция лимфоцитами селезенки ИЛ-17 *ex vivo* была почти вдвое ниже, чем у мышей с высоким уровнем спонтанных и индуцированных абортс (640, 1262, 1042 пг/мл, соответственно), ИЛ-2 – вдвое ниже, чем в парах со спонтанными абортс (5400 пг/мл и 11200 пг/мл), а ИЛ-1 $\alpha$ , в отличие от мышей с высоким уровнем спонтанных и индуцированных резорбций эмбрионов, не выявлялся.

Концентрация ГМ-КСФ и противовоспалительного ИЛ-10 у самок с индуцированными абортами была больше, чем у самок с физиологической беременностью (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

Таким образом, 8-й ДГ при всех вариантах беременности по сравнению с небеременными самками характеризовался усилением продукции цитокинов, отражающих активность Th1-, Th2-, Th17-, T-регуляторных лимфоцитов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, за исключением ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-5, ИЛ-10 при физиологической беременности и ИЛ-10 при спонтанных абортах.

На 14-й день беременности (зрелая плацента, наличие плацентарного кровотока) у самок с физиологической беременностью, в отличие от групп спонтанных и индуцированных аборт, провоспалительные цитокины либо не выявлялись (ИЛ-2 – 0, 1765, 4014 пг/мл; ИЛ-17 – 0, 633, 655, соответственно), либо их уровень был намного ниже, чем у самок указанных групп (ИФН- $\gamma$  – 1146, 4721, 11730 пг/мл; ФНО- $\alpha$  – 26, 70, 292 пг/мл, соответственно). У мышей с индуцированными абортами, у которых ЧР была выше, чем в условиях модели спонтанных репродуктивных потерь, отмечалась максимальная концентрация ИЛ-17 (655 пг/мл), ИФН- $\gamma$  (11730 пг/мл) и ФНО- $\alpha$  (292 пг/мл). Показатели ИФН- $\gamma$  были выше в 10,2 раза, чем в группе физиологической беременности, и в 2,5 раза, чем в парах с частыми спонтанными абортами; концентрация ФНО- $\alpha$  превышала в 11,2 и 4,2 раза таковую в фертильном контроле и у мышей с высоким уровнем спонтанных резорбций, соответственно (табл. 9, 10, рис. 24). Продукция противовоспалительного ИЛ-4, а также ГМ-КСФ в группах со спонтанными и индуцированными абортами была выше, чем у самок высокофертильных пар; концентрации этих цитокинов в супернатантах лимфоцитов селезенки самок с индуцированными абортами превышали соответствующие показатели в парах спонтанных аборт в 10,5 и 8,0 раз, соответственно (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

Таким образом, было установлено, что на 14-й ДГ у самок с физиологической беременностью в отличие от самок со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами провоспалительные цитокины либо не определяются в пределах чувствительности метода (ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-17), либо их уровень намного ниже (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), чем у самок с высоким уровнем эмбриональных потерь. Более высокие, чем при физиологической беременности, показатели продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ГМ-КСФ были выявлены при спонтанных и индуцированных абортах, а ИЛ-10 – при потенцированных абортах.

Анализ динамики продукции про- и противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов у самок экспериментальных групп показал следующее. В группе спонтанного невынашивания беременности 8-й ДГ характеризовался повышением уровня ИЛ-2. Индуцированные и потенцированные аборт отличало сохранение повышенного уровня этого

цитокина на 14-й ДГ, в то время как физиологическая беременность и спонтанные абортс характеризовались снижением провоспалительного ИЛ-2 до нуля (табл. 9, рис. 24).

В группах спонтанных, индуцированных и потенцированных абортс не наблюдалось достоверного снижения уровня ИЛ-6 и ИЛ-17 к 14-й ДГ, как в группе физиологической беременности (табл. 9, 10, рис. 24). В группе физиологической беременности продукция ИФН- $\gamma$  была высокой на раннем сроке беременности, но к 14 дню, резко уменьшалась. В группах спонтанных, индуцированных и потенцированных абортс наблюдали сохранение высокого уровня продукции этого цитокина (табл. 10, рис. 24).

В группах с физиологическим течением беременности и спонтанных абортс, наблюдали повышение уровня ФНО- $\alpha$  на 8-й ДГ и снижение его к 14 дню. Группы индуцированных и потенцированных абортс характеризовались отсутствием динамики уровня этого цитокина на 8-й и 14-й ДГ, так называемым «плато» (табл. 10, рис. 24). По сравнению с группой физиологической беременности в группе спонтанных абортс на 8-й ДГ отмечалось повышение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-17, а также ростового фактора ИЛ-5. На 14-й ДГ наблюдали повышение ИЛ-2, ИЛ-17 и усиление продукции ростового фактора ГМ-КСФ и противовоспалительного цитокина ИЛ-4.

На 8-й ДГ у мышей группы с индуцированными абортс по сравнению с группой физиологической беременности наблюдалось снижение уровня ИФН- $\gamma$ , повышение ИЛ-17 и ИЛ-10, а на 14-й ДГ наблюдалось достоверное повышение провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-17, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и ростового фактора ГМ-КСФ (табл. 9, 10, рис. 24, 25).

В группе беременных мышей с потенцированными абортс на 8-й ДГ по сравнению с группой спонтанных абортс наблюдался рост уровня ИФН- $\gamma$ , противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и снижение уровня ИЛ-5, а на 14-й ДГ - рост уровня ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и ростового фактора ГМ-КСФ (табл. 9, 10, рис. 24, 25). В группе потенцированных абортс по сравнению с группой индуцированных абортс на 8-й ДГ отмечалось повышение только ИЛ-1 $\alpha$ . При аналогичном сравнении на 14-й ДГ отмечалось повышение уровней ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-5 (табл. 9, рис. 24, 25).

**Таблица 9. Изменения концентрации ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 в культуральной среде клеток селезёнки небеременных мышей и мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, мурамилдипептид-индуцированных и мурамилдипептид-потенцированных аборт, Me (25L; 75U)**

Цитокины		ИЛ-1 $\alpha$	ИЛ-2	ИЛ-5	ИЛ-6	ИЛ-10
Экспериментальные группы						
1. Небеременные самки		0,00 (0,00; 0,00.	0,00 (0,00; 54,53)	0,00 (0,00; 0,00)	391,24 (164,55; 899,29)	219,84 (95,82; 458,36)
2. Небеременные самки после введения С7МДП		0,00 (0,00; 81,28.	7643,86* (4510,44; 12359,71)	115,72* (56,34; 143,07)	3302,71* (2651,05; 5894,96)	426,49 (334,75; 747,97)
Физиологическая беременность	3. 8-й ДГ	0,00 (0,00; 27,99)	5358,99* (3213,11; 11070,73)	26,97 (0,00;104,31)	1770,92* (1102,84; 3137,45)	244,16 (104,93; 375,97)
	4. 14-й ДГ	0,00 (0,00; 38,28)	0,00^ (0,00;0,00)	0,00 (0,00; 22,1)	874,34^ (572,3; 1477,57)	188,88 (98,13; 304,05)
Спонтанные аборты	5. 8-й ДГ	50,44*# (31,00; 73,87)	11205,35*# (4256,33; 15513,98)	157,86*# (132,52; 316,43)	3355,42*# (1776,87; 7240,08)	521,67 (155,3; 554,59)
	6. 14-й ДГ	0,00 (0,00; 48,32)	1765,32#^ (0,00; 7362,72)	44,12 (0,00; 144,69)	686,36^ (412,09; 2374,3)	242,83 (154,37; 809,87)
Индукцированные аборты	7. 8-й ДГ	23,41* (17,02; 33,69)	6495,25* (5675,8; 17712,65)	131,54* (0,00; 265,84)	3405,61*# (1396,93; 5180,55)	719,94*# (414,18; 867,86)
	8. 14-й ДГ	30,59 (0,00; 42,30)	4104,77#^ (3817,11; 5071,28)	9,74 (0,00;34,19)	1444,39^ (1055,4; 1849,88)	185,77^ (155,97; 269,92)
Потенцированные аборты	9. 8-й ДГ	97,91*#~♦ (77,42; 167,18)	7712,940* (2471,02;13952,01)	93,86*♦ (51,86; 122,23)	3339,32*# (1042,89; 5747,22)	768,87*# (86,7; 1001,85)
	10. 14-й ДГ	41,25^ (0,00; 57,64)	11427,62#~♦ (7585,35; 13623,61)	165,75#^~ (122,3; 219,31)	3688,21#~♦ (2506,25; 6021,97)	610,86#~ (308,36; 1026,43)

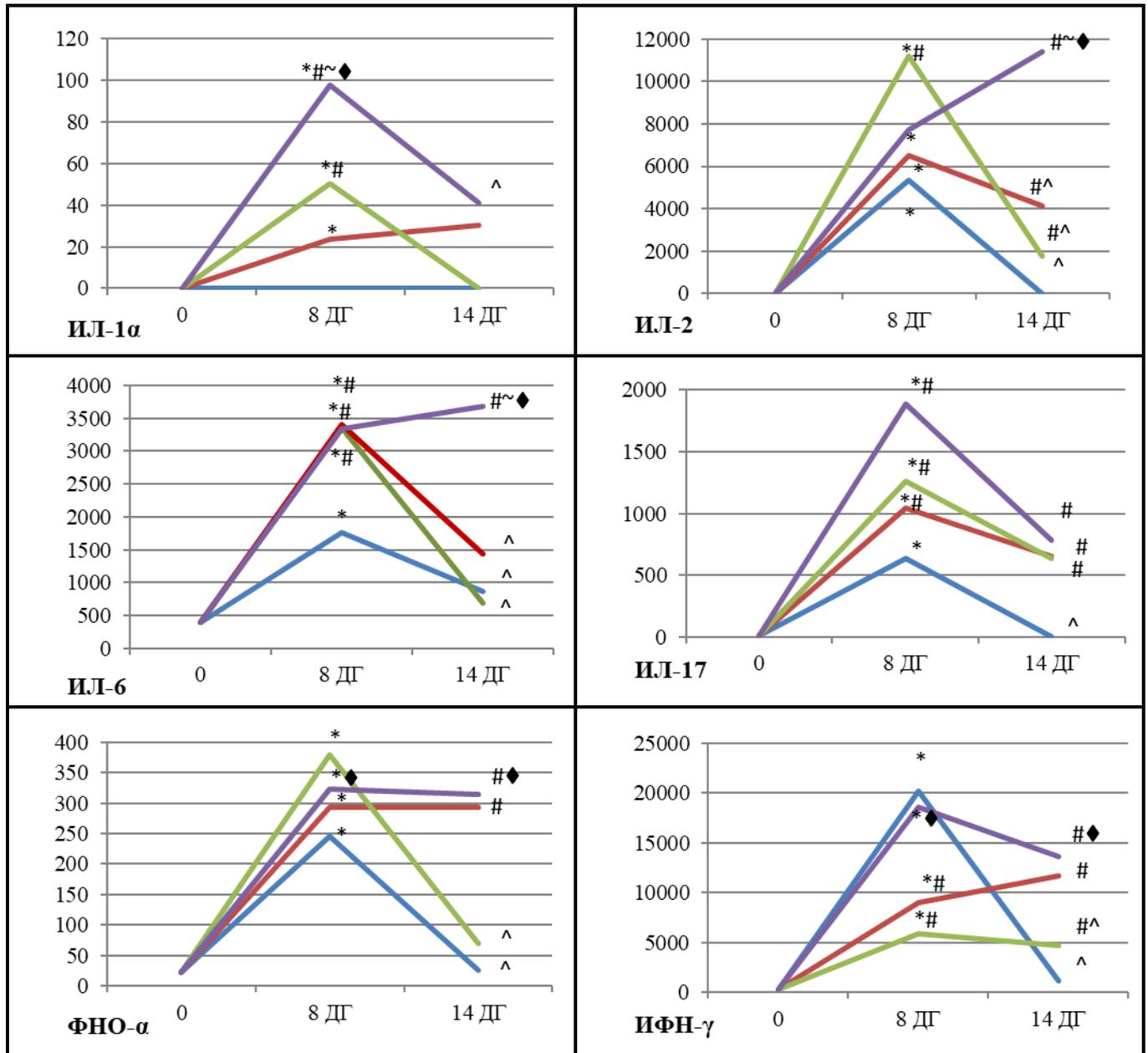
Таблица 9. Продолжение					
Статистически значимые отличия, р * – от небеременных # – от физиологической беременности ^ – между сроками 8-й и 14-й ДГ ~ – индуцированных абортот от потенцированных абортот ◆ – от спонтанных абортот	p1-5=0,032 p1-7=0,032 p1-9=0,008 p3-5=0,038 p3-9=0,008 p5-9=0,063 p7-9=0,009 p9-10=0,022	p1-2=0,01 p1-3=0,029 p 1-5=0,032 p1-7=0,004 p1-9=0,004 p3-4=0,006 p3-5=0,04 p4-6=0,04 p4-8=0,02 p4-10=0,002 p6-10=0,02 p7-8=0,026 p8-10=0,022	p1-2=0,033 p1-5=0,029 p1-9=0,01 p3-5=0,01 p5-9=0,038 p8-10=0,043 p9-10=0,02	p1-2=0,01 p1-3=0,032 p1-5=0,028 p1-7=0,019 p1-9=0,038 p3-4=0,028 p3-5=0,04 p3-7=0,04 p3-9=0,04 p4-10=0,038 p6-10=0,021 p8-10=0,033	p1-7=0,043 p3-7=0,026 p3-9=0,026 p4-10=0,036 p7-8=0,006 p8-10=0,023

**Таблица 10. Изменения концентрации ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-17 в культуральной среде клеток селезёнки небеременных мышей и мышей с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, мурамилдипептид-индуцированных и мурамилдипептид-потенцированных абортот, Ме (25L; 75U)**

Экспериментальные группы		Цитокины	ИФН- $\gamma$	ФНО- $\alpha$	ГМ-КСФ	ИЛ-4	ИЛ-17
1. Небеременные самки			309,32 (139,74; 645,46)	23,07 (14,66; 27,57)	0,00 (0,00; 0,00)	6,22 (0,00; 13,2)	13,12 (5,89; 17,59)
2. Небеременные самки после введения С7МДП			13470,76* (8011,49; 13754,2)	329,61* (195,69; 507,45)	601,28* (389,16; 826,59)	132,01* (71,99; 239,93)	1217,73* (544,93; 1335,36)
Физиологическая беременность	3. 8-й ДГ		20239,76* (15595,28; 30814,67)	245,79* (140,14; 382,8)	402,13* (0,00; 648,52)	156,58* (12,94; 602,36)	639,45* (23,2; 841,23)
	4. 14-й ДГ		1146,26^ (569,63; 2073,82)	26,65^ (17,275; 37,56)	0,00^ (0,00; 23,15)	0,00^ (0,00; 9,71)	0,00^ (0,00; 22,56)
Спонтанные аборты	5. 8-й ДГ		5927,86*# (545,71; 10849,39)	378,48* (195,08; 501,28)	833,58*# (77,73; 1095,03)	52,8* (21,0; 156,72)	1262,72*# (1203,7; 3161,32)
	6. 14-й ДГ		4721,94# (3129,03; 7823,43)	70,72^ (22,28; 226,81)	69,15# (37,95; 566,38)	18,34# (12,94; 246,51)	633,12# (103,51; 1423,64)
Индукцированные аборты	7. 8-й ДГ		9019,16*# (8087,77; 12252,98)	293,37* (223,92; 401,66)	787,31*# (590,37; 840,04)	308,77*# (229,83; 563,16)	1042,35*# (894,81; 1381,34)
	8. 14-й ДГ		11730,75# (8654,52; 20630,16)	292,55# (191,59; 326,57)	555,41# (383,48; 730,33)	190,14# (176,73; 207,52)	655,65# (562,64; 770,84)
Потенцированные аборты	9. 8-й ДГ		18611,11* $\blacklozenge$ (6344,68; 20609,7)	323,11* (5,18; 388,23)	780,55* (590,17; 1196,64)	291,37*# $\blacklozenge$ (175,37; 459,9)	1887,63*# (1030,55; 2599,42)
	10. 14-й ДГ		13610,14# $\blacklozenge$ (11609,88; 27830,05)	314,96# $\blacklozenge$ (248,27; 380,28)	649,36 $\blacklozenge$ (524,43; 927,6)	155,5 $\blacklozenge$ (135,94; 461,94)	787,5# (592,56; 934,53)

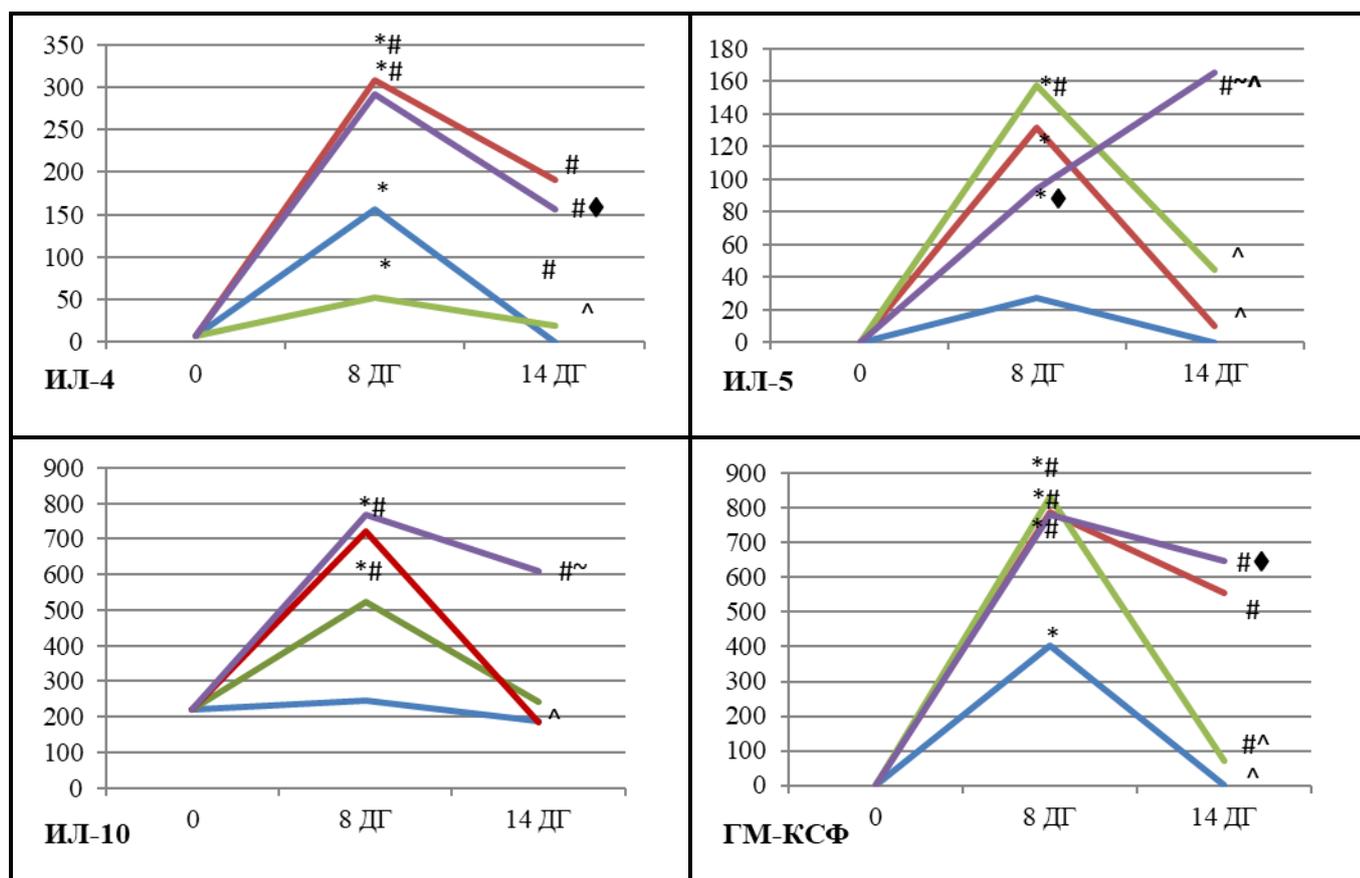
Таблица 10. Продолжение

Статистически значимые отличия, р	1-2<0,001	1-2=0,01	1-2=0,01	1-2=0,01	1-2=0,01
* – от небеременных	1-3=0,015	1-3=0,029	1-3=0,037	1-3=0,014	1-3=0,029
# – от физиологической беременности	1-5=0,036	1-5=0,029	1-5=0,032	1-5=0,045	1-5=0,029
^ – между сроками 8-й и 14-й ДГ	1-7=0,01	1-7=0,01	1-7=0,01	1-7=0,01	1-7=0,016
~ – индуцированных абортот от потенцированных абортот	1-9=0,01	1-9=0,01	1-9=0,01	1-9=0,029	1-9=0,029
◆ – от спонтанных абортот	3-4=0,036	3-4=0,03	3-4=0,03	3-4=0,035	3-4=0,014
	3-5=0,036	4-8=0,005	3-7=0,05	3-7=0,04	3-5=0,043
	3-7=0,038	p4-10=0,005	4-6=0,001	3-9=0,04	3-7=0,045
	4-6=0,05	5-6=0,048	4-8=0,001	4-6=0,011	3-9=0,03
	4-8=0,005	6-10=0,024	6-10=0,011	4-8=0,003	4-6=0,008
	p4-10=0,008			5-9=0,032	4-8=0,003
	5-9=0,008			6-10=0,044	4-10=0,029
	6-10=0,012				



**Рисунок 24. Динамика изменения концентрации ИЛ-1α, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17, ФНО-α, ИФН-γ (пг/мл) в супернатантах лимфоцитов селезенки самок СВА в различные сроки беременности.**

Статистически значимые отличия: \* – от небеременных самок, # – от физиологической беременности, ^ – между сроками 8-й ДГ и 14-й ДГ, ~ – индуцированных абортот от потенцированных абортот, ♦ – от спонтанных абортот



**Рисунок 25.** Динамика изменения концентрации ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ГМ-КСФ (пг/мл) в супернатантах лимфоцитов селезенки самок СВА в различные сроки беременности.

