

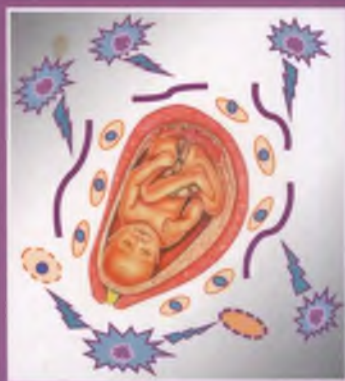
Л.В. Ванько
В.Г. Сафронова
Н.К. Матвеева
Г.Т. Сухих



БИБЛИОТЕКА
ВРАЧА-СПЕЦИАЛИСТА

АКУШЕРСТВО
ГИНЕКОЛОГИЯ

Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

**Л.В. Ванько
В.Г. Сафронова
Н.К. Матвеева
Г.Т. Сухих**



**БИБЛИОТЕКА
ВРАЧА-СПЕЦИАЛИСТА**

**АКУШЕРСТВО
ГИНЕКОЛОГИЯ**

Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений

Москва



**ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»**

2010

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	6
Глава 1. Клеточные и молекулярные основы генерации активных форм кислорода (с участием Н.В. Авхачевой)	7
1.1. Общая характеристика активных форм кислорода	8
1.2. Системы генерации и удаления активных форм кислорода	10
1.3. Окислительный стресс и его последствия	13
1.4. Молекулярные мишени активных форм кислорода	14
1.5. Участие активных форм кислорода в клеточной сигнализации	16
1.6. Участие активных форм кислорода в программированной клеточной гибели	24
1.7. Генерация активных форм кислорода фагоцитами	27
1.8. NADPH-оксидаза фагоцитов	32
Цитохром b_{558}	33
Цитозольные факторы $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$	34
ГТФ-связывающие белки	36
1.9. Семейство белков NOX	39
Локализация белков NOX в клетке	40
1.10. Экспрессия белков семейства NOX в женской репродуктивной системе	41
1.11. Экспрессия белков семейства NOX в клетках и тканях плода	44
1.12. Физиологическая роль NADPH-оксидаз	44
Заключение	46
Глава 2. Физиологическое течение беременности: роль факторов врожденного иммунитета	50
2.1. Иммунные механизмы, способствующие становлению и развитию беременности	50
2.1.1. Факторы, контролирующие процесс имплантации	51
2.1.2. Факторы, участвующие в контроле дифференцировки и функций трофобласта	55
2.2. Клеточные и молекулярные основы иммунных реакций при беременности	61
2.2.1. Клетки фагоцитарной системы	61

2.2.2. Естественные киллерные клетки (НК-клетки), дендритные клетки, $\gamma\delta$ T-лимфоциты	67
2.3. Формирование иммунологической толерантности матери к плоду	75
Заключение	82
Глава 3. Иммунные факторы в патогенезе осложнений течения беременности	85
3.1. Иммунологические факторы в генезе привычного выкидыша	87
3.2. Иммунологические аспекты преэклампсии	96
3.3. Иммунологические факторы при осложнениях беременности, связанных с инфекцией	106
3.4. Аутоиммунные антитела и их роль в осложнении течения беременности	112
3.5. Иммунотерапия в комплексе лечебных и профилактических мероприятий при патологии беременности	125
Заключение	132
Глава 4. Роль оксидативного стресса в развитии осложнений беременности и послеродового периода	135
4.1. Оксидативный стресс и нарушение плацентации	137
4.2. Роль оксидативного стресса в развитии ранних осложнений беременности	141
4.3. Оксидативный стресс в плаценте в поздние сроки беременности и при преэклампсии	146
4.4. Оксидативный стресс в послеродовом периоде	159
Заключение	166
Глава 5. Становление иммунной системы плода и особенности иммунитета новорожденного, зависимость функционального состояния лейкоцитов новорожденных от физиологического или осложненного течения беременности	169
5.1. Общие сведения о становлении иммунной системы плода человека	170
5.2. Иммунитет новорожденных	187
5.2.1. Факторы врожденного иммунитета у новорожденных	188
5.2.2. Состояние Т-клеточного компонента иммунной системы у новорожденных	207

5.2.3. Состояние В-клеточного звена иммунитета у новорожденных	213
5.3. Особенности функционального состояния лейкоцитов новорожденных в раннем неонатальном периоде	219
5.4. Влияние особенностей течения беременности матери на состояние иммунитета новорожденного	221
Заключение	234
Список литературы	237
Приложение	249
Предметный указатель	257

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ERK — протеинкиназы, регулируемые внеклеточным сигналом (*Extracellular signal-Regulated Kinases*)
- fMLF — хемотаксический пептид *N-formyl-Met-Leu-Phe*
- FPR — рецептор формилированных пептидов
- GEF — фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*)
- HLA — лейкоцитарные антигены человека
- KIR — иммуноглобулин-подобные рецепторы NK-клеток
- МАРК — митоген-активируемые протеинкиназы (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)
- MBL — лектин, связывающий маннозу (*Mannose-Binding Lectin*)
- NF-κB — ядерный фактор κB
- NK-клетки — естественные киллерные клетки
- NOX1–5 — ферменты семейства NADPH оксидаз
- Th — Т-лимфоциты хелперы
- TLR — Toll-подобные рецепторы
- АМФ — аденозинмонофосфат
- АПК — антиген-презентирующая клетка
- АФК — активные формы кислорода
- ГДФ — гуанозиндифосфат
- ГТФ — гуанозинтрифосфат
- ДК — дендритная клетка
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛ — интерлейкин
- ИФН — интерферон
- ЛПС — липополисахарид
- МНС — главный комплекс гистосовместимости (*Major Histocompatibility Complex*)
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- СОД — супероксиддисмутаза
- ФАД — флавинадениндинуклеотид
- ФНО — фактор некроза опухоли
- ХГЧ — хорионический гонадотропин человека

Глава 1

Клеточные и молекулярные основы генерации активных форм кислорода

Окислительный (оксидативный) стресс, основным признаком которого считают избыточное количество АФК вследствие дисбаланса между их образованием и удалением, может вносить значимый вклад в патогенез некоторых заболеваний человека. Дисбаланс возникает из-за избыточной мощности систем, продуцирующих АФК, при пониженной емкости антиоксидантных систем. Молекулярная основа таких заболеваний или их осложнений — повреждение биологических молекул (белков, липидов мембран, ДНК и др.) производными молекулярного кислорода с высокой реакционной способностью. Кроме того, окислительный стресс опасен тем, что может вызывать нарушения восприятия и передачи сигнала вследствие участия АФК в качестве сигнальных молекул (например, перекиси водорода) в трансдукции сигнала с рецепторов, а также в регуляции активности определенных ферментов. Возникновение и развитие осложнений беременности и послеродового периода связывают с окислительным стрессом, который носит системный или локальный характер. На структурные и функциональные компоненты репродуктивной системы действуют АФК экзогенного и эндогенного происхождения.

1.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Свободные радикалы в биологических объектах открыты более 50 лет назад. Позже было высказано предположение, что радикалы кислорода образуются *in vivo* как продукты ферментативных реакций. В группу соединений, названных «активные формы кислорода» (АФК), включают следующие метаболиты кислорода:

- свободные радикалы — супероксидный анион-радикал ($\cdot\text{O}_2^-$), гидроксильный ($\cdot\text{OH}$) и гидропероксильный ($\cdot\text{HO}_2$) радикалы;
- нейтральные молекулы — пероксид водорода (H_2O_2) и синглетный кислород ($^1\text{O}_2$);
- пероксинитрит (ONOO^-), озон (O_3) и гипохлорную кислоту (HOCl).

Заинтересованный читатель может обратиться к обзорам (Thamnickal V.J. and Fanburg B.L., 2000; Dröge W., 2002) для получения подробной информации по характеристике отдельных форм, мы же даем краткий перечень с указанием свойств, существенных для последующего изложения.

Супероксидный анион-радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) — основная форма, образующаяся ферментативным путем. Он обладает очень высокой химической активностью за счет неспаренного электрона. Концентрация $\cdot\text{O}_2^-$ в клетке около 10^{-11} М, время жизни оценивают как 10^{-6} с при 37°C . Он не диффундирует на значительные расстояния от места синтеза, так как не растворим в липидах, но может действовать как вторичный посредник во внутриклеточной сигнализации. Сам по себе супероксид не токсичен для клетки, но служит предшественником других АФК, образуемых в каскаде цепных реакций. При взаимодействии $\cdot\text{O}_2^-$ с водородом образуется гидропероксильный радикал ($\cdot\text{HO}_2$), который проникает через мембраны и обладает более высокой реакционной способностью, чем супероксид.

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) имеет на внешних молекулярных орбиталях два неспаренных электрона с противоположно направленными спинами, поэтому он обладает повышенной реакционной способностью по сравнению с молекулярным кислородом (триплетная форма). Время жизни $^1\text{O}_2$ достаточно большое (4,4 мкс в воде) для проникновения в клетки и ткани. В организме человека $^1\text{O}_2$ обеспечивает защиту от патогенов и служит внутриклеточным вторичным посредником.

Пероксид водорода (H_2O_2) — достаточно стабильное соединение, при нормальных условиях не токсичен, его концентрация в клетке около 10^{-8} М. Полупериод жизни пероксида водорода составляет 10–100 с при 37 °С, он диффундирует в воде и липидах, проникает через мембраны и вступает в реакции с компонентами клетки, удаленными от места его синтеза. H_2O_2 может быстро образовывать OH^- , который в присутствии атомов железа или меди вызывает серию окислительных повреждений биологических молекул. Считается, что биологическая активность H_2O_2 существенно зависит от концентрации:

- при низких (микромольных) концентрациях соединение относительно слабоактивно;
- с ростом концентрации агрессивность увеличивается;
- при достаточно высоком (миллимолярном) уровне H_2O_2 атакует биологические молекулы.

Пероксид водорода также действует как вторичный посредник.

Гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) является предельно реактивным окислителем. Константа скорости реакции с химическими соединениями около 10^7 – 10^9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Время жизни радикала в водных растворах около 2 нс, он не диффундирует через мембраны. Гидроксильный радикал вызывает гидроксилирование органических соединений (липидов, белков, углеводов) по радикальному механизму и сильнейшие повреждения ядерной и митохондриальной ДНК. Обнаружено более 100 типов модификаций ДНК, вызванных гидроксильным радикалом.

Гипохлорная кислота (HOCl) — сильный нерадикальный окислитель биологических соединений широкого спектра. Она токсичнее супероксид-аниона и пероксида водорода в 100–1000 раз.

Пероксинитрит (ONOO^-) обладает высокой окислительной активностью, сопоставимой с реакционной способностью гидроксильного радикала (константа скорости реакции с органическими соединениями оценивается как 10^4 – 10^8 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Он легко и с высокой скоростью проникает через биологические мембраны. Кроме окисления пероксинитрит вызывает нитрование некоторых органических соединений.

Общее свойство АФК — зависимость их действия от концентрации:

- при низкой концентрации (порядка 10^{-6} М) они обладают митогенным действием и усиливают пролиферацию клеток;
- в более высоких концентрациях способствуют прекращению роста или старению;
- в высоких дозах (порядка 10^{-3} М) запускают клеточную смерть через апоптоз или некроз (Thannickal V.J. and Fanburg B.L., 2000).

1.2. СИСТЕМЫ ГЕНЕРАЦИИ И УДАЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Эндогенные источники АФК. Все клетки организма продуцируют АФК при физиологическом внутриклеточном метаболизме (рис. 1). Интенсивность генерации АФК широко варьирует в клетках разного типа. Считается, что основной источник супероксида в живой клетке — транспорт электрона в дыхательной цепи митохондрий. Другой источник супероксида — цитохром P₄₅₀ эндоплазматического ретикулума. Супероксид-анион также образуется при активации гипоксантин/ксантин-оксидазы, NADPH-оксидазы, липоксигеназы и циклооксигеназы.

Антиоксидантные системы. Для защиты от АФК в высоких концентрациях в клетках присутствуют специализированные ферментные и неферментные антиоксидантные системы. Термин «антиоксиданты» в контексте живых одно- или многоклеточных организмов включает в себя все вещества, которые снижают уровень свободных радикалов или подавляют их действие для поддержания физиологического равновесия.

Главным ферментом-антиоксидантом считают СОД, которая катализирует дисмутацию $\cdot\text{O}_2^-$ до H_2O_2 . Изоформы СОД присутствуют в различных отделах клетки:

- СОД1 (Cu,Zn-СОД) — в цитоплазме, митохондриях, ядре и лизосомах;
- СОД2 (Mn-СОД) и СОД3 — в митохондриях и внеклеточном матриксе соответственно (Faraci F.M. and Didion S.P., 2004).

Дальнейшее превращение H_2O_2 в H_2O и O_2 происходит с помощью каталазы — гемсодержащего фермента, который обычно находится в пероксисомах. Каталаза — «высокоскоростной» фермент: она превращает 6×10^6 молекул H_2O_2 за минуту. Кроме того, H_2O_2 может быть восстановлен до O_2 с помощью глутатионпероксидазы (GPX) в реакции с обращением восстановленного глутатиона (GSH) в окисленный (GSSG). У человека обнаружено 5 изоформ селеносодержащей глутатионпероксидазы. Глутатион присутствует в клетках в высоких концентрациях (10^{-3} – 10^{-2} М).

Важную роль в окислении и восстановлении белков, содержащих тиоловые группы, наряду с системой глутатиона играет система тиоредоксинов, включающая изоформы тиоредоксина (Trx) и тио-

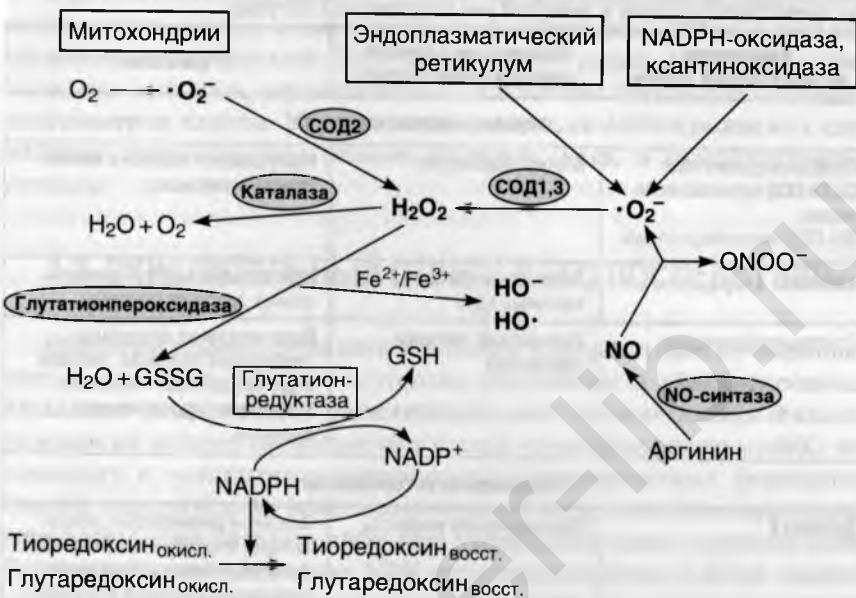


Рис. 1. Источники активных форм кислорода в живой клетке.

Основные источники АФК: электронно-транспортные цепи митохондрий, эндоплазматического ретикулума и NADPH-оксидазы. NO-синтаза — ключевой фермент, ответственный за продукцию NO. Основные перехватчики АФК: супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза и каталаза. Важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетке играет баланс GSH/GSSG (глутатион восстановленный/окисленный) и NADPH/NADP⁺ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный / окисленный)

редоксинредуктазу. Тиоредоксин — мультифункциональный селеносодержащий белок, имеющий два редокс-чувствительных остатка цистеина в консервативном активном домене Cys-Gly-Pro-Cys (Fujino G. et al., 2006).

Большим семейством антиоксидантных белков являются перокси-редоксины (Prx). У млекопитающих выделяют 6 классов Prx, которые распределяют в две группы: 2-Cys пероксиредоксины (Prx I–V) и 1-Cys пероксиредоксины (Prx VI). Локализация основных антиоксидантов в женской репродуктивной системе представлена в табл. 1.

Таблица 1. Ферментные и неферментные компоненты антиоксидантной системы, функционирующие в женской репродуктивной системе

Компоненты антиоксидантной защиты	Локализация в женской репродуктивной системе	Действие
Ферменты-антиоксиданты		
Супероксиддисмутазы: Cu,Zn-СОД цитоплазматическая Mn-СОД митохондриальная	Клетки эндометрия	Нейтрализуют внутри- и внеклеточный супероксид
Каталаза	Жидкость в просвете маточных труб	Нейтрализует внутри- и внеклеточный пероксид водорода
Глутатионпероксидаза	Железистый эпителий эндометрия	Восстановление пероксидов (пероксидов водорода, липидов и других) до воды или спирта. Устранение гидроксильного радикала
Неферментные антиоксиданты		
Витамин Е	Фолликулярная жидкость	Основной антиоксидант, прерывающий окисление в мембранах. Непосредственно нейтрализует супероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал
Витамин С	Яичники	Защищает липопротеины от перекисного окисления
	Фолликулярная жидкость	Блокирует повреждение ДНК
Глутатион	Жидкость в просвете маточных труб, ооцит/эмбрион	Метаболизирует пероксид водорода и гидроксильный радикал
Цистеамин	Фолликулярная жидкость	Предшественник гипотаурина
Таурин	Фолликулярная жидкость/ жидкость в просвете маточных труб	Нейтрализует гидроксильный радикал
Трансферрин	Жидкость в просвете маточных труб	Хелатор металлов
Тиоредоксин	Ооцит/эмбрион	Защищает эмбрион от окислительного стресса и эмбриофатических эффектов

СОД — супероксиддисмутаза;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

При снижении физиологического уровня АФК происходят изменения, приводящие к нарушению пролиферации клеток и защиты организма от инфекций. При повышении уровня АФК могут происходить события, приводящие к усилению процессов старения или к смерти клетки. Увеличенная продукция АФК приводит к случайным повреждениям белков, липидов, ДНК и окислительному стрессу.

1.3. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ

При нормальном функционировании клетки скорости образования и удаления АФК относительно постоянны и сбалансированы. Механизм поддержания окислительно-восстановительного баланса основан на запуске сигнального каскада, чувствительного к АФК, что приводит к увеличению экспрессии антиоксидантных ферментов. Запуск окислительно-восстановительной сигнализации происходит при нарушении баланса либо при увеличении концентрации АФК. Если первичное увеличение АФК относительно мало, клетка компенсирует его и возвращает систему в прежнее сбалансированное состояние (рис. 2).

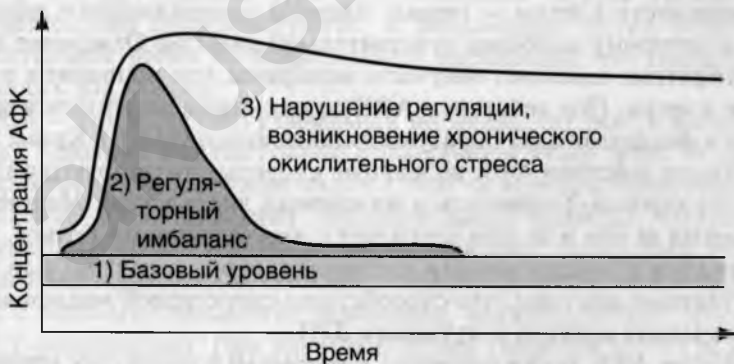


Рис. 2. Поддержание физиологического уровня АФК с помощью баланса между системами, продуцирующими или удаляющими АФК. Нарушение регуляции систем и последующее сохранение высокого уровня АФК приводит к хроническому окислительному стрессу

Хронический метаболический сдвиг, возникающий в результате устойчивого дисбаланса между оксидантами и антиоксидантами, был назван «окислительным стрессом». Окислительный стресс сопровождается более сотни заболеваний, включая хронические (такие как эмфизема, атеросклероз, сахарный диабет, нейродегенеративный синдром, ревматоидный артрит), является одним из главных факторов старения. Развитие беременности приводит к окислительному стрессу из-за усиления метаболической активности организма (Ruder E.H. et al., 2008). Окислительный стресс при преэклампсии может быть связан с активацией нейтрофилов и задержкой их апоптоза. При окислительном стрессе активируется множество сигнальных каскадов, что изменяет экспрессию генов и впоследствии влияет на способность клеток к выживанию или приводит к гибели.

1.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

При окислительном стрессе избыточная продукция АФК приводит к окислительному повреждению липидов, белков, углеводов, ДНК, которое может быть необратимым. Клеточная мембрана и рецепторы на поверхности клетки — первые мишени повреждающего действия АФК, к которому наиболее чувствительны липиды. **Окисление липидов** необратимо изменяет текучесть мембраны, что приводит к разрушению клетки. Под действием АФК остатки ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах образуют липоперекиси (LOO^-). Кроме того, в результате действия АФК на жирные кислоты синтезируются альдегиды (4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид). Малоновый диальдегид *in vivo* и *in vitro* реагирует с аминокруппами белков, фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами, образуя внутри- или межмолекулярные мостики, что способствует структурной модификации биологических молекул и мутациям ДНК.

Действие АФК также приводит к разрывам в молекулах **углеводов**. При избыточном количестве глюкозы и АФК образуются основания Шиффа и далее — токсичные кетоамины в результате перегруппировки Амароди. Образовавшиеся аддукты (продукты присоединения) Амароди меняют структуру и функции белков. Окислительной

модификации подвергаются и углеводы, находящиеся в составе ДНК.

Спектр продуктов окисления **аминокислот и полипептидов** намного больше, чем количество существующих АФК. Модификация полипептидов происходит в основной цепочке, а также в нуклеофильных и редокс-чувствительных боковых цепях. АФК нарушают структуру полипептида, что приводит к образованию белков с повышенным содержанием карбонильных радикалов (COO^\cdot). Далее радикалы карбонила окисляют аминокислотные остатки в боковых цепях (Lys, Arg, Pro) с образованием аддуктов Михаэля между нуклеофильными остатками и α -, β -ненасыщенными альдегидами. АФК также окисляют остатки других аминокислот (Cys, Tug и Met). Обратимое окисление сульфгидрильной группы цистеина превращает его в сульфеновую кислоту (RSOH), которая реагирует с тиоловыми группами и подвергается дальнейшему необратимому окислению до сульфоновой и сульфиновой кислот. Метионин окисляется до метионинсульфоксида и далее — до метионинсульфона. Тирозиновые остатки также подвергаются окислительной модификации с образованием O,O' -дитирозинов, 3-нитротирозинов и 3-хлортирозинов. Кроме того, возможны перекрестные взаимодействия между белками с образованием высокомолекулярных продуктов. В физиологических условиях деградация поврежденных белков происходит с участием убиквитина и 26S-протеасомы. При окислительном стрессе убиквитин и 26S-протеасома инактивируются, и окисленные белки более продолжительное время не подвергаются деградации, что представляет опасность для клетки.

ДНК — относительно стабильная молекула, но даже в физиологических условиях она постоянно подвергается атаке АФК. В клетках млекопитающих обнаружено около $1,5 \times 10^5$ окисленных аддуктов ДНК. Окисление ДНК вызывают гидроксильный радикал, синглетный кислород, пероксид водорода, пероксинитрит. Вследствие окислительной модификации возникают разрывы цепочки, взаимодействия ДНК с белками, выпадение оснований, взаимодействие оснований ДНК с альдегидами. При взаимодействии гидроксильного радикала с гуанином или аденином в позициях 4, 5 или 8 пуринового кольца один из образующихся продуктов — 8-оксо-7,8 дигидрогуанин (8-охоG), также известный как 8-гидроксигуанин, который служит биомаркером повреждения ДНК. Фоновый уровень окисления ДНК в нормальной клетке: на 10^6 остатков гуанина приходится от 0,3 до

4,2 остатков 8-охоG. На клеточном уровне повреждение ДНК затрудняет транскрипцию и репликацию, что приводит к мутациям, остановке клеточного цикла и гибели клетки. На уровне организма повреждение ДНК вовлекается в патологические процессы, генетические заболевания, канцерогенез и старение. Роль АФК и антиоксидантных систем в регуляции выживания клетки двойственна: в низких концентрациях АФК выступают в роли сигнальных молекул, которые усиливают пролиферацию и выживание клетки, а значительное увеличение уровня АФК приводит к гибели клетки.

1.5. УЧАСТИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТочНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Для описания регуляторных процессов с участием окислительно-восстановительных реакций широко используют термин «редокс-регуляция» (от англ. «*reduction*» — восстановление и «*oxidation*» — окисление). Многие белки являются редокс-чувствительными, они контролируют внутриклеточные процессы на разных уровнях: рецептор, сигнал, транскрипция и белки-исполнители. Считается, что баланс в системе редокс-сигнализации определяет судьбу клетки в отношении выживания или гибели (Fujino G. et al., 2006). Наиболее значимым фактором редокс-регуляции считают АФК, действие которых зависит от концентрации. Окисление тиоловых групп — основа редокс-регуляции сигнальных молекул, поэтому основными мишенями АФК как вторичных посредников являются белки, содержащие тирозин, цистеин и метионин, которые подвергаются окислительной модификации в первую очередь.

Рецепторы с тирозинкиназной активностью (рецепторы инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1, ростовых факторов) наиболее чувствительны к АФК по сравнению с другими рецепторами плазматической мембраны клетки. Действие АФК приводит к редокс-модификации остатка тирозина в их структуре и активации рецептора. Активированные АФК рецепторные тирозиновые протеинкиназы активируют далее внутриклеточные тирозиновые и серин/треониновые протеинкиназы и протеинфосфатазы, малые ГТФ-связывающие белки (малые G-белки), Ca^{2+} -зависимую сигнализацию, активируют/инактивируют транскрипционные факторы

(Martindale J.L. and Holbrook N.J., 2002). Интересно, что обратимое окисление тиоловых групп в тирозиновых протеинкиназах приводит к их активации, тогда как окисление тиоловых групп в тирозиновых протеинфосфатазах ингибирует их функции. По данным литературы, в инсулин-компетентных клетках H_2O_2 стимулирует фосфорилирование β -субъединицы инсулинового рецептора по сериновым и тирозиновым остаткам, тем самым активируя рецептор. Инсулиноподобные свойства пероксида водорода проявляются в том, что он усиливает транспорт и утилизацию глюкозы, а также рост фибробластов и гладкомышечных клеток.

Множество сигнальных каскадов активируется при окислительном стрессе. Наиболее высокой редокс-чувствительностью характеризуются компоненты каскада митоген-активируемых протеинкиназ (*Mitogen-Activated Protein Kinases* — MAPK), а также сигнальный путь, зависящий от фосфатидилинозит-3-киназы и протеинкиназы B (Akt/PKB-зависимый путь).

Каскад MAPK — семейство последовательно активируемых протеинкиназ, которые контролируют определенные функции клеток, рост, апоптоз и реакцию на стресс. Активация каскада MAPK, включающего до 4 уровней серин/треониновых и тирозиновых протеинкиназ, инициируется рецептор-опосредованной активацией комплекса адаптерных белков, малого G-белка p21Ras и протеинкиназы Raf-1, которая фосфорилирует MAPKKK (киназа киназы митоген-активируемой протеинкиназы). Эффекторными молекулами каскада в разных клетках являются ERK 1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*), p38 MAPK, ERK 3/4 и большая MAPK-1 (BMK1/ERK5).

Увеличение уровня АФК приводит к активации рецепторов с тирозинкиназной активностью, последующей активации малого G-белка Ras, транслокации к клеточной мембране киназы Raf-1 (MAPKKK), фосфорилированию MEK1/2 и далее ERK1/2, т.е. редокс-модификация может регулировать активацию ERK1/2 на уровне рецепторной тирозинкиназы и активации Ras. При окислительном стрессе среднего уровня ERK1/2 обеспечивают выживание клетки, тогда как JNK инициирует механизмы гибели. АФК в высоких концентрациях активирует JNK и p38MAPK, которые запускают внутренние (выход цитохрома c из митохондрий) и внешние (активация TRAIL) апоптотические и некротические пути. При апоптозе, вызванном активацией JNK, происходит фосфорилирование анти- и проапоп-

тотических белков семейства BCL2 (Bcl-1, Bcl-xL, Mcl-1 и Bim, Bmf, Bad соответственно), активация транскрипционного фактора AP-1 и генов *c-jun* и *ATF2* и стабилизация опухоль-супрессирующего фактора p53. Фосфорилирование Bcl-1, Bcl-xL и Mcl-1 с помощью JNK ингибирует их апоптотическую активность, тогда как фосфорилирование Bim, Bmf и Bad приводит к активации апоптоза, опосредованного выходом цитохрома *c* из митохондрий.

