

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

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор **Болтовская Марина Николаевна**
доктор медицинских наук, профессор **Калюжин Олег Витальевич**

Официальные оппоненты:

Руководитель патологоанатомического отделения ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»
доктор медицинских наук **Барина Ирина Владимировна**

Ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор **Ванько Людмила Викторовна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64)

Защита состоится «___» _____ 2017 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема невынашивания беременности, частота которого стабильно высока и составляет 12–27% клинически установленных беременностей, занимает одно из первых мест в практическом акушерстве [Милованов А.П., Серова О.Ф., 2011; Kwak-Kim J. et al., 2010]. Невынашивание беременности имеет полиэтиологический характер. Если раньше в генезе самопроизвольных абортов преобладали генетические, анатомические и гормональные нарушения, то в последнее десятилетие в числе других причин невынашивания ведущими становятся инфекционные и иммунологические [Соснова Е.А., 2011]. Более чем в 40% случаев причины потери беременности установить не удастся, и по данным ряда исследований в 80% случаев они обусловлены нераспознанными нарушениями иммунной толерантности матери к плоду [Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., 2011; Zenclussen A. et al. 2005; Zhou W.H. et al., 2008; Kwak-Kim J. et al., 2010].

Многочисленные данные указывают на то, что физиологическое течение беременности в значительной степени определяется балансом субпопуляций CD4⁺-клеток и цитокиновой сети, а дисбаланс Th1/Th2/Th17 и T-регуляторных клеток лежит в основе иммунозависимых репродуктивных потерь [Saito S. et al., 2010; Mor G. et al., 2011; Ziganshina M.M., Krechetova L.V., Vanko L.V. et al., 2013; Ozkan Z.S. et al., 2015]. Для изучения патогенеза невынашивания беременности, разработки профилактических и терапевтических мер, направленных на ее сохранение, широко используют экспериментальные модели на мышах, которые 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]. Известны экспериментальные модели абортов, в которых резорбцию эмбрионов индуцировали введением провоспалительных цитокинов [Shiraishi H. et al., 1996; Clark D. A. et al., 1998; Knackstedt M.K. et al., 2003; Jin L.P. et al., 2004], липополисахарида [Robertson S.A. et al., 2007; Friebe A. et al., 2011], синтетической двухцепочечной РНК (poly I:C), имитирующей вирусную инфекцию [Lin Y. et al., 2005] и другие. Наиболее близкой к невынашиванию беременности неустановленного генеза у человека является модель спонтанных абортов, развивающихся при оплодотворении самок линии CBA/J (H-2k) самцами линии DBA/2 (H-2d), отличающимися по антигенам главного комплекса гистосовместимости. В отсутствие неблагоприятных экзогенных факторов уровень эмбриональных потерь в данной модели составляет до 30%, тогда как при других комбинациях линий – около 10% [Clark D.A. et al, 1986; Chaouat G. et al., 1990; Jin L.P. et al., 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 абортов 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 абортос 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 невынашивания беременности.

Степень разработанности темы исследования

На известных экспериментальных моделях аллогенной физиологической беременности, спонтанных и индуцированных абортос 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 абортос и после воздействия иммуномодулятора β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на материнский организм в ранние сроки гестации.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на уровень эмбриональных потерь у самок мышей на моделях физиологической беременности (♀СВА×♂ Balb/c) и спонтанных абортос (♀СВА×♂ DBA/2).
2. Провести сравнительное исследование динамики морфологических изменений тимуса самок мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортос.
3. Сравнить динамику морфологических изменений селезенки самок мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортос.
4. Определить пролиферативную активность клеток селезенки самок СВА *ex vivo* и их реакцию на антигены аллогенных самцов Balb/c и DBA/2 в смешанной культуре лимфоцитов при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных С7МДП абортос.
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 абортос.

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 Balb/c) и беременности с высоким уровнем спонтанных абортов (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- γ 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- γ , ФНО- α) 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.

Полученные данные об изменениях органов иммунной системы 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, 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. Внутривнутрибрюшинное введение иммуномодулятора β -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 г.), 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, анализе и обобщении 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, цитологии и эмбриологии ФGAOY BO «Российский университет дружбы народов».

Модели индуцированных и потенцированных C7MДП абортос используются в научных исследованиях 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 российских и зарубежных источников, в том числе 29 российских и 197 зарубежных. Работа иллюстрирована 35 рисунками и 13 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Исследование проводили на 8–10-недельных мышах инбредных линий CBA, DBA/2, Balb/c массой тела 23–25 г, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Эксперименты осуществляли в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 6А от 19 октября 2009 г.)

Для моделирования аллогенной физиологически протекающей (физиологической) беременности использовали комбинацию линий мышей ♀CBA×♂ Balb/c, высокий уровень спонтанных абортос воспроизводили при скрещивании самок CBA с самцами DBA/2 [Clark D.A. et al., 1986]. 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 оценки влияния иммуномодулятора C7MДП на развитие беременности самкам с физиологически протекающей беременностью и с исходно высоким уровнем спонтанных абортос на 5-й ДГ (завершение имплантации) и 7-й ДГ (до начала формирования плаценты) внутрибрюшинно в 0,1мл 0,9% раствора NaCl вводили C7MДП в дозе 20 мкг на 1 животное (≈ 1 мг/кг).

Небеременным самкам C7MДП вводили двукратно с суточным интервалом. Выбранная доза C7MДП соответствовала ED₅₀, определенной в серии экспериментов на моделях сепсиса *in vivo* [Калюжин О.В. и соавт., 2003]. Беременным и небеременным самкам контрольных групп внутрибрюшинно вводили по 0,1мл 0,9% раствора NaCl в том же режиме.

Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Морфофункциональные исследования тимуса и селезенки у небеременных самок проводили через 7 суток после повторного введения препарата, у беременных – на 8-й ДГ (начало формирования плаценты) и 14-й ДГ (зрелая плацента). Забор селезенки для оценки уровня пролиферации лимфоцитов и постановки реакции смешанной культуры лимфоцитов осуществляли на 9-й ДГ и спустя двое суток после повторного введения С7МДП небеременным самкам. Плаценты исследовали на 14-й ДГ.

Для проведения исследования были сформированы шесть экспериментальных групп животных (табл.1).

Таблица 1. Схема эксперимента

| Экспериментальные группы | Количество животных | | | |
|---|---------------------|----|---|----|
| | Дни гестации | | | |
| | 0 | 8 | 9 | 14 |
| 1. Небеременные самки СВА | 13 | – | | |
| 2. Небеременные самки СВА после введения С7МДП | 13 | – | | |
| 3. Самки с физиологической беременностью | – | 10 | 5 | 10 |
| 4. Самки с высоким уровнем спонтанных аборт | – | 10 | 5 | 10 |
| 5. Самки с физиологической беременностью и введением С7МДП (моделирование индуцированных аборт) | – | 10 | 5 | 10 |
| 6. Самки с исходно высоким уровнем спонтанных аборт и введением С7МДП (моделирование потенцированных аборт) | – | 10 | 5 | 10 |

Методы исследования

Макроскопическое и массометрическое исследование

На 14-й ДГ у самок выделяли рога матки и определяли количество жизнеспособных и резорбированных плодов. Определяли уровень частоты резорбции эмбрионов 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 из рогов матки извлекали плаценты жизнеспособных плодов и определяли их массу, взвешивая на аналитических весах (Sartorius, Германия).