Статистически значимые отличия: \* – от небеременных самок, # – от физиологической беременности, ^ – между сроками 8-й ДГ и 14-й ДГ, ~ – индуцированных абортов от потенцированных абортов, ♦ – от спонтанных абортов

Таким образом, установлено, что на ранних сроках гестации у мышей с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов по сравнению с физиологической беременностью усиливается выработка клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и снижается продукция ИФН- $\gamma$ , который участвует в ремоделировании спиральных артерий эндометрия, ангиогенезе в имплантационных сайтах и сохранении децидуального компонента [Kitaya K. et al., 2007; Murphy S.P. et al., 2009; Zhang J. et al., 2011]. На 14-й ДГ в селезенке самок с высоким уровнем эмбриональных потерь, в отличие от физиологической беременности, сохраняется продукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-17, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), уровень которой максимален при индуцированных и потенцированных абортах. Усиление по сравнению с физиологической беременностью продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 и ГМ-КСФ у самок со спонтанными,

индуцированными и потенцированными абортами, очевидно, имеет компенсаторный характер, однако не отменяет абортотенный эффект провоспалительных Th1- и Th17-цитокинов.

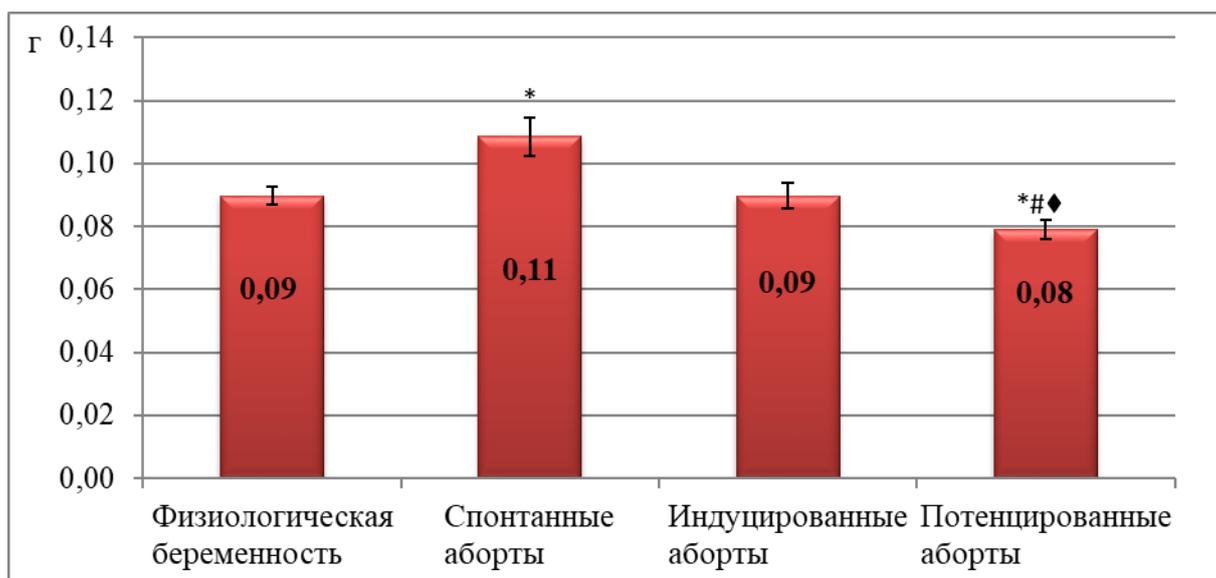
### 3.7. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЦЕНТЫ У МЫШЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ, ВЫСОКИМ УРОВНЕМ СПОНТАННЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ И ПОТЕНЦИРОВАННЫХ АБОРТОВ

#### 3.7.1. Масса плаценты самок СВА при физиологической беременности и высоком уровне спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт

Определение массы плацент жизнеспособных плодов на 14-й день беременности выявило, что средние показатели массы плаценты у самок со спонтанными абортами были достоверно больше, чем у самок с физиологической беременностью ( $0,11 \pm 0,006$  г против  $0,09 \pm 0,003$  г). Показатели массы плаценты в группах физиологически протекающей беременности ( $0,09 \pm 0,003$  г) и индуцированных аборт ( $0,09 \pm 0,004$  г) статистически значимо не различались (табл.11, рис. 26). Масса плаценты у самок с индуцированными абортами была на 12,5% больше, чем у самок с потенцированными абортами. У самок с потенцированными абортами отмечали достоверное уменьшение массы плаценты (гипоплазию) ( $0,08 \pm 0,003$  г) по сравнению с группами физиологической беременности, спонтанных и индуцированных аборт (табл.11, рис. 26).

**Таблица 11. Масса плаценты самок СВА на 14-й ДГ при физиологической беременности и высоком уровне спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт (г,  $M \pm SE$ )**

1. Физиологическая беременность (n=46)	2. Спонтанные аборт (n=46)	3. Индуцированные аборт (n=36)	4. Потенцированные аборт (n=26)
$0,09 \pm 0,003$	$0,11 \pm 0,006$	$0,09 \pm 0,004$	$0,08 \pm 0,003$
Статистическая значимость различий $p_{1-2} = 0,022$ $p_{1-3} = 0,325$ $p_{1-4} = 0,037$ $p_{2-4} = 0,002$ $p_{3-4} = 0,007$			



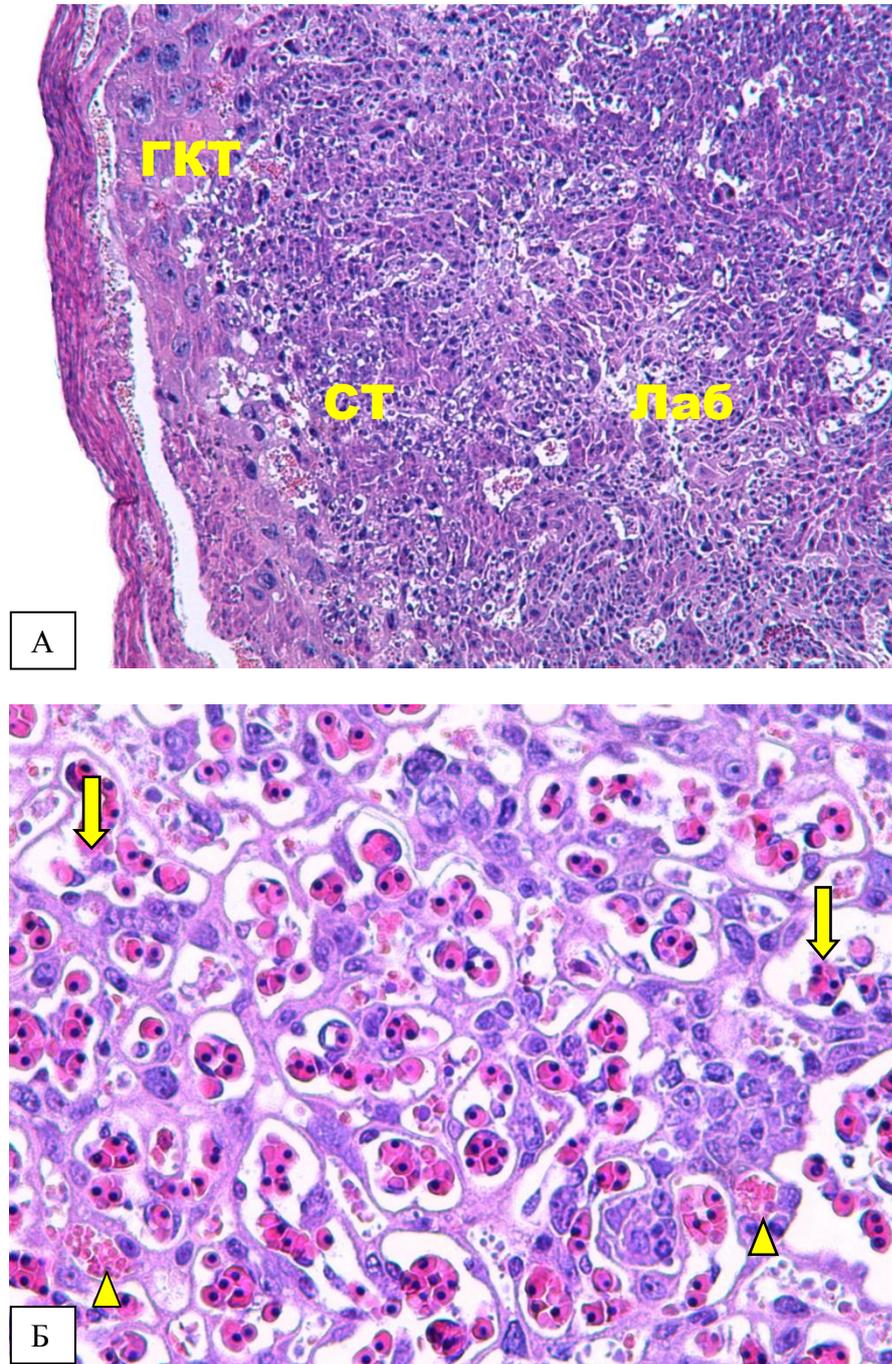
**Рисунок 26. Масса плаценты самок СВА при физиологической беременности и высоком уровне спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов.**

По оси абсцисс – экспериментальные группы, по оси ординат – масса плаценты (г).  
Примечание: статистически значимые отличия \* – от физиологической беременности, # – от спонтанных абортов, ♦ – индуцированных от потенцированных абортов.

### **3.7.2. Морфофункциональная характеристика плаценты при физиологической беременности, высоком уровне спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов на 14-й день гестации**

**Физиологическая беременность.** В плаценте самок с физиологической беременностью на 14-й ДГ четко различались зоны, характерные для зрелого (дефинитивного) органа: слой гигантских клеток (ГКТ), спонгиотрофобласт, или сетчатый слой, и разветвленный лабиринт. Слой ГКТ был непрерывным на большем протяжении и состоял из 2-4 рядов клеток (рис. 27 А). На границе между спонгиотрофобластом и слоем гигантских клеток наблюдали некоторое количество кровеносных сосудов различного диаметра. Лабиринт представлял собой разветвленную сеть плодных сосудов, содержащих фетальные ядерные эритробласты, и материнских лакун с безъядерными эритроцитами (рис. 27 Б). Материнская кровь граничила непосредственно с одноядерным цитотрофобластом, окруженным бислоем синцитиотрофобласта. На некотором протяжении материнская и плодная кровь были разграничены лишь тонким слоем базальной мембраны. Лабиринт являлся наиболее широким слоем плаценты, ширина слоя спонгиотрофобласта была почти вдвое меньше, наименьший слой плаценты составляли гигантские клетки трофобласта (табл. 12, рис. 27А, 31). В структуре лабиринта при физиологической беременности наибольшую долю составлял трофобласт,

объемная плотность плодовых сосудов была вдвое больше объемной плотности материнских лакун (табл. 13, рис. 27Б, 32).



**Рисунок 27. Плацента жизнеспособных плодов при физиологической беременности у самок мышей СВА на 14-й ДГ. ГКТ – гигантские клетки трофобласта, СТ – спонгиотрофобласт, Лаб – лабиринт.**

А. Непрерывный широкий слой ГКТ, состоящий из 3-4 рядов, на границе материнской части плаценты и СТ.

Б. Лабиринт плаценты. Разветвленная сеть плодных сосудов, содержащих фетальные ядерные эритроциты (стрелки), и материнские лакуны с безъядерными эритроцитами (треугольники). Фетально-материнский кровоток разграничен слоями трофобласта.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. А 50, Б 200.

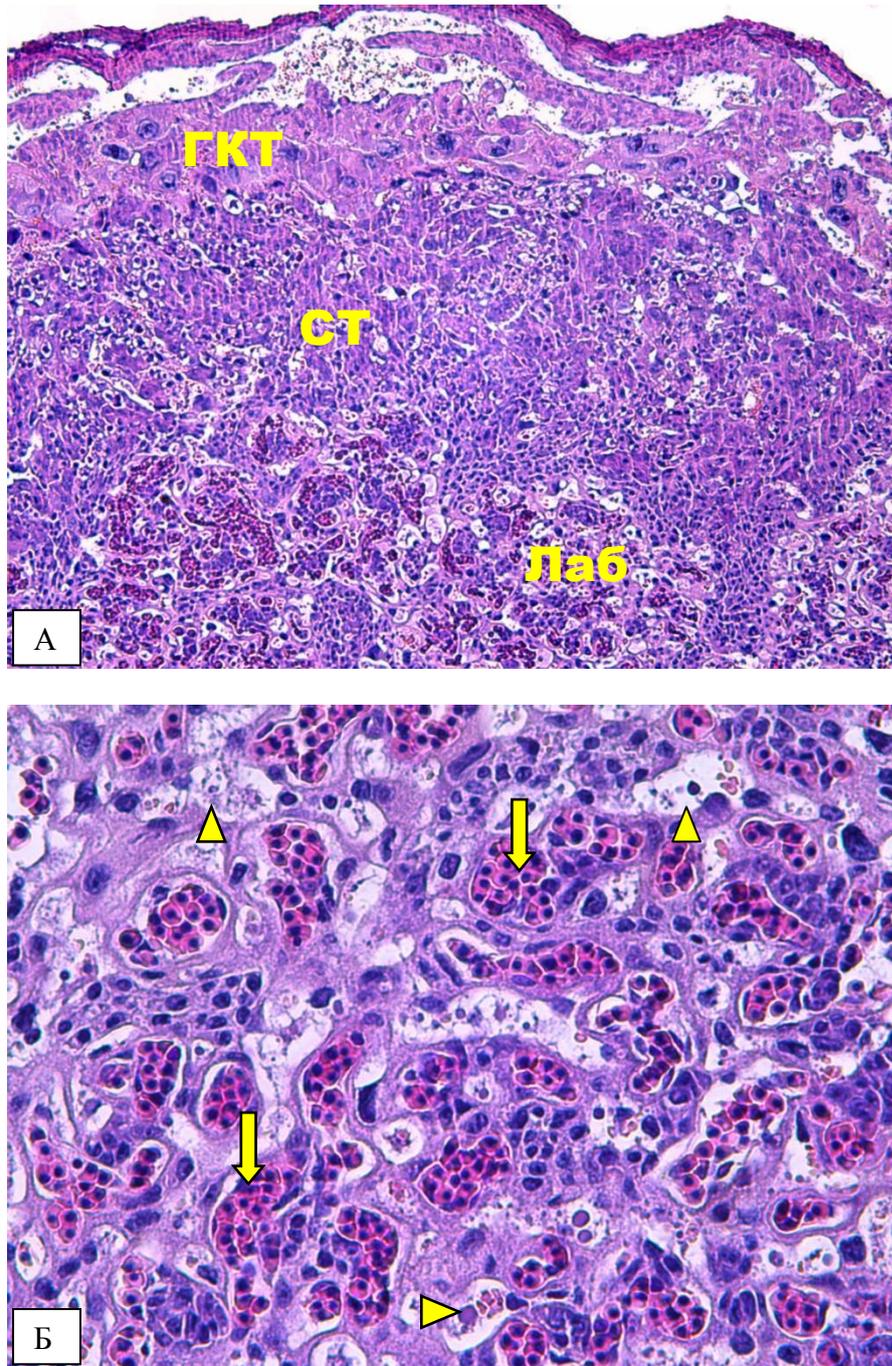
Таблица 12. Ширина слоев плаценты у самок с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных абортов, потенцированными и потенцированными абортами, мкм (M±SE)

Группы Слои плаценты	Физиологическая беременность 1	Спонтанные аборты 2	Индукцированные аборты 3	Потенцированные аборты 4	Статистически значимые отличия
Гигантские клетки	124,8±5,00	101,51±6,44	64,95±3,80	91,16±7,99	p1-2=0,03 p1-3=0,004 p1-4=0,01 p2-4=0,202 p3-4=0,004
Спонгиотрофобласт	327,4±19,02	339,14±5,46	294,33±7,61	349,33±44,81	p1-2=1,000 p1-3= 0,247 p1-4=0,687 p2-4=0,876 p3-4=0,024
Лабиринт	609,4±11,58	661,43±16,76	629,17±25,75	600,4±36,12	p1-2 = 0,048 p1-3=0,429 p1-4=0,882 p2-4=0,121 p3-4=0,662

**Таблица 13. Объемная плотность структур лабиринта плаценты самок с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных аборт, потенцированными и потенцированными абортами, % (M±SE)**

<b>Группы</b> <b>Компоненты лабиринта</b>	<b>Физиологическая беременность</b> <b>1</b>	<b>Спонтанные аборты</b> <b>2</b>	<b>Индукцированные аборты</b> <b>3</b>	<b>Потенцированные аборты</b> <b>4</b>	<b>Статистически значимые отличия</b>
<b>Плодовые сосуды</b>	35,69±3,89	35,56±4,27	15,95±1,06	20,03±2,42	p1-2 = 0,913 p1-3<0,001 p2-4= 0,028 p3-4=0,095 p1-4 =0,028
<b>Материнские лакуны</b>	19,26±1,86	21,72±3,16	21,33±2,96	20,36±2,56	p1-2 = 0,806 p1-3= 0,782 p2-4 = 1,000 p3-4= 0,970 p1-4 =0,824
<b>Трофобласт</b>	45,05±3,56	42,72±4,02	62,73±3,35	59,61±3,90	p1-2 = 0,605 p1-3 = 0,004 p2-4 = 0,016 p3-4= 0,569 p1-4 = 0,016

**Беременность с высоким уровнем спонтанных аборт**. В плаценте самок с высоким спонтанным уровнем абортов по сравнению с фертильными самками уменьшалась ширина слоя ГКТ ( $101,51 \pm 17,04$  мкм и  $124,8 \pm 11,19$  мкм, соответственно,  $p = 0,03$ ) и увеличивалась зона лабиринта ( $661,43 \pm 44,33$  мкм и  $609,4 \pm 25,89$  мкм, соответственно,  $p = 0,048$ ), ширина слоя спонгиозной трофобласты не изменялась (табл. 12, рис. 31). Слой ГКТ был на большом протяжении непрерывным и состоял из 1-3 рядов клеток (рис 28 А). В зоне спонгиозной трофобласты отмечалось расширение материнских артериолярных синусов и их опустошение. Соотношение структур лабиринта плаценты (объемные доли плодных сосудов, материнских лакун, трофобласта) статистически значимо не отличалось от соответствующих показателей структур лабиринта при физиологической беременности. Объемная доля плодных сосудов превышала объемную долю материнских лакун, как и в лабиринте плаценты самок с физиологической беременностью (табл. 13, рис. 32). В лабиринте наблюдалось выраженное полнокровие плодных сосудов и неравномерное кровенаполнение материнских лакун – большинство лакун были расширенными с проявлениями полнокровия, часть лакун была сужена и не содержала клеток крови (рис. 28 Б).