Сигнальные пути, ведущие к активации JNK и p38MAPK — основные в определении судьбы клетки при окислительном стрессе (Martindale J.L. and Holbrook N.J., 2002). В большинстве случаев их активация при действии АФК инициирует апоптоз (рис. 3). Киназа, регулирующая апоптотические сигналы (ASK1), — важный сенсор окислительно-восстановительного статуса клетки и регулятор сигнального каскада MAPK. При физиологических условиях ее ингибируют восстановленный тиоредоксин (Trx) и глутаредоксин (Grx). Окислительный стресс приводит к окислению тиоредоксина и Grx и активации ASK1/MEKK5, которая активирует JNK и p38 MAPK путь через Ser/Thr фосфорилирование MKK: MKK4/MKK7 активирует JNK и MKK3/MKK6 активирует p38 MAPK α/γ . JNK, в свою очередь, в норме может ингибировать образование комплекса глутатион S-трансферазы- π (GST- π). Негативную регуляцию осуществляет Ser/Thr фосфатаза 5 (PP5), которая ингибирует фосфорилирование ASK1, и белок теплового шока 72 (Hsp72), угнетающий активность JNK. АФК и содержащие азот их родственники модифицируют участников сигнального каскада SAPK. Например, S-нитрозирование JNK1/2 приводит к угнетению активности, тогда как нитрование пероксинитритом тирозина в структуре p38MAPK приводит к немедленной активации киназы.

Передача сигнала через фосфатидилинозит-3-киназу играет важную роль в регуляции клеточного роста, пролиферации и выживания, а также адгезии и миграции, но в ситуации сильного окислительного стресса она участвует в активации проапоптотических путей. Фосфатидилинозит-3-киназы представляют собой семейство ферментов, катализирующих фосфорилирование фосфоинозитидных субстратов по третьему положению инозитольного кольца. У млекопитающих выделяют 3 класса фермента. Класс I Фосфатидилинозит-3-киназ составляют: тип IA — изоформы α , β и δ ; тип IB — изоформа фосфатидилинозит-3-киназы γ . В активированных клетках киназы этого класса опосредуют продукцию фосфатидилинозитидов (PtdIns),

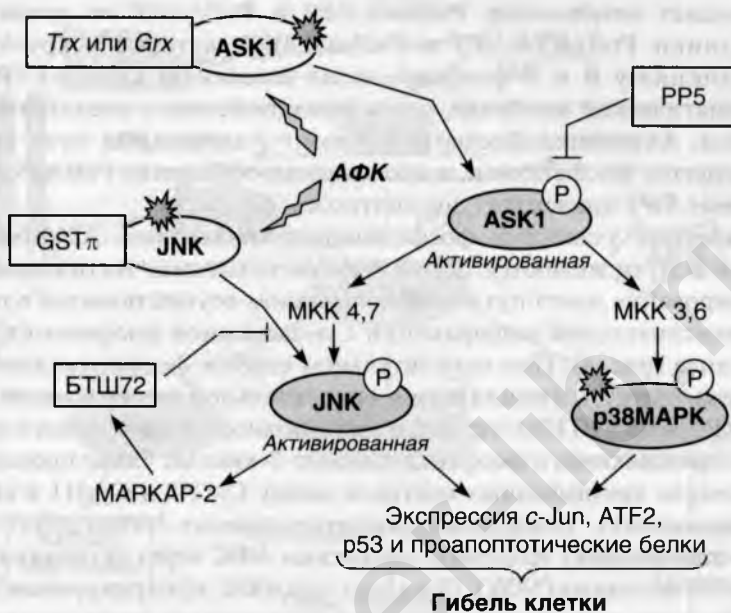



Рис. 3. Редокс-регуляция каскада протеинкиназ, активируемых стрессом:  — редокс-чувствительные протеинкиназы; ASK1 — киназа-1, регулирующая апоптотические сигналы (от англ. apoptosis signal-regulating kinase-1); Trx и Grx — тиоредоксин и глутаредоксин восстановленные соответственно; JNK — эффекторная киназа каскада стресс-активируемых протеинкиназ (Jun-N-концевая киназа, c-Jun N-terminal kinases); МКК-3,-4,-6,-7 — киназы митоген-активируемых протеинкиназ; p38MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа с молекулярной массой 38 кДа; МАРКАР-2 — активируемый МАРК белок 2 (от англ. MAP kinase-activated protein 2); GST-π — глутатион S-трансфераза-π; PP5 — Ser/Thr протеинфосфатаза 5; БТШ72 — белок теплового шока с молекулярной массой 72 кДа; c-Jun, ATF2 — редокс-чувствительные белки, субстраты ферментов каскада МАРК

фосфорилированных по 3-му положению: PtdIns(3,4,5)P₃ и PtdIns(3,4)P₂. Покоящиеся клетки содержат довольно много PtdIns3P, вероятно синтезированного фосфатидилинозит-3-киназами классов II и III. Однако количество PtdIns(3,4,5)P₃ и PtdIns(3,4)P₂ очень низкое, уровни этих соединений значительно возрастают при соответствующей стимуляции клетки. Активированная фосфатидилинозит-3-киназа

превращает мембранные PtdIns(4,5)P₂ и PtdIns(4)P во вторичные посредники PtdIns(3,4,5)P₃ и PtdIns(3,4)P₂, которые рекрутируют протеинкиназу В и 3'-фосфоинозитид-зависимую киназу-1 (PDK1) к плазматической мембране, через взаимодействие с плекстриновым доменом. Активация фосфатидилинозит-3-киназы/Akt пути строго регулируется фосфатазами, в особенности обращение PtdIns(3,4,5)P₃ в PtdIns(4,5)P₂ происходит под контролем фосфатаз.

Различные участники фосфатидилинозит-3-киназа–Akt/протеинкиназа В пути являются редокс-чувствительными. Активация или ингибирование этого пути АФК в основном осуществляется с помощью окислительной модификации Cys-зависимой фосфатазы и протеинкиназ (рис. 4). При окислительном стрессе фосфатидилинозит-3-киназа/Akt путь инициируется окислительной инактивацией фосфатаз (PTPазы и PТЕН), что повышает активность рецепторных тирозиновых протеинкиназ и фосфатидилинозит-3-киназы. Также происходит образование дисульфидных мостиков между Cys297 и Cys311 в киназном домене Akt. Более того, фосфатидилинозит-3-киназа/Akt путь также способствует усилению продукции АФК через активацию Rac и NADPH оксидазы (NOX). Показано, что АФК, продуцируемые NOX, способствуют выживанию моноцитов/макрофагов через активацию Akt и ингибирование сигнального пути р38МАРК.

В последнее время появляются работы, которые показывают роль редокс-регуляции функционирования клетки на транскрипционном уровне. К транскрипционным факторам, которые регулируются с помощью АФК, относятся ядерный фактор-κ В (NF-κВ) и онкогенный продукт гетеродимеризации Jun/Fos или гомодимеризации Jun/Jun (AP-1). NF-κВ координирует регуляцию иммунных клеток, воспалительную реакцию, развитие, пролиферацию клеток и их выживание. В зависимости от концентрации АФК активируют или ингибируют NF-κВ. Ключевым моментом в активации NF-κВ является диссоциация комплекса NF-κВ/IκВ от IκВ киназного комплекса (ИКК). Активированная ИКК фосфорилирует IκВ, что приводит к диссоциации NF-κВ от ингибитора и запускает деградацию IκВ с помощью убиквитин/протеасомной системы. При определенных условиях пероксид водорода активирует NF-κВ непосредственно через фосфорилирование/активацию ИКК или через активацию MEKK-1, или Akt. Мышьяк, перекись водорода, 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE) подавляют активность ИКК, окисляя Cys179 субъединицы ИККβ. Затем NF-κВ транслицируется в ядро, где связывается с ДНК в про-

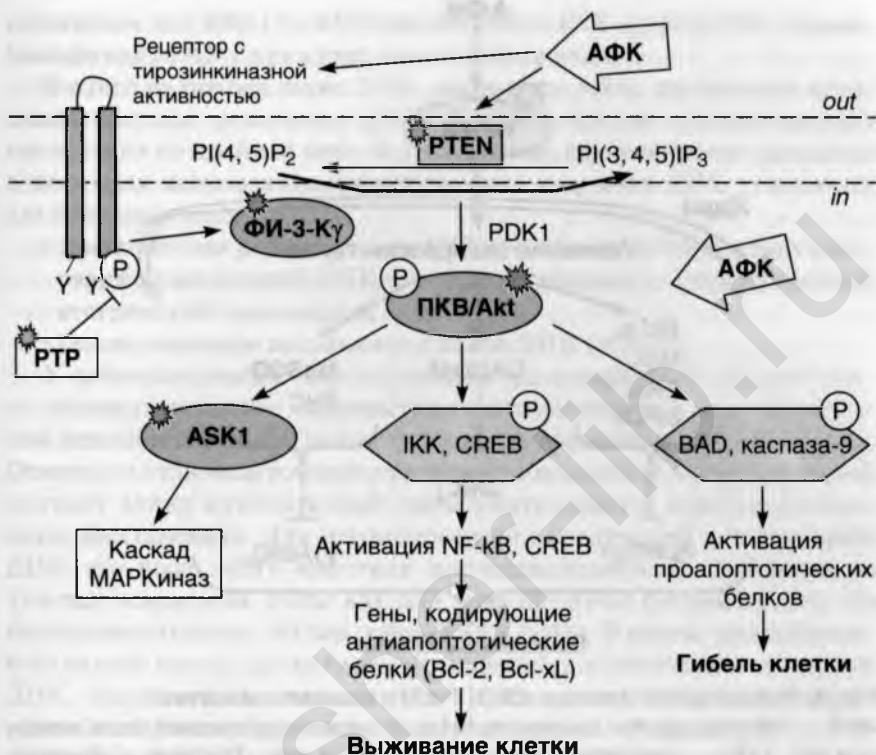


Рис. 4. Редокс-регуляция ФИ-3-Киназа/Акт пути:

☀ — сайты редокс-регуляции, АФК — активные формы кислорода; ФИ-3-Кγ — фосфатидилинозит-3-киназа-γ; ПКВ/Акт — протеинкиназа В; РТЕН — тензиновые гомологи фосфатаз; РТР — тирозиновые протеинфосфатазы; PDK1 — 3'-фосфоинозитид-зависимая киназа-1; ВAD — проапоптотический белок семейства Вcl; IKK — IκB киназа; CREB — редокс-чувствительный домен белков; P — фосфорилированный статус белка

моторном участке. Окисление редокс-чувствительного Cys62 дает возможность NF-κB связаться с ДНК. Активированный NF-κB контролирует выживание клетки с помощью регуляции транскрипции различных генов (рис. 5). В ответ на окислительный стресс NF-κB усиливает экспрессию белков семейства Bcl-2 (Bcl-xL), которые подавляют инициацию гибели клетки, инактивирует экспрессию гомологов каспазы-8 (FLIPL) и фактора, ассоциированного с рецептором

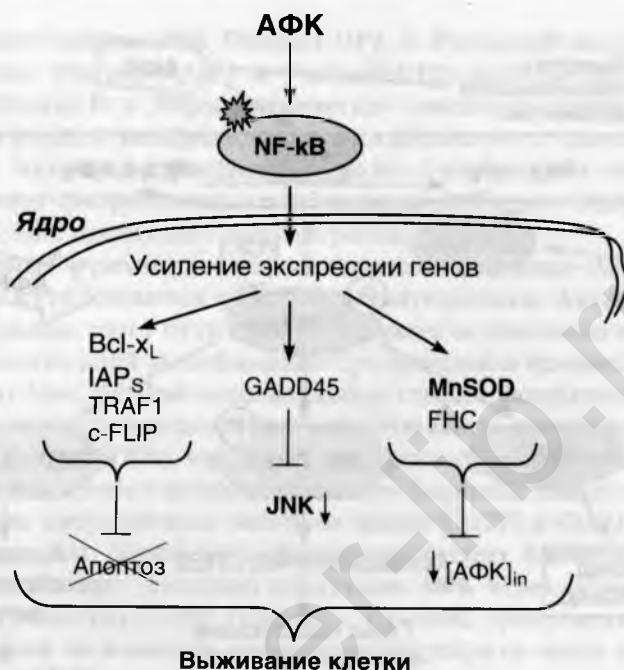


Рис. 5. Роль ядерного фактора κВ (NF-κВ) в выживании клетки: АФК — активные формы кислорода; Bcl-x_L — антиапоптотический белок семейства Bcl; IAPs — ингибиторы белков апоптоза (от англ. Inhibitors of Apoptosis Proteins); TRAF1 — фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли-α (ФНО-α); c-FLIP — гомолог каспазы-8; GADD45 — фактор 45 задержки роста и повреждения ДНК (от англ. Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45); MnSOD — Mn/супероксиддисмутаза; FHC — тяжелые цепи ферритина

ФНО-α (TRAF1). Экспрессия фактора GADD45 (от англ. *Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45*) приводит к ингибированию JNK и предотвращает вызванный JNK апоптоз. NF-κВ также усиливает экспрессию антиоксидантов (например, Mn-СОД) и активирует экспрессию тяжелых цепей ферритина (FHC).

Белки семейства AP-1 являются примером транскрипционных факторов, которые вовлечены как в регуляцию и контроль роста клеток, так и в регуляцию апоптоза. MAPK играют главную роль в контроле активации белков семейства AP-1, состоящего из подсемейств Jun, Fos, Maf и ATF. Три класса MAPK вовлечены в регуляцию активности AP-1: c-jun регулируется JNK и ERK1/2; c-fos является

субстратом для ERK1/2; ATF2 регулируется JNK и p38MAPK. Редокс-модификация AP-1 приводит к развитию опухоли.

В ответ на повреждение ДНК, вызванное АФК, происходит активация системы репарации ДНК. В одной клетке млекопитающих происходит по крайней мере 10 спонтанных двуцепочечных разрывов в день. Для исправления двуцепочечных разрывов ДНК существует два основных механизма:

- гомологичная рекомбинация (HR) — взаимодействие между разорванной молекулой ДНК в одной хромосоме с неповрежденной сестринской хроматидой;
- негомологичное соединение концов ДНК (NHEJ).

У млекопитающих двуцепочечные разрывы ДНК репарируются преимущественно посредством негомологичной и гомологичной рекомбинации, тогда как у дрожжей доминирует гомологичная. Основным отличием гомологичной рекомбинации от негомологичной считают длину нуклеотидной последовательности, которую необходимо восстановить. Для негомологичного соединения концов цепей ДНК это чаще всего короткая последовательность, состоящая из 1–6 пар оснований, тогда как для гомологичной рекомбинации это последовательность 100 пар оснований и более. В клетке поддерживается баланс между двумя типами репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Исследования последних лет показывают, что гомологичная рекомбинация активируется преимущественно во время фаз клеточного цикла S и G₂, тогда как негомологичное соединение происходит в ранней G₁ фазе и во время перехода клетки из фазы S в G₂.

Ранее считалось, что система репарации ДНК представлена только в T- и B-лимфоцитах (Eriksson A. et al., 2000). В последнее время этот миф рассеивается, так как компоненты системы репарации ДНК обнаружены в нейтрофилах и моноцитах/макрофагах (Sallmyr A. et al., 2004).

ДНК-лигаза III (LIG-3) — альтернативный кандидат для регуляции негомологичного соединения концов цепей ДНК. При ее активации задействуется PARP-1 — *Poly(ADP-ribose) polymerase-1* — фермент, связывающий ДНК и участвующий в ее репарации.

Когда произошло повреждение ДНК, клетка стоит перед выбором: восстанавливать поврежденную ДНК или умереть. Если уровень повреждения невысок, клетка активирует механизмы остановки клеточного цикла и восстанавливает повреждения ДНК. Если уровень повреждения ДНК очень высокий, клетка незамедлительно активирует

процессы гибели. В этом случае клетка решает, какой именно механизм гибели активировать: апоптоз или некроз. Степень активации PARP-1 — один из главных факторов для определения судьбы клетки. Если при активации PARP-1 истощаются пулы NAD⁺ и АТФ, то клетка активирует процесс некроза.

1.6. УЧАСТИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

При определенных условиях АФК непосредственно изменяют активность молекул-исполнителей гибели клетки. Основными эффекторами считают редокс-чувствительные каспазы, проапоптотические белки семейства Bcl-2 и цитохром с.

Термин «апоптоз» (от греч. «опадение листьев») введен в научный обиход в 1972 г. для обозначения формы гибели клеток, прототипом которой стала гибель тромбоцитов под действием глюкокортикоидов. При апоптозе происходит отделение клеток от внеклеточного матрикса, конденсация ядра, сморщивание цитоплазматической мембраны и в итоге образование так называемых «апоптотических телец» — мембранных пузырьков с клеточным содержимым, которые впоследствии поглощаются макрофагами и соседними клетками. Макрофаги выделяют особый гликопротеин — MFG-E8 (*Milk Fat Globule-EGF-factor 8*), который специфически связывается с фосфатидилсерином на поверхности клеток, вставших в апоптоз. Вероятно, фосфатидилсерин служит меткой, по которой макрофаги узнают погибшие клетки. При некрозе происходит набухание клетки и органелл, нарушение целостности всех мембранных структур, в первую очередь лизосом, и как следствие — автолиз. В биохимическом механизме апоптоза выделяют четыре основных компонента:

- Cys-Asp-протеазы, или каспазы;
- так называемые «рецепторы смерти» на поверхности клетки;
- митохондрии и выходящий из них цитохром с;
- специфические про- и антиапоптотические белки.

Каспазы (семейство Cys-Asp-протеаз) играют ведущую роль в запуске апоптоза. У млекопитающих семейство каспаз состоит из 14 белков, постоянно синтезируемых практически во всех клетках в виде проферментов, активирующихся при апоптозе. Прокаспазы — белки с моле-

кулярной массой 32–56 кДа содержат 4 домена: N-концевой домен, большую (17–21 кДа) и малую (10–13 кДа) субъединицы и короткую связующую область между ними. При активации N-концевой домен и связующий фрагмент между субъединицами отщепляются. В результате формируется гетеродимер. Активная каспаза — тетрамер, состоящий из двух таких гетеродимеров.

Представление о последовательной активации каспаз позволило сформулировать концепцию так называемого «каспазного каскада». Выделяют инициаторные каспазы -2, -8, -9, -10, -12 и эффекторные каспазы -3, -6, -7. Каскад запускает активация аутокаталитической инициаторной каспазы, которая, в свою очередь, активирует эффекторные каспазы. Последние расщепляют актиновые филаменты, угнетают биосинтез белков и активируют ДНКазу. Прочие представители семейства (каспазы -1, -4, -5, -11, -13) не участвуют в апоптозе, но принимают участие в развитии воспалительных процессов, а также, наряду с эффекторными каспазами, в пролиферации Т-лимфоцитов, терминальной дифференцировке эпителиальных клеток хрусталика и кератиноцитов. АФК могут прямо влиять на функции каспаз (рис. 6). Остатки Cys в активном центре каспаз чувствительны к действию АФК. Пероксид водорода активирует каспазы и вызывает апоптоз, а в высоких концентрациях также и некроз.

У млекопитающих апоптоз часто начинается с активации так называемых «индуцирующих смерть сигнальных комплексов» на плазматической мембране. Эти комплексы образуются при взаимодействии определенных внеклеточных лигандов (например, Fas или ФНО- α) с белками семейства рецепторов фактора некроза опухолей на клеточной мембране, называемых «рецепторами смерти». При связывании лигандов они активируют каспазу-8, образуя «индуцирующий смерть сигнальный комплекс», содержащий «рецептор смерти», адаптеры TRADD (от англ. *TNF-R1-Associated Protein with Death Domain*) или FADD (от англ. *Fas-Associated Protein with Death Domain*) и профермент каспазы-8 (Trachootham D. et al., 2008). Каспаза-8 высвобождается в цитоплазму и инициирует протеазный каскад, который активирует эффекторные каспазы, в частности каспазу-3, служащую точкой пересечения рецепторного и митохондриального путей активации каспаз (см. рис. 6).

Митохондрии играют центральную роль в инициации и осуществлении апоптоза у млекопитающих. Сигналы от рецепторов смерти или от поврежденных участков клетки сходятся на них, вызывая повышение проницаемости внутренней и наружной мембран

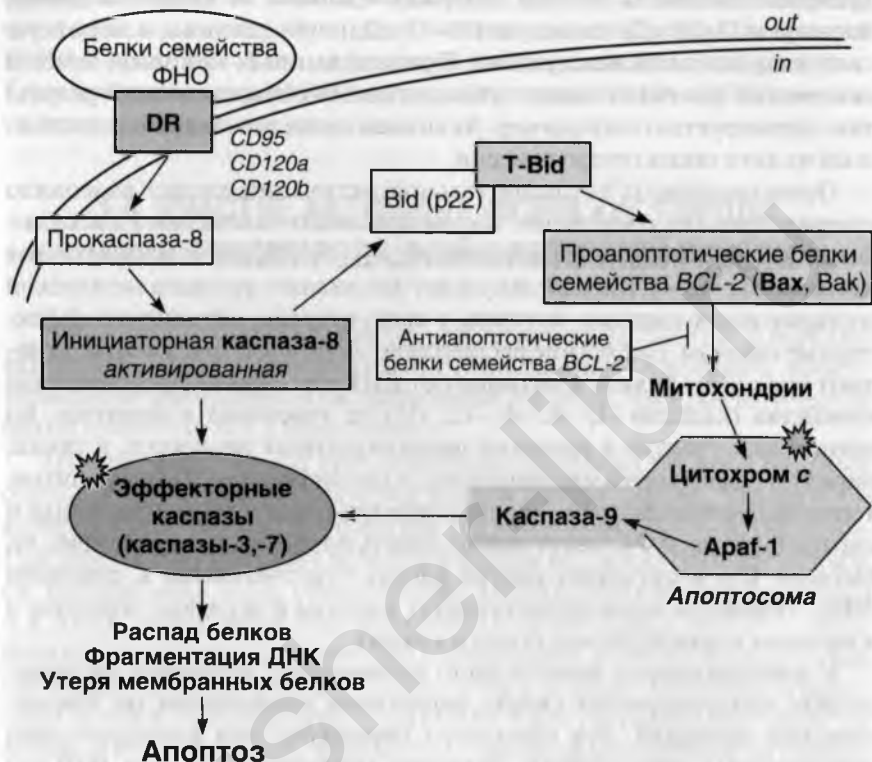


Рис. 6. Редокс-регуляция исполнителей апоптоза:

☀ — сайты редокс-регуляции; DR — рецептор смерти (от англ. Death Receptor); Araf-1 — apoptotic protease activating factor-1; Bid — проапоптотический белок семейства Bcl; ФНО — фактор некроза опухоли; BCL-2 — семейство белков, регулирующих апоптоз; Bax — проапоптотический белок семейства Bcl

митохондрий, снижение мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) и высвобождение из межмембранного пространства белков апоптоза: апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) и некоторых прокаспаз. Высвобождение этих белков происходит вследствие открытия высокопроницаемого канала — митохондриальной поры. Открытие ее стимулируют такие факторы, как неорганический фосфат, прооксиданты, SH-реагенты, истощение митохондриального пула АТФ. Напротив, Mg^{2+} , адениновые

нуклеотиды, антиоксиданты, спермин и циклоспорин А способствуют закрытию поры.

Наряду со специфическими апоптотическими белками в цитоплазму выходит **цитохром с**. Он связывается с **Araf-1** (от англ. *Apoptotic Protease activating factor-1*) и формирует апоптосомный комплекс, инициирующий активацию каспазного каскада. Цитохром с запускает Araf-1-зависимую активацию каспазы-9. Каспаза-9 активирует каспазы-3 и -7 (см. рис. 6); те, в свою очередь, расщепляют различные белки, что приводит к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза (Trachootham D. et al., 2008).

Белки семейства BCL-2 регулируют апоптоз на уровне митохондрий (рис. 6). Цитозольный Bid (p22) расщепляется каспазой-8, активируемой через «рецепторы смерти», и катепсинами — протеазами лизосом. Образующийся активный белок, так называемый «усеченный Bid» (от англ. *truncated Bid, T-Bid*) изменяет конформацию проапоптотического белка Bax, после чего тот встраивается во внешнюю мембрану митохондрий, где образует комплекс с порином. Вместе они формируют канал, по которому цитохром с и другие проапоптотические белки выходят из межмембранного пространства. Поскольку активация каспаз приводит к необратимым последствиям, их активность тщательно регулируется. В этом принимают участие ингибиторы белков апоптоза (*Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAPs*).

Из приведенных литературных данных видно, что отклонения редокс-гомеостаза клетки в ту или другую сторону могут привести к нарушению регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов и апоптоза, инициировать изменения в геноме клетки. Окислительный стресс сопровождается всеми перечисленными нарушениями.

1.7. ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ФАГОЦИТАМИ

Генерация АФК характеризуется реакцией, получившей образное название «респираторный взрыв». Синонимы этого термина — «окислительный взрыв», «дыхательный взрыв» (рис. 7).

Впервые респираторный взрыв, вызванный фагоцитозом, описан в 1933 г. Позже было открыто свойство «белых клеток» интенсивно

Респираторный взрыв

- Усиление потребления O_2
- Повышение расхода глюкозы
- Активация ГМШ
- Интенсивный выброс АФК

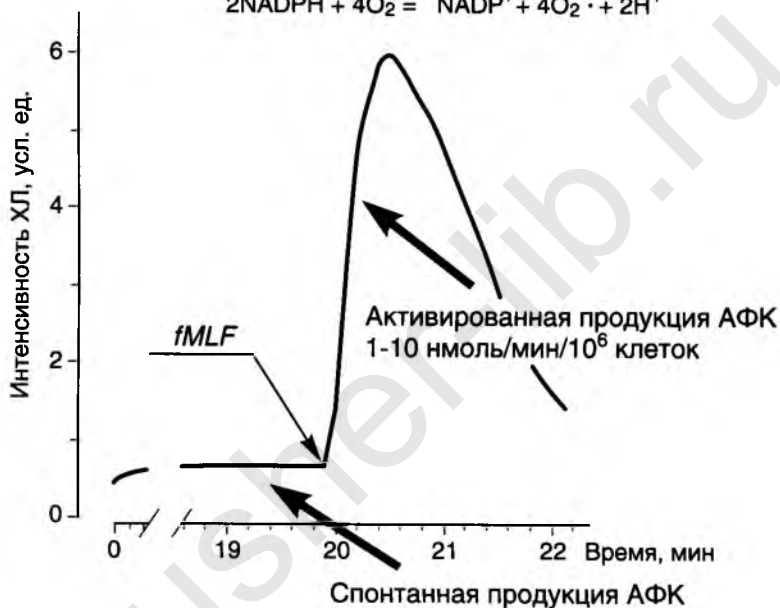
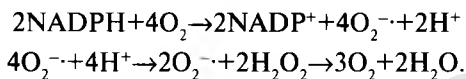


Рис. 7. Развитие респираторного взрыва при стимуляции гранулоцитов человека. Спонтанная и активированная продукция АФК зарегистрирована методом хемилюминесцентного анализа. Респираторный взрыв активирован формилированным пептидом N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF); ГМШ — гексозо-монофосфатный шунт; ХЛ — хемилюминесценция

потреблять кислород из воздуха при активации и показано, что усиленное потребление кислорода активированными нейтрофилами не чувствительно к ингибиторам митохондриального дыхания (например, цианидам). Наиболее яркое проявление метаболического сдвига при активации фагоцитов — резкое увеличение расхода глюкозы в реакциях глюкозо-монофосфатного шунта. В покое нейтрофиле через них утилизируется только 1–2% глюкозы, тогда

как в стимулированном — около 30%. Ферментом, ответственным за респираторный взрыв, считают NADPH-оксидазу. При ее активации внеклеточный кислород превращается в супероксид-анион радикал ($\cdot\text{O}_2^-$), что сопровождается окислением цитозольного NADPH, продуцируемого при активации гексозомонофосфатного шунта. Супероксид-анион далее в водной среде образует пероксид-анион радикал, затем воду и молекулярный кислород ($\tau_{1/2}=10^{-6}$ с, 37 °С). Суммарное уравнение переноса электронов записывается следующим образом:

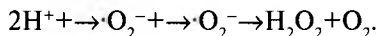


Перенос электрона с NADPH на молекулярный кислород осуществляется с участием простетических групп фермента по электронно-транспортной цепи:



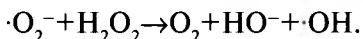
При респираторном взрыве образуются окислители с мощным энергетическим потенциалом. Их взаимопревращения создают динамический спектр молекул, которые вовлекаются в реакции фагоцитов (первичные метаболиты — супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород; вторичные метаболиты — гипохлорная кислота, хлорамины, продукты перекисного окисления липидов).