Гистологическое и морфометрическое исследование

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование проводили 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 определяли объемные доли структурно-функциональных зон – коркового (КВ) и мозгового (МВ) вещества – и вычисляли индекс отношения объемной плотности КВ к МВ в условных единицах. Ширину субкапсулярной зоны тимуса измеряли с помощью программы Image Pro. Акцидентальную инволюцию тимуса оценивали по Зайратьянцу О.В., Берщанской А.М (1998). В селезенке определяли индекс соотношения белой (БП) и красной пульпы (КП) в условных единицах, объемные доли лимфоидных узелков (ЛУ) и

периартериолярных лимфоидных муфт (ПАЛМ) в процентах от площади БП. Ширину слоев плаценты измеряли с помощью программы Image Pro. Для определения объёмной плотности структур лабиринта плаценты на тотальных поперечных срезах при увеличении 200 учитывали точки по трем компонентам: материнские лакуны, трофобласт, плодные сосуды. В каждом препарате исследовали по 10 выбранных случайным образом полей зрения.

Культуральный метод для определения продукции цитокинов *ex vivo*

Клетки, выделенные из селезенки мышей контрольных и опытных групп на 8-й ДГ и 14-й ДГ с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера, отмывали в среде 199 путем двукратного центрифугирования. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации 5×10^6 /мл культивировали в течение 24 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением 5 мкг/мл конканавалина А (Sigma-Aldrich, США) в 24-луночных культуральных планшетах (Nunc, Дания) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Среда для культивирования лимфоцитов селезенки состояла из RPMI 1640 (ПанЭко) с 5% инактивированной фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. По окончании инкубации отбирали культуральную жидкость, которую хранили до проведения анализа при t -32°С.

Радиоизотопный метод определения пролиферативной активности *ex vivo*

Реактивность Т-лимфоцитов селезенки самок против отцовских антигенов оценивали в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) по методу Jin L.P et al. (2004). В качестве стимуляторов использовали обработанные митомицином С лимфоциты селезенки самцов Balb/c или DBA/2. Клетки-стимуляторы вносили в 96-луночные круглодонные планшеты (Nunc, Дания) в количестве 2×10^5 на лунку. 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 потенцированных абортах, которые добавляли к стимуляторам в соотношении 1:1. Контролем служили клетки-респондеры без добавления стимуляторов. После инкубации культур в течение 4-х суток (37° С, 5% CO₂) 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 использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика 1209 RACKBETA (ЛКВ, Швеция). Для оценки пролиферативного ответа рассчитывали индекс стимуляции (ИС) по формуле: $ИС = (\text{имп/мин стимулированных культур} - \text{имп/мин контрольных культур}) / \text{имп/мин контрольных культур}$. Каждый вариант постановки реакции анализировали в трех пробах. Для функциональной характеристики клеток селезенки небеременных самок и самок на 9-й ДГ 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.

Метод проточной цитофлуориметрии

Концентрацию цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) -1 α , 2, 4, 5, 6, 10, 17, интерферона- γ (ИФН- γ), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – определяли в культуральной жидкости активированных конканавалином А лимфоцитов селезенки, выделенных на 8-й ДГ 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).

Статистическая обработка результатов

Данные анализировали с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc.). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. При нормально распределенных показателях использовали t-критерий Стьюдента 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, медианы и квартилей. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние иммуномодулятора С7МДП на уровень резорбции эмбрионов

Для определения частоты резорбции (ЧР) плодов проводили макроскопическое исследование маток на 14-й день беременности. Развивающиеся плоды были крупными, имели розовую окраску, внутри амниотического мешка четко различали дисковидные плаценты. Резорбирующиеся фетоплацентарные единицы были небольшого размера, темными, плотными, плод и плацента не визуализировались.

У самок с физиологической беременностью уровень ЧР эмбрионов на 14-й ДГ составлял в среднем 14,8%, у самок со спонтанными абортми он был в два раза выше (табл. 2). Полученные результаты были сопоставимы с данными других авторов (7–13% и 11–41% при моделировании физиологической беременности и спонтанных абортми, соответственно) [Chaouat G., et al., 1990; Girardi G. et al., 2006; Imaizumi M. et al., 2001; Jin L.P. et al., 2004]. Двукратное внутрибрюшинное введение иммуномодулятора С7МДП самкам ♀СВА×♂Valb/c увеличивало ЧР эмбрионов в три раза (группа индуцированных абортми). После воздействия иммуномодулятора уровень ЧР эмбрионов у мышей ♀СВА×♂DВА/2 с исходно высоким уровнем спонтанных абортми увеличивался в среднем до 50,0% (табл. 2) (группа потенцированных абортми), не отличаясь значимо от ЧР при спонтанных абортми, но существенно превышая показатель ЧР при физиологической беременности.

Таблица 2. Частота резорбции эмбрионов при физиологической беременности, спонтанных абортми и после воздействия С7МДП в ранние сроки беременности

| Группы | Общее число эмбрионов | Число резорбированных эмбрионов | Частота резорбции % | Достоверность различий |
|--|-----------------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 1. Физиологическая беременность (n=10) | 54 | 8 | 14,8 | $p_{1-2}=0,043$ |
| 2. Спонтанные абортми (n=10) | 68 | 22 | 32,3 | $p_{1-3}=0,017$ $p_{1-4}=0,01$ |
| 3. Индуцированные абортми (n=10) | 66 | 30 | 45,4 | $p_{2-4}=0,07$ |
| 4. Потенцированные абортми (n=10) | 56 | 28 | 50,0 | $p_{3-4}=0,745$ |

Увеличение ЧР эмбрионов после воздействия иммуномодулятора в ранние сроки беременности, очевидно, обусловлено способностью С7МДП стимулировать клеточный иммунный ответ, направлять дифференцировку Т-хелперов в направлении Th1 и усилить продукцию провоспалительных цитокинов Th1 клетками и макрофагами [Калюжин О.В. с

соавт., 2002, 2003; Лобанов Д.С., 2009]. Известно, что одним из основных механизмов индукции абортов провоспалительными Th1 цитокинами и ФНО- α является стимуляция продукции фибриноген-подобного белка fgl2 – протромбиназы, непосредственно расщепляющей протромбин до тромбина, эндотелием сосудов. Th1-зависимая активация fgl2 приводит к усиленному тромбообразованию и ишемии плаценты, вызывающих гибель плода [Clark D. A. et al., 1998, 2001]. Повышение экспрессии fgl2 в сочетании с массивными отложениями фибрина, выявляемое у мышей с высоким уровнем спонтанных эмбриональных потерь, было обнаружено также в плацентах женщин с ранними абортами и преэклампсией [Knackstedt M. et al., 2001].

Таким образом, вариант аллогенного скрещивания мышей ♀СВА×♂ Balb/c с высокой частотой резорбции эмбрионов, индуцированной введением иммуномодулятора С7МДП в ранние сроки гестации, является новой воспроизводимой моделью иммунозависимого невынашивания беременности.

Морфофункциональные изменения тимуса при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах

Морфометрическое исследование структуры тимуса показало, что при физиологической беременности и беременности с высоким уровнем спонтанных абортов на 8-й ДГ ширина субкапсулярной зоны (СЗ), в которой происходит активная пролиферация незрелых тимоцитов, увеличивается при сравнении с небеременными самками. При индуцированных и потенцированных абортах расширения СЗ не происходило. На 14-й ДГ во всех экспериментальных группах ширина СЗ уменьшалась в сравнении с предыдущим сроком беременности. На 8-й ДГ ширина СЗ при физиологической беременности была значимо больше, чем при беременности с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов. На 14-й ДГ ширина СЗ при физиологической беременности превышала показатели в группах индуцированных и потенцированных абортов (табл. 3).