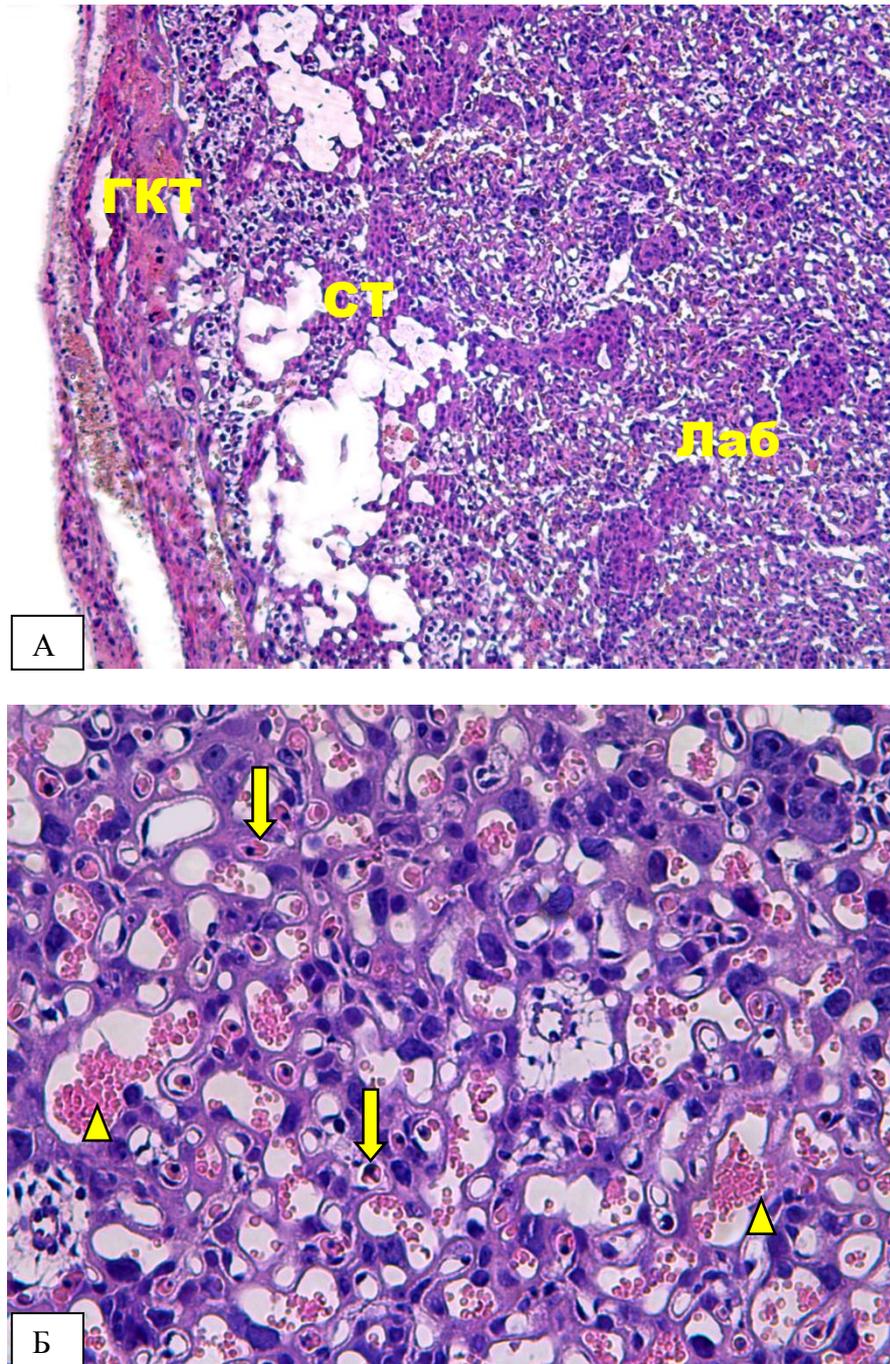


**Рисунок 28.** Плацента жизнеспособных плодов при беременности у самок группы спонтанных абортос на 14-й ДГ. ГКТ – гигантские клетки трофобласта, СТ – спонгиозотрофобласт, Лаб – лабиринт

А. Слой ГКТ на большом протяжении непрерывный, состоит из 1-3 рядов клеток

Б. Лабиринт плаценты. Выраженное полнокровие плодных сосудов (стрелки), и неравномерное кровенаполнение материнских лакун – большинство лакун расширены, с неравномерным кровенаполнением, часть лакун сужена и не содержит клеток крови (треугольники) Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение А 50, Б 200.

**Беременность с индуцированными абортами.** У самок СВА с индуцированными абортами в плаценте жизнеспособных плодов по сравнению с фертильным контролем слой ГКТ был прерывистым, представлен лишь 1-2 рядами клеток (рис. 29 А), ширина слоя резко уменьшалась ( $64,95 \pm 9,3$  мкм и  $124,8 \pm 11,19$  мкм, соответственно (табл. 12, рис. 31)). Ширина зон спонгиозной трофобласты и лабиринта не изменялась. В зоне спонгиозной трофобласты наблюдали многочисленные крупные полости, выраженное расширение и полнокровие материнских лакун (рис. 29 Б). По сравнению с плацентой самок с физиологической беременностью в зоне лабиринта плаценты самок СВА с индуцированными абортами вдвое уменьшалась объемная доля плодовых сосудов ( $35,69 \pm 13,4$  и  $15,95 \pm 3,51$ , соответственно) (табл. 13, рис. 32). Сужение плодовых сосудов сопровождалось их опустошением (рис. 29 Б). Объемная доля трофобласты резко увеличивалась ( $45,05 \pm 12,34$  и  $62,73 \pm 11,10$ , соответственно ((табл. 13, рис. 32))). Объемная доля материнских лакун соответствовала показателям контроля (табл. 13, рис. 32), но наблюдались их расширение и полнокровие (рис. 29 Б). В структуре лабиринта, в отличие от физиологической беременности, объемная плотность материнских лакун значительно превышала объемную плотность плодовых сосудов (табл. 13, рис. 32), что свидетельствует о нарушении фетально-плацентарного кровообращения.



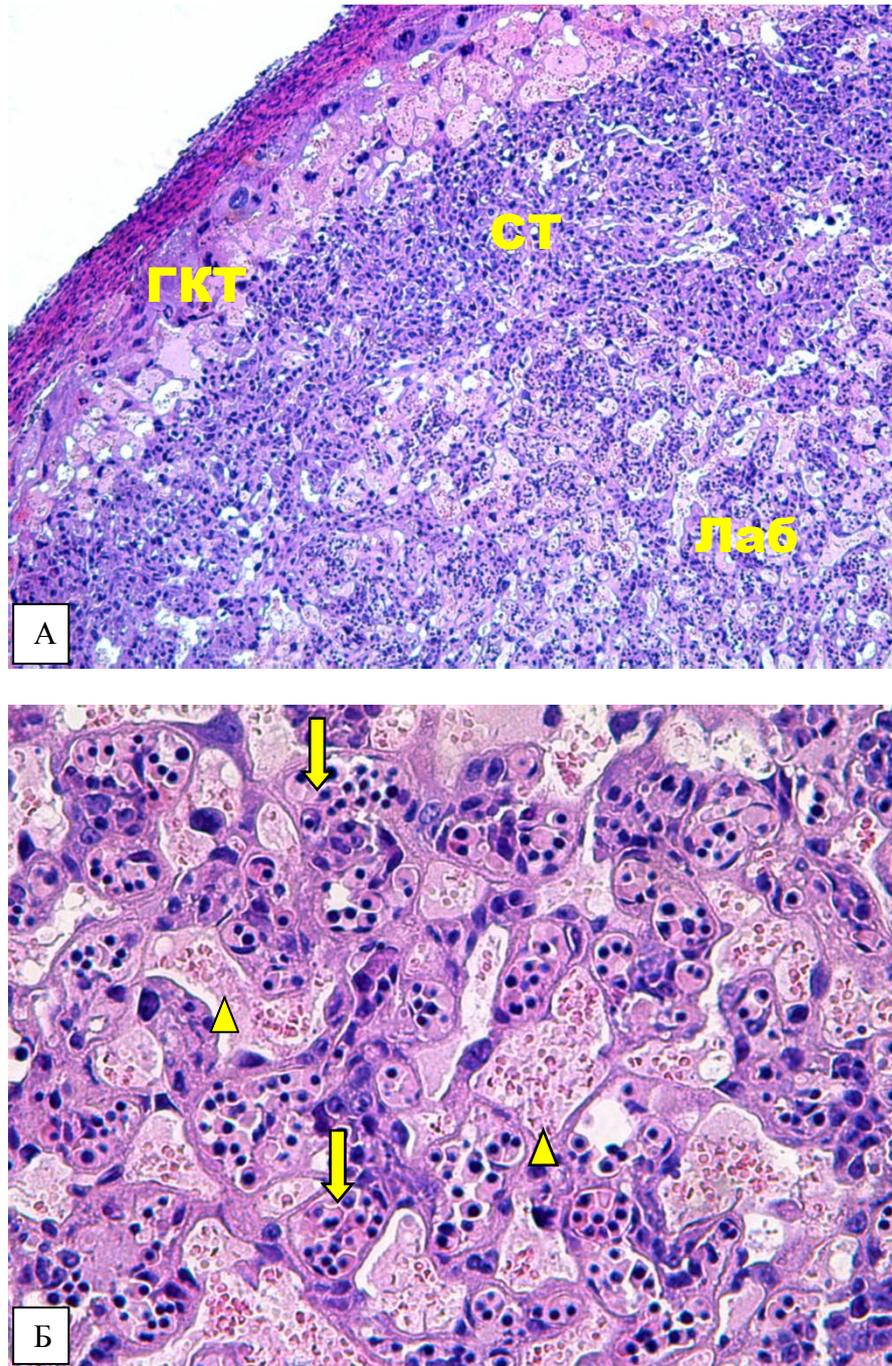
**Рисунок 29.** Плацента жизнеспособных плодов при беременности у самок группы индуцированных аборт на 14-й ДГ. ГКТ – гигантские клетки трофобласта, СТ – спонгиозтрофобласт, Лаб – лабиринт.

А. Слой ГКТ прерывистый, узкий, представлен 1-2 рядами клеток. Многочисленные полости и расширенные полнокровные материнские сосуды в зоне спонгиозтрофобласта.

Б. Лабиринт плаценты. Сужение и запустевание плодных сосудов (стрелки), увеличение толщины слоев трофобласта, выраженное расширение и полнокровие материнских лакун (треугольники).

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение А 50, Б 200.

**Беременность с потенцированными абортами.** Ширина слоя ГКТ плаценты в этой группе была статистически значимо меньше по сравнению с группой физиологической беременности, но больше по сравнению с плацентой самок СВА с индуцированными абортами ( $91,16 \pm 17,86$  мкм и  $64,95 \pm 9,3$  мкм, соответственно), как и ширина слоя спонгиозотрофобласта ( $349,33 \pm 33,71$  мкм и  $294,33 \pm 18,63$  соответственно) (табл. 12, рис. 31). Ширина зоны лабиринта и объемные доли составляющих его структур по сравнению с плацентой самок СВА с индуцированными абортами статистически значимо не менялись (табл. 12, 13, рис. 31, 32). При морфологическом исследовании плацент жизнеспособных плодов у самок СВА в этой группе наблюдали истончение слоя ГКТ и его дезорганизацию (рис. 30 А), расширение и полнокровие материнских синусов в зоне спонгиозотрофобласта (рис. 30 Б) по сравнению с плацентами самок групп физиологической беременности и высокого спонтанного уровня абортот. В слое ГКТ наблюдали клетки с эозинофильной вакуолизированной цитоплазмой и конденсированным хроматином ядер, т. е. признаки дистрофических изменений клеток (рис. 33). В материнских лакунах, как и в плацентах самок СВА с индуцированными абортами, и плодных сосудах лабиринта проявлялось выраженное полнокровие, (рис. 30 Б). В лабиринте плаценты жизнеспособных плодов при потенцированном повышении частоты абортот у самок СВА по сравнению с самками группы спонтанного абортот значительно уменьшалась объемная доля плодных сосудов ( $20,03 \pm 7,25$  и  $35,56 \pm 15,40$ , соответственно), а также резко увеличивалась объемная доля трофобласта ( $59,61 \pm 11,69$  и  $42,72 \pm 14,49$ , соответственно) (табл. 13, рис. 32). Объемная доля материнских лакун не изменялась (табл. 13, рис. 32). Объемные доли плодовых и материнских сосудов были равными (табл. 13, рис. 32). Т. е. в этой группе наблюдались такие же изменения структур лабиринта, что и при индуцированных абортот у самок СВА – уменьшение объемной доли плодовых капилляров и увеличение объемной доли трофобласта, свидетельствующие о нарушении фето-плацентарного кровообращения.

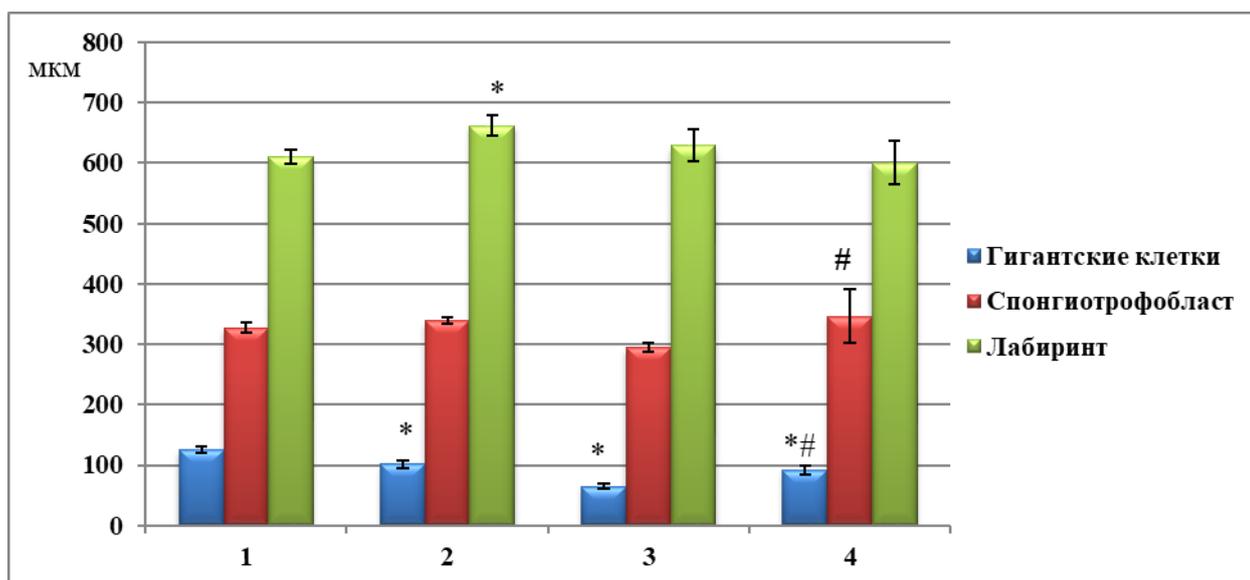


**Рисунок 30.** Плацента жизнеспособных плодов при беременности у самок группы потенцированных абортов на 14-й ДГ. ГКТ – гигантские клетки трофобласта, СТ – спонгиозотрофобласт, Л – лабиринт.

А. Структура плаценты. Истончение слоя ГКТ и его дезорганизация.

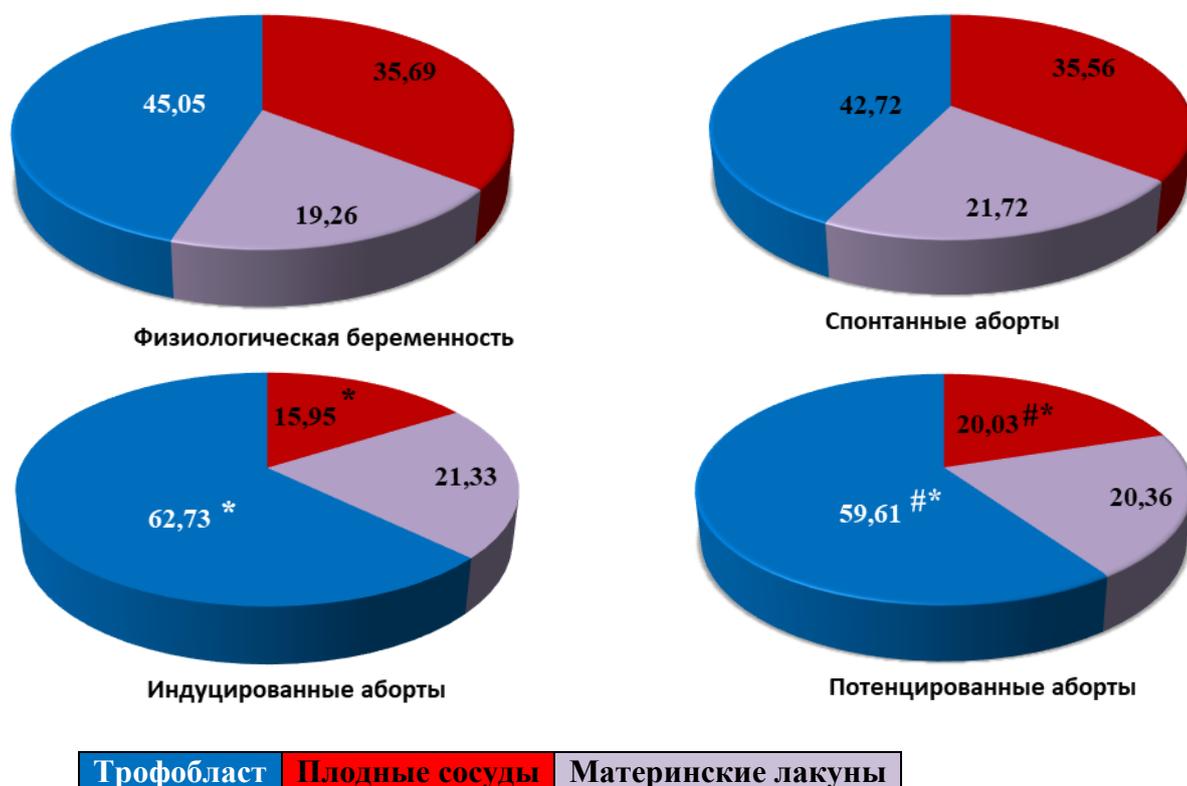
Б) Лабиринт плаценты. В материнских лакунах (треугольники) и плодных сосудах (стрелки) лабиринта – выраженное полнокровие.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение А 50, Б 200.