Превращения в системе NADPH—NADP⁺ сопрягают два альтернативных механизма: аппарат окисления NADPH (NADPH-оксидаза) и аппарат восстановления NADP⁺ (глюкозо-монофосфатный шунт, обеспечивающий клетку NADPH). В воде O_2^- претерпевает дисмутацию до пероксида водорода и кислорода:

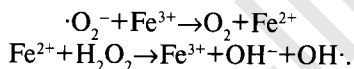


Реакция катализируется СОД или ионами марганца и меди. Пероксид водорода имеет рК около 11,0 и поэтому также почти полностью протонирован при физиологических значениях рН.

Наибольшей активностью из всех АФК обладает гидроксильный радикал $\cdot\text{OH}$, который в биологических системах образуется в реакции, предложенной еще в 30-х годах прошлого века Хабером и Вейссом для процесса, катализируемого солями железа:

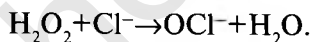


Эта реакция представлена довольно бедно в диапазоне физиологических значений pH. Однако в литературе широко обсуждается протекание реакции Хабера–Вейсса в связи с генерацией радикалов $\cdot\text{HO}$. В этом случае выделяют три основные реакции: восстановление металла супероксид анион-радикалом, дисмутацию последнего и реакцию Фентона. Иногда этот комплекс реакций называют «superoxide-driven Fenton's chemistry», подчеркивая ведущую роль $\cdot\text{O}_2^-$ как восстановителя металла и как источника пероксида водорода. Хотя супероксид анион-радикал не является высоко реакционноспособным соединением, его появление в физиологических жидкостях организма может привести к восстановлению Fe^{3+} и разложению H_2O_2 с образованием агрессивного свободного гидроксильного радикала. Возможно, что продукция свободного радикала гидроксила катализируется Fe^{3+} и Cu^{2+} :



Последняя реакция называется «реакция Фентона».

Другие токсичные продукты происходят из H_2O_2 при действии миелопероксидазы, выбрасываемой из первичных гранул вместе с ионами галогенов:



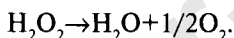
В подобную реакцию кроме Cl^- могут вступать Br^- , I^- , SCN^- . Было показано, что образованный гипохлорит является в сотни раз более сильным бактерицидным агентом, чем H_2O_2 , его роль более важна в цитотоксичности нейтрофилов и других фагоцитов. Количество гипохлорита, произведенного нейтрофилами при активации, весьма велико: 10^6 нейтрофилов при нейтральных значениях pH образует 2×10^{-7} М HOCl , что достаточно, чтобы разрушить около $1,5 \times 10^8$ организмов *E. coli* в течение нескольких миллисекунд. Считается, что если окислительную способность хлора принять за 1,0, этот показатель для:

- гидроксильного радикала — 2,23;
- для кислорода: атомарного — 2,06, синглетного — 1,78;
- пероксида водорода — 1,31;
- гидропероксильного радикала — 1,25.

Такие высокие показатели хорошо демонстрируют цитотоксические возможности АФК, в особенности гидроксильного радикала,

чьи окислительные возможности стоят на втором месте после фтора. Константа скорости реакции между гидроксильным радикалом и органическими материалами оценивается как $10^9-10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

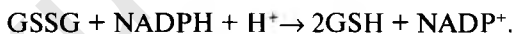
Образующиеся при респираторном взрыве АФК повреждают нуклеиновые кислоты, обладают мутагенным и летальным действием на клетки, инициируют реакции перекисного окисления липидов, инактивируют ферменты. Их цитотоксическое действие может быть направлено не только на клетки-мишени, но и на сами фагоциты. Для защиты от повреждающего действия АФК в фагоцитах и других клетках присутствуют ферменты, активность которых направлена на трансмутацию АФК в менее активные или неактивные формы. Как уже упоминалось, СОД, которая в избытке находится в цитозоле фагоцитов, снижает концентрацию супероксидных радикалов в среде и подавляет образование ионов двухвалентного железа. Наряду с СОД для защиты от самодеструкции под действием пероксида водорода служит каталаза, катализирующая реакцию:



Кроме того, H_2O_2 разрушается ферментом глутатионпероксидазой, для которого в качестве субстрата необходим восстановленный глутатион (GSH), продуктом реакции является окисленный глутатион:



Окисленный глутатион переокисляется при действии глутатионредуктазы, цитозольного фермента, который требует NADPH как донора электронов:



Затем NADPH регенерируется при активации пентозофосфатного шунта. Следует заметить, что гемсодержащий белок каталаза имеет относительно высокую K_m для H_2O_2 (около 1 мМ), что характеризует ее как менее эффективный защищающий фермент, чем глутатионпероксидаза. Кроме того, витамин Е (α -токоферол) и витамин С (аскорбиновая кислота) участвуют в защите фагоцитов от атаки радикалов. Общая схема продукции АФК в фагоцитах приведена на рис. 8.

Мы рассмотрели последовательность образования АФК при активации фагоцитов. Кроме того, можно наблюдать спонтанную генерацию АФК клетками, что отражает исходное состояние метаболических процессов. Вероятно, некоторое количество АФК образуется как

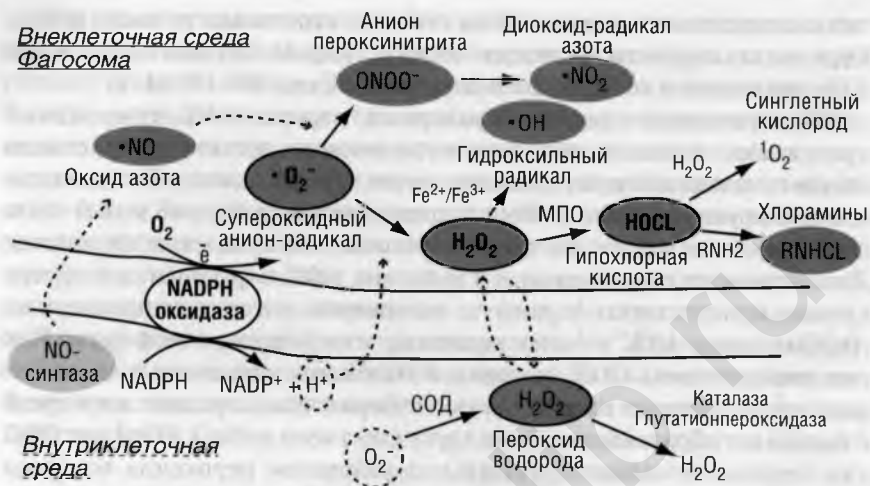


Рис. 8. Схематическое представление суммарной картины окислительного метаболизма полиморфноядерных лейкоцитов во время респираторного взрыва. СOD — супероксиддисмутаза; МПО — миелопероксидаза

побочный продукт энергетического метаболизма клетки. Другим источником может быть NADPH-оксидаза, так как ее ингибиторы полностью подавляют спонтанную продукцию АФК.

1.8. NADPH-ОКСИДАЗА ФАГОЦИТОВ

NADPH-оксидаза — комплекс мембранных и цитозольных белков, который формируется при активации клетки. В покоящейся клетке фермент находится в диссоциированном состоянии. Ядром фермента служит локализованный в цитоплазматической мембране цитохром b558, состоящий из белка с молекулярной массой 22 кДа ($p22^{\text{phox}}$) и гликопротеина с молекулярной массой 91 кДа ($gp91^{\text{phox}}$) в молярном отношении 1:1. (Общепринятое сокращение «phox» образовано от «*phagocyte oxidase*» и обозначает причастность к NADPH-оксидазе фагоцитов.) Часто в качестве мембранного компонента также рассматривают малый ГТФ-связывающий белок Rap1a. Цитозольные компоненты NADPH-оксидазы представлены белками $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ и $p40^{\text{phox}}$. Кроме того, малый ГТФ-связывающий белок Rac2, принадлежащий к семейству Rho, принимает участие в сборке и активации комплекса.

Все компоненты NADPH-оксидазы человека очищены, клонированы, определена их аминокислотная последовательность. Оценку роли компонентов в функционировании комплекса первоначально проводили на основании нарушений, выявляемых у больных хроническим гранулематозом. Это заболевание возникает при мутации одного из четырех генов, кодирующих субъединицы NADPH-оксидазы фагоцитов, в результате чего наблюдается отсутствие или низкий уровень ферментативной активности. Заболевание характеризуется значительным понижением или отсутствием генерации АФК фагоцитами. Идентифицировано более 410 вариантов мутаций при хроническом гранулематозе. В последние годы появились подробные обзоры, посвященные различным аспектам структурной организации и функционированию NADPH-оксидазы фагоцитов (Vignais P.V., 2002; Bedard K., Krause K.-H., 2007; El-Benna J. et al., 2009). Мы же приводим общие сведения, чтобы ввести терминологию, необходимую для дальнейшего изложения.

Цитохром b_{558}

Мембранные компоненты $p22^{phox}$ и $gp91^{phox}$ являются α - и β -субъединицами флавоцитохрома b_{558} соответственно. Название «флавоцитохром b_{558} » было дано по максимуму длины волны поглощения, который составляет 558 мкм. Встречается также другое название: флавоцитохром b_{245} , данное по нормальному восстановительному потенциалу, который составляет -245 мВ.

В нейтрофилах человека компонент $gp91^{phox}$ является продуктом гена *CYBB*, X-хромосома, локус Xp21.1. Он состоит из 570 аминокислот, имеет 6 трансмембранных α -цепей, на экстраклеточных петлях присутствуют 3 участка гликозилирования (Asn132, Asn149, Asn240). Внутриклеточный С-конец имеет места связывания для NADPH, ФАД и два участка для взаимодействия с $p67^{phox}$, регуляторной субъединицей NADPH-оксидазы. Предполагают, что III-й и V-й трансмембранные фрагменты связывают два гема (Vignais P.V., 2002). Роль данного компонента — перенос электрона от NADPH на молекулярный кислород в электронно-транспортной цепи с образованием супероксид-анион радикала. Субъединица $gp91^{phox}$ обнаружена также в мембранах специфических гранул и секреторных везикул, что способствует увеличению пула компонента при образовании фаголизосомы.

Субъединица $p22^{phox}$, продукт гена *CYBA*, имеющего локализацию 16p24, включает 3 трансмембранных домена и С-конец, обогащенный

пролином, который взаимодействует с SH3 доменами субъединицы p47^{phox} при сборке ферментного комплекса. Показано, что функция данной субъединицы состоит в регуляции активации NADPH-оксидазы и привлечении цитозольных компонентов, однако цитохром b558 способен переносить электрон в отсутствии цитоплазматических компонентов.

Цитозольные факторы p47^{phox}, p67^{phox} и p40^{phox}

Субъединицы NADPH-оксидазы p47^{phox}, p67^{phox} и p40^{phox} в покоящейся клетке образуют комплекс в цитоплазме, который поддерживается благодаря специфическим белок-белковым взаимодействиям.

Субъединица p47^{phox}, называемая «организующей субъединицей», продукт гена NCF1 (локализация 7q11.23), включает 390 аминокислотных остатков, организованных в несколько специфических доменов, обеспечивающих взаимодействия белок-белок и/или белок-фосфоинозитид. N-концевая область молекулы p47^{phox} содержит PX домен (домен гомологии с phox белками), тандем из двух SH3 доменов (домены Src гомологии 3). Находящиеся в этой области Ala152 и Thr153 являются критическими для активации оксидазы (Taura M. et al., 2009). C-конец молекулы содержит полиосновную область, богатую остатками аргинина и лизина, с включением домена, обогащенного пролином (PR). Взаимодействие тандема SH3 доменов с полиосновной областью и PX доменом обеспечивает аутоингибирование комплекса в покоящейся клетке.

Компонент NADPH-оксидазы p67^{phox}, называемый «активирующей субъединицей», в геноме человека кодируется геном NCF2, локализация — 1q25. Он состоит из 526 аминокислотных остатков, которые образуют четыре домена, содержащих тетратрикопептидные повторы (TPR 1-4), домен PR, два домена SH3, разделенных доменом PB1 (домен гомологии с белками phox и Bem1).

Субъединица p40^{phox} в течение продолжительного времени оставалась наименее изученной. Хотя ее структура была установлена, роль в активации NADPH-оксидазы оставалась спорной, ей приписывали и ингибирующее, и активирующее действие. Компонент p40^{phox} является продуктом гена NCF4, локализация — 22q13.1, состоит из 339 аминокислотных остатков. В структуре молекулы выделяют домены: PX, SH3 и PB1. В настоящее время установлено, что в покоящейся клетке белок находится в состоянии аутоингибирования, подобно субъединице p47^{phox}. Внутримолекулярное взаимодействие доменов PX и PB1 защищает белок от взаимодействия с фосфатидилинозит-3-фосфатом

без стимуляции клетки (Ueyama T. et al., 2007). Авторы рассматривают оба белка $p40^{phox}$ и $p47^{phox}$ как белки-переносчики для $p67^{phox}$ («carrier proteins»), которые регулируются снятием маскировки доменов для взаимодействия с мембраной.

Субъединицы $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$ удерживаются в комплексе взаимодействием $p67^{phox}$ через SH3 домен с собственным PR доменом и PR доменом субъединицы $p47^{phox}$. Также домен PB1 субъединицы $p67^{phox}$ взаимодействует с доменом PB1 субъединицы $p40^{phox}$ (домен PB1 в структуре $p40^{phox}$ также обозначают как PC — домен гомологии с белками rhox и Cdc). Указанные консервативные взаимодействия поддерживают стабильное состояние комплекса в покое клетки (рис. 9).

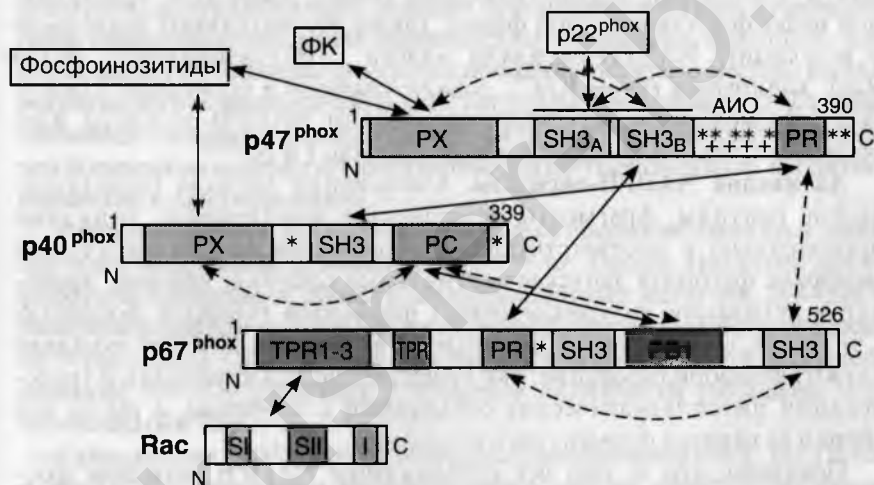


Рис. 9. Возможные взаимодействия цитозольных компонентов NADPH оксидазы фагоцитов человека:

ФК — фосфатидная кислота; АИО — аутоингибиторная область; PR — полипролиновый мотив; SH3 — домен Src гомологии 3; TPR — тетратрикопептидный повтор; PX — домен гомологии с rhox белками; PB1, PC — домен гомологии с rhox и Vem1, rhox и Cdc белками. Знаками «+» показана полиосновная область в белке $p47^{phox}$; * — участки фосфорилирования; цифры — длина аминокислотной последовательности; стрелки — взаимодействия между специфическими участками трех цитозольных компонентов NADPH оксидазы ($phox$ -белки), которые были показаны экспериментально (пунктирные и сплошные — в покоей и активированной клетке соответственно). Между малым ГТФ-связывающим белком Rac и $p67^{phox}$ возникает множество водородных связей. SI и SII в белке Rac обозначают области 'switch I' и 'switch II' и I — вставную область «insert region». Составлено по [Vignais, 2002; Ueyama et al., 2007]

ГТФ-связывающие белки

Важную роль в сборке и регуляции активности NADPH-оксидазы отводят малым ГТФ-связывающим белкам семейства Rho. Большое внимание уделено белку **Rac2**, у человека он кодируется геном **RAC2**, локализация — 22q13.1. В покоящейся клетке белок **Rac2** находится в цитоплазме и сохраняется в форме, недоступной для взаимодействия вследствие связи с белком **GDI** (*GDP-dissociation inhibitor* — ингибитор диссоциации ГДФ). Это препятствует обмену ГДФ на ГТФ, что необходимо для активации белка. При этом адапторный белок **GEF** (*Guanine-nucleotide Exchange Factor* — фактор обмена гуаниновых нуклеотидов), осуществляющий обмен, находится в неактивной нефосфорилированной форме. Также рассматривают вовлечение в регуляцию NADPH-оксидазы малого ГТФ-связывающего белка **Rac1**, кодируется геном **RAC1**, локализованном в хромосоме 7 (локус 7p22). Возможности регуляции активности NADPH-оксидазы **Rac1** были показаны в химерных конструктах **Rac 1** и **p67^{phox}**.

Активация NADPH-оксидазы. Связывание лиганда (хемотаксические пептиды, фрагменты компонентов комплемента, липидные производные) с соответствующим рецептором на плазматической мембране фагоцита запускает сигнальные события, которые приводят к активации внутриклеточных ферментов (киназ и фосфатаз). Считается, что основным механизмом активации NADPH-оксидазы служит фосфорилирование, оно существенно для активации и транслокации цитоплазматических субъединиц к мембране, а также для сборки активного ферментного комплекса.

Показано, что *in vitro* все субъединицы NADPH оксидазы фосфорилируются, для многих актов фосфорилирования установлена функциональная значимость. По данным литературы, (Raad H. et al., 2009) субъединица **gp91^{phox}** фосфорилируется протеинкиназой C по Ser333, Thr509, Ser550, что усиливает каталитическую активность NADPH-оксидазы и способствует сборке ферментного комплекса. Остается неустановленной функциональная значимость фосфорилирования **p22^{phox}** по Thr132 и Thr147 традиционными изоформами протеинкиназы C и протеинкиназой, активируемой фосфатидной кислотой (PA-activated kinase).

Субъединица **p47^{phox}** подвергается множественному фосфорилированию C-концевой полиосновной области, обнаружено 11 сайтов фосфорилирования остатков серина в этой области: 303, 304, 310,

315, 320, 328, 345, 348, 359, 370 и 379. Фосфорилирование осуществляют протеинкиназа С (*in vitro* всеми изоформами; *in vivo* преимущественно протеинкиназа С (изоформы β , δ и ζ), Akt/ протеинкиназа В (слабо), протеинкиназа А, p38МАРК, ERK1/2 и РАК (p21-activated kinase — киназа, активируемая белком p21Rac), СК 2 (casein kinase 2 — казеин-зависимая киназа 2). Фосфорилирование по Ser303, Ser304, Ser328 протеинкиназой С приводит к демаскированию аутоингибиторного SH3 домена для взаимодействия с субъединицей p22^{phox}. Киназа, активируемая белком p21Rac, также фосфорилирует указанные остатки и Ser320, регулируя активность NADPH-оксидазы. Фосфорилирование по Ser345, осуществляемое ERK1/2 или p38МАРК, функционально значимо для праймирования продукции АФК гранулоцит-макрофаг колониестимулирующим фактором или ФНО- α соответственно. Фосфорилирование остатков Ser208, Ser283, Ser348 казеин-зависимой киназой 2 регулирует деактивацию NADPH-оксидазы. Фосфорилирование Ser304 и Ser328 Akt/протеинкиназой В частично опосредует активацию NADPH-оксидазы и, вероятно, вовлечено в праймирование.

В ответ нейтрофилов на fMLF, РМА или опсонизированный зимозан вовлечено фосфорилирование p67^{phox} по Thr233. Показано также фосфорилирование в области аминокислотных остатков 244–526 с участием p38МАРК и ERK1/2, функциональная значимость которого не установлена. Обнаружено, что фосфорилирование РАК в области остатков 193–526 участвует в контроле активности оксидазы, осуществляемым Rac.

Субъединица p40^{phox} фосфорилируется протеинкиназой С по Thr154 и Ser315. По окончании респираторного взрыва p40^{phox} дефосфорилируется. Предполагают, что фосфорилированный остаток Thr154 действует как ингибитор оксидазы, а нефосфорилированный — как активатор. Однако в работе Ueyama T. et al. (2007) не была подтверждена значимость фосфорилирования p40^{phox} для динамики сборки ферментного комплекса. Таким образом, вопрос о роли фосфорилирования в регуляции данной субъединицы остается спорным.

Что касается малых ГТФ-связывающих белков, участвующих в регуляции активности NADPH-оксидазы, то для активации Rac2 необходимо фосфорилирование обменного фактора гуаниновых нуклеотидов Vav1 по остатку тирозина Tyr174 тирозиновой протеинкиназой Syc1. Также перераспределение обменного фактора P-Rex1 в клетке активируется тирозиновым фосфорилированием, тогда как его

фосфорилирование протеинкиназой А приводит к ингибированию транслокации. Фосфорилирование **Rap1A** протеинкиназой С активирует транслокацию белка из специфических гранул, но фосфорилирование протеинкиназой А приводит к подавлению взаимодействия белка с цитохромом b_{558} .

Существует несколько моделей активации NADPH-оксидазы. Наиболее полная современная модель активации респираторного взрыва, опосредованной рецептором Fc γ , описана в работе Ueyama T. et al. (2007). Мы не будем останавливаться на описании моделей, но приведем общую последовательность событий, ведущих к активации NADPH-оксидазы. Связывание лиганда с рецептором на плазматической мембране фагоцита ведет к активации цитоплазматических тирозиновых и серин/треониновых протеинкиназ. Фосфорилирование $p47^{phox}$ снимает аутоингибирование белка, активирует транслокацию комплекса цитоплазматических субъединиц и его взаимодействие с цитохромом b_{558} . С помощью SH3 домена $p47^{phox}$ связывается с обогащенным пролином доменом $p22^{phox}$ и посредством PX домена с фосфоинозитидами мембраны. Кооперативность этих обязательных взаимодействий ведет к активации NADPH-оксидазы. Фосфорилирование по тирозину активирует фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, комплекс GDI/Rac2 распадается и происходит замена ГДФ на ГТФ. Rac2-ГТФ взаимодействует с $p67^{phox}$, связываясь с мотивом тетратрикопептидных повторов. Этот комплекс считается активатором $gp91^{phox}$ для генерации супероксида, $p67^{phox}$ прямо взаимодействует с $gp91^{phox}$. Двойной механизм регуляции NADPH оксидазы компонентом $p40^{phox}$ был показан с применением мутантных продуктов. Предполагается, что взаимодействие домена PX белка с актином цитоскелета стабилизирует NADPH-оксидазу в покоящейся клетке, тогда как связывание домена с фосфатидилинозит-3-фосфатом потенцирует продукцию супероксида при стимуляции, причем в обоих случаях необходимо взаимодействие данной субъединицы с $p67^{phox}$. В динамической последовательности сборки комплекса выделяют раннюю и позднюю фазы активации, соответствующие маскированному или «открытому» состоянию $p40^{phox}$ при взаимодействии с фосфатидилинозит-3-фосфатом плазматической мембраны (Ueyama T. et al., 2007). В двухшаговой модели максимальный уровень активации фермента достигается после того, как заякоренный в мембране Rac2 взаимодействует с $p67^{phox}$. Как последовательные этапы запуска продукции АФК также рассматриваются праймирование и активация, при которых праймированию соответствует состоя-

ние активации GEF и киназ, а активации — полная сборка комплекса из мембранных и цитоплазматических компонентов.

1.9. СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ NOX

В клетках разных тканей обнаружены гомологи gp91^{phox} фагоцитов человека. Они объединены в семейство белков NOX (*NADPH oxidases*). Описаны 5 представителей семейства: NOX-1, NOX-2 (NADPH-оксидаза фагоцитов), NOX-3, NOX-4, NOX-5. Кроме того, к данному семейству относят белки с двойной (оксидазной и пероксидазной) активностью — DUOX-1 и DUOX-2. Экспрессия p67^{phox} и p47^{phox} только частично коррелирует с экспрессией NOX.

Белки семейства NOX обнаружены в клетках организмов разных таксономических групп: от зеленых растений до нематод и млекопитающих. В настоящее время проведена систематизация белков семейства NOX и их регуляторных белков, установлены альтернативные наименования, хромосомная локализация, аминокислотная последовательность, общее количество однонуклеотидного полиморфизма и др. (по Bedard K., Krause K.-H., 2007). Проведен всесторонний анализ молекулярной эволюции и консервативных функций членов семейства NOX и DUOX, включая идентификацию консервативных аминокислотных остатков (Kawahara T. et al., 2007). Авторы считают, что наличие консервативных областей указывает на сохранение своей функции членами семейства в процессе биологической эволюции. Кроме того, прослежена молекулярная эволюция регуляторных субъединиц, что привело к выводу об их высокой консервативности.

Общим свойством белков семейства NOX считают способность продуцировать АФК. Степень гомологии между белками семейства оценивают в 20–60% (Kawahara T. et al., 2007). С-концевая область всех NOX белков имеет участки связывания NADPH и ФАД, трансмембранные домены — участки связывания гемов. В N-концевой внутриклеточной области NOX-5 есть так называемая структура «finger» для связывания ионов Ca²⁺. Такая структура также присутствует в белках DUOX-1 и DUOX-2 между основной частью молекулы и экстраклеточным доменом с пероксидазной активностью. Наличие такого домена указывает на возможность регуляции активности белка ионами Ca²⁺, т.е. на зависимость активности от внутриклеточной концентрации свободного Ca²⁺.

В настоящее время механизмы активации и регуляции активности NOX белков, за исключением NOX-2, охарактеризованы весьма фрагментарно. Показано, что регуляторная субъединица NADPH-оксидазы фагоцитов p47^{phox} в условиях *in vitro* взаимодействует также с NOX-1 и NOX-3, которые образуют мембранный комплекс с p22^{phox}. Выявлены регуляторные белки для NOX-1: p41^{nox} (или NOXO1 — «организующая субъединица», аналог p47^{phox}) и p51^{nox} (или NOXA1 — «активирующая субъединица», аналог p67^{phox}). Присутствие третьего компонента p40^{phox} (или его аналога) остается под вопросом. В структуре p41^{nox} отсутствует полиосновная область, вследствие чего не реализуется механизм аутоингибирования, поэтому фермент активен конститутивно. Другие консервативные взаимодействия в структуре ферментного комплекса сохраняются. Субъединицы p41^{nox} и p51^{nox} могут регулировать также активность NOX-3. Определена только частичная корреляция между экспрессией NOX и регуляторных субъединиц. Считается, что NOX-4 активирована конститутивно и не требует стимуляции. Активность NOX-4, по крайней мере частично, регулируется на уровне mRNA: в гладкомышечных клетках сосудов транскрипционный фактор E2F является позитивным регулятором транскрипции NOX-4. Активность NOX-5, DUOX-1 и DUOX-2 регулируется Ca²⁺, взаимодействие с регуляторными субъединицами, в том числе с p22^{phox}, не установлено. Относительно зависимости от малых G-белков известно, что в регуляции активности NOX-1, NOX-2 и NOX-3 участвуют Ras белки, активация которых опосредована факторами обмена гуаниновых нуклеотидов: Vav-1 и P-Rex-1 для NOX-2 (NADPH-оксидаза фагоцитов) и β-PIX — для NOX-1. Считается, что NOX-4 и NOX-5 не зависят от Ras.