Таблица 3. Морфометрические показатели тимуса мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах

| Группа | Показатели | Срок беременности | Индекс отношения коркового вещества к мозговому, усл. ед. (M±SE) | Ширина субкапсулярной зоны, мкм (M±SE) |
|--|-------------------|--------------------------|---|---|
| 1. Небеременные самки | | 0 | 1,05±0,06 | 24,68±1,29 |
| 2. Небеременные самки после введения С7МДП | | 0 | 1,37±0,1* | 19,36±1,78* |
| 3. Физиологическая беременность | | 8 ДГ | 1,08±0,11 | 28,18±0,60* |
| | | 14 ДГ | 0,51±0,06*^ | 22,66±0,56^ |
| 4. Спонтанные аборты | | 8 ДГ | 1,18±0,16 | 26,12±0,72# |
| | | 14 ДГ | 0,74±0,06*#^ | 21,81±0,68*^ |
| 5. Индуцированные аборты | | 8 ДГ | 1,15±0,02 | 23,85±1,31# |
| | | 14 ДГ | 0,77±0,07#^ | 19,14±0,63#^ |
| 6. Потенцированные аборты | | 8 ДГ | 1,31±0,17 | 22,93±1,47# |
| | | 14 ДГ | 0,89±0,06^# | 17,24±0,74#^◆ |

Статистически значимые отличия: * – от небеременных самок, # – от физиологической беременности, ^ – между 8 ДГ и 14 ДГ, ◆ – от спонтанных абортов

На 8-й ДГ в тимусе беременных самок всех экспериментальных групп наблюдали равное соотношение коркового (КВ) и мозгового (МВ) вещества, за исключением группы потенцированных абортос с выраженным преобладанием КВ. На 14-й ДГ доля КВ значительно уменьшалась по сравнению с предыдущим сроком беременности.

При физиологической беременности снижение доли КВ, в котором происходят дифференцировка и селекция тимоцитов, а также элиминация аутореактивных клонов, было более выраженным, чем у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортос (табл. 3). Полученные результаты, в целом, согласуются с данными о прогрессирующем уменьшении КВ тимуса в течение сингенной и аллогенной беременности у мышей за счет гибели и миграции кортикальных тимоцитов [Kendall M.D., Clarke A.G., 2000; Hegde U.C. et al., 2001; Zoller A.L. et al., 2007]. Структура тимуса самок с С7МДП-индуцированными абортосами на 14-й ДГ была сходна с изменениями тимуса при сингенной беременности у мышей С57В1/6 после воздействия Т-клеточного митогена конканавалина А в ранние сроки гестации [Обернихин С.С., 2014].

При физиологической беременности в тимусе развивалась акцидентальная инволюция, слабо выраженная на 8-й и умеренная – на 14-й ДГ. Спонтанные и индуцированные абортос характеризовались умеренной акцидентальной инволюцией на 8-й ДГ, а на 14-й ДГ – выраженной. При потенцированных абортос выраженные инволютивные изменения тимуса проявлялись уже на 8-й ДГ и сохранялись на 14-й ДГ.

Характерной особенностью реакции тимуса на иммуностимулирующее воздействие С7МДП было появление макрофагов в КВ и множественных тимических телец (ТТ) в виде крупных кистоподобных полостей на границе КВ и МВ, реже – в КВ. Появление многочисленных крупных кистоподобных ТТ наблюдали также после воздействия на небеременных мышей иммуномодулирующих препаратов бактериального происхождения [Русскова А.Н. с соавт., 2010]. Очевидно, выявленные морфофункциональные изменения тимуса при индуцированных и потенцированных абортос отражают не только адаптацию иммунной системы к состоянию беременности, но и активацию Т-клеточного звена иммунного ответа [Калюжин О.В. с соавт., 2002, 2003; Земляков А.Е. с соавт., 2003].

На всех сроках физиологической беременности в МВ тимуса присутствовали многочисленные тимические тельца (ТТ) 1–2 фаз развития. Вероятно, увеличение числа ТТ в МВ во время беременности связано с экспансией Т-регуляторных клеток, более выраженной при аллогенной беременности [Zhao J.X. et al., 2007]. В настоящее время установлено, что ТТ не только участвуют в утилизации аутореактивных тимоцитов [Douek D.C., Altmann D.M., 2000; Беловешкин А.Г., 2012], но играют важную роль в формировании иммунотолерантности. Эпителиальные ретикулярные клетки ТТ продуцируют тимический стромальный лимфопоэтин или ИЛ-7-подобный цитокин, активирующий тимические дендритные клетки, которые, в свою очередь, индуцируют пролиферацию $CD4^+CD8^-CD25^-$ Т-клеток и их дифференцировку в $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-регуляторные клетки – уникальную специализированную популяцию Т-лимфоцитов, играющую ключевую роль в предупреждении иммунного отторжения плода [Watanabe N. et al., 2005; Guerin L.R. et al., 2009; Clark D.A., Chaouat G., 2012; Hanabuchi S. et al., 2012].

Наблюдаемое при экспериментальном невынашивании беременности появление в тимусе множественных ТТ в виде крупных кистоподобных полостей в КВ и на границе КВ и МВ позволяет предположить уменьшение продукции тимического стромального

лимфопоэтина в ТТ и нарушение генерации Т-регуляторных клеток у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортот.

Морфофункциональные изменения селезенки при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортот

При физиологической беременности в селезенке на 8-й ДГ значимо возрастало соотношение белой и красной пульпы по сравнению с небеременными самками, Т- и В-зоны были выражены в равной степени. На 14-й ДГ доля белой пульпы увеличивалась при сохранении равного соотношения долей ЛУ и ПАЛМ.

Беременность с высоким уровнем спонтанных абортот, в отличие от физиологической беременности, характеризовалась меньшей долей белой пульпы на 8-й ДГ, на 14-й ДГ морфометрические показатели селезенки у самок этих групп не различались. Иммуномодулятор С7МДП, индуцирующий абортот у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/c, и повышающий уровень спонтанных абортот у самок СВА, оплодотворенных самцами ДВА/2, вызывал гиперплазию БП за счет увеличения Т-зависимой ПАЛМ-зоны. При индуцированных абортот, когда ЧР эмбрионов трехкратно возрастала по сравнению с физиологической беременностью, структурные изменения проявлялись уже на 8-й ДГ и были более выражены, чем при потенцированных абортот, при которых ЧР увеличивалась в среднем на 20% относительно уровня ЧР при спонтанных абортот (табл.4).