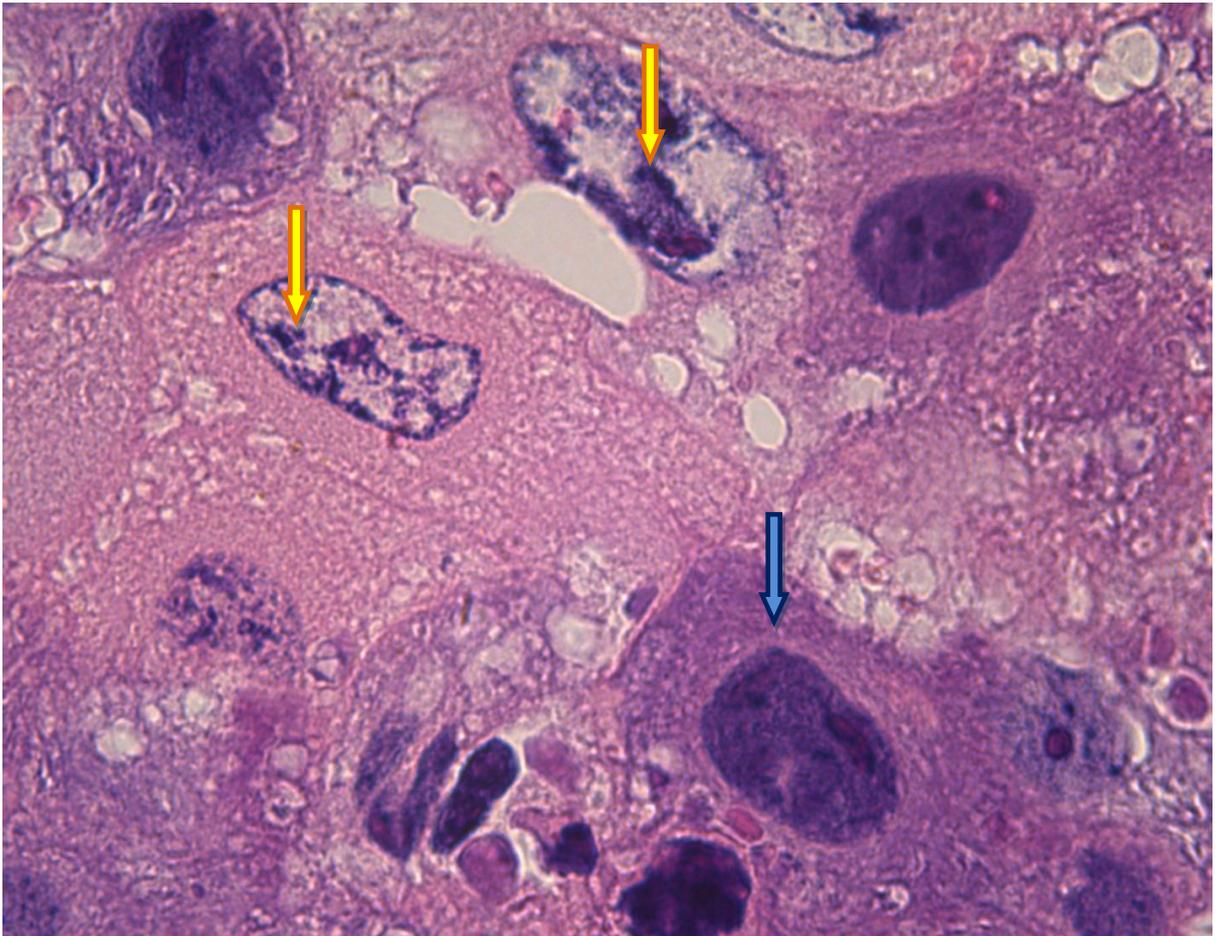


**Рисунок 31. Ширина слоев плаценты у самок с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных абортов, индуцированными и потенцированными абортами, мкм ( $M \pm SE$ )**

1– физиологическая беременность; 2–спонтанные аборты; 3– индуцированные аборты; 4– потенцированные аборты. Примечание: статистически значимые отличия \*– от физиологической беременности, # – от индуцированных абортов



**Рисунок 32. Структурно-функциональные компоненты лабиринта плаценты**  
Примечание: статистически значимые отличия \*- от группы физиологической беременности, # - от группы спонтанных абортов.



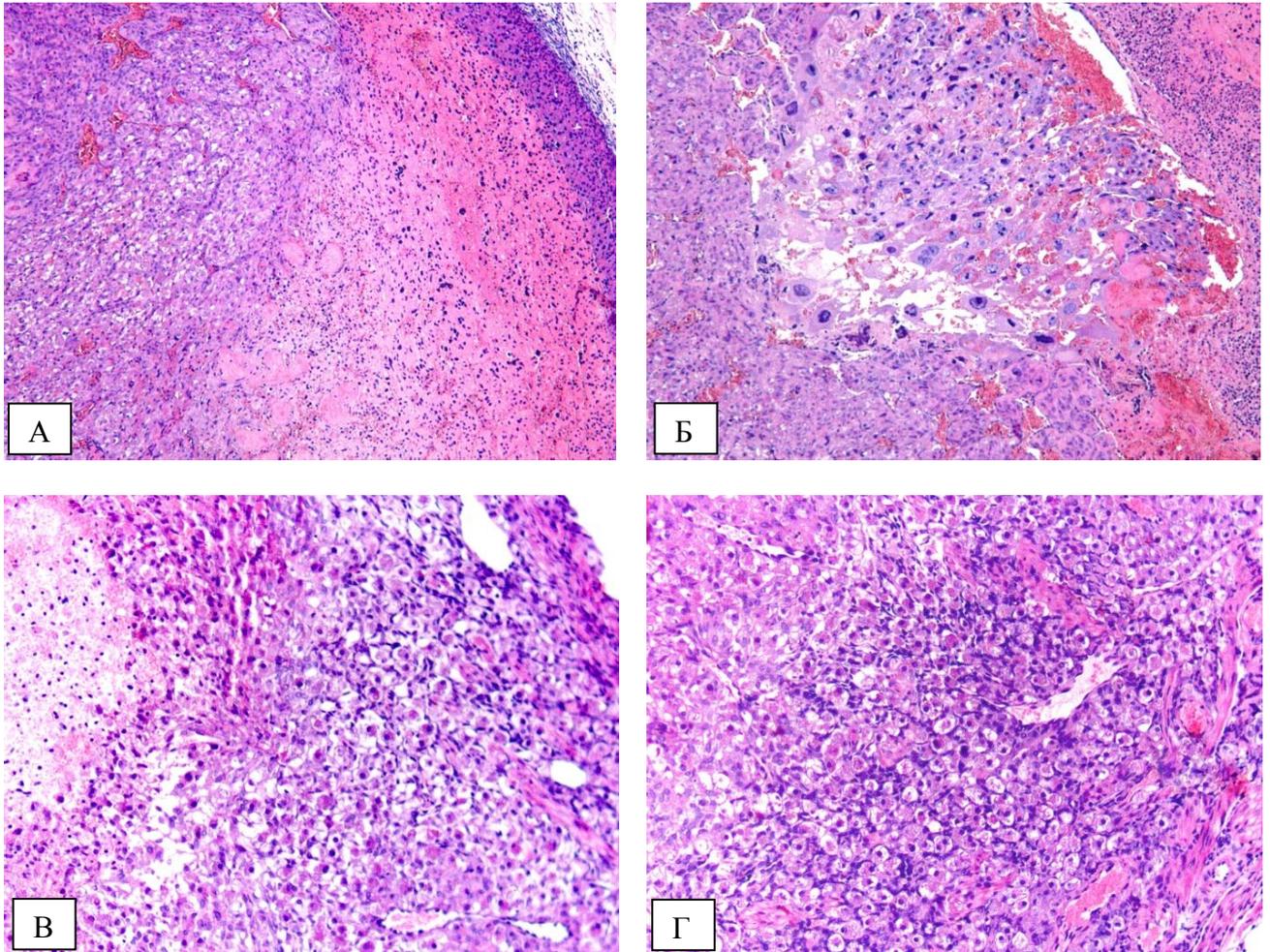
**Рисунок 33. Гигантские клетки трофобласта плаценты самок с потенцированными абортами**

Нормальная гигантская клетка (синяя стрелка).

Вакуолизация цитоплазмы, конденсация хроматина в гибнущих клетках (желтые стрелки).

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400.

**Морфологическая характеристика сохранившихся плацент резорбированных плодов.** В плацентах резорбированных плодов у самок с высокой частотой спонтанных аборт, индуцированными и потенцированными абортами наблюдались аналогичные нарушения структуры. В них нарушалось послойное расположение ГКТ, спонгиозного трофобласта и лабиринта, наблюдались лейкоцитарная инфильтрация, запустевание плодных сосудов, выраженное полнокровие в сохранившихся материнских лакунах, массивные отложения фибрина на границе материнской ткани и трофобласта (рис. 34 А). ГКТ смещались к центру плаценты, в них проявлялись дистрофические изменения - вакуолизация и эозинофилия цитоплазмы, пикноз и фрагментация ядер (рис. 34 Б, В, Г). Стаз и сладжирование эритроцитов, отложение фибрина свидетельствовали об усиленном тромбообразовании в плаценте.



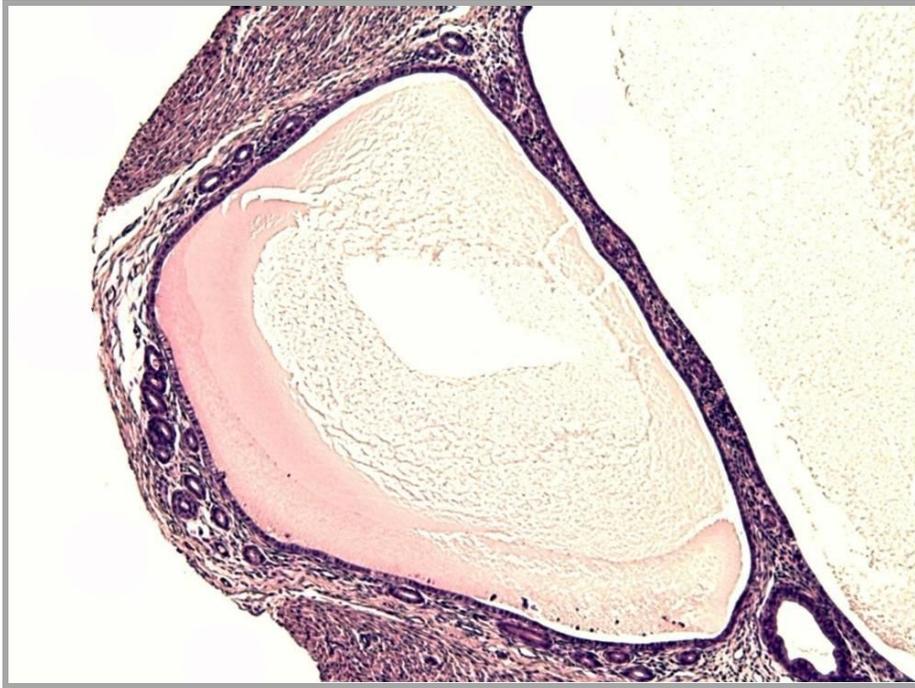
**Рисунок 34. Плацента резорбированных плодов самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт**

А, Б – Нарушение архитектоники плаценты, выраженная лейкоцитарная инфильтрация смещение гигантских клеток трофобласта к центру плаценты, стаз и сладжирование эритроцитов.

В, Г – Гибель клеток трофобласта, запустевание плодных сосудов, отложения фибрина.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение А, Б 50, В, Г 100.

**Индукцированные аборты - полная резорбция.** При исследовании маточно-плодовых единиц в зонах резорбции эмбрионов в некоторых случаях наблюдали картину водянки матки с полным разрушением плаценты и эмбриона, расширенная полость была заполнена клеточным детритом (рис. 35).



**Рисунок 35. Полная резорбция плаценты и эмбриона.**

Полость матки расширена, заполнена эозинофильными массами.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 50.

Таким образом, воздействие иммуномодулятора С7МДП в ранние сроки беременности на 14-й ДГ приводило к структурно-функциональным изменениям в плаценте жизнеспособных плодов - уменьшению количества ГКТ, снижению объемной доли плодных сосудов, нарушению гемодинамики в материнских лакунах, что является морфологическим проявлением плацентарной дисфункции. Очевидно, выраженные нарушения маточно-плацентарного и фетоплацентарного кровообращения, препятствующие трансплацентарному обмену, приводят к ишемии плода и его последующей гибели.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### **Влияние иммуномодулятора С7МДП на течение аллогенной беременности у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2.**

Определение уровня частоты резорбции эмбрионов у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2 (14,8% и 32,3%, соответственно) показало, что полученные результаты были сходны с данными других авторов: частота резорбции в парах с физиологической беременностью (СВА×Balb/c) составляла от 7 до 13%, а в условиях модели спонтанных аборт (СВА×DBA/2) варьировала от 11% до 41%. [Chaouat G., et al., 1990, Girardi G. et al., 2006, Imaizumi M. et al., 2001, 20. Jin L.P. et al., 2004]. Это свидетельствует об отсутствии существенного влияния стресса, связанного с двумя внутрибрюшинными инъекциями, и введенного таким образом 0,9% раствора NaCl на показатели спонтанных фетальных потерь.

Высокий уровень спонтанных аборт достигается только при скрещивании линий СВА/J (H-2k) × DBA/2 (H-2d) и СВА/J×DBA/1 (H-2q), при оплодотворении самцами DBA/2 самок сублиний СВА/Са и СВА/N, идентичных по H-2 локусу, этот феномен не наблюдался [Bobé P., Kiger N., 1989]. Следует отметить, что выраженное «невынашивание» было характерно лишь для первой беременности, последующие беременности у самок СВА×DBA/2 характеризовались низкой частотой резорбции. Предполагается, что благоприятный исход повторных беременностей может быть обусловлен иммунизацией самок антигенами трофобласта (в т.ч. отцовскими) во время первой беременности [Chavez D. J. et al., 1987].

Показатели спонтанной резорбции на модели СВА×DBA/2 при первой беременности зависели от возраста самок, у самок старше 3-х месяцев частота резорбции была вдвое больше, чем у молодых [Ho H.N. et al., 1994].

Двукратное внутрибрюшинное введение С7МДП самкам СВА×Balb/c (группа иммуноиндуцированных аборт) увеличивало частоту резорбций эмбрионов в среднем до 45,4 %, что в три раза превышало показатели фертильного контроля. В некоторых случаях наблюдалась 100%-ная резорбция плодов. Этот факт представляет интерес с точки зрения возможности использования данной модели для оценки эффективности изучаемых методов и средств терапии и профилактики иммуноопосредованного невынашивания беременности. Под влиянием иммуномодулирующего гликопептида доля резорбированных эмбрионов у мышей СВА×DBA/2 (группа потенцированных аборт) увеличивалась в среднем до 50,0%, достигая у некоторых самок 100%. Следует отметить, что достигнутый благодаря применению С7МДП уровень резорбции эмбрионов придал известной модели спонтанного аборт максимальную чувствительность для оценки разнонаправленных воздействий на С7МДП-зависимое невынашивание беременности. Это очень важно с позиции сокращения времени исследования и

числа используемых экспериментальных животных для решения практических задач и проверки научных гипотез, связанных как с разработкой подходов к профилактике спонтанных аборт, так и с изучением безопасности средств и методов, которые предполагается использовать при беременности.

Стимуляции резорбции эмбрионов при фертильном сочетании мышей CBA×Balb/c и увеличение ее частоты в парах CBA×DBA/2 с исходно высоким уровнем спонтанных аборт под влиянием гликозидного аналога МДП, очевидно, связаны с усилением клеточных иммунных реакций и продукции провоспалительных Th1-цитокинов [Калюжин О.В. с соавт., 2002 Калюжин О.В. с соавт., 1994, Михайлова Л.П. с соавт., 2004, Chaouat G. et al., 1990]. Abortогенный эффект С7МДП может быть также связан со стимуляцией продукции ИЛ-1 и ФНО-α макрофагами [Калюжин О.В., 2002]. Одним из основных механизмов abortогенного действия Th1-цитокинов является стимуляция продукции протромбиназы fg12 эндотелием сосудов, приводящая к образованию тромбов, отложений фибрина и ишемии плаценты. Роль fg12 как медиатора резорбции эмбрионов доказана тем, что нейтрализующие антитела к мышинной протромбиназе fg12 уменьшали спонтанные репродуктивные потери у мышей CBA×DBA/2 с 38% до 4,5%, а ИФН-γ+ФНО-стимулированную резорбцию эмбрионов – с 87% до 13%. Механизм гибели плода у мышей со спонтанными абортами сходен с механизмом развития ФНО-индуцированных ишемических некрозов в опухолях и отторжения аллогенных трансплантатов [Clark D. A. et al., 1998, Clark D. A., et al., 2001, Ning Q. et al., 2005]. Повышение экспрессии fg12 и ФНО в сочетании с массивными отложениями фибрина, выявляемое у мышей с высоким уровнем эмбриональных потерь, было обнаружено также в плацентах женщин с ранними спонтанными абортами и преэклампсией [Knackstedt M. et al., 2001].

Таким образом, воздействие С7МДП в ранние сроки гестации увеличивало число эмбриональных потерь как у самок мышей CBA/J с физиологически протекающей беременностью, так и у самок с исходно высоким уровнем спонтанных аборт. Возможность повышения уровня спонтанных аборт у самок CBA/J×DBA/2 гликозидным производным С7МДП показана впервые.

Два варианта аллогенного скрещивания мышей CBA×Balb/c и CBA×DBA/2 с введением на 5-е и 7-е сутки гестации гликозидного деривата С7МДП, усиливающего продукцию Th1-цитокинов, можно рассматривать как новые высокочувствительные модели иммунозависимого зависимого невынашивания беременности у человека.

### **Морфофункциональные изменения тимуса**

Наблюдаемые изменения структуры тимуса в динамике физиологической беременности, в целом, согласуются с данными о прогрессирующем уменьшении массы и клеточности тимуса при сингенной и аллогенной беременности у мышей за счет потери кортикальных тимоцитов,

которая морфологически проявляется в сужении коркового вещества на ранних сроках беременности [Hegde U.C. et al., 2001; Zoller A.L. et al., 2007].

Выявлены различия в степени выраженности и морфологических особенностях инволюции тимуса в течение физиологической беременности, беременности с высоким уровнем спонтанных аборт и С7МДП-зависимыми абортами, вызванными введением гептилгликозидом мурамилдипептида С7МДП, который обладает способностью направлять дифференцировку Т-хелперов в сторону Th1-клеток и тем самым стимулировать клеточные иммунные реакции [Калюжин О.В. с соавт., 1994, Kalyuzhin O.V. et al., 1996].