Локализация белков NOX в клетке

Установлено, что белок NOX-2 в фагоцитах локализован во внутриклеточных везикулах, в плазматической мембране, фагосомах, фаголизосомах; в эндотелиальных и мышечных клетках сосудов — в плазматической мембране, ядре и эндоплазматическом ретикулуме. Кроме того, белок NOX-2 определен в перинуклеарной области эндотелиальных клеток в покое; в негематопоэтических клетках — в везикулах, ассоциированных с эндоплазматическим ретикуломом, которые сливаются с плазматической мембраной при активации клетки. Определено, что белок NOX-1 локализован в поверхностных доменах мышечных клеток, NOX-4 — в локусах адгезии и мембра-

нах внутриклеточных органелл. Белки с двойной активностью DUOX-1/2, присутствующие в тироцитах, локализованы преимущественно в эндоплазматическом ретикулууме.

1.10. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА NOX В ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЕ

Роль NADPH-оксидаз в физиологических процессах, включая репродуктивные, у человека рассмотрена в подробном обзоре литературы (Bedard K. and Krause K.-H., 2007). Есть сведения, что активность, отнесенная к NADPH-оксидазе, и белки семейства NOX присутствуют в различных отделах женской репродуктивной системы вне беременности и во время нее, и АФК участвуют в регуляции ее функций (рис. 10). Например, в матке экспрессируется мРНК гомолога NADPH-оксидазы фагоцитов Mox-1 (NOX-1, согласно современной классификации), но не мРНК оксидазы лейкоцитов периферической крови (NOX-2).



Рис. 10. Физиологическая значимость белков семейства NOX и продуцируемых ими АФК в регуляции функций клеток репродуктивной системы человека

Кроме того, в матке экспрессируется DUOX-2 — оксидаза с двойной (оксидазной и пероксидазной) специфичностью. Экспрессия NOX-2, NOX-4 и NOX-5 выявлена в яичниках.

В плаценте человека NADPH-оксидаза впервые идентифицирована цитохимическими методами в синцитиотрофобласте при своевременных родах. Электронноплотные преципитаты, указывающие на активность NADPH-оксидазы, зарегистрированы на микроворсинчатых мембранах плацент, особенно на поверхности плазматической мембраны микроворсинок синцитиотрофобласта после 25 нед гестации (Matsubara S. and Sato I., 2001). Фермент был солюбилизирован и охарактеризован по биохимическим параметрам. Он состоит из субъединиц с молекулярными массами 58 кДа и 33 кДа. Его свойства явно отличаются от свойств NADPH-оксидазы мигрирующих нейтрофилов и макрофагов (Manes S., 2001). Автор данной работы также установил, что в трофобласте присутствует постоянная (конститутивная) ферментативная активность, которая служит источником АФК в области контакта «плод-мать». Так впервые была охарактеризована NOX-1 в плаценте. Позже определена локализация NOX-1 в мембранных структурах клеток, в нормальной плаценте белок NOX-1 обнаруживают в синцитиотрофобласте, в эндотелии сосудов ворсин и в некоторых стромальных клетках (Cui X. et al., 2006). Плацентарные макрофаги, клетки Хофбауэра, экспрессируют субъединицы NADPH-оксидазы фагоцитов (NOX-2) (Myatt L. and Cui X., 2004). В этой же работе приведены сведения, что NOX-3 экспрессируется в тканях плода, NOX-4 — не только в плодных тканях, но и в плаценте, NOX-5 — в различных фетальных тканях, а также в селезенке взрослых и матке. Фермент с двойной активностью DUOX-1 также экспрессируется в плаценте. В клетках нормальной плаценты определена экспрессия регуляторных субъединиц $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$ и $p67^{\text{phox}}$, она была более высокой в плацентах женщин с гестозом (Dechend R. et al., 2003).

В плаценте человека при нормальных своевременных родах присутствует высокая базальная активность NADPH-оксидазы, которая почти в 3 раза выше на ранних сроках. Также наблюдается более высокая общая антиоксидантная емкость, включая тканевую концентрацию глутатиона и глутатион-S-трансферазную активность, по сравнению с соответствующими значениями в плаценте после своевременных родов. Опосредованную NADPH-оксидазой генерацию супероксида относят к важным модуляторам антиоксидантной защиты на ранних сроках беременности (Raijmakers M.T. et al., 2006).

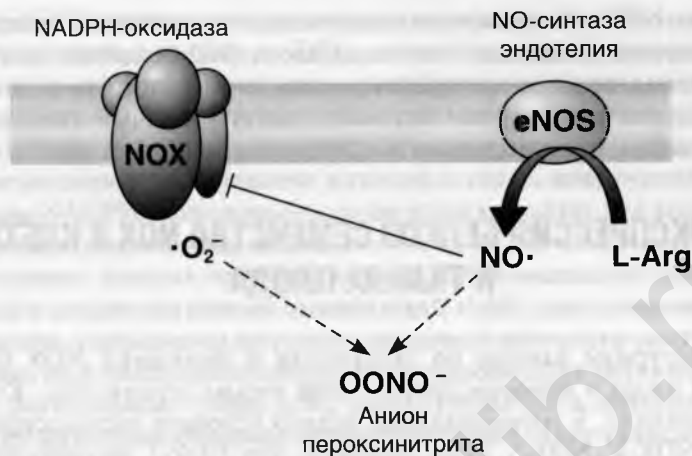


Рис. 11. Фактор расслабления сосудов и ингибитор активности белков семейства NOX — оксид азота ($NO\cdot$), производимый NO-синтазой.

Чрезмерная активация NADPH-оксидазы клеток эндотелия приводит к избыточной продукции супероксида ($\cdot O_2^-$) и его взаимодействию с $NO\cdot$, приводящему к понижению концентрации $NO\cdot$ и образованию пероксинитрита

Ангиогенные и ангиорегуляторные процессы, в которых NADPH-оксидазы принимают активное участие, играют важную роль в функционировании женской репродуктивной системы (например, в регуляции менструального цикла или в формировании децидуальной оболочки матки). Считают, что установление материнского кровообращения в плаценте сопровождается взрывом окислительного стресса, что может играть физиологическую роль для стимуляции дифференцировки, но может стать фактором патогенеза гестоза при недостаточной емкости антиоксидантных систем. Белки семейства NOX экспрессируются в клетках сосудов (по Bedard K., Krause K.-H., 2007):

- NOX-2 — в адвентициальных фибробластах аорты (активация ангиотензином II), в эндотелиальных клетках больших сосудов (активация ФНО- α , ангиотензином II, фактором роста эндотелия сосудов), в гладкомышечных клетках артерий;
- NOX-1 — в гладкомышечных клетках сосудов;
- NOX-4 — в эндотелии и гладкой мускулатуре кровеносных сосудов.

В клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов NOX-4 обеспечивает поддержание дифференцированного фенотипа мышечных клеток (Xiao Q. et al., 2009). В физиологических условиях белки

семейства NOX обеспечивают поддержание нормального артериального давления. Показано, что оксид азота (NO) является фактором расслабления сосудов, который производит NO-синтаза эндотелия. Тонус сосудов регулируется балансом между уровнями оксида азота и супероксида, производимого NADPH-оксидазой (рис. 11).

1.11. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА NOX В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ ПЛОДА

Литературные данные по экспрессии и функциям NOX белков в тканях плода и новорожденных детей весьма ограничены. Как мы уже упоминали, в эмбриональных тканях человека экспрессируются NOX-3, NOX-4, NOX-5. Есть сведения, что NOX-3 экспрессируется в почке, селезенке плода, костных тканях черепа и клетках головного мозга, NOX-5 — в различных тканях плода. В тимусе плода была определена $gp91^{phox}$ мРНК. Экспрессия DUOX-1 вовлечена в функциональную дифференцировку клеток эпителия легких плода, она значительно усиливается незадолго перед родами (Fischer H. et al., 2007). Авторы предполагают, что таким образом слизистая оболочка легких плода подготавливается к встрече с патогенами вне матки. Существуют отличия в экспрессии субъединиц оксидазы в клетках новорожденного и взрослого человека. Показано, что в нейтрофилах пуповинной крови, где функционирует NOX-2, наблюдается увеличенное содержание цитохрома b_{558} в плазматической мембране и пониженный уровень цитозольных компонентов $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$ по сравнению с клетками взрослого человека (Chudgar U.H. et al., 2005).

Выявлены 4 сплайс-формы NOXO1 человека: NOXO1 β является мажорной мРНК сплайс-формой в кишечнике человека и печени плода, тогда как NOXO1 γ была мажорным видом в яйчке.

1.12. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ NADPH-ОКСИДАЗ

Функция белков семейства NOX, состоит главным образом, в генерации АФК, которые могут играть различную роль в жизни клетки. Следует отметить, что в работах по исследованию роли АФК в биологических процессах обращают особое внимание на их источник.

Роль NADPH-оксидаз определяется при использовании ингибиторов (дифенилиод хлорид — DPI, апоцинин, 4-(2-аминоэтил) бензенсульфонилфторид, неоптерин, ингибиторные пептиды), антител к субъединицам фермента, животных с удаленными генами (*knock-out animals*). Первоначально хронический гранулематоз — заболевание, которое развивается вследствие мутаций в генах, кодирующих субъединицы NADPH-оксидазы, — дал богатый материал для выяснения роли фермента и его субъединиц.

Наиболее хорошо изучена роль NADPH-оксидазы фагоцитов (NOX-2) в защите организма от инфекций. АФК, продуцируемые при фагоцитозе, направлены не только на непосредственную деструкцию патогена, но и на создание оптимальных условий для активации протеаз в фаголизосоме (Segal A.W., 2005). Кроме того, электрогенный характер функционирования фермента создает сдвиг трансмембранного потенциала, что приводит к активации и/или инаktivации ионных каналов. Существует интересная интерпретация взаимозависимости активности NADPH-оксидазы и внутриклеточной концентрации Ca^{2+} : благодаря электрогенному характеру функционирования NADPH-оксидазы ограничивает агрессию фагоцитов, регулируя уровень Ca^{2+} в клетке. Участие NADPH-оксидаз в регуляции функций клеток и в воспалительных процессах разной этиологии рассмотрено в обзорах (например, Bedard K., Krause K.-H., 2007; El-Benna J. et al., 2009). Следует отметить, что активность NADPH-оксидазы — необходимое условие разрешения воспаления, так как АФК служат критическим фактором для активации спонтанного или вызванного бактериями апоптоза клеток-участников воспаления. Существуют также данные, что NADPH-оксидазы служат в качестве компонентов сенсоров кислорода (Cui X.-L. et al., 2006). Важная функция NOX белков — поддержание необходимой концентрации АФК как сигнальных молекул, что обсуждалось в разделе 1.5.

В макрофагах плаценты, клетках Хофбауэра, как и в макрофагах, присутствующих в других органах, NOX-2 выполняет защитную функцию. Защитные свойства приписывают также NADPH-оксидазе в трофобластах (Matsubara S., Sato I., 2001).

Результаты, подтверждающие важную роль NADPH-оксидаз как ферментов, продуцирующих АФК, и СОД как наиболее быстро реагирующих на окислительный стресс ферментов в физиологии репродуктивной системы, обобщены в обзоре N. Sugino (2007). Вероятно, АФК и СОД (в дополнение к стероидным гормонам яичников, цитокинам,

факторам роста и эйкозаноидам) вовлечены в регуляцию функций эндометрия человека и действуют в качестве локальных регуляторов. Они участвуют в таких процессах, как менструация и формирование децидуальной оболочки.

Предполагают, что продуцируемые клетками плаценты АФК вовлечены в развитие и дифференцировку, так как в плаценте человека при нормальных своевременных родах отмечается высокая базальная активность NADPH-оксидазы, на ранних сроках беременности она выше почти в 3 раза (Raaijmakers M.T. et al., 2006). Опосредованную NADPH-оксидазой генерацию супероксида считают важным модулятором антиоксидантной защиты на ранних сроках беременности. Она вовлечена в экспрессию антиоксидантных генов, а также в восприятие кислорода в плаценте (см. рис. 10).

Раннее плацентарное развитие характеризуется быстрой дифференцировкой и миграцией клеток, ремоделированием матрикса. Супероксид вовлечен в сигнальные пути, регулирующие эти процессы. Вероятно, основным источником супероксида служит NADPH-оксидаза. Считают, что ферментативная активность NADPH-оксидазы, конститутивная в трофобласте в области контакта «плод-мать», является источником АФК, необходимых для роста и развития клеток (Manes C., 2001; Matsubara S., Sato I., 2001).

Ферменты с двойной специфичностью DUOX-1/2, активность которых связана с выбросом пероксида водорода и созданием кислого pH, как известно, вовлечены в защиту от инфекций слизистых оболочек разных органов (кишечник, матка, слюнные железы и др.). Показано, что незадолго до родов повышенная экспрессия DUOX-1 способствует созреванию клеток слизистой оболочки легких плода, что повышает устойчивость к легочным инфекциям в условиях окружающей среды вне матки (Fischer H. et al., 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Избыточное количество АФК вследствие дисбаланса между их образованием и удалением — основной признак оксидативного стресса. Последний вносит значимый вклад в патогенез заболеваний человека, в основе которых (или их осложнений) лежит повреждение биологических молекул. Кроме того, оксидативный стресс опасен тем, что он вызывает нарушения в восприятии и передаче сигнала вследствие

участия АФК в качестве сигнальных молекул в трансдукции сигнала с рецепторов и в регуляции активности определенных ферментов.

Возникновение и развитие осложнений беременности и послеродового периода связано с оксидативным стрессом, имеющим системный или локальный характер. АФК экзогенного и эндогенного происхождения могут действовать на структурные и функциональные компоненты репродуктивной системы. Общее свойство АФК — зависимость их действия от концентрации: в низких концентрациях они обладают митогенным действием и усиливают пролиферацию клеток; в более высоких концентрациях — способствуют прекращению роста или старению; в высоких дозах — запускают клеточную смерть через апоптоз или некроз.

Системы генерации и удаления АФК играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетке. Основными источниками АФК служат электронно-транспортные цепи митохондрий, эндоплазматического ретикулаума и NADPH-оксидазы (NOX). Для защиты от АФК в высоких концентрациях в клетках есть специализированные ферментные и неферментные антиоксидантные системы.

При снижении физиологического уровня АФК происходят изменения, приводящие к нарушению пролиферации клеток и защиты организма от инфекций. При повышении уровня АФК могут происходить события, приводящие к усилению процессов старения или к смерти клетки. Увеличенная продукция АФК приводит к случайным повреждениям белков, липидов, ДНК и окислительному стрессу. При нормальном функционировании клетки скорости продукции и удаления АФК относительно постоянны и сбалансированы. Механизм поддержания окислительно-восстановительного баланса основан на запуске сигнального каскада, чувствительного к АФК, что приводит к увеличению экспрессии антиоксидантных ферментов. Запуск окислительно-восстановительной сигнализации происходит при нарушении баланса либо при увеличении концентрации АФК.

Хронический метаболический сдвиг, возникающий в результате устойчивого дисбаланса между оксидантами и антиоксидантами (оксидативный стресс), активирует множество сигнальных каскадов, что изменяет экспрессию генов и впоследствии влияет на способность клеток к выживанию. Развитие беременности приводит к оксидативному стрессу из-за усиления метаболической активности организма, при преэклампсии он может быть связан с активацией нейтрофилов.

Избыточная продукция АФК при оксидативном стрессе приводит к окислительному повреждению липидов, белков, углеводов, ДНК, которые могут иметь необратимый характер. Клеточная мембрана и рецепторы на поверхности клетки — первые мишени повреждающего действия АФК. При окислительном стрессе активируется множество сигнальных каскадов, участвующих в регуляции клеточного роста, пролиферации и выживания, а также адгезии и миграции, но в ситуации сильного окислительного стресса — в активации проапоптотических путей.

Генерация АФК характеризуется реакцией, получившей образное название «респираторный взрыв». Наиболее яркое проявление метаболического сдвига в активированных фагоцитах — резкое увеличение расхода глюкозы. Фермент, ответственный за респираторный взрыв — NADPH-оксидаза. При ее активации внеклеточный кислород превращается в супероксид-анион радикал ($\cdot\text{O}_2^-$), что сопровождается окислением цитозольного NADPH, продуцируемого при активации гексозомонофосфатного шунта.

Образующиеся при респираторном взрыве АФК повреждают нуклеиновые кислоты, обладают мутагенным и летальным действием на клетки, инициируют реакции перекисного окисления липидов, инактивируют ферменты. АФК действуют не только на клетки-мишени, но на сами фагоциты. Для защиты от избыточного количества АФК в клетке есть ферменты (СОД, каталаза), активность которых направлена на трансмутацию высокореактивных форм в менее активные или неактивные.

Связывание лиганда (хемотаксические пептиды, фрагменты компонентов комплемента, липидные производные) с соответствующим рецептором на плазматической мембране фагоцита запускает сигнальные события, которые приводят к активации внутриклеточных ферментов (киназ и фосфатаз). Основным механизмом активации NADPH-оксидазы — фосфорилирование. При активации происходит сборка ферментного комплекса из мембранных и цитоплазматических компонентов.

Активность, отнесенная к NADPH-оксидазе, и белки семейства NOX присутствуют в различных отделах женской репродуктивной системы вне беременности и во время нее, а АФК участвуют в регуляции ее функций. В трофобласте присутствует постоянная (конститутивная) ферментативная активность, которая служит источником АФК в области контакта «плод-мать». Ангиогенные и ангиорегуляторные

процессы, в которых NADPH-оксидазы принимают активное участие, играют важную роль в функционировании женской репродуктивной системы (например, в регуляции менструального цикла или в формировании децидуальной оболочки матки). Считают, что установление материнского кровообращения в плаценте сопровождается взрывом окислительного стресса, что может играть физиологическую роль для стимуляции дифференцировки, но может стать фактором патогенеза преэклампсии при недостаточной емкости антиоксидантных систем. Тонус сосудов регулируется балансом между уровнями оксида азота и супероксида, производимого NADPH-оксидазой.

Глава 2

Физиологическое течение беременности: роль факторов врожденного иммунитета

2.1. ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ СТАНОВЛЕНИЮ И РАЗВИТИЮ БЕРЕМЕННОСТИ

Важную роль в репродуктивном процессе играют иммунологические реакции, находящиеся под регуляторным воздействием гипофизарных гонадотропинов и половых гормонов. **Беременность — динамический процесс, при котором происходит адаптация иммунной, сосудистой и гормональной систем матери.** При беременности прерывается менструальный цикл и создается локальное гипоксическое окружение, пригодное для плацентации и развития эмбриона и плода.

Плод, являющийся по сути полуаллогенным трансплантатом, при физиологически протекающей беременности не отторгается благодаря комплексу иммунологических механизмов, которые действуют в период гестации. Иммунологические изменения, происходящие от начала беременности и до 16 нед гестации, создают

благоприятный иммунологический фон для имплантации зародыша, роста и созревания плаценты, а также органогенеза плода.

Обеспечивающая нормальное развитие и выживание плода специфическая перестройка материнского организма сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в иммунной системе беременной, которые индуцируют толерантность к антигенам плода. Реализация супрессии иммунной активности матери происходит в основном на уровне трофобласта и децидуальной ткани, так как плод сам прямо не контактирует с материнскими клетками, с децидуальной тканью матери взаимодействуют клетки трофобласта.

2.1.1. Факторы, контролирующие процесс имплантации

За физиологический обмен между развивающимся плодом и его матерью отвечает плацента — специализированный орган, при образовании которого включается серия событий, известных как имплантация. В ходе нее клетки фетального происхождения (трофобласт) внедряются в децидуальную ткань — модифицированный слой клеток материнского происхождения (эндометрий), выстилающий матку. Имплантация приводит к тесному контакту клеток плода и матери, генетически отличающихся друг от друга. Взаимоотношение плаценты и матки можно сравнить с таковым между трансплантированной тканью и организмом реципиента при клинической трансплантации. Однако при имплантации не действуют законы классической трансплантационной иммунологии, т.е. не развивается материнский Т-клеточный ответ на чужеродные антигены фетальной плаценты. Выявлена более сложная ситуация, поскольку на локальном уровне на имплантацию преимущественно влияет необычное иммунное окружение, в котором большее значение имеют естественные киллерные клетки (NK-клетки), а не Т-лимфоциты.

Трофобласт, представляющий периферическую часть зародыша человека, играет ключевую роль в имплантации и плацентации, происходящих в результате взаимодействия между фетальными и материнскими тканями с участием мембранных лигандов и рецепторов, гормонов и локально секретируемых факторов. Чтобы произошла имплантация бластоцисты, эндометрий должен превратиться в децидуальную ткань. В поздней фазе менструального цикла происходит модификация стромальных клеток эндометрия, желез и сосудов, а также изменение клеточного состава иммунных клеток независимо от присутствия бластоцисты в полости матки.

Экспрессия специфических молекул клеточной адгезии и эндокринных, паракринных, аутокринных сигналов способствует динамически сбалансированному уникальному процессу адгезии трофобласта к эндометрию во время имплантации и последующей его инвазии в материнскую ткань. Успех имплантации во многом зависит от синхронности обмена сигнальными молекулами между эмбрионом и матерью. Продуцируемые эндометрием, предимплантационным эмбрионом и развивающимся трофобластом цитокины и соответствующие рецепторы играют важную роль в материнско-фетальном общении. Необходимый для имплантации бластоцисты процесс общения между эмбрионом и маткой осуществляется взаимодействием между клетками трофобласта и эндометрием в ограниченный период времени, называемый «окном рецептивности» (20–24 дни менструального цикла).

Для успешной имплантации необходимо, чтобы эндометрий был готов к имплантации бластоцисты. Состояние восприимчивости матки (рецептивности эндометрия) продолжается 5–10 дней после овуляции. В ответ на сигналы, поступающие от эмбриона, в периферической крови матери появляются белки, специфические для беременности, и происходит серия морфологических, биохимических и иммунологических изменений в матке. Эти системные и локальные изменения считаются свидетельством «материнского распознавания беременности». Они первоначально зависят от присутствия эстрогенов и прогестерона, хотя в дальнейшем — от сигналов эмбриона и внедряющегося трофобласта. Вне этого периода апикальная поверхность эпителия покрывается толстым гликокаликсом, состоящим главным образом из муцина, в частности MUC-1, трансмембранного гликопротеина, характеризующегося наружным внеклеточным доменом, который предотвращает прилипание бластоцисты.

Этот процесс пробуждается прогестероном и регуляторными агентами, увеличивающими уровни циклического АМФ (цАМФ). Децидуализация продолжается в течение беременности, регулируя последующую инвазию трофобласта и образование плаценты путем изменения экспрессии регуляторных факторов, таких как металлопротеиназы, цитокины, поверхностные интегрины и молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Прилипание бластоцисты к стенке матки зависит от взаимодействия между такими молекулами, как селектин, интегрины и трофинины, экспрессированными на клетках трофобласта и эпителии матки.

Ключевая роль в контроле имплантации бластоцисты принадлежит эндометриальным хемокинам и цитокинам. Хемокины способствуют миграции лейкоцитов в децидуальную ткань и вызывают определенное воспалительное состояние. В этом процессе участвуют НК-клетки, взаимодействующие с неполиморфными антигенами I класса HLA, экспрессированными внедряющимся трофобластом. Кроме того, сигнальные агенты, секретируемые семенальными везикулами и железистой тканью простаты, взаимодействуют с эпителиальными клетками шейки матки и эндометрием, рекрутируя и активируя макрофаги, гранулоциты и ДК. Они играют роль в иммунорегуляции и ремодулировании тканей, что увеличивает рецептивность эндометрия. Трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β) и простагландины, присутствующие в семенной жидкости, участвуют в увеличении цитокиновой продукции и сосудистой проницаемости, что способствует привлечению и прилипанию бластоцисты к эндометрию. Хотя нормальная беременность — физиологический процесс, наблюдаемое на ранней стадии состояние воспаления в месте имплантации, а позже и системное, регулируются теми же цитокинами, которые участвуют в запуске воспаления, ведущего к различным осложнениям беременности. По мнению Lunghi L. и соавт. (2007), доминирующую в репродуктивной иммунологии в течение многих лет гипотезу о «Th-1/Th-2» сдвиге следует интерпретировать скорее как модуляцию экспрессии цитокинов, регулирующих сосудистые процессы плацентации, чем как специфический механизм подавления Т-клеточного механизма отторжения плода.

В свою очередь, трофобласт продуцирует паракринные сигналы, модулирующие экспрессию генов децидуальных стромальных клеток. Клетки становятся круглыми, ультраструктурно сходными с миофибробластами и эпителиальными клетками. Они освобождают пролактин, релаксин, ренин, специфические белки внеклеточного матрикса, ламинин и фибронектин, и белок, связывающий инсулин-подобный фактор роста (IGFBP-1). Определена корреляция между высвобождением белков и изменениями в экспрессии рецепторов стероидных гормонов и стероидного метаболизма, экспрессии ферментов, ростовых факторов и цитокинов, индукции модуляторов апоптоза и специфических транскрипционных факторов. Происходит удлинение спиральных артерий путем пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток с сохранением интегральной структуры сосудов.

Процесс имплантации представляет собой серию определенных событий, многие из которых сходны с таковыми воспалительной реакции и подвержены влиянию факторов, присутствующих в маточном микроокружении, которое включает гормоны, ростовые факторы, воспалительные и провоспалительные цитокины. Восприимчивость эндометрия к имплантирующейся бластоцисте формируется с участием инсулиноподобного фактора роста (ИФР-1 и -2), эпидермального фактора роста, основной формы фактора роста фибробластов, сосудистого эндотелиального ростового фактора, трансформирующих факторов роста. На ранних стадиях имплантации обнаружены фактор, ингибирующий лейкоз, интерлейкин-1 (ИЛ-1) и трансформирующие факторы роста α и β . Исследование влияния ИЛ-1 и ИЛ-6 на экспрессию некоторых молекул адгезии на клетках трофобласта человека в условиях *in vitro* показало, что эти цитокины стимулировали экспрессию рецепторов ламинина и коллагена (интегрины $\alpha 1$ и $\alpha 2$).

При имплантации важную роль играют факторы, определяющие первичную зону децидуализации (фактор роста фибробластов, фибронектин, ламинин, коллаген I, III, V типов, циклооксигеназа 2). В процессе имплантации участвуют следующие интегрины: $\alpha V\beta 3$, обладающий сродством к фибронектину; $\alpha 4\beta 1$ — к фибронектину и к VCAM-1; $\alpha 1\beta 1$ — к ламинину и коллагену. Факторы, участвующие в формировании вторичной зоны децидуализации (металлопротеиназы матрикса, их тканевые ингибиторы, активаторы и ингибиторы плазминогена, протеин, связывающий инсулиноподобный фактор роста 1, трансформирующий фактор роста β), важны для процесса инвазии.

Апоптоз (программированная клеточная гибель) железистых клеток в рецептивном эндометрии необходим для образования децидуальной ткани и имплантации. Клеточная гибель путем апоптоза в железистых клетках эндометрия совпадает по времени с окном имплантации, апоптотический феномен сопровождается снижением экспрессии Bcl-2, зависящей от постовуляторного снижения концентрации эстрадиола.

Индукция апоптоза в эндометрии имплантирующейся бластоцистой — возможный механизм, позволяющий эмбриону проникнуть через эпителиальный барьер перед тем, как он внедряется глубоко в строму. Считается, что апоптоз в эндометрии — необходимое условие успешной имплантации бластоцисты в течение имплантационного окна. Увеличенная экспрессия Вах и уменьшенная Bcl-2 создают предпосылки для индукции апоптоза в железистых клетках, что ассоциируется с началом децидуальной реакции стромы эндометрия.

После овуляции в эндометрии резко увеличивается количество НК-клеток, фенотипически и функционально отличающихся от циркулирующих. Они не обладают цитолитической активностью, экспрессируют интегрины, способствующие миграции и внедрению этих клеток в децидуализированный эндометрий. В результате децидуализации эндометрия создается уникальное микроокружение, играющее важную роль в приобретении специфичности децидуальными НК-клетками. Во второй половине беременности наблюдается снижение количества децидуальных НК-клеток вплоть до полного исчезновения к моменту родов. В связи с этим выдвинута гипотеза о том, что главная роль НК-клеток имеет отношение к ранней беременности, когда они модулируют имплантацию и плацентацию, взаимодействуя как с децидуальными стромальными клетками, так и с клетками трофобласта.

Показано, что рекрутирование децидуальных НК-клеток является материнской функцией, контролируемой гормонально и не зависящей от присутствия имплантирующегося эмбриона (Ordi J. et al., 2006). Выживание НК-клеток кажется зависимым от присутствия прогестерона, действие которого преимущественно не прямое, а обусловлено децидуальными стромальными клетками, экспрессирующими гормональные рецепторы. Показано, что глюкокортикоиды способны снижать количество децидуальных НК-клеток (Quenby S., Farquharson R., 2006).