Таблица 4. Морфометрические показатели селезенки при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортот

| Морфометрические показатели Экспериментальные группы | Срок беременности | Объемная плотность, белой пульпы в % | | Индекс отношения объемной плотности белой пульпы к красной, усл. ед. |
|---|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| | | Лимфоидные узелки | Периартериолярные лимфоидные муфты | |
| 1. Небеременные самки | 0 | 75,46± 10,9 | 24,54± 10,9 | 0,93±0,13 |
| 2. Небеременные самки после введения С7МДП | 0 | 39,62± 7,67* | 60,38± 7,67* | 1,38±0,42* |
| 3. Физиологическая беременность | 8 ДГ | 53,54± 5,62* | 46,46± 5,62* | 1,19± 0,13* |
| | 14 ДГ | 50,26± 8,28* | 49,74± 8,28* | 1,5± 0,12*^ |
| 4. Спонтанные абортот | 8 ДГ | 60,46± 6,17* | 39,55± 6,17* | 1,03±0,26# |
| | 14 ДГ | 46,34± 7,47*^ | 53,66±7,47*^ | 1,46±0,28*^ |
| 5. Индуцированные абортот | 8 ДГ | 17,90± 3,02*# | 82,1± 3,02*# | 1,8± 0,36*# |
| | 14 ДГ | 30,4± 5,47*#^ | 69,60±5,47*#^ | 1,81± 0,14*# |
| 6.Потенцированные абортот | 8 ДГ | 38,21±4,95*#~♦ | 61,79±4,95*#~♦ | 1,44±0,33*#♦ |
| | 14 ДГ | 40,16± 5,66~ | 59,84± 5,66~ | 1,8±0,15#^♦ |

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

Очевидно, увеличение объемных долей белой пульпы селезенки и ее Т-зависимой зоны при индуцированных и потенцированных абортах отражает усиление клеточных иммунных реакций, негативно влияющих на развитие беременности [Kwak-Kim J., 2010], обусловленное свойством гликозидов МДП, в частности, С7МДП, направлять дифференцировку Т-хелперов в сторону Th1-клеток [Калюжин О.В. с соавт., 1994; Калюжин О.В., 2002].

Определение уровня пролиферации лимфоцитов селезенки самок СВА показало, что на 9-й ДГ пролиферативная активность резко возрастает при сравнении с небеременными самками, как при физиологической беременности, так и при спонтанных абортах (рис. 1).

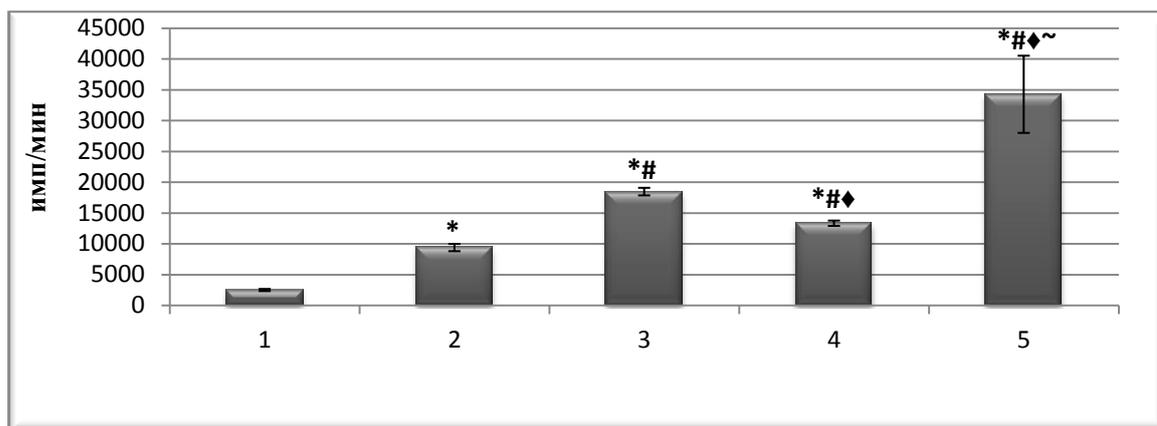


Рисунок 1. Уровень пролиферации лимфоцитов селезенки мышей СВА при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах. Ось абсцисс – экспериментальные группы: 1 – небеременные самки, 2 – физиологическая беременность, 3 – спонтанные аборт, 4 – индуцированные аборт, 5 – потенцированные аборт. Ось ординат – уровень включения [3H]тимидина, импульсы в минуту.

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

Полученные результаты согласуются с данными об увеличении доли пролиферирующих лимфоцитов селезенки при сингенной беременности у мышей C57BL/6 при сравнении с небеременными самками [Обернихин С.С., 2014; Norton M.T. et al., 2009].

Повышение пролиферативной активности клеток селезенки при наступлении беременности может быть обусловлено действием репродуктивных гормонов, которые усиливают спонтанную пролиферацию Т-лимфоцитов [Куклина Е.М., 2003].

У самок с физиологической беременностью уровень пролиферации лимфоцитов был выше, чем у небеременных самок, в 2 раза, а у самок со спонтанными абортами – в 7 раз. Это свидетельствует о том, что при высокой частоте спонтанных аборт лимфоциты самок активированы в значительно большей степени, чем при физиологической беременности. При индуцированных и потенцированных абортах у самок СВА уровень пролиферации лимфоцитов селезенки был почти в полтора и два раза выше, чем у самок с физиологически протекающей беременностью и спонтанными абортами, соответственно. Очевидно, это обусловлено способностью С7МДП усиливать спонтанную пролиферацию лимфоцитов и его выраженной комитогенной активностью [Лобанов Д.С., 2009]. Максимальный уровень пролиферации, отражающей степень активации лимфоцитов, наблюдали в группе потенцированных аборт с максимальным показателем частоты резорбции эмбрионов. Таким образом, увеличение частоты эмбриональных потерь при спонтанных,

индуцированных и потенцированных абортах происходит на фоне высокой пролиферативной активности лимфоцитов, значительно превышающей этот показатель при физиологической беременности.

При оценке пролиферативного ответа лимфоцитов самок на отличающиеся по локусу гистосовместимости лимфоциты самцов в смешанной культуре было установлено, что индекс стимуляции (ИС) лимфоцитов самок со спонтанными абортами был в 2,7 раза меньше, чем ИС при физиологической беременности (рис. 2).

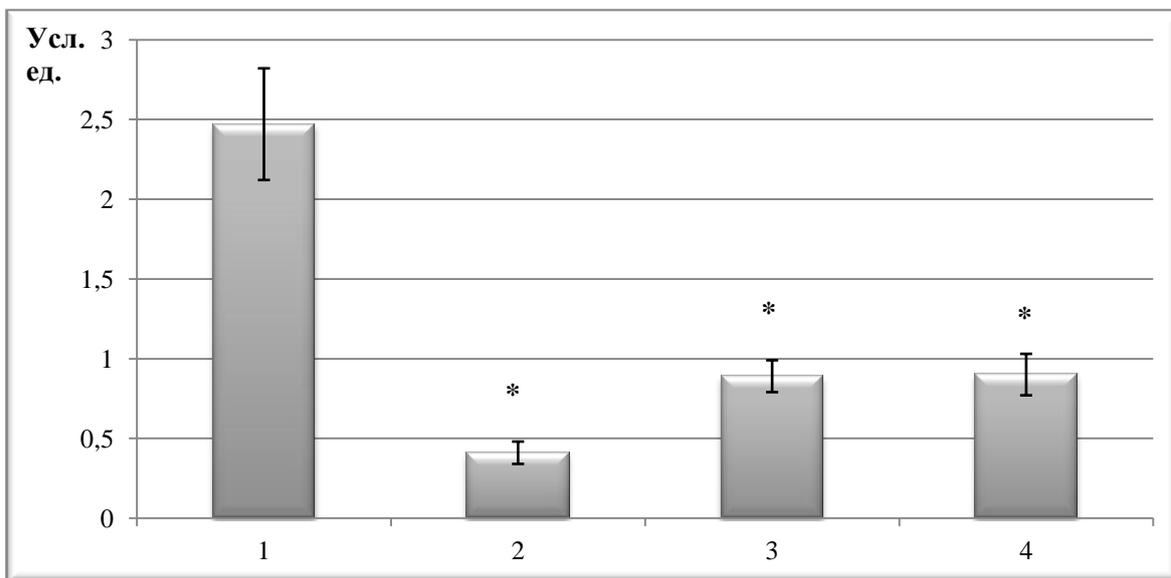


Рисунок 2. Пролиферативный ответ лимфоцитов селезенки беременных самок СВА на лимфоциты самцов в смешанной культуре. Ось абсцисс – экспериментальные группы: 1 – физиологическая беременность, 2 – индуцированные аборты, 3 – спонтанные аборты, 4 – потенцированные аборты. Ось ординат – индекс стимуляции в условных единицах. Статистически значимые отличия: * – от физиологической беременности

Это согласуется с данными об отсутствии пролиферативного ответа Т-лимфоцитов лимфатических узлов беременных самок СВА на антигены самцов DBA/2 и выраженном ответе на антигены самцов Valb/c [Куклина Е.А. с соавт., 2013]. При потенцированных абортах ИС не отличался от показателя ИС при спонтанных абортах, а при индуцированных абортах был в 6 раз меньше, чем при физиологической беременности. Полученные данные свидетельствуют об уменьшении реактивности лимфоцитов самок на отцовские антигены при беременности с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных аборт.