У самок с высоким уровнем спонтанных аборт были более выражены инволютивные изменения тимуса по сравнению с физиологической беременностью тех же сроков. Так, у самок с физиологической беременностью на 8-й ДГ акцидентальная инволюция соответствовала I стадии, и лишь на 14-й ДГ – II, тогда как у самок со спонтанными абортами уже на 8-й ДГ наблюдалась инволюция тимуса II стадии.

Известно, что С7МДП усиливает клеточные иммунные реакции в различных тест-системах *in vitro* и *in vivo* [Караулов А.В. с соавт., 2002], что определяется его способностью стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов Th1 клетками и моноцитами/макрофагами [Земляков А.Е. с соавт., 2003, Калюжин О.В. с соавт., 2002, Михайлова Л.П., 2006.]. Очевидно, эти свойства позволяют С7МДП потенцировать резорбцию эмбрионов при аллогенной беременности. В настоящем исследовании этот гликопептид усиливал проявления акцидентальной инволюции центрального органа иммунной системы, индуцировал появление множественных кистоподобных тимических телец (ТТ) на границе коркового и мозгового вещества и большого количества макрофагов в корковом веществе как при высокофертильном сочетании линий, так и при скрещивании, ведущем к высокой частоте резорбции эмбрионов. Тимус небеременных самок также реагировал на введение С7МДП появлением макрофагов в корковом веществе и появлением ТТ в виде множественных кистоподобных полостей в мозговом веществе. Расширение коркового вещества и картина акцидентальной инволюции тимуса у небеременных и беременных самок соответствовали реакции этого органа на курсовое введение С7МДП самцам Balb/c [Михайлова Л.П., 2006.] и других иммуномодуляторов бактериального происхождения мышам СВА [Русскова А.Н. с соавт., 2010]. Это свидетельствует о том, что описанные структурные изменения не только отражают процессы гестационной перестройки тимуса, но и являются следствием системной активации Т-клеточных, в том числе Th1-зависимых, реакций, ведущих к резорбции эмбрионов.

На всех сроках беременности в мозговом веществе тимуса присутствовали многочисленные ТТ 1-2 фаз развития. В настоящее время установлено, что ТТ не только участвуют в индукции апоптоза и утилизации аутореактивных тимоцитов [Douek D.C., Altmann

D.M., 2000; Беловешкин А.Г., 2012], но и играют важную роль в формировании иммунотолерантности и регуляции иммунного гомеостаза.

Эпителиальные ретикулярные клетки ТТ продуцируют тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), ИЛ-7-подобный цитокин, активирующий тимические дендритные клетки, которые, в свою очередь, индуцируют пролиферацию и дифференцировку CD4(+)CD8(-)CD25(-) Т-клеток в CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Т-регуляторные клетки - уникальную специализированную популяцию Т-лимфоцитов, играющую ключевую роль в предупреждении иммунного отторжения плода [Clark D., Chaouat G., 2012, Guerin L.R. et al., 2009, Watanabe N. et al., 2005, Hanabuchi S. et al., 2012]. Возможно, увеличение числа ТТ в мозговом веществе во время беременности связано с усилением экспансии Т-регуляторных лимфоцитов под влиянием фетальных аллоантигенов [Zhao J.X. et al., 2007]. На основании полученных данных о появлении большого количества ТТ в виде крупных кистоподобных полостей и перемещении их на границу коркового и мозгового вещества, а также частично в корковое вещество тимуса самок с высоким уровнем спонтанных и индуцированных С7МДП абортос можно предположить уменьшение продукции TSLP в ТТ и нарушение генерации Т-регуляторных клеток.

Таким образом, было установлено, что у самок с высоким уровнем спонтанных абортос акцидентальная инволюция тимуса на 8-й и 14-й дни беременности была более выражена, чем у самок с физиологической беременностью. Гептилгликозид мурамилдипептида (С7МДП), значимо повышающий частоту резорбции эмбрионов, усиливал проявления акцидентальной инволюции тимуса при индуцированных и потенцированных абортах, вызывая появление большого количества макрофагов в корковом слое, множественных крупных кистоподобных ТТ на границе коркового и мозгового слоев.

### **Морфофункциональные изменения селезенки**

Иммуномодулятор С7МДП, индуцирующий абортос у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c, и повышающий уровень спонтанных абортос у самок СВА, оплодотворенных самцами DBA/2 вызывал увеличение объемных долей белой пульпы и Т-зависимой ПАЛМ-зоны. В условиях воздействия С7МДП при фертильном сочетании линий СВА x Balb/c, когда частота резорбции эмбрионов возрастала почти втрое (до 100%, в среднем 45,4±6,31%), изменения показателей проявлялись уже на 8-й ДГ и были более выражены, чем при сочетании линий СВА×DBA/2, при котором частота резорбции под влиянием С7МДП увеличивалась в среднем лишь на 20%. Очевидно, увеличение объемных долей белой пульпы и Т-зависимой ПАЛМ-зоны в селезенке при индуцированных и потенцированных абортах отражает усиление клеточных иммунных реакций, неблагоприятных для развития беременности [Kwak-Kim J. et al., 2010], обусловленное свойством гликозидов МДП, в частности, С7МДП, направлять

дифференцировку Т-хелперов в сторону Th1-клеток [Калюжин О.В. с соавт., 1994, Kalyuzhin O.V. et al., 1996].

Определение уровней спонтанной пролиферации лимфоцитов селезёнки самок СВА показало, что по сравнению с небеременными самками на 9-й ДГ пролиферативная активность резко возрастает как при физиологической беременности, так и при беременности с высоким уровнем спонтанных абортот. Полученные результаты согласуются с данными Norton M.T. с соавторами об увеличении доли пролиферирующих лимфоцитов селезенки на 8-й день сингенной беременности у мышей C57BL/6 по сравнению с небеременными самками. Пик пролиферации, оцениваемой по включению бромдезоксипуридина после введения *in vivo*, наблюдали на 12 ДГ [Norton M.T. et al., 2009]. Повышение пролиферативной активности клеток селезёнки при наступлении беременности может быть обусловлено действием репродуктивных гормонов, которые усиливают спонтанную пролиферацию Т-лимфоцитов [Куклина Е.М, 2003] и антигенной стимуляцией материнской иммунной системы полуаллогенным плодом. У самок со спонтанными абортотами пролиферативная активность лимфоцитов превышала уровень пролиферации лимфоцитов небеременных самок в 7,41 раза, а самок с физиологической беременностью – в 1,97 раза, что свидетельствует о том, что при беременности с высоким уровнем спонтанных абортот лимфоциты самок активированы в значительно большей степени, чем при физиологической беременности.

При индуцированных абортотам уровень пролиферации лимфоцитов селезенки был в 1,42, а при потенцированных – в 1,86 раза выше, чем в группах физиологической беременности и спонтанных абортот, соответственно. Это обусловлено способностью  $\beta$ -гликозидов мурамилдипептида усиливать спонтанную пролиферацию лимфоцитов и их выраженной комитогенной активностью [Лобанов Д.С., 2009]. Таким образом, повышение уровня эмбриональных потерь при мурамилдипептид-индуцированных и потенцированных абортотам происходит на фоне усиления пролиферативной активности лимфоцитов беременных самок, значительно превышающей показателя пролиферации при физиологической беременности и спонтанных абортотам.

У беременных самок ИС клеток селезёнки лимфоцитами самцов на 9-й ДГ уменьшался по сравнению небеременными как при фертильной (с 10,61 до 2,47), так и при «абортотогенной» (с 30,46 до 0,89) комбинации линий. Это согласуется с данными об ассоциированном с сингенной и аллогенной беременностью снижении реактивности клеток селезёнки и парааортальных лимфоузлов, дренирующих матку, на митогены [Hooper D.C., Chantry D.H., Billington W.D. 1987] и аллогенные клетки, в том числе лимфоциты самцов [Gottesman S.R., Stutman O., 1980]. В то же время существуют данные о повышении реактивности лимфоцитов беременных самок (7-11 день) на аллогенные клетки по сравнению с небеременными самками

[Dorić M, Rukavina D., 1987]. Вероятно, противоречивость результатов может быть следствием межлинейных различий сокультивируемых клеток.

Из-за высокого уровня пролиферации в контрольных (нестимулированных) культурах лимфоцитов группы спонтанных аборт, вдвое превышающего показатель контроля для группы физиологической беременности, при практически одинаковом включении ЗН-Т в стимулированные отцовскими лимфоцитами клетки (табл. 2), ИС лимфоцитов самок с высоким уровнем спонтанных аборт был достоверно меньше, чем ИС у фертильных самок (таблица 3). Полученные нами результаты противоречат данным Jin et al. (2004) о более высоком ИС лимфоцитов беременных самок СВА лимфоцитами самцов DBA/2 по сравнению с лимфоцитами самцов Balb/c, но согласуются с данными Е.А.Куклиной с соавт. (2013) об отсутствии пролиферативного ответа периферических Т-лимфоцитов самок СВА на антигены самцов DBA/2 при выраженном ответе на антигены самцов СВАхBalb/c.

При индуцированных абортах ИС был почти в 6 раз меньше, чем в группе физиологической беременности (0,42 и 2,47, соответственно) за счет уменьшения включения ЗН-Т в лимфоциты стимулированных культур и увеличения включения ЗН-Т в контроле (нестимулированные культуры лимфоцитов самок с индуцированными абортами). В варианте потенцированных аборт у мышей включение ЗН-Т в лимфоциты самок возрастало почти вдвое как в стимулированных отцовскими лимфоцитами, так и в контрольных (нестимулированных) культурах по сравнению с группой спонтанных аборт. Поэтому ИС лимфоцитов самок группы потенцированных аборт, рассчитанный по формуле, учитывающей уровень пролиферации контрольных культур, был таким же, как у самок с высоким уровнем спонтанных аборт (табл. 3). Низкий индекс стимуляции (меньше 1), очевидно, характеризует группы с неблагоприятным течением беременности, что говорит о супрессии иммунного ответа материнских клетками селезенки на отцовские антигены. Полученные данные согласуются с результатами исследований, в которых показана благоприятная роль предшествующей лимфоцитотерапии в коррекции привычного невынашивания беременности [Pandey M.K. et al., 2004; Yuan M.M. et al., 2015].

### **Оценка динамики продукции цитокинов клетками селезенки небеременных и беременных самок *ex vivo***

На 8-й ДГ ГМ-КСФ, секретируемый клетками селезенки, способный стимулировать пролиферацию плацентарных клеток, во всех группах невынашивания беременности значительно превышал уровень при физиологической беременности. Это согласуется с данными, полученными Athanassakis I. и Iconomidou B. (1996), о том, что как недостаточная, так и избыточная продукция ГМ-КСФ может являться одной из причин потери беременности. В

группе спонтанного невынашивания беременности 8-й ДГ характеризовался повышением уровня ИЛ-2. индуцированные и потенцированные абортоты отличало стойкое сохранение повышенного уровня этого цитокина на 14-й ДГ, в то время как беременности, не скомпрометированные введением С7МДП, характеризовались снижением провоспалительного ИЛ-2 до нуля. У самок мышей с ИЛ-2- индуцированными абортотами Shiraishi H. et al., 1996 показали усиление экспрессии гранзима В – эффекторной молекулы цитотоксических Т-лимфоцитов, а также повышение уровня апоптоза в трофобласте ворсин плаценты. В группах спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотов не наблюдалось достоверного снижения уровня ИЛ-6 к 14-й ДГ, в отличие от группы физиологической беременности. Это согласуется с данными Zenclussen A.C. et al., 2003, которые показали взаимосвязь высокого уровня этого цитокина на поздних сроках беременности с более высоким процентом резорбции у самок мышей СВА/JхДВА/2J, чем у самок с физиологической беременностью СВА/JхBalb/c. В группах спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотов не наблюдалось достоверного снижения уровня ИЛ-17 к 14-й ДГ, как в группе физиологической беременности. Необходимый в начале беременности для регуляции трофобластической инвазии и эндокринной функции трофобласта [Pongcharoen S. et al., 2006, 2009], на более поздних сроках ИЛ-17 рассматривается как неблагоприятный для развития беременности фактор [Ozkan Z.S. et al., 2015, Wang W.J. et al., 2014]. В группе физиологической беременности продукция ИФН- $\gamma$  была высокой на ранней стадии, а затем, к 14 дню, резко уменьшалась. В группах спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотов наблюдали сохранение высокого уровня данного цитокина. Необходимый в начале беременности, ИФН- $\gamma$  играет значительную роль в структурно-функциональной гестационной перестройке стромы и сосудов эндометрия [Kitaya K. et al., 2007, Murphy S.P. et al., 2009, Zhang J. et al., 2011], регулирует фагоцитарную активность трофобласта как механизм снабжения плода железом и питательными веществами до начала формирования и функционирования плаценты [Albieri A. et al., 2005]. Избыток его на более поздних сроках, очевидно, связан с осложнениями беременности и ее невынашиванием [Haider S., Knöfler M., 2009]. В группе с нормальным течением беременности, а также спонтанных абортотов, наблюдали повышение уровня ФНО- $\alpha$  на 8-й ДГ и снижение его к 14 дню. Группы индуцированных и потенцированных абортотов характеризовались отсутствием динамики уровня на 8-й ДГ и 14-й ДГ, так называемым «плато». Clark D.A. et al. в 1998 году показали, что резорбция эмбрионов обусловлена ФНО-индуцированной активацией НК, усилением продукции ИФН- $\gamma$  и Th1—зависимой протромбиназы fgl2, вызывающей тромбоз и ишемию плаценты. Haider S. и Knöfler M. продемонстрировали в экспериментах *in vitro*, что избыточный уровень ФНО ведет к нарушению формирования синцитиотрофобласта,

увеличению уровня апоптоза ворсинчатого трофобласта, уменьшению продукции  $\beta$ -ХГЧ и миграционной активности трофобласта [Haider S., Knöfler M., 2009]. .

Таким образом, впервые было установлено, что на ранних сроках гестации у мышей с высоким уровнем спонтанных и индуцированных абортотворения по сравнению с физиологической беременностью усиливается выработка клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2 и ИЛ-17 и снижается продукция ИФН- $\gamma$ , который участвует в ремоделировании спиральных артерий эндометрия, ангиогенезе в имплантационных сайтах и сохранении децидуального компонента плаценты [S.P. Murphy et al., 2009]. На поздних сроках гестации у самок с высоким уровнем репродуктивных потерь сохраняется преобладание продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-17, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), наиболее выраженное при индуцированном и потенцированном С7МДП невынашивании беременности. Усиление продукции противовоспалительных Th2-цитокинов и ГМ-КСФ, благоприятно влияющих на течение мышинной беременности [G. Chaouat et al., 1995; S. Savion et al., 2000], у самок с высоким уровнем спонтанных и С7МДП-зависимых резорбций эмбрионов по сравнению с физиологической беременностью, очевидно, имеет компенсаторный характер, что, однако, не отменяет и не компенсирует абортотворительный эффект провоспалительных Th1- и Th17-цитокинов.

#### **Морфофункциональные изменения плаценты**

Определение массы плацент жизнеспособных плодов на 14-й день беременности выявило, что средние показатели массы плаценты у самок со спонтанными абортотворениями были достоверно выше чем у самок с физиологической беременностью. Масса плаценты у самок с индуцированными абортотворениями была на 12,5% больше, чем у самок с потенцированными абортотворениями. У самок с потенцированными абортотворениями отмечали достоверное уменьшение массы плаценты по сравнению с группой с высоким уровнем спонтанных абортотворения. Масса плаценты самок СВА на 14-й день аллогенной беременности в условиях фертильного и «абортотворительного» скрещивания была соизмерима с показателями массы плаценты при сингенной беременности у самок С57BL/6J (0,096 г, 19 ДГ) [Coan P.M. et al., 2010] и самок ICR (0,073 г, 12,5 ДГ) [Tsuji A. et al., 2013], при аллогенной беременности у самок CF1 x B6D2F1 (0,097 г, 15,5 ДГ) [Bloise E. et al., 2012, G. Girardi et al., 2006]. Стереологическое исследование плаценты мыши в динамике эмбрионального развития от стадии E12.5 до E18.5 показало, что ее объем достигает максимума (0,104 см<sup>3</sup>) на стадии E16.5 [Mayhew T.M., 2009]. У млекопитающих рост плода определяется способностью плаценты обеспечивать его питание путем диффузионного и опосредованного переносчиками транспорта аминокислот и глюкозы, экспрессией ключевых генов факторов роста и белков-транспортёров. Транспортные процессы зависят от величины плаценты, ее морфологии, кровоснабжения. Исследование Р.М. Соан с соавторами (2008) показало, что при нормальной сингенной беременности у мышей С57BL/6J существует значительная

вариабельность массы плаценты внутри одного помета. Масса наиболее легких плацент на 16-й и 19-й дни беременности составляла 65-75% массы наиболее тяжелых плацент, плаценты с разной массой располагались внутри рога матки случайным образом. При этом плацентарная эффективность, определяемая как отношение масс плода и плаценты, у «легких» плацент оказалась на 30-45% больше, чем у «тяжелых» в оба срока гестации. Сравнительное стереологическое исследование показало, что в «легких» плацентах на 16-й день беременности объемная фракция лабиринтной зоны и поверхность обмена больше, чем в «тяжелых» плацентах, при этом объемные фракции компартментов лабиринта - трофобласта, фетальных капилляров и материнских лакун - не различались. Преобладание зоны лабиринта, где происходит фетально-материнский обмен, может обуславливать большую эффективность «легкой» плаценты в обеспечении питания плода [Coan P.M. et al, 2008].

Для обеспечения жизнеспособности и роста плода при наличии материнских факторов риска плацента адаптируется к субоптимальным условиям увеличением (гипертрофический рост) или уменьшением (ограниченный рост) массы в зависимости от характера и сроков неблагоприятного воздействия. Так, избыточное увеличение массы плаценты у человека отмечали при ограничении питания в ранние сроки беременности [Lumeu L.H., 1998], психосоциальном стрессе [Khalife N. et al., 2012], анемии и курении табака [Baptiste-Roberts K. et al., 2008], у мышей - при моделировании вспомогательных репродуктивных технологий [Bloise E. et al., 2012], у крыс – после длительного воздействия свинца до наступления и в течение беременности [Куликова Г.В., дисс. к.б.н., 2008]. Независимо от того, обусловлен ли избыточный рост плаценты генетическими причинами (мутации генов факторов роста, транспортеров глюкозы и аминокислот) или экспериментальными манипуляциями во время беременности, увеличенная плацента была менее эффективной в обеспечении питания плода по сравнению с нормальной. У мышей это проявлялось во внутриутробной задержке развития плодов и маловесности [Coan P.M. et al, 2008, Bloise E. et al., 2012].

Масса плаценты у лабораторных и сельскохозяйственных животных уменьшалась при дефиците цинка [Tian X. et al., 2014], нарушении метаболизма L-триптофана [Tsuji A. et al., 2013], длительной пищевой депривации беременных самок [Coan P.M. et al., 2010], после воздействия теплового шока, глюкокортикоидов, гипоксии [Fowden A.L. et al., 2008], нарушения маточного кровоснабжения [Кузнецов Р.А., 2008, Fowden A.L. et al., 2008]. Экспериментальное ограничение роста плаценты могло сопровождаться повышением ее функциональной эффективности [Coan P.M. et al, 2008, Fowden A.L. et al., 2008]. Однако, как правило, уменьшение размера плаценты у лабораторных животных в результате генетической модификации или неблагоприятного воздействия на самок в течение беременности вызывало

задержку внутриутробного развития плода и уменьшение массы потомства [Fowden A.L. et al., 2008, Coan P.M. et al., 2010].