Децидуализация характеризуется также снижением количества Th-1 и увеличением Th-2-лимфоцитов, эффект которых пробуждается прогестероном и цитокинами. Предполагают, что Th-2-цитокины защищают плод и трофобласт, угнетая НК-клеточную цитотоксическую активность и пролиферацию, производя сдвиг НК-клеточной цитокиновой продукции к Th-2 фенотипу и угнетая цитотоксическую активность Т-клеток.

2.1.2. Факторы, участвующие в контроле дифференцировки и функций трофобласта

Специализированные клеточные типы — синцитиотрофобласт и вневорсинчатый цитотрофобласт — происходят от стволовых клеток цитотрофобласта. Во время имплантации бластоцисты клетки цитотрофобласта сливаются, образуя наружный слой непролиферирующего многоядерного синцитиотрофобласта, растущего благодаря включению новых клеток цитотрофобласта. Важную роль в фето-материнском

обмене играет обладающий эндокринной функцией синцитиотрофобласт, который секретирует гормоны, участвующие в гомеостазе беременности, такие как ХГЧ и плацентарный лактоген.

Приблизительно на 14-й день имплантации цитотрофобластные клетки прорываются через слой синцитиотрофобласта. Начинается вторжение клеток вневорсинчатого цитотрофобласта в виде колонн трофобластных клеток в строму эндометрия, затем глубже в часть миометрия, которое производит глубокие изменения внутри маточных сосудов.

Дифференцировку цитотрофобласта контролируют различные агенты, такие как транскрипционные факторы, специфические гены, гормоны, ростовые факторы, цитокины и уровень O_2 .

Трансформирующий фактор роста β угнетает дифференцировку клеток, располагающихся вдоль пути инвазии при помощи эндоглина, компонента—рецепторного комплекса трансформирующего фактора роста β , тогда как ФНО- α редуцирует образование синцитиального цитотрофобласта. Инвазия вневорсинчатым цитотрофобластом эндометриальных сосудов становится очевидной с 8-й недели, тогда как инвазия сосудов миометрия начинается с 14-й недели.

Экспрессия ангиопоэтинов и их рецептора (Tie-2) наблюдается в течение ранней плацентации, что предполагает участие регуляторных факторов в ремоделировании сосудов и регулировании функции цитотрофобласта. Показано, что ангиопоэтины стимулируют пролиферацию и миграцию культивируемых цитотрофобластных клеток. Внедряющиеся цитотрофобластные клетки и НК-клетки способны освобождать вазоактивные молекулы. Вазодилататорами служат оксид азота и монооксид углерода, продуцируемый гемоксигеназой.

Взаимодействие между рецепторами НК-клеток (KIR) и молекулами I класса МНС (HLA-C, E и G) на клетках цитотрофобласта модифицирует цитокиновый репертуар НК-клеток и регулирует экспрессию молекул адгезии, а также функцию металлопротеиназ матрикса. Клетки интерстициального цитотрофобласта движутся к внутреннему миометрию, где сливаются и становятся гигантскими клетками плацентарного ложа. Так как эти многоядерные клетки теряют способность к миграции и инвазии, не исключено, что их образование представляет механизм, предотвращающий более глубокое проникновение трофобласта в стенку матки.

Внедряющиеся клетки цитотрофобласта увеличивают экспрессию белков, способствующих инвазии, включая матриксные металлопро-

теиназы, $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 1\beta 1$ -интегрины, VE-кадгерин и специфические трофобластные молекулы I класса HLA, которые, по-видимому, играют роль в предотвращении отторжения плода. Эти клетки снижают экспрессию молекул адгезии, таких как $\alpha 6\beta 4$ -интегрин или E-кадгерин, не относящихся к процессу инвазии, или регуляторных факторов, угнетающих клеточную инвазию.

Уровни O_2 влияют на клеточные функции вневорсинчатого цитотрофобласта, в частности на экспрессию некоторых транскрипционных факторов. Имплантацию бластоцисты, плацентацию и раннее развитие эмбриона до 10 нед гестации характеризуют относительно низкие уровни кислорода в окружающей среде. Низкие уровни O_2 стимулируют пролиферацию цитотрофобласта и угнетают дифференцировку вневорсинчатого цитотрофобласта и синцитиотрофобласта.

Гипоксия действует, модифицируя экспрессию генов или стабильность мРНК. Дифференцировку цитотрофобласта стимулирует фактор роста эндотелия сосудов, экспрессирующийся в децидуальных, цитотрофобластных и клетках вневорсинчатого цитотрофобласта, а его эффект угнетается fms-подобной тирозиновой киназой-1 (sFIT-1), которая связывает фактор роста эндотелия сосудов.

Гипоксия снижает инвазивность вневорсинчатого цитотрофобласта. Вероятно, это обусловлено модификацией экспрессии интегринов, на которые, в свою очередь, влияют компоненты экстраклеточного матрикса.

Кислородный баланс влияет на функцию трофобласта и развитие эмбриона. Помимо влияния на дифференцировку цитотрофобласта и функцию клеток вневорсинчатого цитотрофобласта, он оказывает воздействие на выживание и развитие эмбриона. Гипоксия пробуждает экспрессию HIF-1 гена, который активирует множество генов, включенных в пролиферацию и дифференцировку, а также в клеточный адаптивный ответ на низкий уровень O_2 .

Гипоксическая среда, в которой зародыш развивается в ранний период беременности, защищает фетальные ткани и процесс развития от опасного воздействия АФК во время критических фаз эмбриогенеза и органогенеза. Эта защита возможна в связи с наличием внутренних и наружных антиоксидантных защитных механизмов. К первым относятся антиоксидантные ферменты, такие как СОД, глутатионпероксидаза и γ -глутамилцистеин-синтаза. В ооците, эмбрионе и маточных трубах обнаружены кодирующие ферменты транскрипты, экспрессия которых существенна для приобретения эмбрионом склонности к развитию.

Наружные защитные механизмы представлены неферментными антиоксидантами (гипотаурин, таурин и аскорбиновая кислота), которые найдены в фолликулярной и трубной жидкости. Установлено, что трофобластные клетки, экспонированные к АФК или другим цитотоксикантам, увеличивают экспрессию металлсвязывающего протеина, металлотионеина, который проявляет защитную роль прямыми и непрямыми механизмами, связывая и нейтрализуя эти токсиканты, одновременно освобождая нормально связанный цинк, обладающий цитопротективным действием.

Напряжение O_2 резко повышается в конце первого триместра, когда увеличиваются маркеры оксидативного стресса и в клетках трофобласта появляются мРНК окислительных ферментов. Такая ферментная экспрессия может быть индуцирована NADPH-оксидазами, стимулирована собственно гипоксией, которая ведет к внутриклеточной продукции супероксида (Rajmakers M.T. et al., 2006). В дальнейшем увеличивается экспрессия антиоксидантных ферментов, возможно участвующих в модуляции функции вневорсинчатого цитотрофобласта. Авторы продемонстрировали, что супероксид и различные АФК индуцируют экспрессию HIF-1 и других генов, относящихся к сосудистому и матриксному ремоделированию, так же как и к клеточному апоптозу. Преждевременное и широко распространенное начало материнского плацентарного кровообращения до развития антиоксидантной защиты в плаценте коррелирует с оксидативным повреждением трофобласта и может быть причиной раннего прерывания беременности.

Данные о том, что физиологические концентрации АФК действуют благоприятно, позволили сформулировать «свободнорадикальную теорию развития». Согласно этой теории на временной курс и направление формирования развивающихся организмов может влиять различное снабжение O_2 и/или градиенты внутриклеточного редокс-состояния. Известно, что низкие концентрации АФК стимулируют клеточную пролиферацию и экспрессию генов. Именно поэтому предполагают, что благоприятное влияние АФК может иметь отношение к контролю локальной воспалительной реакции.

W. Droge (2002) показал, что физиологические уровни АФК индуцируют экспрессию некоторых клеточных транскрипционных факторов посредством активации множественных сигнальных путей трансдукции. Напротив, высокие уровни АФК заведомо опасны для выживания и функционирования клеток. Исследования *in vitro* пока-

зали, что увеличенное требование O_2 развивающимся эмбрионом усиливает продукцию АФК, представляя тератогенную угрозу для тканей плода мышцы. Более того, вызванные оксидативным стрессом повреждения могут быть ответственны за задержку или прекращение развития преимплантационных эмбрионов. Не исключено, что высокие уровни образования АФК могут инициировать воспаление и способствовать его распространению, вызывая апоптоз плацентарных тканей. В работе Biondi и соавт. (2005) подчеркнута важная роль оксидативного баланса при беременности. Поддержание баланса между свободными радикалами и антиоксидантами существенно для нормального течения беременности, поскольку низкие концентрации радикалов благоприятно действуют на развитие эмбриона и контроль уровня воспалительных цитокинов.

Плацента служит источником множества прооксидантных агентов, антиоксидантных ферментных систем и гормонов, благодаря чему при нормальной беременности может контролировать перекисное окисление липидов. В связи с тем, что при беременности усиливаются процессы окисления, следует ожидать укорочение лаг-фазы окисления липопротеинов низкой плотности. Показано, что резистентность окисления липопротеинов низкой плотности не изменяется при нормальной беременности во II и III триместрах. Полагают, что эстриол — антиоксидант, концентрация которого увеличивается у беременных, — может быть частью собственной защиты, ограничивающей оксидативные повреждения.

Беременность сопровождается уменьшением тотальной антиоксидантной защиты в I триместре с постепенным увеличением в течение беременности и достижением нормальной оценки в послеродовом периоде. Уровень липидных пероксидов значительно увеличивается к концу беременности. Их изменение коррелировало с увеличением субфракционного профиля липопротеинов низкой плотности.

В плаценте женщины отмечен высокий уровень ангиогенеза (неоваскуляризация из предсуществующих сосудов) и васкулогенеза (образование сосудов из ангиобластов). Кроме того, здесь происходит сосудистая мимикрия (псевдоваскулогенез). Она заключается в том, что при нормальном развитии плаценты клетки цитотрофобласта, замещающего эндотелий плацентарных артериол, меняют эпителиальный фенотип на эндотелиальный. При этом внутрисосудистый трофобласт разрушает и изменяет структуру материнских артериол, питающих плаценту. Замещая внутреннюю и среднюю оболочку,

клетки трофобласта превращают эти сосуды в несокращающиеся аневризмы. Синтезируемый находящимися в этой области большими гранулярными лимфоцитами оксид азота индуцирует расслабление гладких мышц сосудов.

Вневорсинчатый цитотрофобласт, таким образом, выполняет свою основную функцию, которая заключается в создании привилегированного снабжения кровью межворсинчатых пространств путем закупорки сосудов на ранних стадиях гестации, защите зародыша от высокого материнского артериального давления и ремоделировании стенки артерий. Благодаря изменению строения мышечного слоя артерий, с замещением гладких мышц и эластического и коллагенового внеклеточного матрикса фибриноидным матриксом, происходит увеличение и стабилизация кровотока в плаценте. Плод остается анатомически отделенным от иммунной системы матери оболочками трофобласта или хориона.

Паракринные сигналы из появляющейся мезенхимы ворсин и аутокринные сигналы из цитотрофобласта стимулируют его инфильтративное миграционное поведение. Сигнальные молекулы, такие как ингибиторы протеаз, продуцируемые децидуальными клетками, способны угнетать миграцию трофобласта. Миграция клеток цитотрофобласта прогрессирует не далее внутренней трети миометрия. В течение этого процесса клетки цитотрофобласта прекращают деление и приобретают поверхностные характеристики эндотелиальных клеток. Например, экспрессия E-кадгерина и интегрина $\alpha_6\beta_4$ снижается, а vc -кадгерина, $\alpha_5\beta_3$ -интегрин и молекулы адгезии клеток сосудов (VCAM) — увеличивается. С нарушением процесса псевдоваскулогенеза связывают преэклампсию — опасное осложнение беременности, связанное с мелкой (поверхностной) инвазией цитотрофобласта. Модуляция фенотипа адгезии является критической для нормальной инвазии цитотрофобласта. Кроме того, оптимальная экспрессия молекул адгезии на эндотелиальных клетках необходима для нормальной циркуляции иммунокомпетентных клеток.

Несомненно интересен вопрос, какую роль в процессе имплантации и плацентации играют различные компоненты иммунной системы матери и как они взаимодействуют с развивающимся эмбрионом. Очевидно, в процессе имплантации участвуют механизмы, препятствующие отторжению полуаллогенного трансплантата.

2.2. КЛЕТочНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Во второй половине XX в. усилия иммунологов были направлены в основном на изучение адаптивного (приобретенного) иммунитета и лимфоцитарных механизмов клеточного и гуморального иммунитета, интерес к врожденному иммунитету ослабевал. Однако созданное И.И. Мечниковым учение о фагоцитах в последнее время переживает свое второе рождение, которое в значительной степени связано с открытием цитокиновой регуляции иммунного ответа и изучения влияния цитокинов на клеточный ответ. В матке присутствуют все клеточные элементы, необходимые для развития и врожденного, и приобретенного иммунитета.

2.2.1. Клетки фагоцитарной системы

Увеличивается количество экспериментальных работ, выполненных на животных, и клинических исследований, в которых подтверждена важная роль фагоцитов в иммунопатологических процессах, устойчивости к инфекциям, при неспецифическом воспалении, уничтожении малигнизированных и иных форм патологически измененных клеток. Для фагоцитов характерно наличие значительного цитотоксического потенциала, высокой мобилизационной готовности и реактивности, что позволяет им, как и НК-клеткам, выступать в первой линии эффекторных механизмов иммунологического гомеостаза.

Фагоцитирующую функцию в организме человека выполняют несколько типов клеток. В первую очередь, это клетки, осуществляющие защиту при каких-либо инфекциях и инвазиях — макрофаги, моноциты и нейтрофилы. У эозинофилов и базофилов она представлена в значительно меньшей степени. Кроме того, фагоцитирующую функцию могут брать на себя специфические клеточные элементы различных тканей (фиброкласты, остеокласты, клетки микроглии).

В основе современных взглядов на процесс фагоцитоза лежат исследования, свидетельствующие об особенностях окислительного метаболизма активированных фагоцитов, процессов поглощения и разрушения внеклеточных объектов. Цитотоксический потенциал фагоцитирующих клеток реализуется путем их активации и запуска

секреции эффекторных молекул. В активированном фагоците происходит усиление энергетического и окислительного метаболизма, процессов синтеза и секреции, адгезивных свойств и рецепторной функции плазматической мембраны, изменение активности лизосомальных и мембранных ферментов, благодаря чему увеличивается способность к миграции и хемотаксису. Значительное увеличение при фагоцитозе количества кислорода, поглощаемого лейкоцитами, называют «респираторным взрывом». Активация мембранных оксидаз, катализирующих перенос электронов с NADPH на молекулярный кислород — ключевой механизм респираторного взрыва. Происходящая при этом стимуляция окисления глюкозы в гексозомонофосфатном шунте приводит к гиперпродукции биологических оксидантов — свободных радикалов кислорода и пероксида водорода. Фагоциты, сами хорошо переносящие гипоксию, используют респираторный взрыв в качестве оружия против объектов, воспринимаемых как антигомеостатические факторы.

В гранулах фагоцитов содержится богатый арсенал гидролитических ферментов (нейтральных и кислых гидролаз). Секретируя эти ферменты, клетки разрушают внеклеточные объекты, размер которых исключает возможность поглощения, и способны воздействовать на другие медиаторные системы. Фагоциты в кратчайший срок мобилизуются и функционируют в физиологических ситуациях и при разнообразных патологических процессах благодаря активному секреторному высвобождению эффекторных молекул. Кроме гидролитических ферментов активированные фагоциты выделяют также и другие биологически активные вещества (пирогены, интерфероны, простагландины, тромбоксаны, биооксиданты, монокины, факторы, сами стимулирующие предшественники миелопоэза, лейкотриены, вызывающие сокращение гладких мышц и повышение сосудистой проницаемости). Молекулы, активирующие фагоциты, продуцируются лимфоцитами, фибробластами, тромбоцитами, эндотелием и образуются в системах комплемента, свертывания, фибринолиза, калликреин-кининов, иммуноглобулинов.

Достаточно сложные взаимоотношения существуют внутри фагоцитарной системы. Нейтрофилы первыми мигрируют в зону альтерации, продуцируя хемоаттрактанты, вызывающие направленную миграцию моноцитов в очаги тканевого повреждения и формирование моноцитарного инфильтрата. В свою очередь, нейтрофилы активируются факторами, выделяемыми моноцитами и макрофагами.

Распознавание и восприятие внешнего сигнала фагоцитом приводят к реактивным изменениям в плазматической мембране, которая дифференцирует молекулярный профиль внешних раздражителей. Происходит активация внутриклеточных сигналов-посредников и трансформация их в определенную форму клеточного ответа. Энергия раздражения трансформируется в энергию клеточного возбуждения. Макрофаги и нейтрофилы способны рецептировать Fc-фрагмент IgG и IgA, производные комплемента (C 3b, C 3d, C 3e, C 5a, C 567), различные хемоаттрактанты, бактериальные гликопротеиды, фибронектин, адренергические и холинергические агенты, гистамин, глюкокортикоиды, эстрогены.

Фагоцитоз усиливается в сывороточной среде при связывании опсоинов: сывороточные белки — IgG, C 3 (C 3b), фибронектин, C-реактивный белок. Кооперативно созданную мощную опсоническую защиту рассматривают как один из главных факторов противoinфекционного иммунитета. Однако роль ее шире, так как при опсонизации клеточные реакции фокусируются на любых объектах экзогенного и эндогенного происхождения, вступающих в противоречие с гомеостазом при попадании во внутреннюю среду. Например, опсонизация способствует:

- удалению продуктов тканевого распада;
- разрушению малигнизированных и инфицированных вирусами клеток;
- гибели паразитов;
- элиминации антигенов, прочно связанных с тканевыми субстратами.

В результате опсонизации, сопровождающейся реакциями различных систем гуморального гомеостаза, происходит гиперпродукция биологически активных веществ, влияющих на клеточную реактивность. Нарботка C 3-опсоинов вызывает каскадную активацию комплемента, при которой образуется C 5a — один из самых сильных эндогенных стимуляторов фагоцитоза.

Мононуклеарные фагоциты, представленные в основном макрофагами, играют также важную роль в механизмах формирования приобретенного иммунитета, так как на плазматической мембране макрофагов происходит представление антигенных детерминант Т-лимфоцитам в виде комплекса с продуктами иммунорегуляторных генов. Без участия моноцитов/макрофагов и полинуклеарных лейкоцитов в полном объеме не осуществляются реакции, индуцированные

антителами-опсонинами, гиперчувствительность замедленного типа, повреждения, вызываемые иммунными комплексами. Активированные макрофаги подавляют пролиферацию нормальных и опухолевых клеток. В организме они проявляют клеточную цитотоксичность — специфическую (цитолитический эффект) и неспецифическую (цитостатический эффект).

Большое количество макрофагов содержится в эндометрии и миометрии матки. Они находятся в эндометриальной строме, интраэпителиальных участках, базальных лимфоидных скоплениях и внутри полостей желез. Макрофаги экспрессируют рецепторы для эстрогенов, стероидные гормоны регулируют их количество. Макрофаги привлекают эстроген-стимулированные ростовые факторы. Обнаруживается увеличение количества этих клеток уже в середине лютеиновой фазы цикла.

Моноциты, составляющие один из компонентов врожденной иммунной системы, играют ключевую роль в иммунном ответе, перерабатывая антиген и продуцируя цитокины, что определяет последующий ответ лимфоцитов. При беременности циркулирующие моноциты активируются и продуцируют ряд цитокинов, среди которых находятся относящиеся к Th-1 типу. Секретируемый моноцитами интерлейкин-12 (ИЛ-12) стимулирует НК-клетки и Т-лимфоциты, индуцирует продукцию интерферона- γ (ИФН- γ) и усиливает клеточный иммунитет.

Факторы, активирующие моноциты у беременных, могут продуцировать клетки трофобласта. Они способны вырабатывать ИЛ-4, который после 24 ч инкубации *in vitro*, праймирует продукцию ИЛ-12. С другой стороны, клетки (клетки трофобласта, фетальные эритроциты и лейкоциты), так же как субклеточные частицы (мембранные фрагменты синцитиотрофобласта), обнаруживаются в кровяном русле матери и служат материалом, который фагоцитируется циркулирующими моноцитами и вызывает их активацию. Предполагают, что этот механизм важен для нормального течения беременности.

Хотя существует большое количество данных, поддерживающих «полуаллогенную» теорию, она сфокусирована, главным образом, на изучении процесса толерантности к антигенам партнера, представленным бластоцистой. Показано, что внедряющийся трофобласт активно рекрутирует материнские иммунные клетки. Трофобластные клетки экспрессируют рецепторы, способные распознавать патоген-ассоциированные молекулярные образцы, представляемые бакте-

риями, вирусами, паразитами и грибами. Эти трансмембранные рецепторы, распознающие молекулярные образцы патогенов, называют Toll-подобными рецепторами (TLR). TLR — ключевые фигуры в активации врожденной иммунной системы. Все 10 типов TLR экспрессирует плацента (Abrahams V.M., Mor G. 2005). Стимуляция TLR-4 липополисахаридом (ЛПС) или TLR-3 поли(I:C) — синтетическим аналогом вирусной ssRNA — приводит к увеличению продукции провоспалительных хемокинов клетками трофобласта человека. Хемокины рекрутируют материнские иммунные клетки, в частности CD14⁺-моноциты, к месту имплантации.

Предполагают, что воспалительное микроокружение необходимо для прикрепления и инвазии бластоцисты (Mor G. et al., 2005). По мнению авторов, существование «воспаления, обусловленного имплантацией эмбриона» — условие, зависящее от соответствующего «обучения» врожденной иммунной системы трофобластом. При этом клетки трофобласта успешно организуют воспалительное микроокружение и регулируют дифференцировку и активацию моноцитов, что и назвали «обучением моноцитов». В свою очередь, рекрутированные моноциты продуцируют и секретируют факторы, такие как цитокины и хемокины, которые способствуют переживанию и функционированию трофобласта.

S. Fest и соавт. (2007) представили данные о том, что трофобластные клетки регулируют миграцию и дифференцировку моноцитов. Трофобластные клетки увеличивали миграцию и индуцировали значительное увеличение секреции и продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α) и хемокинов. Эти хемокины включают RANTES (регулируемые активацией, экспрессированные и секретированные нормальными Т-клетками), моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1), ИЛ-8 и ростовой онкоген- α (GRO- α), которые имеют сильные хемоаттрактантные свойства и могут рекрутировать материнские иммунные клетки, в частности CD14⁺ моноциты, к месту имплантации. Более того, ответ моноцитов на ЛПС изменялся после экспозиции к трофобластным клеткам.

Таким образом, показано, что трофобластные клетки способны рекрутировать и успешно обучать моноциты продуцировать и секретировать провоспалительные цитокины и хемокины, поддерживающие их рост и выживание. Более того, они могут модулировать ответ моноцитов на бактериальные стимулы. Значение влияния макрофагов на процесс имплантации неясно, тогда как этим клеткам отводится

важная иммунорегуляторная роль в событиях, происходящих после имплантации. Децидуальная ткань обладает различными иммунологическими и гематологическими свойствами.

Одним из компонентов врожденной иммунной системы, принадлежащих к первой линии защиты против внедряющихся патогенов, считают полиморфоядерные лейкоциты, мигрирующие в ткани в ответ на воспалительные или хемоаттрактантные стимулы. При активации полиморфоядерные лейкоциты производят интенсивный оксидативный взрыв, генерируя токсичные свободные радикалы и высвобождая деградирующие ферменты и воспалительные медиаторы при дегрануляции. При нормальном менструальном цикле их много в фаллопиевых трубах. После овуляции количество их увеличивается в фаллопиевых трубах и эндометрии.

Привлечение полиморфоядерных лейкоцитов в ткани женского репродуктивного тракта происходит под контролем стероидных половых гормонов. Не исключено и прямое влияние половых гормонов на функции полиморфоядерных лейкоцитов. В полиморфоядерных лейкоцитах, выделенных из крови женщин, обнаружены транскрипты рецепторов для эстрогенов. Показана экспрессия в полиморфоядерных лейкоцитах обоих протеинов. Исследования *in vitro* продемонстрировали эффект эстрадиола на хемотаксис полиморфоядерных лейкоцитов, респираторный взрыв, фагоцитоз и дегрануляцию в ответ на хемоаттрактант *N-formyl-Met-Leu-Phe*.

Нейтрофилы, полученные от беременных женщин, вызывали продукцию ФНО тромбосан- и циклооксигеназа-2-зависимыми механизмами. Активированные нейтрофилы генерируют АФК, которые могут приводить к окислительному повреждению биомолекул. Показано, что тромбосан принимает участие в продукции супероксида нейтрофилами, полученными от беременных женщин (Vaughan J.E. et al., 2006). Генерация супероксида нейтрофилами значительно снижается при угнетении синтеза тромбосана, циклооксигеназы-2 или фосфолипазы 2. Угнетение супероксидной генерации аспирином предполагает, что циклооксигеназа-2 играет важную роль в продукции супероксида нейтрофилами, обусловленной тромбосаном.

Беременность была определена как противовоспалительное состояние (превалирование Th-2 типа иммунного ответа), однако появились данные, подтверждающие, что для нормального процесса имплантации и инвазии трофобласта необходимо провоспалительное микроокружение. При имплантации бластоцисты в эндометрий

наблюдается увеличение продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а угнетение воспалительного ответа приводит к нарушению имплантации.

2.2.2. Естественные киллерные клетки (НК-клетки), дендритные клетки, $\gamma\delta$ T-лимфоциты

При нормальной физиологически протекающей беременности в децидуальной оболочке увеличивается количество различных лейкоцитов, однако клетки врожденной иммунной системы доминируют в этой ткани. С 80-х годов прошлого столетия большой интерес вызывает популяция НК-клеток — необычных лимфоцитов, предпочтительно распознающих и убивающих клетки, лишенные экспрессии классических МНС I класса, причем цитолитический эффект их не связан с предварительной иммунизацией. НК-клетки способны вызывать цитоллиз опухолевых клеток-мишеней, а также клеток, пораженных вирусами и другими внутриклеточными патогенами. Получив сигнал об угрозе нарушения генетически обусловленного постоянства внутренней среды, они первыми неспецифически реагируют на чужеродный агент, способствуя его элиминации путем проявления цитотоксической активности и участвуя в регуляции защитных реакций других систем организма (эндокринной, иммунной, нервной).

По мнению многих авторов, НК-клетки — ключевой компонент врожденной иммунной системы, особенно на ранних стадиях иммунного ответа против определенных вирусов, паразитов и микробных патогенов. НК-клетки — наиболее распространенная популяция в секреторном эндометрии и в децидуальной ткани при ранней беременности, что ассоциируется с успешным исходом беременности.

Зрелые НК-клетки циркулируют главным образом в периферической крови, составляя 5–20% общего количества лимфоцитов. На основании уровня экспрессии низкоафинного рецептора к Fc-фрагменту γ -иммуноглобулина IIIA (CD16) и молекулы адгезии нейтральных клеток (CD56), периферические НК-клетки делят на две большие субпопуляции: CD56⁺CD16⁻- и CD56⁺CD16⁺-НК-клетки. CD56⁺CD16⁻-НК-клетки — первичный источник секретируемых иммунорегуляторных цитокинов. Субпопуляцию CD56⁺CD16⁺ составляют эффекторы естественной цитотоксической активности и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

НК-клетки — доминирующие лейкоциты в децидуальной ткани, количество их в матке резко увеличивается в поздней фазе менструального цикла и на ранней стадии беременности. Они быстро аккумулируются в паренхиме органов при инфекции, опухолевом росте или воспалении, активно принимают участие в элиминировании поврежденных клеток или в активации и рекрутировании других иммунных клеток путем секреции ряда цитокинов и хемокинов. Устанавливая тесный контакт с дендритными клетками (ДК), они выполняют критическую роль в регуляции и врожденного, и приобретенного иммунитета.