Продукция цитокинов лимфоцитами селезенки *ex vivo* при физиологической беременности, спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах

Восьмой день гестации при всех вариантах беременности при сравнении с небеременными самками характеризовался усилением продукции цитокинов, отражающих активность Th1-, Th2-, Th17-, Т-регуляторных лимфоцитов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, за исключением ИЛ-1 α , ИЛ-5, ИЛ-10 при физиологической беременности и ИЛ-10 при спонтанных абортах (рис. 3, 4).

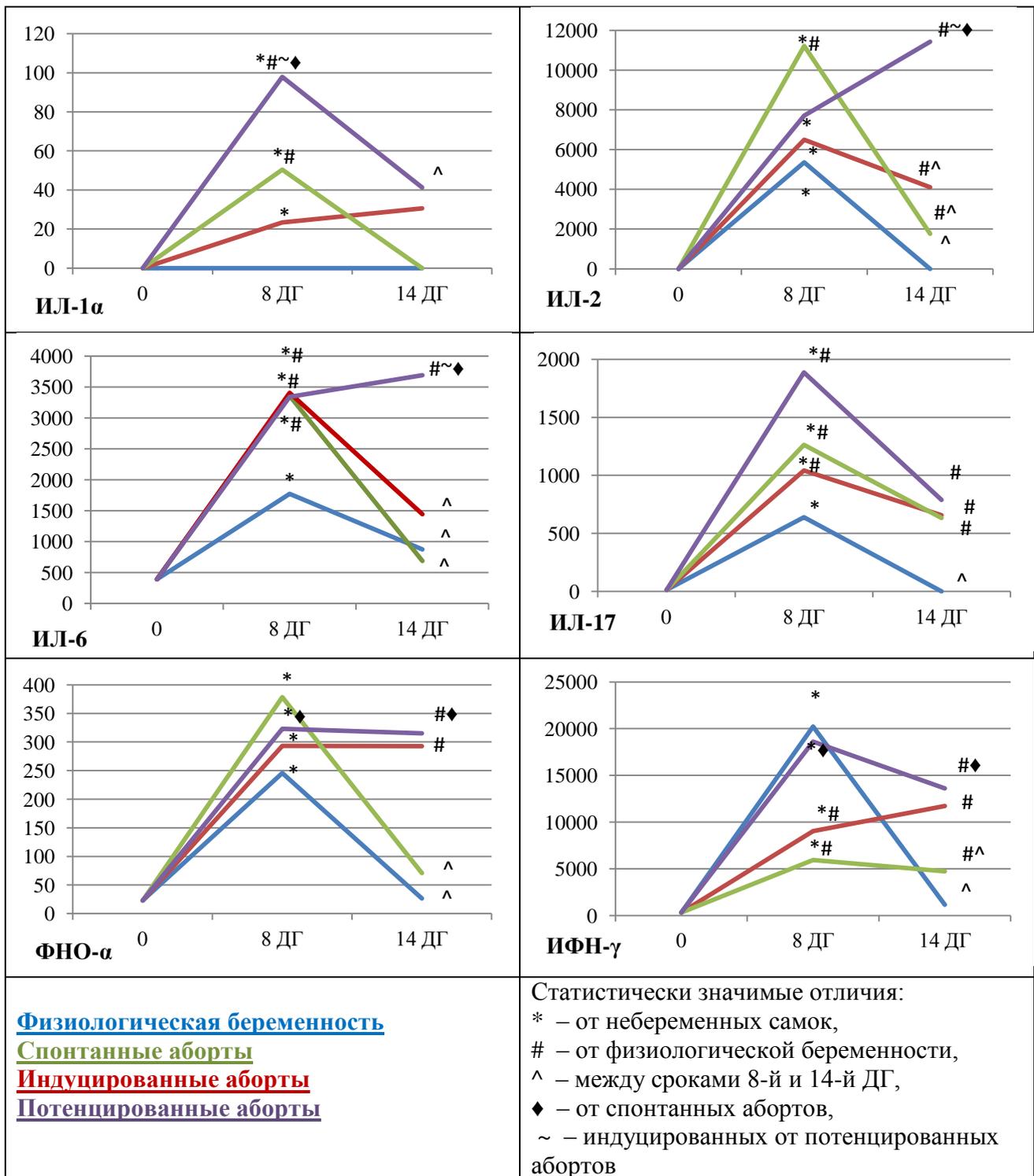


Рисунок 3. Продукция провоспалительных цитокинов лимфоцитами селезенки *ex vivo*. Ось абсцисс – сроки беременности, ось ординат – концентрация цитокинов в среде культивирования лимфоцитов (пг/мл, Ме)