Сравнительный анализ показателей массы плаценты самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2, подвергавшихся двукратному воздействию  $\beta$ -гликозидного производного мурамилдипептида С7МДП в ранние сроки беременности, позволяет заключить, что при потенцированных абортах компенсаторная реакция плаценты на иммуномодулирующее воздействие проявляется ограничением ее роста. Снижение массы плаценты (гипоплазия) рассматривается как один из критериев ее дисфункции [Баринова И.В., 2015]. В группе индуцированных абортоспособных изменений массы плаценты не наблюдалось, что, вероятно, говорит об индивидуальной реактивности на воздействие С7МДП.

В плаценте самок с высоким спонтанным уровнем абортоспособности по сравнению с фертильными самками на 14-й ДГ отмечали увеличение зоны лабиринта при уменьшении толщины дезорганизации слоя ГКТ. Полученные результаты согласуются с данными о значительно меньшем количестве ГКТ на 10-й и 11-й ДГ у самок с высоким спонтанным уровнем абортоспособности по сравнению с физиологической беременностью [Girardi G. et al., 2006]. Сужение слоя ГКТ наблюдали также в плаценте крыс после длительного воздействия низких и высоких концентраций свинца [Куликова Г.В., 2008].

По сравнению с группами физиологической беременности и высокого спонтанного уровня абортоспособности при потенцированных абортах у самок СВА отмечали большое количество расширенных полнокровных материнских артериальных синусов в зоне спонгиозотрофобласта. Подобные изменения плаценты наблюдали у самок C57BL/6J после введения на 12.5 день беременности липополисахарида в дозе 60 мкг/кг), вызывающей резорбцию эмбрионов. Уже через 24 ч после иммунной активации отмечались расширение плацентарных сосудов, выраженное полнокровие, очаги геморрагии, участки некроза в слое спонгиозотрофобласта, большое количество клеток с пикнотическими ядрами [Carpentier P. A. et al., 2011].

Резкое уменьшение количества ГКТ, жизненно важных для имплантации, развития эмбриона и материнской адаптации к беременности, можно также отнести к проявлениям плацентарной недостаточности у самок СВА со спонтанными, иммуноиндуцированными и потенцированными абортами. Эти клетки секретируют широкий спектр гормонов и паракринных факторов, включая стероидные гормоны и пролактин-связанные цитокины, обладают инвазивным потенциалом и рассматриваются как аналог вневорсинчатого трофобласта плаценты человека [Hu D., Cross J.C., 2010, Krishnan L. et al., 2013]. Уменьшение количества ГКТ или нарушения их дифференцировки приводят к дефектам ангиогенеза и васкуляризации плаценты и нарушению развития плода [Cross J.C., 2005]. Так, G. Girardi с соавторами показали, что масса плодов самок СВАхDBA/2 с дефицитом ГКТ была в среднем на

30% меньше, чем у плодов СВА×Balb/c, что свидетельствует о внутриутробной задержке роста плода. Фенотип внутриутробной задержки роста был гомозиготным, так как проявлялся более чем у 95% плодов. [Girardi G. et al., 2006]. Возможно, расширение лабиринта является проявлением компенсаторных реакций.

Наблюдаемые структурные изменения плаценты жизнеспособных плодов у самок СВА с высокой частотой спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт (маточно-плацентарные дисциркуляторные расстройства, сужение слоя и альтерация гигантских клеток трофобласта, уменьшение объема и запустевание плодных сосудов лабиринта) соответствовали морфологическим изменениям плаценты крыс при моделировании плацентарной недостаточности после окклюзии предплацентарного сосудистого бассейна [Кузнецов Р.А., 2008], подкожного введения четыреххлористого углерода [Беленичев И.Ф. с соавт., 2008], водно-солевой нагрузкой [Шубина О.С с соавт., 2011], которые авторы расценивали как морфологический субстрат плацентарной недостаточности.

Увеличение объемной плотности трофобласта лабиринтной зоны после иммунной стимуляции самок мурамилдипептидом, свидетельствующее об утолщении плацентарного барьера, также можно рассматривать как признак нарушения фетально-материнского обмена.

При исследовании маточно-плодовых единиц в зонах резорбции эмбрионов в группе индуцированных абортов в единичных случаях наблюдали картину водянки матки с полным разрушением плаценты и эмбриона, расширенная полость была заполнена клеточным детритом. Такую же структуру матки наблюдали при 100%-ной потере беременности у мышей Balb/c после действия высокой дозы блокатора рецепторов прогестерона RU 486 (мифепристон), используемого для медикаментозных абортов [Lv F. et al., 2012].

Таким образом,  $\beta$ -гептилгликозид мурамилдипептида в плаценте жизнеспособных плодов вызывал уменьшение толщины и разрежение слоя ГКТ, снижение объемной доли плодных сосудов, нарушение гемодинамики в материнских лакунах, что является морфологическим проявлением плацентарной дисфункции. Полученные данные позволяют заключить, что двукратное введение иммуномодулятора  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида в ранние сроки беременности приводит к формированию плацентарной недостаточности у самок СВА как при фертильном, так и при «абортотенном» сочетании линий. Очевидно, выраженные нарушения маточно-плацентарного и фетоплацентарного кровообращения, препятствующие трансплацентарному обмену, приводят к ишемии плода и его последующей гибели.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У самок с физиологической беременностью, спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами различалась гестационная динамика морфофункциональных изменений тимуса. На 8-й и 14-й ДГ физиологической беременности ширина субкапсулярной зоны, в которой происходит активная пролиферация незрелых тимоцитов, была значительно больше, а снижение доли коркового вещества, в котором происходят дифференцировка и селекция тимоцитов, а также элиминация аутореактивных клонов, более выраженным, чем у самок с высоким уровнем индуцированных и потенцированных абортот. При физиологической беременности в тимусе развивалась акцидентальная инволюция, слабо выраженная на 8-й и умеренно – на 14-й ДГ, спонтанные и индуцированные аборты характеризовались умеренной акцидентальной инволюцией на 8-й ДГ и выраженной – на 14-й ДГ, при потенцированных абортах выраженные инволютивные изменения тимуса проявлялись уже на 8-й ДГ и сохранялись на 14-й ДГ. Особенностью реакции тимуса на иммуностимулирующее воздействие С7МДП, индуцирующее и потенцирующее аборты у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2, соответственно, было появление макрофагов в корковом веществе и множественных тимических телец в виде крупных кистоподобных полостей на границе коркового и мозгового вещества.

В селезенке самок с индуцированными и потенцированными С7МДП абортами развивалась гиперплазия белой пульпы за счет увеличения Т-зависимой ПАЛМ-зоны. При индуцированных абортах с трехкратным, по сравнению с физиологической беременностью, увеличением частоты резорбции, структурные изменения проявлялись уже на 8-й ДГ и были более выражены, чем при потенцированных абортах, при которых частота резорбции увеличивалась в среднем на 20% относительно показателя спонтанных абортот.

По сравнению с физиологической беременностью пролиферативная активность селезенки самок при спонтанных абортах увеличивалась в 2 раза, при индуцированных и потенцированных абортах – в 1,5 и 3,7 раза, соответственно. Пролиферативный ответ лимфоцитов самок на лимфоциты самцов, отличающихся по локусу гистосовместимости, при спонтанных и потенцированных абортах был в 2,7 раза, а при индуцированных абортах – в 6,0 раз меньше, чем при физиологически протекающей беременности. Это свидетельствует о том, что при высоком уровне спонтанных и индуцированных эмбриональных потерь лимфоциты самок активированы в значительно большей степени, чем при физиологической беременности, а их реактивность на отцовские антигены снижена.

На раннем сроке гестации у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортот по сравнению с физиологической беременностью усиливалась выработка клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и

снижалась продукция ИФН- $\gamma$ , который участвует в ремоделировании спиральных артерий и децидуализации эндометрия, ангиогенезе в сайтах имплантации. На 14-й ДГ в селезенке самок с высоким уровнем эмбриональных потерь, в отличие от физиологической беременности, сохранялась интенсивная продукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), наиболее выраженная при индуцированных и потенцированных абортах. Более высокий по сравнению с физиологической беременностью уровень продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 и ГМ-КСФ у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных резорбций эмбрионов не отменял абортотенный эффект провоспалительных Th1- и Th17-цитокинов.

Воздействие иммуномодулятора С7МДП в ранние сроки беременности, индуцирующее и потенцирующее аборт у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/c и DBA/2, соответственно, приводило к структурно-функциональным изменениям плаценты жизнеспособных плодов на 14-й ДГ – уменьшению толщины и дезорганизации слоя гигантских клеток трофобласта, снижению объемной доли плодных сосудов, утолщению плацентарного барьера, нарушениям маточно-плацентарного и фетоплацентарного кровообращения, что является морфологическими признаками плацентарной дисфункции.

## ВЫВОДЫ

1. На моделях физиологической беременности и ее невынашивания (спонтанные аборт, оригинальные модели индуцированных и потенцированных абортов, вызванных воздействием иммуномодулятора  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида), установлено, что выраженность морфофункциональных изменений органов иммунной системы и профиль продукции цитокинов различаются при низкой и высокой частоте резорбции эмбрионов.

2. При физиологической беременности в тимусе развивается акцидентальная инволюция, слабо выраженная на 8-й и умеренно – на 14-й день гестации. Спонтанные и индуцированные аборт характеризуются на 8-й день умеренной, а на 14-й день – выраженной акцидентальной инволюцией. При потенцированных абортах выраженные инволютивные изменения тимуса наблюдаются уже на 8-й день гестации. Особенностью реакции тимуса на воздействие С7МДП, индуцирующее и потенцирующее аборт, является формирование множественных тимических телец в виде крупных кистоподобных полостей.

3. Селезенка самок с физиологически протекающей беременностью по сравнению с небеременными самками характеризуется гиперплазией белой пульпы, обусловленной увеличением объемной доли Т-зависимой зоны. При индуцированных и потенцированных абортах гиперплазия Т-зависимой зоны более выражена, чем в селезенке самок с физиологической беременностью и спонтанными абортами.

4. Увеличение частоты резорбции эмбрионов при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах происходит на фоне снижения реактивности лимфоцитов селезенки самок на антигены самцов и повышения уровня пролиферации по сравнению с физиологической беременностью.

5. При индуцированных и потенцированных абортах в плаценте жизнеспособных плодов проявляются морфологические признаки плацентарной недостаточности – выраженное сужение слоя и альтерация гигантских клеток трофобласта, уменьшение относительной плотности и запустевание плодных сосудов, расширение и полнокровие материнских лакун со стазом и сладжированием эритроцитов.

6. На 8-й день гестации у мышей с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов по сравнению с физиологической беременностью усиливается продукция клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-17 и снижается продукция ИФН- $\gamma$ . На 14-й день гестации у самок со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами, в отличие от физиологической беременности, сохраняется высокий уровень продукции провоспалительных цитокинов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**БП** – белая пульпа

**ГКТ** – гигантские клетки трофобласта

**ГМ-КСФ** – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

**ДГ** – день гестации

**ИЛ** – интерлейкины

**Индукцированные аборт**ы – аборт, индуцированные внутрибрюшинным введением  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида самкам СВА, оплодотворенным самцами Balb/c

**ИС** – индекс стимуляции

**ИФН** – интерферон

**КВ** – корковое вещество

**КП** – красная пульпа

**ЛУ** – лимфоидные узелки

**МДП** – мурамилдипептид

**МВ** – мозговое вещество

**ПАЛМ** – периартериолярные лимфоидные муфты

**Потенцированные аборт**ы – аборт, потенцированные внутрибрюшинным введением  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида самкам СВА, оплодотворенным самцами DBA/2

**СЗ** – субкапсулярная зона

**ТТ** – тимические тельца

**ФНО** – фактор некроза опухоли

**ЧР** – частота резорбции

**С7МДП** –  $\beta$ -гептилгликозид мурамилдипептида

**Th1, Th2, Th17** – Т-хелперы 1-го, 2-го, 17-го типов

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. / Г.Г. Автандилов – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Барина И. В. Патогенез и танатогенез плодовых потерь при антенатальной гипоксии: дис. докт. мед. наук – М., 2015. – 217 с.
3. Беленичев И.Ф. Исследование ноотропной и нейропротективной активности Тиоцетама в условиях моделирования фетоплацентарной недостаточности./ И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов, А.В. Абрамов, Н.В. Бухтиярова, С.В. Горбачева, Д.А. Зуева // Международный неврологический журнал. – 2008. – Т.6. – №22. – С. 34–46.
4. Беловешкин А.Г. Роль телец Гассала тимуса человека в позитивной и негативной селекции тимоцитов/ А.Г. Беловешкин // Молодой ученый. – 2012. – №7(32). – С. 334–338
5. Велиева Э.Э. Значение лимфоцитоиммунотерапии в оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения у супружеских пар с совместимостью по антигенам HLA–системы : автореф. дис. канд. мед. наук, М., 2010 – 24 с.
6. Внутритрубное развитие человека/ Руководство для врачей/ Под редакцией проф. А.П.Милованова, проф. С.В.Савельева. – М.: МДВ. –2006. – 384 с.
7. Зайратьянц О.В., Берщанская А.М. Строение и развитие вилочковой железы (Гл.1 с. 6–58 в книге «Болезни вилочковой железы»./ В.П. Харченко, Д.С. Саркисов, П.С. Ветшев (и др.). М.: Триада-Х. –1998. – 232 с.
8. Земляков А.Е. Гликозиды N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина. Влияние конфигурации гликозидного центра и природы агликона на биологическую активность./ А.Е. Земляков, В.В. Цикалов, О.В. Калюжин (и др.) // Биоорганическая химия. – 2003. – Т. 29. – № 3. – С. 316–322.
9. Земляков А.Е. Синтез и протективная активность  $\beta$ -гликозидов N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина с агликонами алкилалициклической и арилалифатической природы./ А.Е. Земляков, Цикалова В.Н., Цикалов В.В. (и др.) // Биоорганическая химия. – 2005. – Т. 31. – № 6. – С. 637–644.
10. Калюжин О.В. Поиск предпочтительных направлений синтеза и разработка высокоэффективных иммуномодуляторов–мурамилпептидов: дис. докт. мед. наук – М., 2002. – 311 с.
11. Калюжин О.В. Влияние конфигурации гликозидной связи и структуры агликона гликозидов мурамилдипептида на их способность стимулировать продукцию интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли макрофагами. / О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов, Е.В. Калюжина (и др.) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2002. – Т.134. –№9. –С. 326–328

12. Калюжин О.В. Стимуляция резистентности мышей к бактериальной инфекции гликозидами мурамилдипептида. / О.В. Калюжин, Н.Г. Калина, А.Ф. Баштаненко (и др.) // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2003. – Т. 135. – № 5. – С. 531–535
13. Калюжин О.В. Биологическая активность аномерных пар липофильных гликозидов N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина. / Калюжин О.В., Земляков А.Е., Калина Н.Г. (и др.) // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2008. – Т. 145. – № 5. – С. 561–564.
14. Караулов А.В. Биологическая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина. / А.В. Караулов, О.В. Калюжин, А.Е. Земляков // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т.1. – № 1. – С. 14–24.
15. Кузнецов Р.А. Патоморфология, профилактика и коррекция плацентарной недостаточности у крыс: дис. канд. мед. наук. – М., 2008. – 147 с.
16. Куклина Е.М. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующей активности репродуктивных гормонов: дис. докт. биол. наук: – М., 2003 – 236 с.
17. Куклина Е.М. Экстратимическая дифференцировка и антигенраспознающая активность  $\alpha\beta$ T-лимфоцитов при беременности у мышей. / Е.М. Куклина, С.В. Ширшев, Н.С. Глебздина // Онтогенез. – 2013. –Т.44. – №2. – С.136-140
18. Куликова Г.В. Влияние низкой концентрации свинца на плаценту и плод (экспериментальное исследование): дис. канд. биол. наук – М., 2008 – 129 с.
19. Лобанов Д.С. Гликозиды мурамилдипептида: иммуномодулирующая активность и возможность использования при вирусных болезнях: дис. канд. мед. наук. – М., 2009. – 109 с.
20. Михайлова Л.П. Иммуноморфология гранулематозного воспаления при саркоидозе, экспериментальном туберкулезе и применении иммуномодуляторов: дис. д-ра мед. наук. – М., 2006. – 314 с.
21. Мордвинов В.А. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина–5 человека. / В.А. Мордвинов, Д.П. Фурман //Вестник ВОГиС, 2009. – Т. 13. – № 1– С. 53–67
22. Обернихин С.С. Постнатальный морфогенез органов иммунной системы и кожи потомства самок мышей, подвергшихся иммуностимуляции в ранние сроки беременности: дис. докт. мед. наук – М., 2014. – 259 с.
23. Петросян Л.А. Оптимизация лимфоцитоиммунотерапии в лечении привычной потери беременности первого триместра: автореф. канд. мед. наук. – М., 2009. – 138 с.
24. Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности (руководство для врачей)/ Под редакцией А.П. Милованова, О.Ф. Серовой. – М.: Студия МДВ. –2011. – 216 с.

25. Русскова А.Н. О взаимосвязи действия бактериальных и растительных иммуномодуляторов и морфогистохимических изменений лимфоидных, гемопоэтических и паренхиматозных органов./ А.Н. Русскова, Лебединская Е.А., Лебединская О.В. // Успехи современного естествознания. – 2010. – №7. – С. 52–53
26. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности: Руководство для практикующих врачей. М: МИА. - 2011. - 536 с.
27. Соснова Е.А. Прегравидарная подготовка у пациенток с вирусными инфекциями// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2011. -Т. 10.- №5. - С. 72-78
28. Шубина О.С. О взаимоотношении плаценты и амниотической оболочки./ О.С. Шубина, Н.А. Смертина, Н.А. Мельникова //Фундаментальные исследования. –2011. – №2. – С. 173–177
29. Ярилин А.А. Иммунология – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. – 752 с.
30. Abrahams V. M. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. / V. M. Abrahams //J Reprod Immunol. – 2011. – Vol. 88 (2). – P. 112–117.
31. Adam A. Muramyl peptides: Immunomodulators, sleep factors and vitamins/ A. Adam, E. Lederer // Med. Res. Rev. – 1984. – Vol. 4. – P. 111–152.
32. Albieri A. Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. / A. Albieri, M.S Hoshida., S.M. Gagioti [et al.] // Reprod Biol Endocrinol. – 2005. – Vol. 10. – P. 3–34
33. Alexander C.M. T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. / Alexander C.M., Tygrett L.T., Boyden A.W. [et al.] // Immunology. – 2011. – Vol. 133(4). – P. 452–68.
34. Arruvito L. A physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure /Arruvito L., Sotelo A.I., Billordo A. [et al.] // Clin Immunol. 2010 Vol. 136(3). – P. 432–41.
35. Athanassakis I. Cytokine production in the serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation: cytokines/placenta/spleen/serum. /Athanassakis I., Iconomidou B. // Dev Immunol. – 1996. – Vol. 4(4). – P. 247–55.
36. Athié-Morales V. Activation of Human NK Cells by the Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern Muramyl Dipeptide / Athié-Morales V., O'Connor G. M. and Gardiner C.M. // The Journal of Immunology. – 2008. – Vol.180(6). – P. 4082–4089.
37. Baines M.G. Immunological prevention of spontaneous early embryo resorption is mediated by non-specific immunosimulation. / Baines M.G., Duclos A.J., de Fougères A.R. [et al.] // Am J Reprod Immunol. –1996. – Vol. 35(1). – P. 34–42.