НК-клетки непосредственно распознают молекулы, принадлежащие патогенам, с помощью активирующих и ингибиторных рецепторов, которые являются биоактивационными рецепторами или Toll-подобными рецепторами (TLR). Путем взаимодействия с использованием активаторных рецепторов (NKG2D) они способны распознавать собственные белки, экспрессия которых увеличивается на «стрессированных» или поврежденных клетках. С помощью ингибиторных рецепторов распознают специфические молекулы I класса МНС. Уровни последних часто снижаются при трансформации или инфицировании вирусами клеток-мишеней, которые становятся более чувствительными к НК-клеточному лизису. Контролируя экспрессию молекул I класса МНС, НК-клетки используют много рецепторов, которые распознают группы собственных классических и неклассических рецепторов аллелей I класса МНС.

Ингибиторные рецепторы способны распознавать молекулы I класса МНС, принадлежащие к 2 группам:

- семейство KIR-рецепторов, распознающих антигены HLA-A, B, C аллелей;
- рецепторы C-типа лектина, CD94/NKG2A, которые связывают широко представленные неклассические молекулы I класса — HLA-E.

Оба рецепторных семейства включают активационные копии со сходной специфичностью. Функциональная роль МНС-I-активирующих рецепторов и идентичность их лигандов еще неясна. Все эти рецепторы олигоклонально распределены на разных НК-клеточных подгруппах, но большинство НК-клеток экспрессирует по меньшей мере один ингибиторный рецептор собственного I класса МНС, который связывается специфическим лигандом, блокирующим НК-клеточную активацию путем угнетения передачи активационного сигнала.

Продемонстрировано существование НК-клеток, которые не экспрессируют рецепторы для собственного МНС I класса. Предполагаются некоторые механизмы, ведущие к собственной толерантности НК-клеток (Raulet D.H., Vance R.E., 2006; Yokoyama W.M., Kim S., 2006).

НК-клеточная функция — результат сопутствующего вовлечения различных активирующих и ингибиторных рецепторов особым набором лиганд, представленных на клетках-мишенях. В большинстве случаев ингибиторные сигналы перекрывают активирующие.

Однако индукция лигандов для активаторных рецепторов на стрессированных или поврежденных клетках-мишенях, таких как протеины, относящиеся к МНС I класса А и В (MICA и MICB), ведет к связыванию NKG2D-активирующего рецептора, который передает сигналы, преимущественно перекрывая ингибиторные, и таким образом НК-клетки активируются, приобретая способность убивать эти клетки-мишени. NKG2D-лиганды экспрессируются на поверхности опухолевых клеток различных гистотипов, инфицированных клетках и индуцируют их повреждение. Показано, что NKG2D-лиганды также экспрессируются на Т-клетках, пролиферирующих в ответ на антигенную стимуляцию (Cerboni C. et al., 2007). НК-клетки могут экспрессировать рецепторы для микробных продуктов, принадлежащих к семейству TLR, такие как TLR-3, TLR-7, TLR-9. Их экспрессия на НК-клетках увеличивается в течение НК-клеточной дифференцировки и активации, причем некоторые из них экспрессируются только на определенных подтипах НК-клеток.

На основе рецепторного репертуара и уровней экспрессии поверхностных рецепторов идентифицированы фенотипически различающиеся НК-клеточные популяции, ассоциирующиеся с разными функциями и миграционными способностями. В периферической крови человека описаны 2 больших подтипа НК-клеток:

- CD56^{low}CD16^{high} (CD56^{тусклые}CD16^{яркие}), представляющие большинство (около 90%) НК-клеток, экспрессирующие мало CD56 молекул и много CD16 — цитотоксические НК-клетки;
- CD56^{high}CD16^{low}-подтип, составляющий около 10% от НК-клеток (много CD56 и мало CD16) молекул на поверхности — продуценты иммунорегуляторных цитокинов.

НК-клетки вносят вклад в поддержание гомеостаза иммунной системы и регулируют приобретенный иммунный ответ, продуцируя цитокины и хемокины. При развитии инфекционного процесса

НК-клетки — ранний источник ИФН- γ , который необходим для поляризации Т-хелперов 1 типа (Th-1). Разные подтипы НК-клеток могут продуцировать цитокины 1-го типа (ИФН- γ и ФНО- α) или 2-го типа (ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-10). Они могут также производить трансформирующий фактор роста β и контролировать рекрутирование специфических подтипов Т-клеток путем секреции различных хемокинов. При вирусных и бактериальных инфекциях НК-клетки продуцируют такие хемокины, как макрофагальные воспалительные белки 1a и 1b (MIP-1a, MIP-1b), RANTES, которые важны для привлечения и активации других воспалительных клеток.

НК-клетки участвуют в индукции иммунного ответа Т-клеток и поддержании Т-клеточного гомеостаза прямой элиминацией антиген-презентирующих клеток (АПК) и активированных Т-клеток и/или освобождением ингибиторных цитокинов (трансформирующий фактор роста β и ИЛ-10), которые угнетают созревание ДК, либо активацию и функцию Т-клеток.

В течение последних лет роль НК-клеток в контроле беременности оживленно дискутируется. При нормальной беременности они функционируют скорее как нецитотоксические клетки, приносят пользу, секретируя цитокины, хемокины и ангиогенные факторы. Однако цитотоксические потенции их против тканей плода и матери могут проявляться во время инфекции и воспаления.

НК-клетки, играющие важную роль в течение беременности, в первом триместре составляют около 70% иммунных клеток, присутствующих в децидуальной ткани. Для них характерен фенотип поверхности CD56^{яркие}/CD16⁻. Напротив, приблизительно 95% периферических НК-клеток являются CD56^{тусклые}/CD16⁺ и только малая фракция (5%) — CD56^{яркие}/CD16⁻. Популяция периферических CD56^{тусклые}-НК-клеток обладает высокой цитотоксичностью, тогда как CD56^{яркие}-НК-клетки имеют низкую цитотоксическую способность, но эффективно секретируют цитокины (Hanna J. et al., 2006).

Во время имплантации децидуальные НК-клетки экспрессируют фенотип, отличающийся от такового периферических НК-клеток. При развитии гестационного процесса количество НК-клеток снижается, во время родов эти лейкоциты отсутствуют. Напротив, макрофаги составляют 20–30% децидуальных иммунных клеток в месте имплантации, и количество их остается высоким в течение всей беременности.

Фенотипический и функциональный анализ децидуальных НК-клеток указывает, что они являются уникальной популяцией,

отличающейся от НК-клеток периферической крови уникальным транскрипционным профилем. Экспрессируемый ими набор молекул адгезии и рецепторов для хемокинов отличается от такового клеток периферической крови. Маточные НК-клетки способны мигрировать в ответ на CXCL-9, CXCL-10, CXCL-12 хемокины.

Происхождение маточных НК-клеток до сих пор недостаточно ясно. Они могут пролиферировать и дифференцироваться из НК-клеточных предшественников под контролем половых стероидных гормонов, эстрогенов и прогестерона, а также индуцироваться ИЛ-15, который обнаруживают в децидуальном микроокружении. По данным Keskin D.B. и сотрудников (2007), высвобождаемый децидуальными стромальными клетками трансформирующий фактор роста β способствует конверсии CD16⁺-НК-клеток в CD16⁻-НК-клетки, что позволяет предположить участие трансформирующего фактора роста β в контроле дифференцировки маточных НК-клеток. Кроме того, маточные НК-клетки могут быть рекрутированы из CD56⁺-клеток крови.

Фенотипические различия между децидуальными НК-клетками и НК-клетками периферической крови позволяют предположить, что при поступлении CD56⁺-НК-клеток из крови, независимо от стадии созревания, они производят тканеспецифическую дифференцировку в маточном микроокружении.

Экспрессия костимуляторных лигандов на плазматической мембране активированных НК-клеток может позитивно регулировать Т-клеточный адаптивный ответ с помощью не прямых механизмов, включающих секрецию цитокинов или хемокинов и созревание или активацию ДК. Кроме того, активированные НК-клетки, экспрессирующие лиганды для Т-клеточных костимуляторных молекул, такие как CD-86, CD-80, CD-70 и OX40L, общаются с Т-клетками посредством прямых клеточных контактов (Nanna J. et al., 2006).

НК-клетки могут ослаблять Т-клеточный адаптивный иммунный ответ механизмами, включающими уничтожение ДК и/или активированные Т-клетки и секрецию ингибиторных цитокинов. Показано, что активированные ИЛ-2 мышинные НК-клетки распознают и лизируют Т-клеточные бласты перфорин-зависимым образом через НК-клеточный активаторный рецептор NKG2D (Cerboni C. et al., 2007).

НК-клетки непосредственно участвуют в регуляции созревания ДК, играющих важную роль в индукции адаптивных иммунных ответов, путем продукции ИФН- γ и ФНО- α . Взаимодействие незрелых ДК

с НК-клетками, активированными ИЛ-2, может вызывать созревание или клеточную гибель. Идентификация рецепторов, вовлеченных в цитотоксический эффект, обусловленный НК-клетками, на зрелых и незрелых ДК, показала важную роль НКp30 и DNAM-1/nectin-2 рецепторной пары. Зрелые ДК в свою очередь стимулируют эффекторные функции и пролиферацию НК-клеток при участии ряда цитокинов: ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и ИФН- α/β .

Так, НК-клетки могут вносить вклад в супрессию индукции Т-клеточных ответов и поддержание Т-клеточного гомеостаза прямой элиминацией АПК и активированных Т-лимфоцитов и/или высвобождением ингибиторных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста β и ИЛ-10, которые угнетают созревание ДК или активацию Т-клеток и их функцию.

Секреция НК-клетками широкого спектра цитокинов и хемокинов без стимуляции предполагает, что они активируют децидуальную ткань. Путем освобождения цитокинов и хемокинов маточные НК-клетки могут контролировать внутрисосудистую инвазию трофобласта, рекрутирование и функционирование других иммунных клеток, таких как ДК и Т-лимфоциты. Предполагают, что НК-клетки, освобождая гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и ИЛ-10, вносят вклад в поддержание толерогенного фенотипа ДК (Dietl J. et al., 2006).

Близкое окружение спиральных артерий НК-клетками вместе с их способностью продуцировать ангиогенные факторы — фактор роста сосудистого эндотелия, плацентарный ростовой фактор и ангиопоэтин-2 — предполагает большую роль влияния этих клеток на васкуляризацию слизистых и развитие плаценты (Croy A.V. et al., 2006).

Получены данные, указывающие, что особенная комбинация материнских KIR (KIR AA) и фетальных молекул MHC класса I (HLA-C2 группа аллелей) сопровождается увеличением риска преэклампсии (Hiby S.E. et al., 2004). На основании этого предположили, что взаимодействие между материнскими KIR, присутствующими на децидуальных НК-клетках, и отцовскими аллелями HLA-C, экспрессированными цитотрофобластом, имеет важные функциональные следствия, касающиеся регуляции развития плаценты и ремоделирования сосудов. Причем риск преэклампсии будет выше среди пар, состоящих из японских женщин, у которых преобладание KIR AA генотипа — 60%, и европеоидных отцов, у которых частота HLA-C2 группы — 32%

в популяции (тогда как у японцев — 9% HLA-C2 в популяции). Однако в связи с малым количеством исследованных пациентов авторы не смогли подтвердить эту гипотезу.

Таким образом, важная роль НК-клеток в контроле беременности на нескольких уровнях становится все более ясной. При нормальной беременности кажется, что они приносят пользу, секретируя цитокины, хемокины и ангиогенные факторы. Однако имея цитолитический аппарат, они способны атаковать фетальные и материнские ткани при развитии инфекции и воспаления.

В эндометрии и децидуальной ткани при ранней беременности присутствуют зрелые CD83⁺ — ДК миелоидной природы. CD83 — маркер зрелости ДК — представляет собой гликопротеин 45 кДа иммуноглобулинового суперсемейства, который взаимодействует с Т-клетками. В зоне материнско-фетального взаимодействия найдена также небольшая субпопуляция CD1a⁺ клеток. Наличие CD1a считают характерным для клеток Лангерганса. Экспрессия CD1a может быть индуцирована на моноцитах с помощью гранулоцит/макрофагального колониестимулирующего фактора, ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-1. Есть данные, что незрелые ДК у мышей необходимы для поддержания периферической толерантности (Steinman R.M., 2007). Зрелые ДК ассоциируются с поляризацией Т-клеток Th-1-типа, хотя было показано, что децидуальные CD83⁺ CD11c⁺ CD80⁺ CD86⁺ клетки проявляют сниженную способность продуцировать ИЛ-12 по сравнению с ДК периферической крови.

Laškarin G. и соавт. (2008) исследовали возможные различия в фенотипе и функции CD1a⁺ CD83⁺ ДК в отношении их взаимодействия с аутологичными децидуальными НК-клетками в I триместре нормальной беременности. Значительные различия в фенотипе и цитокиновом профиле наблюдались между свежевыделенными из децидуальной ткани CD1a⁻ и CD83⁻-клетками. CD1a⁺-клетки имели менее зрелый фенотип и более низкую экспрессию HLA-DR и костимуляторных молекул (CD80 и CD86), а также более высокую экспрессию эндочитарного рецептора CD206 и рецептора для провоспалительных цитокинов CD195 по сравнению с CD83⁺-клетками. Установлено, что децидуальные CD83⁺-клетки с более зрелым фенотипом, в противоположность менее зрелым CD1a⁺-клеткам, содержали меньше ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-15 цитокинов в цитоплазме и вызывали более слабую пролиферацию CD56⁺-клеток после культивирования *in vitro* в течение 48 ч. CD83⁺ клетки не влияли на экспрессию цитолитических

медиаторов и продукцию провоспалительных цитокинов CD56⁺-клетками, тогда как незрелые CD1a⁺-клетки увеличивали перфорин-, FasL- и ФНО- α -зависимый апоптоз и снижали содержание ИЛ-15 в децидуальных CD56⁺-клетках после 18-часового совместного культивирования. Предполагают, что децидуальные CD1a⁺-клетки регулируют и формируют в децидуальной ткани НК-клеточную функцию более глубоко, чем CD83⁺ клетки.

ДК среди АПК играют центральную роль в инициации адаптивного иммунного ответа. В дополнение к стимуляторным свойствам АПК играют регуляторную роль в иммунной системе, будучи способными индуцировать анергию или толерантность против встречаемых антигенов. Значимость ДК для периферической толерантности очевидна, так как они индуцируют дифференцировку Т-хелперных клеток не только в Th-1-, но и в Th-2-типы клеток.

Инвазия трофобласта происходит глубоко в ткани матки без явной активации материнской иммунной системы. Децидуальная ткань содержит относительно большое количество гемопозитических мононуклеарных клеток во время беременности. Причем децидуальные макрофаги составляют около 20% этих клеток, тогда как Т-клеток содержится очень мало. На ранней стадии беременности найдены зрелые CD83⁺ДК. В это время НК-клетки составляют главную популяцию мононуклеарных клеток. Количество их значительно уменьшается к окончанию гестационного периода.

К клеткам врожденной иммунной системы относят субпопуляцию Т-лимфоцитов, экспрессирующих антигенсвязывающий рецептор $\gamma\delta$. Считают, что классические $\alpha\beta$ Т-лимфоциты не способны распознавать трофобласт, на клетках которого экспрессируются атипичные молекулы МНС-1. $\gamma\delta$ Т-клетки могут распознавать атипичные (неклассические) антигены трофобласта. В децидуальной ткани идентифицированы $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, способные реагировать на антигены, экспрессированные трофобластом, и взаимодействовать с антиген-распознающим рецептором $\alpha\beta$ Т-клеток. Известно, что $\gamma\delta$ Т-клетки — первая линия защиты от инфекционных агентов, таких как бактерии, вирусы и паразиты. Представляющие первую линию защиты от инфекционных агентов $\gamma\delta$ Т-клетки — возможные источники Th-1 и Th-2-цитокинов, треть из которых продуцируется как Th-1-, так и Th-2-типы цитокинов, имея Th-0-фенотип. Значительная доля $\gamma\delta$ Т-клеток тимус-независима, имеет Т-клеточный рецептор, может не иметь CD4 и/или CD8, но распознает специфические антигены и

белки теплового шока (БТШ). Могут также распознавать антигены, не связанные с МНС, растворимые антигены и углеводы.

В ранние сроки беременности децидуальные лимфоциты человека содержат $\gamma\delta$ -лимфоциты со сниженной аллореактивностью. Предполагают, что децидуальная ткань при ранней беременности служит местом временного внутиматеринского созревания клеток-предшественников $\gamma\delta$ -клеток, являющихся незрелыми клетками костно-мозгового происхождения, экспрессирующими CD56 рецептор — маркер NK-клеток. CD56⁺16⁺ $\gamma\delta$ -клетки периферической крови при активации проявляют Th-1 фенотип, продуцируя ФНО- α и ИФН- γ . В децидуальной ткани CD56⁺ многочисленны, но лишены маркера периферических NK-клеток — CD16. С помощью ПЦР показано, что эти цитокины могут продуцироваться по меньшей мере некоторыми децидуальными CD56⁺16⁻-клетками. Кроме того, субпопуляция CD56⁺16⁻-клеток окрашивается на трансформирующий фактор роста β 2.

Таким образом, врожденная иммунная система не индифферентна к плоду и играет важную роль не только в защите хозяина от инфекции, но также и в регулировании фетально-материнского взаимодействия. Важным условием в этом процессе является установление адекватного микроокружения, которое способствует клеточному росту и угнетает вредные воспалительные реакции.

2.3. ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ МАТЕРИ К ПЛОДУ

Путем пролиферации, миграции и инвазии эмбрионального трофобласта в эндометрий и его сосуды образуется гемохориальная плацента человека. Инвазивные процессы, которые сопровождают имплантацию бластоцисты, контролируются в зоне материнско-плодового взаимодействия факторами из децидуальной ткани и gravidарного эндометрия и самого трофобласта. В течение децидуализации специализированные субпопуляции лимфоцитов (NK-клетки) активируются. Они пролиферируют *in situ*, увеличиваются в размере и по количеству, приобретают цитоплазматические гранулы и начинают продуцировать цитокины и факторы роста, участвующие в подготовке материнского организма к имплантации бластоцисты (Стой А.В. и et al., 2006).

В процессе плацентации клетки цитотрофобласта, контактируя со спиральными артериями и сегментами эндометрия, вместе с синцитиотрофобластом и децидуальной оболочкой формируют зону иммунологического взаимодействия матери и плода. О центральной роли развивающейся плаценты в обеспечении иммунологической толерантности матери к плоду свидетельствуют результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований. Плацента не только выполняет функцию пассивного анатомического фильтра между матерью и плодом, позволяющего проникать кислороду и питательным веществам к плоду, но и играет важную роль иммунорегуляторного барьера.

Формирование зоны взаимодействия матери и плода — одно из ключевых событий, которые определяют успешное протекание беременности. Иммунная толерантность к плоду, с одной стороны, зависит от активной продукции ингибиторных клеток или супрессорных факторов, с другой — является пассивной, основанной на отсутствии стимуляции иммунного ответа. При беременности обнаружены оба вида взаимодействия. К активным механизмам относится генерация супрессорных клеток и супрессорных блокирующих факторов/антител, которые участвуют в угнетении иммунного ответа. К пассивным механизмам следует отнести отсутствие экспрессии классических антигенов I и II классов МНС (HLA-A, В и D) на клеточной поверхности синцитиотрофобласта и наличие покрывающего трофобласт сиаломуцина, затрудняющих распознавание и лизис клеток.

НК-клетки, играя ключевую роль в противоопухолевом иммунитете, защите от внутриклеточных патогенов, отторжении костно-мозговых трансплантатов и развитии приобретенного иммунитета путем продукции ряда цитокинов, выполняют также важную роль в репродукции и материнской толерантности к плоду (Riley J.K., Yokoуama W.M., 2008). Наблюдающиеся в эндометрии матки и вне беременности НК-клетки увеличиваются в количестве в течение ранней стадии беременности. Увеличение НК-клеточной популяции при успешной имплантации достигает пика в I триместре и затем снижается к концу II триместра (Kitaya K. et al., 2007).

Функция НК-клеток во время гестации — поддержание ремоделирования маточных спиральных артерий и облегчение успешной плацентации путем регуляции трофобластной инвазии (Hanna J. et al., 2006). Обладая полным цитотоксическим арсеналом (перфорин, гранзимы А и В) и рецепторами NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, маточ-

ные НК-клетки остаются толерантными, цитокин-продуцирующими клетками в зоне материнско-фетального взаимодействия. Будучи толерантными к плоду, НК-клетки не разрушают фетальные ткани. Становится ясно, что существует много уровней толерантности, которые направлены на обе ветви иммунного ответа, врожденного и приобретенного, что защищает развивающийся плод от агрессии материнской иммунной системы.

НК-клеточные функции, продукция цитокинов и уничтожение клеток-мишеней регулируют экспрессированные на клетках трофобласта белки МНС I класса, которые служат лигандами для НК-клеточных рецепторов. Экспрессия нормальных количеств молекул МНС I класса на клетках-мишенях угнетает лизис клеток-мишеней НК-клетками, тогда как при низком уровне МНС I класса наблюдают цитолитический эффект. Предполагают, что НК-клетки распознают и элиминируют ненормальные или инфицированные клетки, оценивая количество протеинов МНС I класса, которые экспрессированы на поверхности клетки.

Ингибиторные рецепторы блокируют активацию НК-клеток через рекрутирование тирозиновых протеинфосфатаз. Степень генерированного угнетения соответствует степени связывания ингибиторных рецепторов с молекулами МНС I класса. Чем больше ингибиторных рецепторов связано, тем больший блокирующий эффект оказывается на сигналы активирующих рецепторов. Связывание НК-клеточных ингибиторных рецепторов молекулами МНС I класса регулирует активационный статус НК-клеток, существенный для способности отличать «свое» от «не-своего».

Показано, что МНС-I-специфические ингибиторные рецепторы участвуют в приобретении функциональной компетентности НК-клетками посредством прямого взаимодействия с белками МНС I класса. Кроме того, МНС-I-специфические ингибиторные рецепторы могут опосредованно способствовать приобретению компетентности НК-клетками путем перекрестного связывания МНС-I молекул на аксессуарных клетках, которые производят факторы, необходимые для этого процесса.

Существует по меньшей мере 2 модели приобретения НК-клеткой компетентности. Простейшей считают прямую передачу сигнала самим МНС-специфическим рецептором (стимуляторная модель). Ингибиторный рецептор может запускать дифференцировку НК-клетки. Вторая (ингибиторная модель) представляет собой модель

того, каким образом МНС-специфические рецепторы направляют функциональную дифференцировку НК-клеток в сторону ингибиторной функции при участии в эффекторном ответе, состоит в индукции МНС-специфическими ингибиторными рецепторами ослабленных активационных рецепторных сигналов. В этой модели необходимо предположить, что на приобретение НК-клеточной функции сильно влияет неохарактеризованная активация рецептора, связывающего «свои» молекулы МНС-I. Ответ НК-клеток может быть слабым в результате сверхстимуляции через активацию рецепторов. Ингибиторные рецепторы путем вовлечения подавления активационного рецепторного сигнала к «своему», в свою очередь, позволяют НК-клеткам достигнуть функциональной компетентности. Эта модель напоминает модель Т-клеточной анергии. Возможно, генерированные МНС-I -специфическими рецепторами сигналы способны модулироваться корецепторами или молекулами адгезии, поскольку не все НК-клетки с данными специфичными к «своему» рецепторами могут запускаться при перекрестном связывании активационных рецепторов.

Проведение экспериментальных исследований функции маточных НК-клеток с использованием линий мышей, дефицитных в отношении НК-клеток, продемонстрировало фертильность этих животных, хотя наблюдались аномалии в местах имплантации. Мыши с дефицитом маточных НК-клеток проявляли неполное расширение маточных сосудов и значительную патологию децидуальной ткани. Показана критическая роль секретируемого НК-клетками ИФН- γ , облегчающего ремоделирование сосудов и нормальную эндометриальную децидуализацию ангиогенных факторов, в числе которых фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтин-2 и PlGF (Lash G.E. et al., 2008) и способность регулировать трофобластную инвазию (Hanna J. et al., 2006). Таким образом, функция маточных НК-клеток заключается, по крайней мере отчасти, в облегчении успешной плацентации и положительном влиянии на поддержание беременности.

Высоко полиморфные лейкоцитарные антигены, классические молекулы I класса HLA-A и HLA-B не экспрессируются на клетках ворсинчатого и вневорсинчатого трофобласта. Но внедряющиеся в матку клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют HLA-C, полиморфные классические молекулы МНС-I. Клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют неклассические молекулы МНС I класса HLA-G и HLA-E, проявляющие ограниченный полиморфизм.

Присутствие отцовских молекул HLA-C на клетках внедряющегося трофобласта превращает их в потенциальную мишень для аллогенного иммунного ответа. Однако специфически распознаваемые HLA-C (также как HLA-G and HLA-E) распознаются также MHC-I-специфическими ингибиторными рецепторами на NK-клетках. NK-клетки могут экспрессировать множество MHC-I-специфических ингибиторных рецепторов в различных комбинациях. Клетки вневорсинчатого трофобласта, на которых экспрессированы молекулы HLA-C, HLA-G и HLA-E соответственно, распознаются ингибиторными специфическими рецепторами KIR2DL2/3 и KIR2DL1, ILT2 и CD94/NKG2A, экспрессированными на NK-клетках (Khakoo S.I., Carrington M., 2006).

Что касается происхождения NK-клеток в матке, предполагают следующие возможности. Популяция периферических CD56^{яркие}/CD16⁻ NK-клеток может мигрировать в матку и быть источником децидуальных NK-клеток во время беременности. В противоположность децидуальным NK-клеткам, периферические CD56^{яркие}-NK-клетки не экспрессируют KIR. По-видимому, они приобретают их уже в матке. Показано, что гематопозитические стволовые клетки или клетки-предшественники с фенотипом клеточной поверхности Lin⁻CD34⁺CD45⁺ присутствуют в децидуальной ткани и могут превращаться в NK-клетки *in vitro* (Keskin D.B. et al., 2007). Эти предшественники также могут приобретать способность к экспрессии KIR в матке. Повышенная экспрессия KIR на маточных NK-клетках может быть объяснена стимулирующим влиянием комплекса цитокинов, продукция которых увеличивается в матке при беременности.

Нарушения функциональной дифференцировки NK-клеток в матке, связанные с изменением цитокинового профиля или других условий, могут препятствовать установлению толерантности к «своему» и ассоциируются с определенными осложнениями беременности. Подходящее сочетание фетальных HLA-антигенов трофобласта и материнских KIR на NK-клетках считают решающим фактором для оптимальной плацентации и репродуктивного успеха. Установлены эпидемиологические взаимосвязи между специфическими комбинациями KIR и HLA-генотипов, с одной стороны, и определенными клиническими исходами — с другой (Moffett A., Loke C., 2006). Эти корреляции позволяют предположить функциональные взаимодействия между KIR и их HLA-лигандами. Не исключено, что NK-клетки у человека могут приобретать функциональную компетентность путем

взаимодействия KIR с HLA-C, что может иметь отношение к результатам наблюдений у пациенток с преэклампсией и привычным выкидышем (Hiby S.E. et al., 2004).

В зоне материнско-фетального взаимодействия происходят два интригующих процесса, которые представляются ключевыми для нормального течения и исхода беременности: индукция иммунной толерантности и *de novo* васкуляризация. Иммунная толерантность возникает, несмотря на присутствие активной иммунной системы матери, включающей макрофаги, ДК и специализированные децидуальные CD56^{яркие}CD16⁻-NK-клетки (65–70%). Продолжается обсуждение природы и специализированного программирования NK-клеток, которые вооружены для уничтожения чужеродных клеток, но толерантны к клеткам полуаллогенного зародыша и облегчают течение беременности, продуцируя регуляторные цитокины и факторы роста.

Децидуальные NK-клетки — источник фактора роста эндотелия сосудов С (VEGF-C), ангиопоэтина-1, ангиопоэтина-2 и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ внутри плацентарного ложа, который уменьшается с гестационным возрастом. Kalkunte S. и соавт. (2008) предполагают, что эндометриальная и децидуальная ткани функционируют как «индуцибельная третичная лимфоидная ткань», которая поддерживает рекрутирование и экспансию CD56^{яркие}CD16⁻-NK-клеток и индуцируют транскрипционное усиление ангиогенных механизмов в ответ на экспозицию к локальным гормональным факторам, комплексу цитокинов и, возможно, гипоксии. Эти клетки дифференцируются из клеток-предшественников CD45⁺CD34⁺ и CD56^{тусклые}CD16⁺ NK-клеток и экспрессируют ангиогенные факторы, L-селектин и CCR-7, которые программируют их адгезивные свойства.