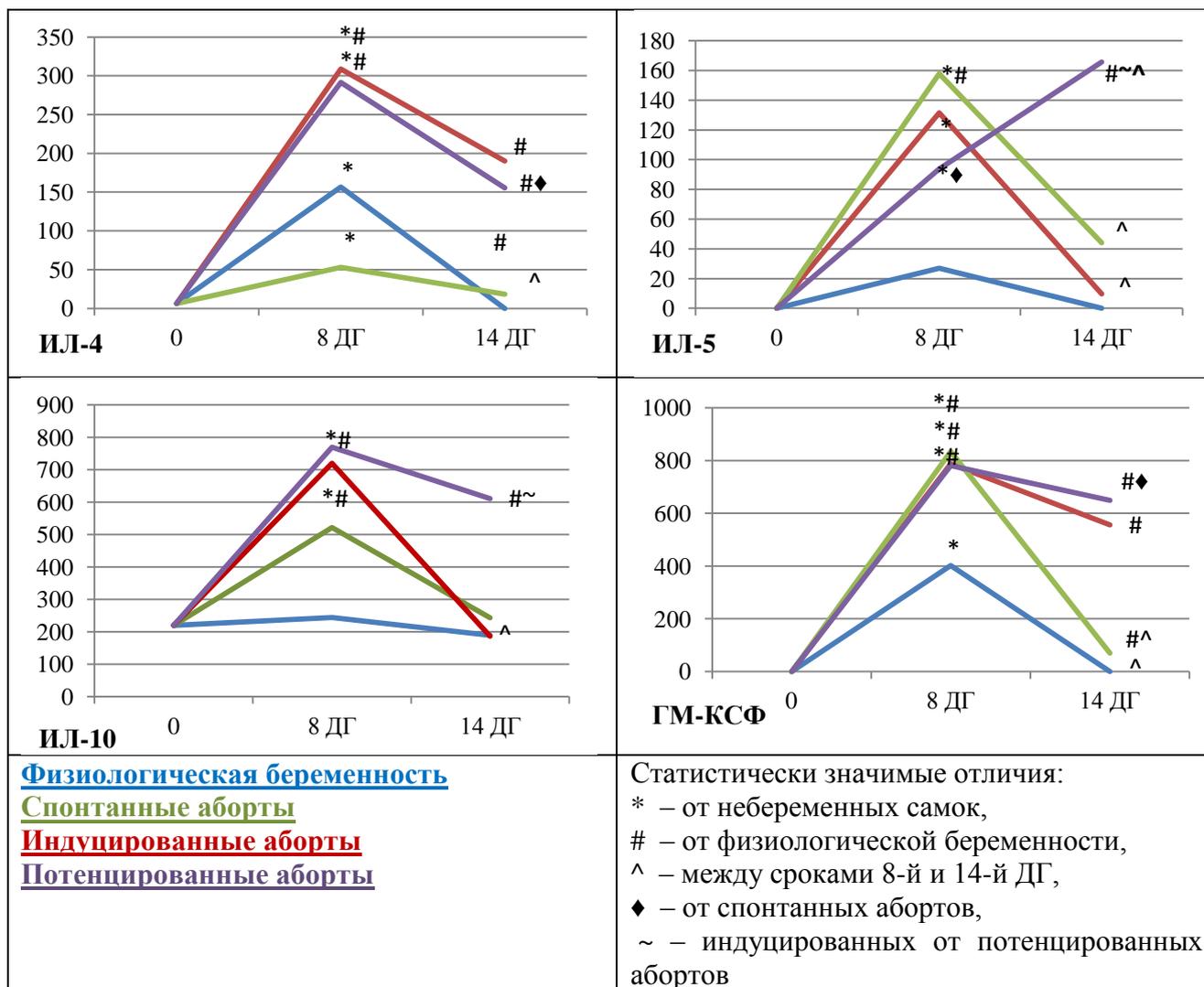


Рисунок 4. Продукция противовоспалительных цитокинов и факторов роста лимфоцитами селезенки *ex vivo*. Ось абсцисс – сроки беременности, ось ординат – концентрация цитокинов в среде культивирования лимфоцитов (пг/мл, Ме)

Концентрации провоспалительных цитокинов при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах были выше, чем при физиологической беременности: ИЛ-6 в два раза, ИЛ-17 в 1,6 – 3,0 раза, ИЛ-2 при спонтанных абортах – вдвое. При спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах наблюдали продукцию ИЛ-1 α , не выявляемую при физиологической беременности в пределах чувствительности метода.

При этом уровень продукции ИФН- γ , традиционно рассматриваемого как цитокин, вызывающий аборт [Clark D.A. et al., 2003; Knackstedt M.K. et al., 2003; Zenclussen A.C. et al., 2005], на раннем сроке физиологической беременности был выше, чем при индуцированных и спонтанных абортах более чем в два и три раза, соответственно. При индуцированных и потенцированных абортах концентрации противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ростового фактора ГМ-КСФ были больше, чем при физиологической беременности.

На 14-й ДГ у самок с физиологической беременностью, в отличие от самок со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами, провоспалительные цитокины либо не определялись (ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-17), либо их уровень был намного ниже

(ИФН- γ , ФНО- α), чем у самок с высоким уровнем эмбриональных потерь. Более высокие, чем при физиологической беременности, уровни продукции противоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ГМ-КСФ были выявлены при спонтанных и индуцированных абортах, а ИЛ-10 – при потенцированных абортах (рис. 3, 4).

Таким образом, установлено, что на ранних сроках гестации у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотворения при сравнении с физиологически протекающей беременностью усиливается выработка клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и снижается продукция ИФН- γ , который у мышей участвует в децидуализации, ремоделировании спиральных артерий эндометрия и ангиогенезе в сайтах имплантации [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- γ , ФНО- α), наиболее выраженная при индуцированных и потенцированных абортах. Усиление продукции противоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 и ГМ-КСФ у самок с высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных резорбций эмбрионов при сравнении с физиологической беременностью, очевидно, имеет компенсаторный характер, однако не отменяет абортотворный эффект провоспалительных Th- и Th17-цитокинов.

Морфофункциональные изменения плаценты при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах

По сравнению с физиологической беременностью выявлено увеличение массы плаценты у самок со спонтанными абортами ($0,11 \pm 0,006$ г и $0,09 \pm 0,003$ г, соответственно, $p=0,022$) и уменьшение массы плаценты – у самок с потенцированными абортами ($0,08 \pm 0,003$ г, $p=0,037$). Снижение массы плаценты (гипоплазия) рассматривается как один из критериев ее дисфункции [Барина И.В., 2015]. Масса плаценты у самок с индуцированными абортами не отличалась от аналогичного показателя при физиологической беременности.

В плаценте самок с физиологической беременностью на 14-й ДГ четко различались структуры, характерные для зрелого органа – слой гигантских клеток трофобласта (ГКТ) на границе с материнской decidua basalis, спонгиозотрофобласт (контактная зона) и лабиринт. Лабиринт являлся наибольшей зоной плаценты, ширина спонгиозотрофобласта была почти вдвое меньше, непрерывный слой ГКТ, состоящий из 2–4 рядов, представлял самую узкую зону (рис. 5). В структуре лабиринта наибольшую относительную долю составлял трофобласт, объемная плотность плодных сосудов была вдвое больше объемной плотности материнских лакун (рис.6).

В плаценте самок со спонтанными абортами ширина слоя ГКТ уменьшалась до 1–3 рядов, увеличивалась зона лабиринта (рис. 5), в нем отмечалось расширение и полнокровие плодных сосудов.

У самок с индуцированными абортами вдвое уменьшались ширина слоя ГКТ и объемная плотность плодных сосудов, резко возрастала объемная доля трофобласта при сравнении с физиологической беременностью (рис. 5, 6). В лабиринте наблюдали опустошение суженных плодных сосудов, расширение и полнокровие материнских лакун.

При потенцированных абортах в плаценте также отмечали истончение и дезорганизацию слоя ГКТ, в зоне спонгиозотрофобласта – появление многочисленных крупных полостей, расширение и полнокровие материнских артериальных синусов. В

лабиринте уменьшалась объемная плотность плодных сосудов за счет увеличения трофобласта (рис. 6), в материнских лакунах и плодных сосудах проявлялось выраженное полнокровие. Подобные изменения плаценты развивались у самок C57BL/6J после введения высокой дозы липополисахарида, вызывающей резорбцию эмбрионов [Carpentier P. A. et al., 2011].