38. Banerjee P. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. / Banerjee P., Ghosh S., Dutta M. [et al.] // *PLoS One*. – 2013– Vol. 8(11). – e80940.
39. Baptiste-Roberts K. Maternal risk factors for abnormal placental growth: The national collaborative perinatal project. / Baptiste-Roberts K., Salafia C.M., Nicholson W.K. [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2008. – Vol. 8. – P. 44.
40. Barbu-Tudoran L. Accumulation of tissue macrophages and depletion of resident macrophages in the diabetic thymus in response to hyperglycemia-induced thymocyte apoptosis/Barbu-Tudoran L., Gavriluc O.I., Paunescu V. [et al.] // *J Diabetes Complications*. – 2013. – Vol. 27(2). – P.114–22
41. Bazer F. W. Comparative aspects of implantation. / Bazer F.W., Spencer T. E., Johnson G.A. [et al.] // *Reproduction*. –2009. – Vol.138. – P. 195–209
42. Bertoja A.Z. Anti-P- and E-selectin therapy prevents abortion in the CBA/J x DBA/2J combination by blocking the migration of Th1 lymphocytes into the foetal-maternal interface. / Bertoja A.Z., Zenclussen M.L., Casalis P.A. [et al.] // *Cell Immunol*. –2005. – Vol. 238(2). – P. 97–102.
43. Blank M. Anti-GalNAc $\beta$ : a novel anti-glycan autoantibody associated with pregnancy loss in women with antiphospholipid syndrome and in a mouse experimental model. / Blank M., Krause I., Dotan N. [et al.] // *J Autoimmun*. – 2012. – Vol. 39(4). – P. 420–7.
44. Blois S. Therapy with dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model. /Blois S., Alba S. C. D., Olmos S. [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. –2004. – Vol. 51(1). – P. 40–8.
45. Blois S. M. Dendritic Cells: Key to Fetal Tolerance? / Blois S. M., Kammerer U., Soto C. A. [et al.] // *Biol Reprod*. –2007. – Vol. 77. – P. 590–598
46. Bloise E. Impaired Placental Nutrient Transport in Mice Generated by in Vitro Fertilization / Bloise E., Lin W., Liu X. [et al.] // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153(7). – P. 3457–3467
47. Bobé P. Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. III. Non-H-2 antigens and gestation/ Bobé P., Kiger N. // *J Immunogenet*. – 1989. – Vol. 16(3). – P. 223–31.
48. Bodey B. Novel insights into the function of the thymic Hassall's bodies. / Bodey B., Bodey B. Jr., Siegel S.E. [et al.] // *In Vivo*. – 2000. – Vol. 14(3). – P.407–18.
49. Bodey B. The role of the reticulo-epithelial (RE) cell network in the immune-neuroendocrine regulation of intrathymic lymphopoiesis. / Bodey B., Bodey B. Jr., Siegel S.E. [et al.] // *Anticancer Res*. – 2000. – Vol. 20(3A). – P. 1871–88.

50. Bonney E.A. To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. / Bonney E.A., Brown S.A. // *Reproduction*.—2014. – Vol. 147(5). – P. 153–67.
51. Bouillot S. Tracing of glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. / Bouillot S., Rampon C., Tillet E. [et al.] // *Placenta*. – 2006. – 27 (8). – P. 882–888
52. Boyson J.E. Gestation stage-dependent mechanisms of invariant natural killer T cell-mediated pregnancy loss. / Boyson J.E., Nagarkatti N., Nizam L. [et al.] // *PNAS*. –2006. – Vol. 103(12). – P. 4580–4585
53. Brogin Moreli J. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. / Brogin Moreli J., Cirino Ruocco A.M., Vernini J.M. [et al.] // *ISRN Obstet Gynecol*. –2012. – Vol. 2012. –e 230742.
54. Brown M.B. Macrophage Polarity in Normal and Complicated Pregnancy. /Brown M.B., von Chamier M., Allam A.B. [et al.] // *Front Immunol*. –2014. – Vol. 5(606). – P. M1/M2
55. Bulmer J. N. Immune cells in the placental bed. / J.N. Bulmer, P.J. Williams, G. E. Lash// *Int. J. Dev. Biol*. – 2010. – Vol.54. – P.281 – 294
56. Bustamante J.J. Pregnancy and lactation modulate maternal splenic growth and development of the erythroid lineage in the rat and mouse. / Bustamante J.J., Dai G., Soares M.J. // *Reprod Fertil Dev*. – 2008. – Vol. 20(2). – P. 303–10.
57. Carpentier P.A. Placental TNF- $\alpha$  Signaling in Illness-Induced Complications of Pregnancy. / Carpentier P.A., Dingman A.L., Palmer T.D. // – *Am J Pathol*. – 2011. – Vol. 178(6). – P. 2802–2810.
58. Carter A.M. Animal models of human placentation/ Carter A.M. // *Placenta*. – 2007. – V.21. – Suppl.A. – P. 41–47
59. Chakraborty D. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions/ Chakraborty D., Rumi M.A., Konno T. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol.108. – N39. – P.16295–16300
60. Chaouat G. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. /Chaouat G., Menu E., Clark D.A. [et al.] // *J Reprod Fertil*. – 1990 . – Vol.89(2). – P. 447–58.
61. Chaouat G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion– prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. / Chaouat G., Assal Meliani A., Martal J. [et al.] // *J Immunol*. – 1995. – Vol. 154(9). – P. 4261–8.
62. Chaouat G. Cytokines, implantation and early abortion: re–examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. / Chaouat G., Lédée-

Bataille N., Zourbas S. [et al.] // *American Am J Reprod Immunol.*– 2003 . – Vol. 50(3). – P.177–86.

63. Chaouat G. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost? Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm / Chaouat G., Ledée-Bataille N., Dubanchet S. [et al.] *International Archives of Allergy and Immunology.* – 2004. – Vol.134. – P. 93–119.

64. Chapman J. Neurological and neuroendocrine–cytokine inter–relationship in the antiphospholipid syndrome / Chapman J., Shoenfeld Y. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – Vol. 966. – P. 415–24.

65. Chatterjee P. Interleukin 10 deficiency exacerbates toll–like receptor 3–induced preeclampsia–like symptoms in mice. / Chatterjee P., Chiasson V.L., Kopriva S.E. [et al.] // *Hypertension.* – 2011. – Vol. 58(3). – P. 489–96.

66. Chatterjee P. Interleukin–4 deficiency induces mild preeclampsia in mice. / Chatterjee P., Kopriva S.E., Chiasson V.L. [et al.] // *J Hypertens.* – 2013.– Vol. 31(7). – P. 1414–23.

67. Chavez D.J. Allogeneic matings and immunization have different effects on nulliparous and multiparous mice. / Chavez D.J., McIntyre J.A., Collive J.A. [et al.] // *The Journal of Immunology.* . – 1987 . – Vol.139(1). – P. 85–88

68. Chen S.J. Immunologic Regulation in Pregnancy: From Mechanism to Therapeutic Strategy for Immunomodulation / Chen S.J., Liu Y.L., Sytwu H.K. // *Clin Dev Immunol.* 2012. – Vol. 2012. – P. 258391.

69. Chung Y. Th 17 cells and nesfatin-1 are associated with spontaneous abortion in the CBA/j × DBA/2 mouse model. / Chung Y., Kim H., Im E., Kim P., Yang H. // *Dev Reprod.* – 2015. – Vol.19(4). – P. 243–252.

70. Clark D.A. Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non–T suppressor cell activity. / Clark D.A., Chaput A., Tutton D. *J Immunol.* –1986 . – Vol. 136(5). – P. 1668–75.

71. Clark D.A. Cutting Edge: Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothombinase / Clark D.A., Chaouat G., Arck P.C. [et al.] // *J. Immunology.* – 1998. – Vol. 160. – P. 545–549.

72. Clark D.A. Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX–2. / Clark D.A., Ding J. –W., Yu G. [et al.]. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 7 (2). – P. 185–194

73. Clark D.A. MD-1 is a critical part of the mechanism causing Th1-cytokine-triggered murine fetal loss syndrome. / Clark D.A., Yu G., Arck P.C. [et al.] *Am J Reprod Immunol.* – 2003. – Vol. 49(5). – P. 297–307.
74. Clark D.A. Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells./ Clark D.A., Fernandes J., Banwatt D. *Am J Reprod Immunol.* – 2008. – Vol. 59(6). – P. 525–34.
75. Clark D.A. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model: II. Fecal LPS levels in colonies with different basal abortion rates. / Clark D.A., Chaouat G., Banwatt D. [et al.]. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – Vol. 60 (6). – P. 529–933.
76. Clark D.A. Regulatory T cells and reproduction: how do they do it? / Clark D.A., Chaouat G. // *J Reprod Immunol.* – 2012. – Vol. 96(1–2). – P. 1–7
77. Coan P.M. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. / Coan P.M., Angiolini E., Sandovici I. [et al.] // *J Physiol.* –2008. – Vol. 586(18). – P. 4567–4576.
78. Coan P.M. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. / Coan P.M., Vaughan O.R., Sekita Y. [et al.] // *The Journal of Physiology*, 2010. – Vol. 588. – P. 527–538.
79. Cortina M.E Impact of mouse pregnancy on thymic T lymphocyte subsets. / Cortina M.E., Litwin S., Roux M.E. [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2013. – Vol. 24 (8). – P. 1123–1133.
80. Costello M.J. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. / Costello M.J., Joyce S.K., Abrahams V.M. *Am J Reprod Immunol.* – 2007. – Vol. 57(1):67–80.
81. Cross J.C. How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice /J.C. Cross// *Placenta.* –2005. –Vol. 26. – P S3–S9.
82. Dawe G.S. Cell Migration from Baby to Mother Cell. / Dawe G.S., Tan X.W., Xiao Z.C.// *Cell Adh Migr.* – 2007. – Vol. 1(1). – P. 19–27.
83. Deb K. A ‘minimum dose’ of lipopolysaccharide required for implantation failure: assessment of its effect on the maternal reproductive organs and interleukin-1 $\alpha$  expression in the mouse. / Deb K., Chaturvedi M.M., Jaiswal Y.K. // *Reproduction* 2004. – Vol. 128. – P. 87–97.
84. Dey S.K. Molecular cues to implantation. / Dey S.K., Lim H., Das S.K. [et al.] // *Endocr Rev.* – 2004 . – Vol. 25(3). – P. 341–73.
85. Dorić M. Alterations in immunological reactivity during pregnancy in mice determined in vitro by lymphoproliferation tests. / Dorić M., Rukavina D. // *Immunobiology.* 1987. – Vol. 175(3). – P. 236–44.

86. Douek D. C. T-cell apoptosis and differential human leucocyte antigen class II expression in human thymus. / Douek D.C., Altmann D.M. // *Immunology*. – 2000. – Vol. 99(2). – P. 249–256
87. Du M.R. Cyclosporin A improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducing maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse. / Du M.R., Dong L., Zhou W.H. [et al.] // *Biol Reprod*. – 2007 . – Vol. 76(5). – P. 906–14.
88. Dubinsky V. IL-6 as a regulatory factor of the humoral response during pregnancy. / Dubinsky V., Junovich G., Gentile T. [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2008. – Vol. 60(3). – P. 197–203.
89. El-Hashash A.H.K. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. / A.H.K El-Hashash, Warburton D., Kimber S.J. // *Mech. Dev*. – 2010. – Vol. 127(1–2). – P1–20
90. Ellouz F. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. / Ellouz F., Adam A., Ciorubaru R. [et al.] // *Biochim. Biophys. Res. Commun*. – 1974 . – Vol. 59. – P. 1317–1325
91. Fowden A.L. The Placenta and Intrauterine Programming. / Fowden A.L., Forhead A.J., Coan P.M. [et al.] // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2008. – Vol. 20(4). – P. 439–450
92. Friebe A. Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy. / Friebe A., Douglas A.J., Solano E. [et al.] // *J Mol Med (Berl)*. – 2011. – Vol. 89(7). – P. 689–99;
93. Fu B. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. / Fu B., Tian Z., Wei H. // *Cell Mol Immunol*. – 2014. – Vol. 11(6). – P. 564–570.
94. Gendron R.L. Morphometric analysis of the histology of spontaneous fetal resorption in a murine pregnancy. / Gendron R.L., Baines M.G. // *Placenta*. – 1989. – Vol. 10(3). – P. 309–18.
95. Giakoumopoulos M. Embryonic stem cell-derived trophoblast differentiation: a comparative review of the biology, function, and signaling mechanisms. / M. Giakoumopoulos, T. G. Golos // *J. Endocrinol*. – 2013. – Vol. 216. – P. 33–45
96. Girardi G. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction / Girardi G., Yarilin D., Thurman J.M. [et al.] *J Exp Med*. –2006. – Vol. 203(9). – P. 2165–2175.
97. Girardi G. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. / Girardi G., Prohászka Z., Bulla R. [et al.] *Mol Immunol*. – 2011 . – Vol. 48(14). – P. 1621–30

98. Gorivodsky M. TNF-alpha messenger RNA and protein expression in the uteroplacental unit of mice with pregnancy loss. / Gorivodsky M., Zemlyak I., Orenstein H. [et al.] *J Immunol.* – 1998 . – Vol. 160(9). – P. 4280–8.
99. Gottesman S.R. Cellular immunity during pregnancy. I. Proliferative and cytotoxic reactivity of paraaortic lymph nodes. / Gottesman S.R., Stutman O. // *Am J Reprod Immunol.* – 1980. – Vol. 1(1). – P. 10–7.
100. Greco A. High frequency ultrasound for in vivo pregnancy diagnosis and staging of placental and fetal development in mice. / Greco A., Ragucci M., Coda A.R. [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(10). – e77205
101. Groth K. Cyclosporine A exposure during pregnancy in mice: effects on reproductive performance in mothers and offspring. / Groth K., Brännström M., Mölne J. [et al.] *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25 (3). – P. 697–704.
102. Guerin L. R. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? / Guerin L. R., Prins J.R., Robertson S.A. // *Hum Reprod Update.* –2009. – Vol. 15(5). – P.517–535
103. Gui J. Effects of acupuncture on Th1, th2 cytokines in rats of implantation failure. / Gui J., Xiong F., Li J. [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 893023.
104. Gutiérrez G. Regulation of interleukin-6 fetoplacental levels could be involved in the protective effect of low-molecular weight heparin treatment on murine spontaneous abortion. / Gutiérrez G., Sarto A., Berod L. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2004 . – Vol. 51(2). – P. 160–5.
105. Haider S. Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. / S. Haider, M. Knöfler // *Placenta.* – 2009. – Vol. 30(2). – P. 111–123.
106. Hakim F.T. Thymic involution: implications for self-tolerance// Hakim F.T., Gress R.E. // *Methods Mol Biol.* – 2007. – Vol. 380. – P. 377–90
107. Hanabuchi S. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. / Hanabuchi S., Ito T., Park W.R. [et al.] // *J Immunol.* –2010. – Vol. 184(6):2999–3007.
108. Hanabuchi S. TSLP and immune homeostasis. / Hanabuchi S., Watanabe N., Liu Y. –J. // *Allergol. Int.* – 2012. – Vol.61. – P. 19–25
109. Hegde U.C. Immunoregulatory pathways in pregnancy. / Hegde U.C., Ranpura S., D'Souza S. [et al.] // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol.38(4). – P.207–19

110. Ho H.N. Age, environment, and lymphocyte immunization influence the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model. / Ho H.N., Chen S.U., Yang Y.S. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* –1994. – Vol. 31(1). – P. 47–51.
111. Hooper D.C. Murine pregnancy-associated modulations in lymphocyte reactivity to mitogens: identification of the cell populations affected. / Hooper D.C., Chantry D.H, Billington W.D. // *J Reprod Immunol.* – 1987. – Vol. 11(4). – P. 273–86.
112. Hu D. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. / D. Hu, J.C. Cross // *Int. J. Dev. Biol.* –2010. – Vol.54.(2–3). – P. 341–54
113. Imaizumi M. Pregnancy and murine thyroiditis: thyroglobulin immunization leads to fetal loss in specific allogeneic pregnancies. / Imaizumi M., Pritsker A., Kita M. [et al.] // *Endocrinology.* 2001. – Vol. 142(2). – P. 823–9.
114. Inagaki J. Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of anti-laminin-1 autoantibodies. / Inagaki J., Kondo A., Lopez L.R. [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005 . – Vol. 1051. – P. 174–84.
115. Ingman W. V. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. / Ingman W. V., Jones R. L. // *Hum. Reprod. Update.* – 2008. – Vol. 14(2). – P. 179–192.
116. Inohara N. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. / Inohara N., Ogura Y., Fontalba A. [et al.] // *J Biol Chem.* 2003. – Vol. 278(8). – P. 5509–12.
117. Inohara N. NOD–LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. / Inohara N., Chamaillard M., McDonald C. [et al.] // *Annu Rev Biochem.* – 2005. – Vol. 74. – P. 355–83.
118. Jasper M.J. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. / Jasper M.J., Tremellen K.P., Robertson S.A. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 12 (5). – P. 301–308.
119. Jin L.P. Blockade of CD80 and CD86 at the time of implantation inhibits maternal rejection to the allogeneic fetus in abortion- Prone matings. / Jin L.P., Zhou Y.H., Wang M.Y. [et al.] // *J Reprod Immunol.* – 2005. – Vol. 65(2). – P. 133–46.
120. Jin L.P. Adoptive transfer of paternal antigen-hyporesponsive T cells induces maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion– Prone matings. / Jin L.P, Li D.J., Zhang J.P. [et al.] // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 173(6). – P. 3612–9.
121. Joachim R.A. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P. / Joachim R.A., Hildebrandt M., Oder J. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2001. – Vol. 45(5). – P. 303–9.

122. Junovich G. Comparative immunological effect of anticoagulant and antioxidant therapy in the prevention of abortion in mice. / Junovich G., Dubinsky V., Gentile T. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2011. – Vol. 65. – P. 104109.
123. Kawano Y. Effects of interferon-gamma on secretion of vascular endothelial growth factor by endometrial stromal cells. / Kawano Y., Matsui N., Kamihigashi S. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2000. – Vol. 43(1). – P. 47–52.
124. Kendall M.D. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment. / Kendall M.D., Clarke A.G. // *J Anat.* 2000. – Vol. 197(3). – P. 393–411.
125. Khalife N. Placental size is associated with mental health in children and adolescents. / Khalife N., Glover V., Hartikainen A.L. [et al.] // *PLoS One.* 2012. – Vol. 7(7). – P. e40534.
126. Kiger N. Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. Preimmunization of females with allogeneic cells. / Kiger N., Chaouat G., Kolb J.P. [et al.] // *J Immunol.* 1985. – Vol. 134(5). – P. 2966–70.
127. Kimura A. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. / Kimura A., Kishimoto T. // *Eur J Immunol.* – 2010. – Vol. 40(7). – P. 1830–5.
128. King A.E. Differential expression and regulation of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in human endometrium: a potential role in innate immune protection and menstruation. / King A.E., Horne A.W., Hombach-Klonisch S. [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2009. – Vol. 15(5). – P. 311–9.
129. Kitaya K. Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. / Kitaya K., Yasuo T., Yamaguchi T. [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2007. – Vol. 20(5). – P. 689–97.
130. Klein T. Biological response modifiers in human oncology and Immunology. / Klein T., Specter S., Freldman H. [et al.] // N.Y.: Plenum. – 1983. – P. 117–158.
131. Knackstedt M. Activation of the novel prothrombinase fgl2, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia. / Knackstedt M., Ding J.W., Arck P.C. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2001. – Vol. 46(3). – P. 196–210.
132. Knackstedt M. K. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. / Knackstedt M.K., Zenclussen A.C., Hertwig K. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2003. – Vol. 49(4). – P. 210–20.
133. Kotani S. Muramyl dipeptides: prospect for cancer treatment and immunostimulation. / Kotani S., Azuma I., Tacada H. [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 1983. – Vol. 166. – P. 117–58.