Гипоксия, вызванная имплантированным и быстро развивающимся эмбрионом, может стимулировать дальнейшие ангиогенные сигналы и экспрессию хемокинов в маточных NK-клетках для рекрутирования клеток внедряющегося трофобласта. При отсутствии соответствующих количеств ИЛ-10, сосудистого фактора роста эпителия, белка стромальных клеток (SCP), ХГЧ или при наличии внутриматочной инфекции могут происходить дальнейшее созревание и дифференцировка в цитотоксические CD56^{тусклые}CD16⁺-NK-клетки, запускающие осложнения беременности.

Некоторые предполагаемые механизмы объясняют материнскую толерантность к плоду. Известно, что децидуальная ткань иммуносу-

прессивна. Показано, что макрофаги из децидуальной ткани обуславливают супрессию в смешанной лимфоцитарной реакции.

Клетки трофобласта резистентны к убиванию обычными НК-клетками и макрофагами, но чувствительны к активированным клеткам. Предполагают, что потеря раннего эмбриона — событие, обусловленное запуском продукции цитотоксинов праймированными макрофагами. НК-клетки, трансформированные ИЛ-2 в активированные лимфокинами НК-клетки, приобретают способность убивать клетки трофобласта. Экспрессия антигенов I класса МНС (неклассических HLA-G, HLA-E, HLA-F и классического HLA-C) на клетках трофобласта может играть важную роль в угнетении цитотоксических эффекторных клеток, таких как НК и активированные лимфокинами НК-клетки, посредством взаимодействия с KIR.

Считают, что экспрессия молекул HLA-G (МНС класса Ib) защищает трофобласт от атаки материнскими НК-клетками активацией киллерингибиторных рецепторов. Цитотрофобласт продуцирует противовоспалительный ИЛ-10 и экспрессирует Fas-лиганды (FasL). Предполагают, что преимущественный ответ Th-2-типа способствует успешному течению беременности. Некоторое иммуносупрессивное влияние оказывает прогестерон, включая склонение к Th-2-типу иммунного ответа. Показано, что фермент, катаболизирующий триптофан, индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) блокирует материнскую T-клеточную активацию против мышинных плодов. Установлено также, что плацентарные и децидуальные клетки экспрессируют индолеамин 2,3-диоксигеназу.

Механизмы, поддерживающие иммуносупрессивное микроокружение в беременной матке, остаются не полностью выясненными. Показано, что децидуальные макрофаги экспрессируют низкие уровни костимуляторных молекул CD80 и CD86. Они не способны к дифференцировке в ДК. Децидуальные макрофаги продуцируют спонтанно высокие уровни ИЛ-10 и экспрессируют индолеамин 2,3-диоксигеназу. Эти данные подтверждают, что децидуальные CD14⁺-клетки представляют иммуоингибиторный тип макрофагов. Предполагается центральная роль этих клеток в локальной регуляции материнского иммунного ответа на антигены плода.

Децидуальные НК-клетки, в противоположность периферическим НК-клеткам, регулируют трофобластную инвазию *in vitro* и *in vivo*, продуцируя ИЛ-8 и интерферон-индуцибельный протеин-10 (IP-10) в дополнение к другим ангиогенным факторам (Hanna J. et al., 2006).

Увеличенные сывороточные уровни IP-10 ассоциируются с бедным ангиогенезом, наблюдаемым при преэклампсии.

Противовоспалительный цитокин ИЛ-10 играет важную роль при беременности в связи с его регуляторными отношениями с другими внутриутробными модуляторами и широким рангом иммуносупрессивных факторов. Экспрессия ИЛ-10 тканями плаценты зависит от возраста плода, с максимумом во втором триместре и последующим снижением к родам. Она низка в децидуальной и плацентарной тканях в случае необъяснимых спонтанных выкидышей, преждевременных родов и преэклампсии (Hanna N. et al., 2006).

Таким образом, при беременности маточные НК-клетки становятся адаптированными и толерантными к полуаллогенному плоду, служат специфическим микроокружением, балансируя между сниженной цитотоксичностью и увеличенной продукцией ангиогенных ростовых факторов. В ответ на соответствующую стимуляцию они могут реализовать свой цитолитический потенциал, что приведет к потере беременности.

В децидуальной ткани также присутствуют $CD8^+ \alpha\beta T$ -клетки, но на них снижена экспрессия TCR. Можно ожидать, что $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta T$ -клетки с редуцированной поверхностной экспрессией TCR при первой встрече с антигеном могут быть гипореактивными, но нормальная реактивность ранее активированных клеток проявляется в синтезе цитокинов, поддерживаемом аутокринной и/или паракринной стимуляцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Беременность — динамический процесс, при котором происходит адаптация иммунной, сосудистой и гормональной систем матери. При физиологически протекающей беременности плод, по сути являющийся полуаллогенным трансплантатом, не отторгается благодаря комплексу иммунологических механизмов, действующих в течение всего периода гестации. Морфологические и функциональные изменения в иммунной системе беременной, которые индуцируют толерантность к антигенам плода, сопровождают специфическую перестройку материнского организма, обеспечивающую нормальное развитие и выживание плода. Иммуносупрессия материнской иммунной активности реализуется в основном на децидуально-трофобластическом уровне. Между развивающимся плодом и его матерью происходит

физиологический обмен, за который отвечает плацента — специализированный орган, при образовании которого включается серия событий, известных как имплантация и плацентация. При этом клетки фетального происхождения (трофобласт) внедряются в децидуальную ткань (модифицированный слой клеток материнского происхождения). Такой процесс приводит к тесному контакту генетически отличающихся клеток, плода и матери. Успех имплантации во многом зависит от синхронности обмена сигнальными молекулами между эмбрионом и матерью. Ключевую роль в имплантации и плацентации играет трофобласт — периферическая часть зародыша человека.

Имплантацию бластоцисты контролируют эндометриальные цитокины и хемокины, способствующие миграции лейкоцитов в децидуальную ткань и вызывающие определенное воспалительное состояние. В этом процессе участвуют НК-клетки, взаимодействующие с непалиморфными антигенами I класса HLA, экспрессированными внедряющимся трофобластом. Важную роль играют факторы, определяющие первичную зону децидуализации (фактор роста фибробластов, фибронектин, ламинин, коллаген I, III, V типов, циклогеназа 2), и участвующие в формировании вторичной зоны децидуализации (металлопротеиназы матрикса, их тканевые ингибиторы, активаторы и ингибиторы плазминогена, протеин, связывающий трансформирующий фактор роста β , интегрины).

Децидуализация характеризуется резким увеличением в эндометрии количества НК-клеток — необычных лимфоцитов, предпочтительно распознающих и убивающих клетки, лишённые экспрессии классических MHC I класса. Они фенотипически и функционально отличаются от циркулирующих, так как не обладают цитолитической активностью, экспрессируют интегрины, способствующие миграции и внедрению этих клеток в децидуализированный эндометрий. Продукция цитокинов и уничтожение клеток-мишеней НК-клетками регулируются экспрессированными на клетках трофобласта белками MHC I класса, которые служат лигандами для НК-клеточных рецепторов. Наблюдается снижение количества Th-1 и увеличение Th-2-лимфоцитов, эффект которых пробуждается прогестероном и цитокинами. Th-2-цитокны защищают плод и трофобласт, угнетая НК-клеточную цитотоксическую активность и пролиферацию, производя сдвиг цитокиновой продукции НК-клетками к Th-2 фенотипу и угнетая цитотоксическую активность T-клеток. НК-клетки играют решающую роль в регуляции и врожденного, и приобретенного

иммунитета. Они вносят вклад в поддержание гомеостаза иммунной системы и регулируют приобретенный иммунный ответ, продуцируя цитокины и хемокины. К клеткам врожденной иммунной системы относят субпопуляцию Т-лимфоцитов, экспрессирующих антиген-связывающий рецептор $\gamma\delta$. Представляющие первую линию защиты от инфекционных агентов $\gamma\delta$ Т-клетки — возможные источники Th-1 и Th-2 цитокинов.

Дифференцировка цитотрофобласта контролируется различными агентами, такими как транскрипционные факторы, специфические гены, гормоны, ростовые факторы, цитокины и уровень O_2 . Однако для нормального процесса имплантации и инвазии трофобласта необходимо провоспалительное микроокружение. При имплантации бластоцисты в эндометрий наблюдают увеличение продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а угнетение воспалительного ответа приводит к нарушению имплантации.

Трофобластные клетки регулируют миграцию и дифференцировку моноцитов, индуцируют значительное увеличение секреции и продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Полиморфоядерные лейкоциты, мигрирующие в ткани в ответ на воспалительные или хемоаттрактантные стимулы, при активации производят интенсивный оксидативный взрыв, генерируя токсические АФК и освобождая деградирующие ферменты и воспалительные медиаторы при деградации, которые могут приводить к окислительному повреждению биомолекул.

Гипоксическая среда, в которой зародыш развивается в ранний период беременности, защищает фетальные ткани и процесс развития от опасного воздействия реактивных видов кислорода во время критических фаз эмбриогенеза и органогенеза. Эта защита возможна в связи с наличием внутренних и наружных антиоксидантных защитных механизмов. Известно, что низкие концентрации АФК стимулируют клеточную пролиферацию и экспрессию генов. Напротив, высокие уровни АФК заведомо опасны для выживания и функции клеток.

Таким образом, врожденная иммунная система не индифферентна к плоду и играет роль не только в защите хозяина от инфекции, но также в регулировании фетально-материнского взаимодействия. Важным условием в этом процессе считают установление адекватного микроокружения, которое способствует клеточному росту и угнетает вредные воспалительные реакции.

Глава 3

Иммунные факторы в патогенезе осложнений течения беременности

Различие форм осложнений течения беременности может быть связано с нарушением регулирующей или эффекторной роли компонентов иммунной системы на разных этапах развития системы мать—плацента—плод. Среди иммунных факторов, участвующих в патогенезе прерывания беременности, выделяют:

- аллоиммунные (NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, эмбриотоксические факторы и др.);
- аутоиммунные (аутоантитела к фосфолипидам, гормонам, нейротрансмиттерам и др.).

Представление об аллоиммунном нарушении основано на данных об активации клеток-эффекторов иммунных и воспалительных реакций, присутствующих в матке (резидентные клетки), в ответ на микробные или репродуктивные антигены, такие как отцовские антигены внедряющегося цитотрофобласта. Происходит вызванная активацией секреция этими клетками разнообразных цитокинов, включая ИЛ-2, ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-12, ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-6, колониестимулирующие факторы (КСФ), трансформирующий фактор роста β и др., с преобладанием Th-1- или Th-2-типов. Многократно

подтверждалась гипотеза, согласно которой при нормальной беременности иммунная система матери склонна к уходу от потенциально повреждающего ответа 1-го типа (Th-1 — воспалительного) ко 2-му типу (Th-2 — супрессорному). Предполагают, что при успешной беременности поддерживается гомеостаз среди этих белков, модулирующих процесс роста. В случае преобладания цитокинов Th-1-типа может произойти выкидыш или ограниченное внедрение трофобласта, заканчивающееся задержкой внутриутробного развития плода или тяжелой преэклампсией. В случае продуцирования малого количества цитокинов Th-1-типа может происходить неограниченная инвазия трофобласта с приращением плаценты или персистентной трофобластной болезнью.

Развитие иммунного ответа на аллоантигены отца, а иногда на антигены микроорганизмов и собственные антигены, на разных этапах гестации может приводить к различным осложнениям течения беременности:

- спонтанные выкидыши;
- тяжелая преэклампсия;
- внутриутробная задержка роста плода;
- преждевременные роды.

Большое внимание уделяют изучению роли аутоантител различной специфичности при осложненном течении беременности, в частности, изучению аутоантител к мембранным фосфолипидам, ДНК, тканям мозга, гормонам и др. при невынашивании беременности, преэклампсии, плацентарной недостаточности и внутриутробной задержке развития плода.

Системные и локальные аномальные уровни ростовых факторов и провоспалительных цитокинов, обусловленные генетическими или средовыми факторами, повреждают секреторную и инвазивную функции трофобласта. Например, трисомия 21 сочетается с различными нарушениями дифференцировки синцитиотрофобласта, уменьшением экспрессии молекул адгезии (интегрин $\alpha 1$) и увеличенным уровнем матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9), увеличением апоптоза синцитиотрофобласта в зоне материнско-фетального взаимодействия. При воспалительном процессе дизрегуляция секреции цитокинов и ростовых факторов, участвующих в контроле пролиферации, дифференцировки и функционировании клеток вневорсинчатого цитотрофобласта, изменение уровней продукции некоторых цитокинов могут приводить к снижению инвазивности трофобласта.

Нарушения функционирования трофобласта вызывают ряд неблагоприятных исходов беременности:

- уродства;
- задержку внутриутробного развития;
- спонтанные выкидыши;
- мертворождение.

Например, ограниченная инвазия трофобластом материнских сосудов коррелирует с преэклампсией, и задержкой внутриутробного развития, тогда как избыточная инвазия трофобласта ассоциируется с пузырным заносом, приращением плаценты и хориокарциномой.

3.1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО ВЫКИДЫША

Спонтанный выкидыш — наиболее частое осложнение беременности, поскольку им заканчивается в среднем 10–15% беременностей. Этиология значительной части выкидышей еще неизвестна. В основе 60–70% ранних самопроизвольных выкидышей лежит элиминация генетически неполноценного эмбриона. В патогенезе поздних выкидышей ведущая роль принадлежит инфекционным, аутоиммунным факторам, анатомическим аномалиям, истмико-цервикальной недостаточности.

Привычный выкидыш, определяемый как 2 и более клинически обнаруженных потерь беременности, случившихся до 20 нед гестации, имеет место у 1–4% беременных женщин. Около 60% ранних выкидышей связаны с хромосомными аномалиями плода, которые нельзя объяснить наличием родительских хромосомных аномалий, составляющих менее 5% из всех случаев.

Причины привычного выкидыша разнообразны:

- хромосомные аномалии зародыша;
- анатомические аномалии матки;
- эндокринные нарушения (недостаточная секреция прогестерона или активация либо недостаточность лютеиновой фазы, неконтролируемый диабет или заболевания щитовидной железы);
- инфекции;
- другие заболевания матери.

Кроме того, существует большая группа случаев, причины которых установить не удастся, названных «необъяснимыми». Частота

необъяснимых привычных выкидышей варьирует от 20 до 80%, в зависимости от диагностических возможностей медицинского учреждения. С каждым последующим случаем выкидыша риск прерывания беременности существенно увеличивается. Большинство супружеских пар с тремя (и более) привычными выкидышами не имеет живых детей.

К аллоиммунным механизмам потери беременности относят отсутствие блокирующих факторов, которые определяются у женщин с физиологическим течением беременности. Выявлена молекула с м.м. 80 кДа, не-HLA отцовский антиген, иногда определяемый в синцитиотрофобласте, который может увеличивать гуморальный ответ у матери. Развитие антител IgG к не-MHC отцовским антигенам, экспрессированным на трофобласте, подразумевает генерацию Th-2-хелперных клеток. Эти антитела, по-видимому, способствуют нормальному развитию беременности, блокируя активность NK-клеток.

Спонтанные абортс связаны с дефицитом локальной децидуальной супрессорной активности, опосредуемой естественными супрессорными клетками, продуцирующими трансформирующий ростовой фактор- $\beta 2$. $CD8^+$ $\gamma\delta$ T-клетки активируются в матке перед развитием $\gamma\delta$ -NK-подобных клеток, продуцирующих трансформирующий фактор роста $\beta 2$. У женщин с привычными выкидышами уменьшается количество лимфоцитов с большими гранулами ($CD56^+CD16^-$) и отсутствует мРНК трансформирующего фактора роста $\beta 2$. Предполагают, что трансформирующий фактор роста $\beta 2$ в матке угнетает активированные лимфокинами NK-клетки (LAK), которые прямо или косвенно опосредуют выкидыш, и регулирует инвазию трофобласта в спиральные артерии.

Кроме того, при ранней беременности могут становиться активными периферические T-клетки, которые экспрессируют CD8-маркер, участвующий в связывании T-клеточного рецептора с антигеном, связанным с молекулами Ib класса MHC, включая HLA-G. Они экспрессируют рецепторы для прогестерона и в ответ на прогестерон секретируют белок, угнетающий NK-клетки. Подобные $CD8^+$ $\gamma\delta$ T-клетки могут присутствовать и активироваться в матке до начала продукции трансформирующий фактор роста $\beta 2$ $\gamma\delta$ -NK-подобными клетками.

Предполагают существование ряда иммунологических механизмов, необходимых для нормального развития беременности, недостаточная или избыточная активность которых приводит к осложненному течению или прерыванию беременности. К ним относятся как различные защитные механизмы, предотвращающие так называемое

«отторжение» фетального аллотрансплантата, так и разные дефекты в защите, которые могут привести к выкидышу. Однако установлено, что в большинстве случаев прерывание беременности опосредуют не-антигенспецифические НК-клетки и макрофаги.

Показано, что при раннем спонтанном выкидыше и неразвивающейся беременности четко выявляется воспалительная реакция в пределах материнской части *decidua parietalis* и *decidua basalis*. Здесь постоянно присутствуют многочисленные материнские макрофаги, большие гранулярные и Т-лимфоциты, но нет В-лимфоцитов и плазматических клеток. Воспалительная реакция в маточно-плацентарной области в ранние сроки беременности протекает в редуцированном виде: преобладают некротические микроочаги с кариорексисом децидуальных клеток без выраженного эксудативного компонента и лейкоцитарной инфильтрации. После завершения органогенеза у плода (в основном во II триместре) в процессе морфофункционального становления иммунных органов и воспалительной реакции в органах плода появляется продуктивный компонент, главным образом за счет мезенхимных элементов. Срок 20 нед считается своеобразным рубежом, поскольку начинают функционировать собственные клеточный и гуморальный механизмы иммунитета плода.

Многие исследователи считают, что у пациенток, абортированный плод которых имеет нормальный хромосомный набор, прерывание беременности может быть связано с активацией НК-клеток. Показано, что у этих женщин выше содержание в крови НК-клеток, которые экспрессируют также CD16-антиген (CD56⁺CD16⁺) и могут продуцировать эмбриотоксические цитокины. В эндометрии увеличен процент классических CD16⁺-НК-клеток. В децидуальной ткани также увеличивается содержание активированных цитотоксических НК-клеток (CD57⁺) и уменьшается число клеток, продуцирующих трансформирующий фактор роста β2 (CD56⁺). Децидуальная популяция последних у пациенток с привычным выкидышем меньше, чем при нормальной беременности. Вероятно, сдвиг в субпопуляции CD56⁺-клеток служит основным механизмом для выкидыша (при нормальном хромосомном наборе).

Оценивали содержание НК-клеток с фенотипом CD56⁺CD16⁻CD3⁻ (составляющих главную популяцию децидуальных лимфоцитов при нормальной беременности) в периферической крови и децидуальной ткани женщин с привычными выкидышами. Доля CD56⁺CD16⁻CD3⁻клеток в периферической крови женщин после привычного выкидыша

составляла $0,71 \pm 0,32\%$, в децидуальной ткани — $17,5 \pm 8,1\%$, тогда как у женщин после первого выкидыша в крови определялось $0,92 \pm 0,51\%$, в децидуальной ткани — $41,1 \pm 19,2\%$ этих клеток. Уменьшение содержания клеток данного фенотипа у женщин с привычными выкидышами может быть связано с изменением профиля экспрессии цитокинов и в связи с этим — с невозможностью обеспечить зародыш соответствующей средой, содержащей факторы роста.

Изучение субпопуляций лейкоцитов в эндометрии женщин, страдающих привычным невынашиванием беременности, показало, что у пациенток, у которых произошел выкидыш, было значительно больше Т-хелперов ($CD4^+$), макрофагов ($CD14^+$) и НК-клеток ($CD16^+$, $CD56^+$) в эндометрии, чем у родивших живых детей (Quenby S., Farquharson R., 2006). Об увеличении количества периферических НК-клеток и инфильтрации ими эндометрия свидетельствуют данные многих авторов.

Отношение к целесообразности определения количества НК-клеток в периферической крови беременных женщин неоднозначно. Уровни их в крови колеблются, и для получения значимых результатов необходима специальная стандартизация. Тесты, проводимые с клетками эндометрия или децидуальной ткани, находящиеся на стадии эксперимента, не внедрены в клинику. В настоящее время большое внимание уделяют исследованию профиля продуцируемых цитокинов на системном и локальном уровнях. Установлено, что эндометрий у женщин, которые не переносили повторных выкидышей, продуцирует Th-2-цитокины ИЛ-4 и ИЛ-6, тогда как провоспалительные Th-1-цитокины ИЛ-2, ИЛ-12 и ИФН- γ преобладают в эндометрии женщин, страдающих необъяснимым привычным невынашиванием. Клинические и экспериментальные данные подтвердили концепцию, что нормальная беременность характеризуется Th-2-подобным феноменом. Цитокины Th-1-типа стимулируют аборт, а Th-2-типа предотвращают их. При беременности постулируется «Th-1 \rightarrow Th-2» сдвиг.

Существует еще одна гипотеза аллоиммунного механизма, предложенная для некоторых случаев репродуктивных нарушений у женщин. Она основана на данных об эмбриотоксическом влиянии цитокинов Th-1-типа, таких как ИФН- γ и ФНО- α . НК-клетки, активированные цитокинами, продуцируемыми при иммунной реакции, способны убивать клетки трофобласта. ИЛ-2 способствует превращению НК-клеток в лимфокин-активированные киллеры (ЛАК), повреждающие трофобласт. ИФН- γ активирует продукцию макрофагами

ФНО- α и ИЛ-12, которые в свою очередь стимулируют НК-клетки. Синтезированный макрофагами ИЛ-1 активирует Т-клетки и способствует дальнейшей цитокиновой продукции (цитокиновый каскад). Активированные макрофаги могут продуцировать АФК, токсичные для трофобласта, но неясно, НК-клетки или макрофаги в действительности убивают клетки трофобласта. Аналогичные выкидышу процессы у мышей указывают на то, что мишенями для макрофагов и НК-клеток служат скорее клетки эндотелия, чем трофобласт. Высокие уровни ИЛ-1, ИФН- γ и ФНО- α активируют свертывание крови, которой снабжается развивающийся эмбрион. Появляются вещества, вызывающие васкулиты, в результате инфильтрации полиморфоядерными лейкоцитами. При этом первым сигналом угрожающего выкидыша считают снижение уровня ХГЧ в крови. Клетки, ответственные за секрецию этих эмбриотоксических факторов, экспрессируют CD45 антиген (фенотип белых клеток крови) и особенно CD56 (большие гранулярные лимфоциты, НК-подобные клетки) и CD3 (Т-клетки).

В настоящее время стало очевидным, что защита плода от повреждающего материнского иммунного ответа основана на сложном механизме и сообщении между разными шагами в каскаде событий осуществляется посредством цитокинов.

Цитокины, имеющие отношение к беременности, делят на 2 категории:

- увеличивающие клеточный иммунитет, которые потенциально вредны для беременности (Th-1-тип цитокинов);
- проявляющие потенциально полезный эффект путем угнетения клеточных ответов (Th-2-цитокины).

Совместно с сотрудниками отделения невынашивания беременности, руководимого проф. В.М. Сидельниковой, мы исследовали связи сывороточных уровней цитокинов Th-1-типа (ИФН- γ и ФНО- α) и Th-2-типа (ИЛ-4) с исходом беременности у женщин с привычными выкидышами в анамнезе (Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., 2010). Статистически значимое увеличение продукции ФНО- α , ИФН- γ и снижение ИЛ-4 было характерно для пациенток с угрозой прерывания беременности. ИЛ-4 был обнаружен только у 19,6% пациенток с невынашиванием, тогда как у женщин с физиологическим течением беременности у 90%. Наличие сильной положительной корреляционной связи между повышением уровней провоспалительных цитокинов и прерыванием беременности свидетельствует о значительных локальных нарушениях, при которых происходит проникновение

цитокинов в системную циркуляцию. Нормализация уровней ФНО- α и ИФН- γ ассоциировалась с регрессией симптомов угрожающего выкидыша. Эти данные позволяют предположить, что нарушение цитокинового баланса может играть значительную роль в механизмах иммунологически обусловленного выкидыша.

Одним из компонентов системы защиты плода от повреждающего иммунного ответа матери является иммуномодуляция, опосредованная прогестероном. Прогестерон — существенный фактор для поддержания беременности у многих видов животных. Высокие концентрации прогестерона продлевают переживание ксеногенных и аллогенных трансплантатов и этот гормон влияет на разные фазы иммунного ответа *in vitro*. Стероидные гормоны действуют по принципу «толкнул и убежал». Связывание гормона с рецептором индуцирует структурные изменения или «трансформацию» рецептора, которые в свою очередь дают возможность комплексу связать специфические ДНК-последовательности. Это может вызывать избирательную транскрипцию генов-мишеней с прицельным синтезом ключевых медиаторных белков.

Иммуномодулирующий эффект прогестерона проявляется посредством прогестерон-индуцированного блокирующего фактора (ПИБФ), который угнетает иммунный ответ, развивающийся по Th-1-типу, аллоантиген- или митоген-индуцированную пролиферацию и изменяет профиль цитокиновой секреции активированными лимфоцитами.

Биологическое значение представленных данных заключается в хорошо известном факте — сильный клеточный ответ против антигенов плода вредит беременности, тогда как увеличенная продукция антител не оказывает такого эффекта. В спонтанном прекращении беременности наиболее вероятной кажется роль НК-клеток. При нормальной беременности у человека естественная цитотоксическая активность значительно ниже, чем у небеременных женщин. Наконец, отмечают значительное увеличение ее уровня у женщин перед родами. Прогестерон-индуцированный блокирующий фактор ингибирует НК-активность *in vitro* и предотвращает резорбцию плодов у мышей, индуцированную переносом селезеночных клеток с высокой естественной цитотоксической активностью.

Измененная продукция цитокинов клетками периферической крови, обусловленная прогестерон-индуцированным блокирующим фактором, может быть отражением локальных событий, происходя-

щих в материнско-плодовой области. В течение нормальной беременности иммуномодулирующие эффекты могут быть обусловлены измененной продукцией цитокинов лимфоцитами и изменением баланса Th-1/Th-2, которые наблюдаются у беременных, что связано с влиянием прогестерон-индуцированного блокирующего фактора (ПИБФ).

Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о положительном влиянии производного прогестерона (дидрогестерона) на регуляцию клеточных взаимодействий при ранних привычных потерях беременности. Молекула ретроизомера натурального прогестерона растительного происхождения — Дюфастона (дидрогестерона) почти идентична молекуле эндогенного прогестерона, но по гестагенной активности Дюфастон® в 10-30 раз превышает микронизированный прогестерон. Уникальная структура Дюфастона обуславливает повышение биодоступности при приеме внутрь и отсутствие метаболитов с нежелательной гормональной активностью (глюкокортикоидной, минералокортикоидной и др.). Благодаря высокому сродству к рецепторам прогестерона и селективному влиянию на них, Дюфастон® обеспечивает полноценную секреторную трансформацию эндометрия и является эффективным у пациенток с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и хроническим эндометритом.

Помимо гестагенного эффекта Дюфастон оказывает иммуномодулирующее влияние на систему мать-плацента-плод. Установлено, что Дюфастон® модулирует иммунный ответ беременной женщины и предотвращает отторжение плода путем стимуляции синтеза ПИБФ, который модулирует цитокиновый профиль и обеспечивает сохранение и прогрессирование беременности. Именно с иммуномодулирующим механизмом связывают высокую эффективность Дюфастона в терапии угрозы прерывания беременности и профилактике фетоплацентарной недостаточности. Н.Ю.Сотникова и соавт. (2006) приводят данные о снижении продукции провоспалительных цитокинов и повышении противовоспалительных цитокинов у женщин с угрозой невынашивания беременности при применении Дюфастона. В исследовании J. Kalinka и соавт. (2005) доказано, что Дюфастон® достоверно повышает уровень ПИБФ, изменяя иммунный ответ матери в направлении сохранения беременности.

Женщинам с привычными выкидышами в анамнезе или угрозой выкидыша во время беременности рекомендуют применение

Дюфастона в дозе 10-20 мг до 16 нед гестации (Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., 2010). Пациенткам с сенсибилизацией к прогестерону назначают 20-30 мг Дюфастона в сутки.