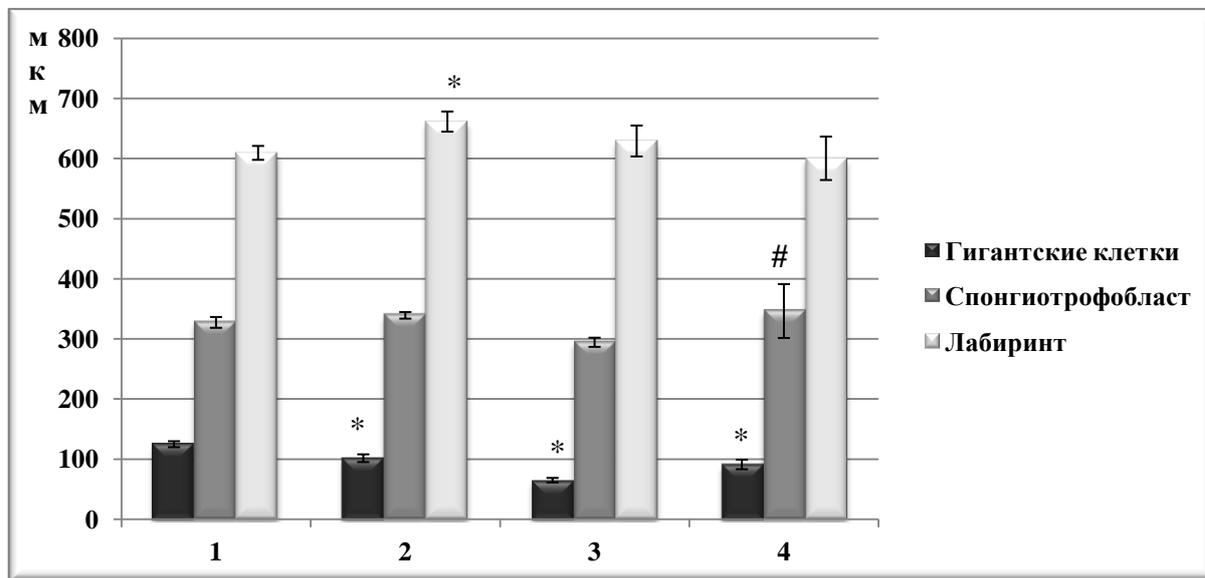


Рисунок 5. Ширина слоев плаценты у самок с физиологической беременностью, высоким уровнем спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов. Ось абсцисс – экспериментальные группы: 1 – физиологическая беременность; 2 – спонтанные аборты; 3 – индуцированные аборты; 4 – потенцированные аборты. Ось ординат – ширина слоев (микрометры, $M \pm SE$). Статистически значимые отличия: * – от физиологической беременности, # – от индуцированных абортов.

Уменьшение слоя ГКТ в плаценте самок со спонтанными абортами при сравнении с физиологической беременностью подтверждает данные Girardi G. et al. (2006), полученные на той же модели. ГКТ секретируют широкий спектр гормонов и паракринных факторов, жизненно важных для имплантации, развития эмбриона и материнской адаптации к беременности, обладают инвазивным потенциалом и рассматриваются как аналог вневорсинчатого трофобласта плаценты человека [Hu D., Cross J.C., 2010, Krishnan L. et al., 2013]. Уменьшение их количества или нарушения дифференцировки приводят к дефектам ангиогенеза и васкуляризации плаценты, нарушению развития плода [Cross J.C., 2005]. Следовательно, сужение слоя ГКТ у самок с высоким уровнем эмбриональных потерь, наиболее выраженное при индуцированных и потенцированных абортах, является морфологическим проявлением плацентарной недостаточности у мышей.

Наблюдаемые структурные изменения плаценты жизнеспособных плодов у самок с индуцированными и потенцированными абортами (маточно-плацентарные дисциркуляторные изменения, сужение слоя и альтерация ГКТ, уменьшение объема и запустевание плодных сосудов лабиринта) соответствовали морфологическим изменениям плаценты у крыс при моделировании плацентарной недостаточности, вызванной длительным воздействием свинца [Куликова Г.В., 2008], окклюзией предплацентарного сосудистого бассейна [Кузнецов Р.А., 2008], введением четыреххлористого углерода [Беленичев И.Ф., 2008], водно-солевой нагрузкой [Шубина О.С. с соавт., 2011]. Как морфологический признак

нарушения фетально-материнского обмена можно рассматривать также увеличение трофобласта лабиринтной зоны, свидетельствующее об утолщении плацентарного барьера.

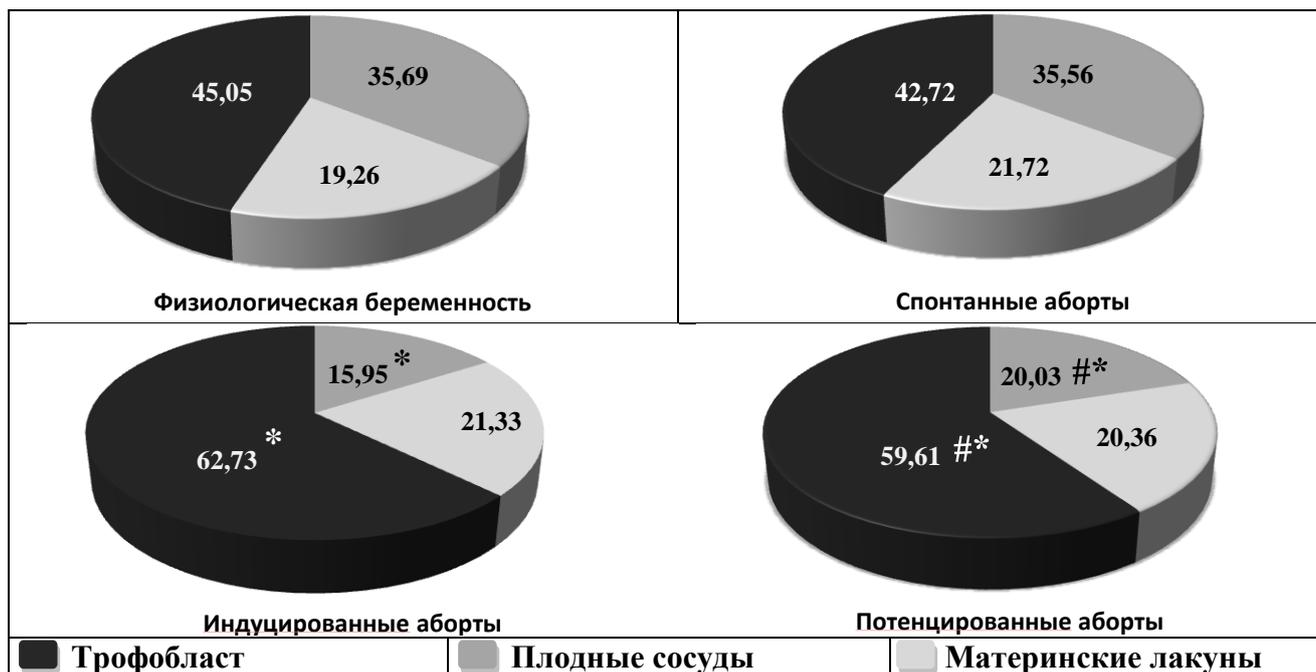


Рисунок 6. Объемная плотность структурно-функциональных компонентов лабиринта плаценты. Статистически значимые отличия: * – от физиологической беременности, # – от спонтанных абортов.

В сохранившихся плацентах резорбированных плодов, независимо от варианта беременности, наблюдали нарушение послойного расположения ГКТ, спонгиозного трофобласта и лабиринта, лейкоцитарную инфильтрацию, запустевание плодных сосудов, выраженное полнокровие в сохранившихся материнских лакунах, массивные отложения фибрина на границе материнской ткани и трофобласта. ГКТ смещались к центру плаценты, в них проявлялись дистрофические изменения – вакуолизация и эозинофилия цитоплазмы, пикноз и фрагментация ядер. Стаз и сладжирование эритроцитов, отложение фибрина в плацентах свидетельствовали об усиленном тромбообразовании.