134. Kotani S. Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. / Kotani S., Tsujimoto M., Koga T. [et al.] // *Federat. Proc.* – 1986. – Vol. 45 (11). – P. 2534–2540
135. Krishnan L. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. / L. Krishnan, T. Nguen, S. J. McComb // *Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 97. – P. 62–73
136. Kumar A. IL-10, TNF- $\alpha$  & IFN- $\gamma$ : potential early biomarkers for preeclampsia. / Kumar A., Begum N., Prasad S. [et al.] // *Cell Immunol.* – 2013. – Vol. 283(1–2). – P. 70–4.
137. Kusumoto S. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: Chemical synthesis and functional studies. / Kusumoto S., Fukase K., Shiba T. // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* – 2010. – Vol. 86(4). – P. 322–337.
138. Kwak-Kim J. Immunological modes of pregnancy loss. / Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 63 (6). – P. 611–623
139. Lash G. E. Interferon- $\gamma$  inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. / Lash G. E., Otun H. A., Innes B. A. [et al.] // *FASEB Journal.* – 2006. – Vol. 20(14). – P. 2512–2518
140. Lea R.G. Tumor necrosis factor-alpha mRNA- Positive cells in spontaneous resorption in rodents. / Lea R.G., McIntyre S., Baird J.D. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 1998. – Vol. 39(1). – P. 50–7.
141. Lee J.Y. Role of endometrial immune cells in implantation. / Lee J.Y., Lee M., Lee S.K. // *Clin Exp Reprod Med.* – 2011. – Vol. 38(3). – P. 119–125.
142. Lee K.Y. Animal models of implantation. / Lee K.Y., DeMayo F.J. // *Reproduction.* – 2004. – Vol. 128(6). – P. 679–95.
143. Lee S.K. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. / Lee S.K., Kim J.Y., Hur S.E. [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26(11). – P. 2964–71.
144. Lee Y.L. Increased fetal abortion rate in autoimmune thyroid disease is related to circulating TPO autoantibodies in an autoimmune thyroiditis animal model. / Lee Y.L., Ng H.P., Lau K.S. [et al.] // *Fertil Steril.* 2009. – Vol. 91(5). – P. 2104–9.
145. Lim H. J. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. / H. J. Lim, H. Wang // *J. Clin. Invest.* – 2010. – V.120(4). – P. 1004– 1015
146. Lin Y. Murine CD200<sup>+</sup>CK7<sup>+</sup> trophoblasts in a poly (I:C)–induced embryo resorption model. / Lin Y., Zeng Y., Di J., Zeng S. // *Reproduction.* – 2005. – Vol. 130. – P. 529–537.

147. Lumey L.H. Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. / Lumey L.H. // *Placenta*. – 1998. – Vol. 19(1). – P. 105–11.
148. Lv F. Repeated abortion affects subsequent pregnancy outcomes in BALB/c mice. / Lv F., Xu X., Zhang S. [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(10). – e48384.
149. Makkar G. Excessive ovarian response is associated with increased expression of interleukin-2 in the periimplantation endometrium. / Makkar G., Ng E.H., Yeung W.S. [et al.] // *Fertil Steril*. – 2009. – Vol. 91(4). – P. 1145–51.
150. Malassiné A. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. / Malassiné A., Frendo J.L., Evain-Brion D. // *Hum Reprod Update*. – 2003. – Vol. 9(6). – P. 531–9.
151. Manni M. Muramyl dipeptide induces Th17 polarization through activation of endothelial cells. / Manni M., Ding W., Stohl L.L. [et al.] // *J Immunol*. – 2011. – Vol. 186(6). – P. 3356
152. Maroni E.S. The lymphoid organs during pregnancy in the mouse. A comparison between a sygeneic and an allogeneic mating. / Maroni E.S., De Sousa M.A. // *Clin Exper Immunol*. – 1973. – Vol. 31. – P. 107–124.
153. Matalon S.T. The pathogenic role of anti-thyroglobulin antibody on pregnancy: evidence from an active immunization model in mice. / Matalon S.T., Blank M., Levy Y. [et al.] // *Hum Reprod*. – 2003. – Vol. 18(5). – P. 1094–9.
154. Mayhew T.M. A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. / Mayhew T.M. // *J Anat*. – 2009. – Vol. 215(1). – P. 77–90.
155. Medina K.L. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. / Medina K.L., Smithson G., Kincade P.W. // *J Exp Med*. – 1993. – Vol. 178(5). – P. 1507–15.
156. Miranda S. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. / Miranda S., Litwin S., Barrientos G. [et al.] // *Scand J Immunol*. – 2006. – Vol. 64(5). – P. 493–9.
157. Moldenhauer L.M. GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. / Moldenhauer L.M., Keenihan S.N., Hayball J.D. [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185(11). – P. 7085–7096.
158. Mor G. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. / Mor G., Cardenas I. *Am J Reprod Immunol*. – 2010. – Vol. 63(6). – P. 425–433.
159. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. / Mor G., Cardenas I., Abrahams V. [et al.] // *Ann N Y Acad Sci*. – 2011. – Vol. 1221(1). – P. 80–87.

160. Morgan D.A. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. / Morgan D.A., Ruscetti F.W., Gallo R.C. // *Science*. – 1976. – Vol. 193(4257). – P.1007–1008
161. Mulla M.J. Regulation of Nod1 and Nod2 in first trimester trophoblast cells. / Mulla M.J., Yu A.G., Cardenas I. [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2009. – Vol. 61(4). – P. 294–302.
162. Murphy S.P. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. / Murphy S.P., Tayade C., Ashkar A.A. [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2009. – Vol. 80(5). – P. 848–859.
163. Nakashima A. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. / Nakashima A., Ito M., Yoneda S. [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. 2010. – Vol. 63(2). – P. 104–9.
164. Nakashima A. Accumulation of IL-17-Positive cells in decidua of inevitable abortion cases. / Nakashima A., Ito M., Shima T. [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2010. – Vol. 64(1). – P. 4–11.
165. Nayak N.R. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. / Nayak N.R., Giudice L.C. // *Placenta*. – 2003. – Vol. 24(4). – P. 281–96.
166. Ning Q. Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/ fibroleukin in experimental and human allograft rejection. / Ning Q., Sun Y., Han M. [et al.] // *J. Immunol*. – 2005. – Vol. 174 (11). – P. 7403–7411.
167. Nishiura R. Expression of matrix metalloproteinase-3 in mouse endometrial stromal cells during early pregnancy: regulation by interleukin-1alpha and tenascin-C. / Nishiura R., Noda N., Minoura H. [et al.] // *Gynecol Endocrinol*. – 2005. – Vol. 21(2). – P. 111–8.
168. Norton M.T. Pregnancy Alters the Proliferation and Apoptosis of Mouse Splenic Erythroid Lineage Cells and Leukocytes. / Norton M.T., Fortner K.A., Bizargity P. [et al.] // *Biol Reprod*. – 2009. – Vol. 81(3). – P. 457–464.
169. Norton M.T. Evidence that CD8 T-cell homeostasis and function remain intact during murine pregnancy. / Norton M.T., Fortner K.A., Oppenheimer K.H, [et al.] // *Immunology*. – 2010. – Vol. 131(3). – P. 426–437.
170. Ozkan Z.S. What is the impact of SOCS3, IL-35 and IL-17 in immune pathogenesis of recurrent pregnancy loss? / Ozkan Z.S., Deveci D., Simsek M. [et al.] // *J Matern Fetal Neonatal Med*. – 2015. – Vol. 28(3). – P. 324–8.
171. Paiva P. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. / Paiva P., Hannan N.J., Hincks C. [et al.] // *Hum. Reprod*. – 2011. – Vol. 26 (5). – P. 1153–1162.

172. Pandey M.K. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. / Pandey M.K., Thakur S., Agrawal S. // *Arch Gynecol Obstet.* – 2004. – Vol. 269(3). – P. 161–72.
173. Persson M. Immunological status in patients undergoing in vitro fertilisation: responses to hormone treatment and relationship to outcome. / Persson M., Ekerfelt C., Jablonowska B. [et al.] // *J Reprod Immunol.* – 2012. – Vol. 96(1–2). – P. 58–67.
174. Phuc L.H. Thymic involution in pregnant mice. I. Characterization of remaining thymocyte subpopulations. / Phuc L.H., Papernik M., Berrih S. [et al.] // *Clin Exper Immunol.* – 1981. – Vol. 44. – P. 247–252;
175. Piccinni M.P. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. / Piccinni M.P. // *Reprod Biomed Online.* – 2007. – Vol. 14(1). – P. 95–9.
176. Polese B. The endocrine milieu and CD4 T-lymphocyte polarization during pregnancy. / Polese B., Gridelet V., Araklioti E. [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2014. – Vol. 5. – P. 106.
177. Pongcharoen S. The effect of interleukin-17 on the proliferation and invasion of JEG-3 human choriocarcinoma cells. / Pongcharoen S., Niomsup P., Sangansermisri D. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2006. – Vol. 55(4). – P. 291–300.
178. Pongcharoen S. Interleukin-17 increased progesterone secretion by JEG-3 human choriocarcinoma cells. / Pongcharoen S., Supalap K. // *Am J Reprod Immunol.* – 2009. – Vol. 61(4). – P. 261–4.
179. Prins J.R. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. / Prins J.R., Gomez-Lopez N., Robertson S.A. // *Reprod Immunol.* – 2012. – Vol. 95(1–2). – P. 1–14
180. Rader K.A. *Making Mice: Standardizing Animals for American Biomedical Research, 1900–1955* / K. A. Rader // Princeton University Press. – 2004. – P. 299.
181. Redecha P. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. / Redecha P., van Rooijen N., Torry D. [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113(17). – P. 4101–4109.
182. Rezaei A. T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. / Rezaei A., Dabbagh A. // *Med Sci Monit.* – 2002. – Vol. 8(8). – P. 607–10.
183. Robertson S.A. Fertility Impairment in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice. / Robertson S.A., Roberts C.T., Farr K.L. [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 1999. – Vol. 60(2). – P. 251–261.
184. Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post-mating inflammatory response in mice. /

Robertson S.A, O'Connell A.C., Hudson S.N. [et al.] // *J Reprod Immunol.* – 2000. – Vol. 46(2). – P. 131–54.

185. Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. / Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J. [et al.] // *Biol Reprod.* – 2001. – Vol. 64(4). – P. 1206–15.

186. Robertson S.A. Interleukin 10 Regulates Inflammatory Cytokine Synthesis to Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Abortion and Fetal Growth Restriction in Mice. / Robertson S.A., Care A.S., Skinner R.J. // *Biology of Reproduction.* – 2007. – Vol. 76(5). – P. 738–748

187. Robertson S.A. Seminal Fluid Drives Expansion of the CD4+CD25+ T Regulatory Cell Pool and Induces Tolerance to Paternal Alloantigens in Mice. / Robertson S.A., Guerin L.R., Bromfield J.J. [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 2009. – Vol. 80(5). – P. 1036–1045.

188. Saito S. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. / Saito S., Nakashima A., Shima T. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2010. – Vol. 63(6). – P. 601–10.

189. Savion S. Ciprofloxacin affects pregnancy loss in CBA/J x DBA/2J mice possibly via elevation of interleukin-3 and granulocyte macrophage–colony stimulating factor production. / Savion S., Blank M., Shepshelovich J. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2000. – Vol. 44 (5). – P. 293–298.

190. Savion S. Cytokine expression in the uterus of mice with pregnancy loss: effect of maternal immunopotentialization with GM-CSF. / Savion S., Zeldich E., Orenstein H. [et al.] // *Reproduction.* – 2002. – Vol. 123. – P. 399–409

191. Schumacher A. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. / Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S. [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182(9). – P. 5488–97.

192. Schumacher A. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. / Schumacher A., Heinze K., Witte J. [et al.] // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190(6). – P. 2650–8.

193. Shiraishi H. Murine experimental abortion by IL-2 administration is caused by activation of cytotoxic T-lymphocytes and placental apoptosis. / Shiraishi H., Hayakawa S., Satoh K. // *J Clin Lab Immunol.* – 1996. – Vol. 48(3). – P. 93–108.

194. Siristatidis C. Granulocyte macrophage colony stimulating factor supplementation in culture media for subfertile women undergoing assisted reproduction technologies: a systematic review. / Siristatidis C., Vogiatzi P., Salamalekis G. [et al.] // *Int J of Endocrinol.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 704967.

195. Soloff M.S. Interleukin-1-induced NF-kappaB recruitment to the oxytocin receptor gene inhibits RNA polymerase II– Promoter interactions in cultured human myometrial cells. /

Soloff M.S., Izbán M.G., Cook D.L. Jr [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2006. – Vol. 2(10). – P. 619–24.

196. Svensson L. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. / Svensson L., Arvola M., Sällström M.A. [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology.* – 2001. – Vol. 51(1). – P.3–7

197. Szekeres-Bartho J. Progesterone-dependent immunomodulation. / Szekeres-Bartho J., Polgar B., Kozma N. [et al.] // *Chem Immunol Allergy.* 2005. – Vol. 89. – P. 118–25.

198. Takeda M. Administration of high-dose intact immunoglobulin has an anti-resorption effect in a mouse model of reproductive failure. / Takeda M., Yamada H., Iwabuchi K. [et al.] // *Molecular Human Reproduction* – 2007. – Vol. 13(11). – P. 807–814.

199. Tangri S. Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. / Tangri S., Wegmann T., Lin H. [et al.] // *J Immunol.* – 1994. – Vol. 152. – P. 4903–4911.

200. Thuere C. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. / Thuere C., Zenclussen M.L., Schumacher A. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2007. – Vol. 58(6). – P. 514–23.

201. Tian X. Preconception zinc deficiency disrupts postimplantation fetal and placental development in mice. / Tian X., Anthony K., Neuberger T. [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 2014. – Vol. 113. – P.113910

202. Tibbetts T.A. Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. / Tibbetts T.A., DeMayo F., Rich S.[et al]. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* –1999. – Vol. 96(21). – P.12021–12026

203. Toder V. Mouse model for the treatment of immune pregnancy loss. / Toder V., Strassburger D., Carp H. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 1991. – Vol. 26(1). – P. 42–6.

204. Torchinsky A. TNF- $\alpha$  protects embryos exposed to developmental toxicants. / Torchinsky A., Shepshelovich J., Orenstein H. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2003. – Vol. 49(3). – P. 159–68.

205. Tsuji A. L-tryptophan metabolism in pregnant mice fed a high L-tryptophan diet and the effect on maternal, placental, and fetal growth. / Tsuji A., Nakata C., Sano M. [et al.] // *Int J Tryptophan Res.* – 2013. – Vol. 6. – P. 21–33

206. Wang W.J. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. / Wang W.J., Hao C.F., Yi-Lin [et al.] // *Reprod Immunol.* – 2010. – Vol. 84(2). – P. 164–70.

207. Wang W.J. Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ regulatory T cells reverses the increase in abortion rate caused by interleukin 17 in the CBA/JxBALB/c mouse model. / Wang W.J, Liu F.J., Xin-Liu [et al.] // *Hum Reprod.* – 2014. – Vol. 29(5). – P. 946–52.
208. Watanabe N. Hassals' corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. / Watanabe N., Wang Y.H., Lee H.K. [et al.] – // *Nature.* – 2005. – Vol. 436(7054). – P. 1181–1185/
209. Watson E.D. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta/ E. D.Watson, J. C. Cross// *Physiology.* – 2005. – Vol. 20. –No. 3. – P. 180–193.
210. White C.A. Effect of Interleukin-10 Null Mutation on Maternal Immune Response and Reproductive Outcome in Mice. / White C.A., Johansson M., Roberts C.T. [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 2004. – Vol. 70(1). – P. 123–131.
211. Winger E.E. Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. / Winger E.E., Reed J.L. // *Am J Reprod Immunol.* – 2008. – Vol. 60(1). – P. 8–16.
212. Xu W.M. IL-17 Induces Fetal Loss in a CBA/J×BALB/c Mouse Model, and an Anti-IL-17 Antibody Prevents Fetal Loss in a CBA/J×DBA/2 Mouse Model. / Xu W.M., Xiao Z.N., Wang X.B. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2016. – Vol.75(1). – P. 51-8.
213. Yuan M.M. Combination of CD4(+)/CD25(+)/CD127(–) regulatory T cells with MLC-BE and BE-Ab2: an efficient evaluation of the therapy of paternal lymphocyte induced immunization in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. / Yuan M.M., Du M.R., Wang M.Y. [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8(4). – P. 4022–32.
214. Zenclussen A.C. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. / Zenclussen A.C., Blois S., Stumpo R. [et al.] // *Cytokine.* – 2003. – Vol. 24(4). – P.150–60.
215. Zenclussen A.C. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. / Zenclussen A.C., Gerlof K., Zenclussen M.L. [et al.] // *Am J Pathol.* – 2005. – Vol. 166(3). – P.811–22.
216. Zenclussen A.C. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal–maternal interface. / Zenclussen A.C., Gerlof K., Zenclussen M.L. [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2006 . – Vol. 36(1). – P. 82–94.
217. Zenclussen M.L. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. / Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N. [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2010. – Vol. 63(3). – P. 200–8.

218. Ziganshina M.M. Time course of the cytokine profiles during the early period of normal pregnancy and in patients with a history of habitual miscarriage / Ziganshina M.M., Krechetova L.V., Vanko L.V. [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2013. – Vol. 154(3). – P. 385–387.
219. Zhang J. Natural killer cell–triggered vascular transformation: maternal care before birth? / Zhang J., Chen Z., Smith G.N. [et al.] // *Cell Mol Immunol*. – 2011. – Vol. 8(1). – P. 1–11.
220. Zhao A. Adoptive transfer of mFas ligand into dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2 mouse model. / Zhao A., Xiong M., Zhang Y. [et al.] // *Fertil Steril*. – 2010. – Vol. 93(5). – P. 1700–5.
221. Zhao F.X. Effect of blockage of costimulatory signal on murine abortion- Prone model. / Zhao F.X., Zhang Y.Y., Liu R.H. [et al.] // *Medical Journal*. – 2007. – Vol. 120(14). – P. 1247–1250.
222. Zhao J.X. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cells pool during pregnancy. / Zhao J.X., Zeng Y.Y., Liu Y. // *J. Reprod. Immunol*. – 2007. – Vol. 75(2). – P. 71–81.
223. Zheng S.G. Cutting Edge: Foxp3+CD4+CD25+ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF- $\beta$  Are Resistant to Th17 Conversion by IL-6. / Zheng S.G., Wang J., Horwitz D.A. // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – P. 7112–7116.
224. Zhou W.H. Cyclosporin A improves murine pregnancy outcome in abortion-Prone matings: involvement of CD80/86 and CD28/CTLA-4. / Zhou W.H., Dong L., Du M.R. [et al.] // *Reproduction*. – 2008. – Vol. 135. – P. 385–395.
225. Zoller A.L. Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of  $\beta$ -Selected thymocyte. / Zoller A.L., Kersh G.J // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 176. – P. 7371–7378.
226. Zoller A.L. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration/ Zoller A.L., Schnell F.J., Kersh G.J. // *Immunology*. – 2007. – Vol. 121(2). – P. 207–215.