Таким образом, воздействие иммуномодулятора С7МДП в ранние сроки беременности приводило к структурно-функциональным изменениям в плаценте жизнеспособных плодов на 14-й ДГ – истончению и дезорганизации слоя ГКТ, снижению объемной доли плодных сосудов, утолщению трофобласта, нарушению гемодинамики в материнских лакунах, что является морфологическим проявлением плацентарной дисфункции. Очевидно, выраженные нарушения маточно-плацентарного и фетоплацентарного кровообращения приводят к ухудшению трансплацентарного обмена, 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 дни физиологической беременности ширина субкапсулярной зоны, в которой происходит активная пролиферация незрелых тимоцитов, была значимо 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 умеренная – на 14-й ДГ, спонтанные и индуцированные абортот характеризовались умеренной акцидентальной инволюцией на 8-й ДГ, и выраженной на 14-й ДГ, при потенцированных абортот выраженные инволютивные изменения тимуса проявлялись уже на 8-й ДГ и сохранялись на 14-й ДГ. Особенностью реакции тимуса на иммуностимулирующее воздействие С7МДП, индуцирующего и потенцирующего абортот у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/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 абортот развивалась гиперплазия белой пульпы за счет увеличения Т-зависимой зоны периартериолярных лимфоидных муфт. При индуцированных абортот с трехкратным по сравнению с физиологической беременностью увеличением частоты резорбции структурные изменения проявлялись уже на 8-й ДГ и были более выражены, чем в случаях потенцированных абортот, при которых частота резорбции увеличивалась в среднем на 20% относительно показателя спонтанных абортот.

По сравнению с физиологической беременностью пролиферативная активность селезенки самок при спонтанных абортот увеличивалась в 2 раза, при индуцированных и потенцированных абортот – в 1,5 и 3,7 раза, соответственно. Пролиферативный ответ лимфоцитов самок на лимфоциты самцов, отличающихся по антигенам гистосовместимости, при спонтанных и потенцированных абортот был в 2,7 раза, а при индуцированных абортот – 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 при сравнении с физиологической беременностью усиливалась выработка клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и снижалась продукция ИФН- γ , 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- γ , ФНО- α), наиболее выраженная при индуцированных и потенцированных абортот. Более высокий в сравнении 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 абортотгенный эффект провоспалительных Th1- и Th17-цитокинов.

Введение иммуномодулятора С7МДП в ранние сроки беременности, индуцирующего и потенцирующего абортот у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/c и DBA/2, соответственно, приводило к структурно-функциональным изменениям плаценты жизнеспособных плодов на 14-й ДГ – выраженному сужению слоя и альтерации 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 аборт, вызванных воздействием иммуномодулятора β -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, индуцирующего и потенцирующего аборт, является формирование множественных тимических телец в виде крупных кистоподобных полостей.

3. Селезенка самок с физиологически протекающей беременностью по сравнению с небеременными 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 аборт по сравнению с физиологической беременностью усиливается продукция клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-17 и снижается продукция ИФН- γ . 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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:

1. **Артемьева К.А.** Моделирование индуцированного невынашивания беременности на мышах с использованием гликозида мурамилдипептида / Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2012. – №2. – С. 34–39
2. **Артемьева К.А.** Структурные изменения селезенки при аллогенной беременности у мышей с нормальной фертильностью, высоким уровнем спонтанных и мурамилдипептид-индуцированных аборт / Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Богданова И.М., Обернихин С.С., Земляков А.Е., Калюжин О.В. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2013. – С. 5–10
3. **Артемьева К.А.** Структурные изменения тимуса при аллогенной беременности у мышей с высокой частотой спонтанных и мурамилпептид-индуцированных аборт / Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158. – № 8. – С. 250–255.
4. Калюжин О.В. Внутривбрюшинное введение β -гептилгликозида мурамилдипептида беременным и небеременным самкам мышей модулирует выработку Th1/Th2/Th17/Tr1-цитокинов спленоцитами *ex vivo* / Калюжин О.В., **Артемьева К.А.**, Болтовская М.Н., Бунятян К.А., Инвиева Е.В., Винницкий Л.И., Караулов А.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159. – № 1. – С. 62–67

Другие публикации:

5. **Артемьева К.А.** Морфофункциональные характеристики органов иммунной системы и плаценты при аллогенной беременности у мышей с высокой фертильностью и мурамилдипептид-индуцированными абортами/ Артемьева К.А., Калюжин О.В., Степанова И.И., Назимова С.В., Болтовская М.Н. // Клиническая и экспериментальная морфология.– 2013.– №4.– С. 34–40
6. **Артемьева К.А.** Морфофункциональные сопоставления плацент человека и мыши как предпосылки к моделированию невынашивания беременности / Артемьева К.А. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Сб. науч. тр. науч. конфер.– М., 2010.– С. 13–17
7. **Артемьева К.А.** Влияние β -гептилгликозида мурамилдипептида на частоту резорбции эмбрионов у мышей с нормальной фертильностью и высоким уровнем спонтанных аборт / Артемьева К.А., Калюжин О.В., Болтовская М.Н. //Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Сб. научных трудов. – М., 2012 г. – С.13–17
8. **Артемьева К.А.** Продукция цитокинов спленоцитами беременных мышей с нормальной фертильностью, высоким уровнем спонтанных и мурамилдипептид-индуцированных аборт / Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Сб. научных трудов Международной научной конференции. – М. – 2014. – С.18–21
9. **Артемьева К.А.** Пролиферативная активность спленоцитов беременных мышей с нормальной фертильностью, высоким уровнем спонтанных и мурамилдипептид-индуцированных аборт / Артемьева К.А., Богданова И.М., Обернихин С.С., Болтовская

М.Н., Калюжин О.В. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Сб. научных трудов Международной научной конференции. М. – 2014. – С. 21–23

10. **Артемьева К.А.** Структура плаценты мышей при моделировании аллогенной нормальной беременности, спонтанных, индуцированных и мурамилдипептид-потенцированных аборт / Артемьева К.А. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Сб. научных трудов научной конференции с международным участием. М. – 2016.– С.12–13

11. **Артемьева К.А.** Новая экспериментальная модель индуцированных аборт у мышей / Артемьева К.А., Калюжин О.В., Болтовская М.Н. // Материалы V Международной научно-практической конференции молодых ученых «SCIENCE4HEALTH 2013»/ Российский Университет Дружбы Народов Медицинский Факультет 29 октября – 2 ноября 2013 года М.– 2013.– С.83 <http://www.science4health.org/konferentsiya-2013/sbornik-2013.html>

Патент

Способ моделирования индуцированного невынашивания аллогенной беременности у лабораторных мышей: патент на изобретение № 2511107 Российская Федерация: МПК G09B23/28/ **К.А.Артемьева**, М.Н.Болтовская, О.В.Калюжин, И.И.Степанова, Н.В.Яглова; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН; заявка № 2012156695/14; заявл. 26.12.2012; опубл. 10.04.2014, Бюлл. №10. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 06 февраля 2014 г.

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 – аборт, индуцированные внутрибрюшинным введением β-гептилгликозида мурамилдипептида самкам СВА, оплодотворенным самцами Balb/c

ИС – индекс стимуляции

ИФН – интерферон

КВ – корковое вещество

МДП – мурамилдипептид

МВ – мозговое вещество

ПАЛМ – периартериоларные лимфоидные муфты

Потенцированные аборт – аборт, потенцированные внутрибрюшинным введением β-гептилгликозида мурамилдипептида самкам СВА, оплодотворенным самцами DBA/2

СЗ – субкапсулярная зона

ТТ – тимическое тельце

ФНО – фактор некроза опухоли

ЧР – частота резорбции

С7МДП – β-гептилгликозид мурамилдипептида

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