Назначение Дюфастона на этапе прегравидарной подготовки и на ранних сроках беременности с целью коррекции состояний, обусловленных недостаточным эффектом прогестерона, позволяет не только сохранить беременность, но и снизить частоту преждевременных родов, частоту и тяжесть преэклампсии, предупредить формирование фетоплацентарной недостаточности. Адекватная подготовка эндометрия к беременности важна для обеспечения более высокой эффективности лечения бесплодия в программах ЭКО, так как после переноса эмбрионов довольно часто беременность заканчивается выкидышем или замершей беременностью. Применение в программах ЭКО Дюфастона увеличивает частоту успешной имплантации и благодаря высокой степени надежности создаваемого им гормонального фона и иммуномодулирующего эффекта поддерживает многоплодную беременность.

Чувствительность к запускаемому цитокинами аборту у животных зависит от генетических особенностей самки и от того, провоцирует ли самец сильную защитную реакцию у нее. Однако результаты исследований распределения антигенов II класса HLA среди женщин с привычным выкидышем неясной этиологии противоречивы. Выявляется большая частота HLA-DR1, DQ5 и DR3, DQ2 гаплотипов у женщин по меньшей мере, с 4-мя привычными выкидышами в анамнезе по сравнению с контрольной группой. При проспективном исследовании у 62% женщин с HLA-DR1 и/или DR3 были привычные выкидыши, в то время как у женщин без этих аллелей — в 29% случаев. Делается заключение, что HLA-DR1 и -DR3 или близко связанные с HLA-DR аллогенотипы предрасполагают к потере беременности, причем вероятным механизмом может быть предрасположенность к гиперсекреции определенных цитокинов, в частности ФНО- α , в фетоплацентарной области.

Исследование связи между совместимостью по HLA в парах с привычными выкидышами и при бесплодии неясного генеза, после неуспешных попыток экстракорпорального оплодотворения выявило высокую частоту совместимости в парах по HLA-DR, а у пар с необъяснимым бесплодием — по HLA-DQ. Предполагают, что гены, локализованные в разных частях области II класса MHC, влияют на разные аспекты репродукции и что совместимость по антигенам HLA сама

по себе не является механизмом, вносящим вклад в репродуктивные дефекты. Сегмент МНС, в котором находятся гены, влияющие на репродукцию, также содержит гены, связанные с различными аутоиммунными заболеваниями, и это сопоставление может объяснять связь между репродуктивными дефектами и аутоиммунными заболеваниями.

Представлены данные о том, что определенные гаплотипы II класса МНС или гены в нерандомизированной ассоциации с этими локусами могут служить маркерами чувствительности к привычному выкидышу, включая иммунитет, развивающийся по Th-1-типу. А определенные микросателлитные (второстепенные) гаплотипы ФНО- α можно использовать в качестве маркеров защиты от потери беременности.

В генезе привычного выкидыша важную роль отводят материнскому иммунному ответу посредством активации материнских макрофагов и НК-клеток, а также изменения уровня продуцируемых цитокинов. По мнению Lunghi L. и соавт. (2007), доминирующую в репродуктивной иммунологии в течение многих лет гипотезу о Th-1/Th-2 сдвиге следует интерпретировать скорее как изменение уровня продукции цитокинов, регулирующих процессы, происходящие в сосудах при плацентации, чем как специфический механизм подавления Т-клеточного механизма отторжения плода. Поддерживается новая парадигма фето-материнского взаимодействия, полагающая, что беременность является взаимоотношением хозяин–паразит и что она может быть прервана, если для пользы вида необходимо сохранить жизнь матери.

На смену распространенному убеждению, что имплантацию зародыша контролирует материнский иммунный ответ, обусловленный Т-клеточным распознаванием экспрессированных плацентой отцовских аллоантигенов, пришло представление о том, что в контроле имплантации преимущественно участвует система аллогенетического распознавания, основанная на НК-клетках. При этом большое значение придается взаимодействию НК-клеточных рецепторов с молекулами, кодируемыми HLA-G, HLA-E и HLA-C. Цитокины Th-1-типа стимулируют НК-макрофагальную систему, что связано с выкидышем, тогда как цитокины Th-2-типа (и CD8 $^+$ γ Т-клетки) угнетают НК-макрофагальную систему, способствуя сохранению беременности. В децидуальной ткани обнаружены γ Т-лимфоциты, способные реагировать на антигены, экспрессированные трофобластом, и взаимодействовать с антигенраспознающим рецептором

$\alpha\beta$ T-клеток. По-видимому, клетки врожденной иммунной системы, такие как НК-клетки, макрофаги и $\gamma\delta$ T-лимфоциты, программируют иммунную систему поддержать иммунный ответ.

Однако в последнее время на ведущую роль в объединении многих механизмов формирования иммуносупрессии в ходе взаимоотношения матери и плода вновь выходит представление о важной роли T-клеточного распознавания экспрессированных плацентой отцовских аллоантигенов. T-регуляторные клетки способны осуществлять контроль над толерантностью к собственным антигенам, регулируя аутоиммунитет, и к аллоантигенам плода, предотвращая его отторжение. Нарушение функционирования T-регуляторных клеток вносит вклад в патогенез различных осложнений беременности.

3.2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Преэклампсия — многофакторный синдром, вызываемый комбинацией генетических, средовых, иммунологических факторов и факторов питания. Встречается приблизительно у 2–3% беременных женщин и является причиной материнской и фетальной заболеваемости и смертности. В основном она диагностируется в III триместре и часто связана с индуцированными беременностью артериальной гипертензией и протеинурией.

Патогенез преэклампсии в течение долгого времени остается достаточно иллюзорным. Предполагают, что в основе его лежит ненормальное состояние эндотелиальных клеток, хотя ход событий, ведущих к этим нарушениям, не совсем ясен. Помимо клинических симптомов, характерной считают патологическую основу преэклампсии, представленную общей вазоконстрикцией, увеличенной реактивностью сосудов, паренхимальной гиперперфузией, избыточными отеками и активацией тромбоцитов, запускающей коагуляционный каскад.

Некоторые аспекты преэклампсии предполагают иммунологическую этиологию. Они включают склонность к развитию преэклампсии при первой беременности, повышенный риск ее появления у женщин с аутоиммунными состояниями (системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром), и патофизиологическое сходство с другими иммунологически обусловленными заболеваниями, такими как гемолитическо-уремический синдром и тромбоцитопеническая пурпура. Поскольку преэклампсия потенциально

влияет на все органные системы, неудивительно, что наблюдаются изменения и в функционировании иммунной системы. Однако экспериментальные данные об иммунологических изменениях при преэклампсии разрозненны и противоречивы.

Многие проявления преэклампсии могут быть вызваны неадекватной активацией материнского воспалительного клеточного ответа. С помощью проточной цитометрии анализировали маркеры воспаления (CD11b, CD64, CD62L, HLA-DR и внутриклеточные активные формы кислорода) в лейкоцитах у женщин с физиологической беременностью и с преэклампсией. У последних была выявлена более низкая экспрессия CD62L и значительно более высокие уровни продукции АФК по сравнению со здоровыми беременными. Однако различия между беременными с преэклампсией и здоровыми были во многих отношениях меньшими, чем таковые в контрольных группах беременных и небеременных женщин. По сравнению с образцами от небеременных женщин, лейкоциты здоровых беременных показали значительно более высокие уровни у них CD11b⁺-, CD64⁺-клеток и АФК. Подтверждена и расширена концепция о том, что при преэклампсии происходят генерализованные изменения в циркулирующих лейкоцитах, характерные для воспаления. Кроме того, установлено, что нормальная беременность уже сама по себе характеризуется подобным ответом.

Вневорсинчатый цитотрофобласт при нормальной беременности трансформирует спиральные артерии в низкорезистентные сосуды. Ремоделирование спиральных артерий у беременных с преэклампсией дефектно, вследствие чего маточно-плацентарное кровообращение происходит в условиях высокого сопротивления сосудов. Предполагают, что для развития преэклампсии одной только нарушенной перфузии плаценты недостаточно. Это становится патологическим условием, когда изменение плацентации происходит на фоне определенных материнских конституциональных факторов. На развитие преэклампсии влияют различные факторы со стороны матери и плода.

Несовершенная иммуногенетическая адаптация — одна из популярных гипотез этиологии и патогенеза преэклампсии. Согласно этой гипотезе, недостаточное высвобождение Th-1-цитокинов, протеолитических ферментов и свободных радикалов вызывает мелкую инвазию спиральных артерий эндovasкулярными цитотрофобластными клетками и системную дисфункцию эндотелиальных клеток.

Это приводит к артериальной гипертензии, протеинурии и системной коагулопатии. При недостаточной инвазии и конвертировании цитотрофобластом миометриальной части материнских спиральных артерий в резистентные трубки в III триместре развивается артериальная гипертензия, которая отчасти служит реакцией, корректирующей рост плода путем адекватной плацентарной перфузии.

Во взгляде на этиологию преэклампсии в настоящее время преобладают две точки зрения (Robillard P.-Y. et al., 2007):

- неадекватная индукция иммунной толерантности к отцовским антигенам;
- предрасположенность к сосудистым заболеваниям.

При этом в развитых странах преобладает тип преэклампсии, наблюдающийся в последнем триместре беременности у тучных женщин 30 лет и старше. В развивающихся странах и в низких социально-экономических группах населения развитых стран преэклампсия преимущественно встречается у молодых женщин (15–25 лет), что более соответствует гипотезе нарушенной иммунной адаптации.

Согласно эпидемиологическим данным, представленным в ряде работ, короткие эпизоды экспозиции спермы (при использовании барьерных методов контрацепции перед зачатием) — фактор риска развития преэклампсии. Потенциально защитным эффектом обладает продолжительная экспозиция спермы. Толерантность к отцовским антигенам индуцирована продолжительной вагинальной экспозицией растворимых антигенов I класса МНС. В эксперименте гипореактивность Т-клеток к отцовским антигенам у мышей индуцировалась инсеминацией. Предполагают, что за индукцию толерантности к отцовским антигенам отвечают регуляторные Т-клетки CD4⁺CD25^{яркие}, количество которых увеличивается максимально во II и уменьшается в III триместре беременности. Снижение содержания этих Т-клеток совпадает со временем появления симптомов преэклампсии (после 20 нед гестации) и быстро уменьшается после родов. При второй беременности с тем же партнером количество их может быстро увеличиваться. Однако при второй беременности с новым партнером защитный эффект регуляторных Т-клеток памяти, специфичных к антигенам первого партнера, отсутствует (Saito S. et al., 2007).

Толерантность, специфичную к антигенам I класса МНС, могут индуцировать растворимые антигены семенной жидкости. При этом главную роль играют НК-клетки, но могут принимать участие и

регуляторные Т-лимфоциты. Специфическую к антигенам II класса МНС толерантность индуцируют HLA-DR антигены, экспрессированные на сперматозоидах. При этом центральную роль в индукции и поддержании ее играют $CD4^+CD25^+$ Т-регуляторные клетки.

Регуляторные $CD8^+$ и $CD4^+CD25^+$ Т-клетки могут объяснять такие факторы риска преэклампсии, как первоотцовство, короткую экспозицию спермы и перенос донорского эмбриона. Количество Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{яркие}$), свыше 70% которых экспрессируют маркер FoxP3, у женщин с преэклампсией значительно снижено (как в периферической крови, так и в децидуальной ткани), по сравнению с небеременными и женщинами с физиологически протекающей беременностью (Sasaki Y. et al., 2007).

Показано, что Toll-подобные рецепторы (TLR) ингибируют иммунорегуляцию, обусловленную $CD4^+CD25^+$ Т-регуляторными клетками. При преэклампсии наблюдается избыточный воспалительный ответ и увеличение экспрессии TLR-4 и ядерного фактора NF- κ B во вневорсинчатом цитотрофобласте. На основании этого предположили, что Т-регуляторную функцию угнетает TLR-сигнал. Снижение количества Т-регуляторных клеток и ослабление их функции может разрушать материнскую толерантность к плоду.

Патофизиология преэклампсии основана на нарушении плацентации и дефиците маточно-плацентарного кровотока. Goldman-Wohl D. и Yagel S. (2007) указывают на существование двух возможных путей развития преэклампсии.

- В случае развития преэклампсии по **фетальному пути** спиральные артерии не подвергаются превращению и остаются узкими.
- При **материнском пути** развития преэклампсии спиральные артерии могут произвести конверсию, но дефицит маточно-плацентарного кровотока развивается в результате их блокады.

Возможна комбинация обоих путей, материнского и плодового, с отсутствием преобразования спиральных артерий и соответствующей блокадой артерий. Общим для материнского и фетального путей считают образование узких спиральных артерий, являющихся основой механизма развития преэклампсии.

Вклад фетального пути зависит от влияния отцовских генов. Niby S.E. и соавт. (2004) выявили взаимосвязь с преэклампсией HLA-C антигенов на фетальных цитотрофобластных клетках и KIR, экспрессированных на материнских децидуальных НК-клетках. Оба эти фактора характеризуются значительным полиморфизмом. В частности,

авторы предполагают, что матери, лишённые большинства или всех активационных KIR, имеют высокий риск развития преэклампсии в случае наличия у плода антигенов HLA-C, принадлежащих к группе HLA-C2. Для развития преэклампсии важно отсутствие контакта вневорсинчатого цитотрофобласта с НК-клетками, необходимого для корректного ремоделирования спиральных артерий на ранних сроках беременности.

Первичный дефект в ремоделировании сосудов при преэклампсии неизвестен. Goldman-Wohl D. и Yagel S. (2007) предполагают, что фетальный путь возникает в результате действия регулятора, возможно транскрипционного фактора, который контролирует дифференцировку трофобласта, дефективную энзимологию при миграции или инвазии трофобласта, деградацию внеклеточного матрикса, отклонение от контроля материнской иммунной системой, отсутствие НК-клеточной стимуляции и снижение продукции цитокинов и хемокинов, а также ангиогенные дефекты. По-видимому, таким образом фетальный путь может приводить к отсутствию внутрисосудистой инвазии трофобласта и конверсии спиральных артерий.

Дефектный материнский путь вызывает блокаду спиральных артерий. Вероятно, дефицит маточно-плацентарного кровотока может быть вызван блокадой спиральных артерий даже после нормального расширения в результате острого атероза, характеризующегося фибриноидным некрозом и инфильтрацией средней оболочки пенястыми клетками, а также артериальным тромбозом, наблюдаемым в плацентах беременных с артериальной гипертензией. Эта блокада может быть вызвана генетическими или приобретенными тромбофилическими нарушениями.

Известна молекулярная основа некоторых врожденных тромбофилических нарушений, которые повышают риск развития осложнений беременности (в том числе развитие преэклампсии). Например, фактор V мутации Лейдена, G1691A замещение, которое кодирует резистентность фактора V к инактивации протеином С, увеличивающим риск тромбоза. Другая форма врожденной тромбофилии с известным молекулярным механизмом, связанная с повышенным риском развития преэклампсии, — мутация гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) с заменой 677 C→T. Дефект фермента приводит к гипергомоцистеинемии, которая известна как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Увеличение в плазме уровня гомоцистеина увеличивает риск венозных и артериальных тромбозов.

Исследования, проведенные в нашем Центре, показали повышение частоты выявления мутантной формы метилентетрагидрофолатредуктазы у женщин с преэклампсией (Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е., 2010). Наиболее часто она встречалась при тяжелых формах заболевания (77,8%) и повторной преэклампсии (86,7%). Показана прямая корреляционная зависимость между уровнем гомоцистеина и степенью тяжести преэклампсии.

Приобретенные тромбофилические нарушения, такие как антифосфолипидный синдром, сочетаются с плацентарной сосудистой патологией и с ненормальным свертыванием крови в кровотоке плаценты. Два типа антифосфолипидных аутоантител (волчаночный коагулянт и антикардиолипидные антитела) наиболее часто приводят к развитию преэклампсии. Эти аутоантитела могут вызывать преэклампсию двумя путями:

- повреждая имплантацию эмбриона;
- вызывая тромбоз маточно-плацентарных сосудов.

Таким образом, в основе материнского пути развития преэклампсии могут лежать коагуляционные дефекты, вызывающие блокаду уже ремоделированных спиральных артерий. К ним относят хроническую артериальную гипертензию, гипергомоцистеинемию, тромбофилические нарушения, ожирение, синдром X и сахарный диабет.

Показано, что сниженная экспрессия HLA-G на инвазирующемся трофобласте — компонент тяжелой преэклампсии (Goldman-Wohl D., Yagel S., 2007). Редуцированная экспрессия HLA-G может стать первичной причиной поверхностной инвазии трофобласта, так как лишенные экспрессии HLA-G клетки цитотрофобласта чувствительны к лизису децидуальными НК-клетками и не способны внедряться глубоко в децидуальную ткань и спиральные артерии.

Данные ряда исследователей легли в основу теории центральной роли НК-клеток во взаимодействии фетального трофобласта и материнской иммунной системы в процессе ремоделирования спиральных артерий (Croy et al., 2006; Hiby et al., 2004; Hanna J. et al., 2006). Показано, что НК-клетки, взаимодействующие с вневорсинчатым цитотрофобластом, секретируют ростовые факторы, цитокины и ангиогенные стимуляторы, обладающие способностью увеличивать трофобластную инвазию, необходимую для расширения спиральных артерий. Выявлены генетические особенности, которые вызывают сверхугнетение НК-клеток, ведущее к уменьшению секреции цитокинов (ИЛ-8, индуцируемый ИФН- γ протеин-10), ангиогенных

факторов (фактора роста сосудистого эндотелия и плацентарного фактора роста) и увеличивают риск преэклампсии.

Угнетение ангиогенеза как причины преэклампсии подтверждают данные о повышенном уровне растворимого рецептора фактора роста эндотелия сосудов и растворимого корецептора трансформирующего фактора роста β в сыворотке беременных женщин с преэклампсией (Venkatesha S. et al., 2006). Возможно, эти факторы могут способствовать развитию дефектов маточно-плацентарного кровотока, приводящих к гипоксии плаценты и дисрегуляции эндотелиальной клеточной функции. Ключевые патогенетические механизмы развития преэклампсии — недостаточная внутрисосудистая инвазия вневорсинчатого трофобласта в спиральные артерии, несоответствующая активация эндотелиальных клеток и чрезмерная воспалительная реакция. Активация эндотелиальных клеток кажется частью генерализованной внутрисосудистой воспалительной реакции, включающей лейкоциты, свертывающую систему крови и систему комплемента.

Наблюдают значительные вариации степени трофобластной инвазии, которые дают основание предполагать, что не существует универсального ответа факторов, участвующих в процессах миграции и инвазии трофобласта. Недостаточная дифференцировка трофобласта является критической при полной неудаче плацентации, в таком случае беременность не продолжается. Подобным образом при недостаточной иммунной адаптации, возникшей фетальным или материнским путем, происходит прерывание беременности. Но в случае, если фетальный путь трофобластной инвазии был не полностью дефектным и некоторые сосуды произвели конверсию или только некоторые сосуды были заблокированы при материнском коагуляционном нарушении, беременность может продолжаться. При этом проявления преэклампсии будут явными в III триместре, когда обедненный плацентарный кровоток не сможет больше обеспечивать плод необходимым питанием. По мнению авторов, разделение преэклампсии соответственно дефективному материнскому или фетальному путям развития может способствовать идентификации беременных с риском преэклампсии, разделению на группы и назначению адекватной терапии (Goldman-Wohl D., Yagel S., 2007).

Некоторые другие факторы вовлечены в недостаточное ремоделирование спиральных артерий:

- дифференцировка вневорсинчатого цитотрофобласта в инвазивный фенотип;

- увеличение степени апоптоза;
- несбалансированный контроль миграционных и инвазивных функций вневорсинчатого цитотрофобласта;
- неспособность клеток цитотрофобласта принимать эндovasкулярный фенотип.

Исследованию роли цитокинов в патогенезе преэклампсии уделяют особое внимание. Сниженная продукция гепатоцитарного ростового фактора (hEGF) при преэклампсии может быть частью дефицита, который вносит вклад в аномальное переключение молекул адгезии цитотрофобласта и инвазию, которая сопутствует этому синдрому. Параллельно при преэклампсии также может быть искажена передача сигналов hEGF — c-Met при ангиогенезе и неудачен цитотрофобластный псевдоваскулогенез. Эти данные указывают, что одним из важных дефектов при преэклампсии может быть отсутствие существенного уровня hEGF для инициации и поддержания дифференцировки и инвазии цитотрофобласта.

В крови женщин с преэклампсией обнаружены изменения уровней некоторых цитокинов, которые продуцировались в зоне материнско-фетального взаимодействия и включались в физиологический контроль пролиферации клеток вневорсинчатого цитотрофобласта, дифференцировку и функцию. Предполагают, что увеличение продукции ИЛ-2, обусловленное сниженной экспрессией плацентарного HLA-G, приводит к снижению инвазивности трофобласта у женщин с преэклампсией. Кроме того, дефицит ИЛ-10 может вносить вклад в повышенный воспалительный ответ, вызванный ФНО- α и ИФН- γ , против клеток трофобласта.

При преэклампсии выявлено увеличенное соотношение про- и противовоспалительных цитокинов, обусловленное сдвигом к Th-1-состоянию, в сочетании с избыточной продукцией воспалительных цитокинов, среди которых отмечен ИЛ-12. ИЛ-12 может быть доминирующим фактором в генезе преэклампсии, однако события, ведущие к активации макрофагов при преэклампсии, неизвестны. Неясно, активируются ли макрофаги до изменений функционирования эндотелиальных клеток или после. Для преэклампсии характерны задержка внутриутробного развития плода и значительные изменения иммунной функции матери. Поскольку ИЛ-12 обладает антиангиогенным эффектом, влияющим на опухолевый рост и метастазирование, предполагают его участие в повреждении сосудов плаценты. Последнее приводит к задержке роста плода, обычно выявляемой у женщин с артериальной гипертензией во время беременности.

Известно, что ИЛ-12 способен направлять развитие Т-клеточного ответа на чужеродные антигены по Th-1-типу. Продукция ИЛ-12 может вносить вклад в фундаментальный сдвиг иммунологического баланса при развитии преэклампсии. Вероятно, в то время как нормальная беременность регулируется Th-2-типом иммунного ответа, иммунологическая функция клеток-эффекторов при преэклампсии может быть образцом Th-1-типа иммунного ответа при доминировании продукции ИЛ-4 и ИЛ-10 и факторов роста, что отражает нарушенную регуляцию цитокиновой продукции в этих условиях.

Обнаружено снижение экспрессии ИЛ-10 ворсинками трофобласта у беременных с преэклампсией при одновременном увеличении содержания ФНО- α . У 30% беременных с преэклампсией в клетках вневорсиночного трофобласта отмечено ядерное окрашивание на ИЛ-10. Снижено по сравнению с нормой содержание ИЛ-10 в сыворотке крови. Уменьшение экспрессии ИЛ-10 ворсинчатым трофобластом связывают с возможным усилением материнского иммунного ответа на антигены плода и неадекватным развитием плаценты при преэклампсии.

Существуют механизмы, которые во время беременности угнетают Th-1-клетки, макрофаги и NK-клетки. Трофобласт сам продуцирует фактор, угнетающий экспрессию Т-клеточного рецептора для антигена. В дополнение прогестерон способствует развитию Т-хелперных клеток 2-го типа, которые секретируют ИЛ-4 и/или ИЛ-10. ИЛ-4 — цитокин, угнетающий развитие Th-1-клеток. ИЛ-10 — возможный ингибитор Th-1-клеток, NK и макрофагов, его может также продуцировать трофобласт. Децидуальные большие гранулярные лимфоциты продуцируют многие цитокины, включая некоторые типы Th-1 и Th-2.

Исследование плацентарной экспрессии цитокинов у больных с преэклампсией выявило в образцах плаценты при преэклампсии повышенный уровень экспрессии ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-10. Предполагается, что это может иметь отношение к плацентарной гипоксии и вносить вклад в глобальную эндотелиальную дисфункцию при преэклампсии.

Нарушения в экспрессии трансформирующего фактора роста $\beta 3$ также связаны с преэклампсией. Показано, что снижение ростовых факторов восстанавливает инвазивную способность преэкламптических трофобластных клеток.

При нормальной беременности отмечают умеренно выраженное внутрисосудистое воспаление, тогда как преэклампсия характеризу-

ется сильно выраженным внутрисосудистым системным воспалением (Richani K. et al., 2005; Sargent I.L. et al., 2006) и активацией врожденной иммунной системы (Wang C.C. et al., 2007).

Один из рецепторов врожденной иммунной системы, который продуцируется печенью — лектин, связывающий маннозу (*Mannose-Binding Lectin* — MBL). Он распознает определенные углеводные лиганды на микроорганизмах и измененную собственную структуру, активирует опосредованный лектином путь активации комплемента через MBL-ассоциированные сериновые протеазы. MBL может также способствовать комплемент-независимому опсонифагоцитозу, апоптозу и модуляции воспалительных процессов (Gal P. et al., 2007). Он способствует фагоцитозу апоптотических клеток, модуляции воспалительного ответа, расщеплению коагуляционного фактора XIII и фибриногена.

Поскольку гены MBL содержат одиночные нуклеотидные полиморфизмы в промоторе и кодирующих участках, в концентрациях MBL сыворотки крови наблюдаются большие индивидуальные различия, зависящие от генотипа. Показано, что при дефиците MBL повышена чувствительность к микробной инфекции. Некоторые исследователи обнаружили, что низкие концентрации лектина связаны с повышенным риском привычного выкидыша неустановленной этиологии. Напротив, MBL играет активную провоспалительную роль при хронических заболеваниях и высокое содержание его в сыворотке крови связано с увеличенным повреждением гипоксией/реперфузией и микрососудистыми осложнениями при сахарном диабете. Гомозиготность по аллелям, связанным с высокой концентрацией MBL в сыворотке крови, чаще встречается у женщин с преэклампсией, чем при физиологической беременности. Это позволяет предполагать участие опосредованных MBL процессов в патогенезе преэклампсии (Sziller I. et al., 2007).

Than N.G. и соавт. (2008) показали, что средний вес и гестационный возраст при родах были значительно выше, а процент не рожавших ранее — значительно ниже в группе женщин с физиологической беременностью по сравнению с таковыми у женщин с преэклампсией. У пациенток с преэклампсией более высокие средние концентрации MBL в плазме периферической крови и в большем проценте случаев были выявлены высокие концентрации MBL. Вероятно, этот компонент врожденной иммунной системы включается в механизмы развития преэклампсии. По мнению авторов, лектиновый путь играет важную роль в запуске активации комплемента после гипоксии/реоксигенации в эндотелиальных клетках человека.

Предполагают, что активация материнского комплемента через MBL может вносить вклад в процесс разрушения трофобласта, экспрессирующего отцовские антигены (Girardi G. et al., 2006). При повреждении внедряющегося трофобласта увеличивается возможность недостаточной инвазии трофобласта в спиральные артерии с последующей гипоксией и развитием симптомов, характерных для преэклампсии.

В материнском кровотоке у пациенток с преэклампсией выявлены усиленное расщепление продуктов комплемента (Richani K. et al., 2005), увеличенное отложение компонентов комплемента в стенках маточных спиральных артерий и гломерулярных капилляров почек. Хотя отложения компонентов комплемента были найдены также в нормальных зрелых плацентах и в маточно-плацентарных артериях при нормальной беременности, они были слабее выражены, чем при преэклампсии. Точная патофизиологическая роль MBL при преэклампсии еще не выяснена. Однако не исключено, что более высокие концентрации MBL и продуктов расщепления комплемента в кровотоке матери отражают чрезмерное внутрисосудистое воспаление и активацию врожденной иммунной системы при преэклампсии (Wang C.C. et al., 2007; Than N.G. et al., 2008).

Причислив преэклампсию к воспалительным заболеваниям, исследователи сфокусировались на признании инфекции в качестве причины преэклампсии. Показано, что риск развития преэклампсии был повышен у женщин с отрицательной серологической реакцией на вирусные инфекции (цитомегаловирус, вирусы Эпштейна-Барр и простого герпеса) до беременности. Риск развития индуцированной беременностью артериальной гипертензии был значительно выше у инфицированных вирусом герпеса.

Таким образом, у женщин с осложнением беременности преэклампсией происходят значительные изменения функционирования иммунной системы, преимущественно в ее врожденном компоненте.

3.3. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ, СВЯЗАННЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ

Несмотря на большое количество проводимых исследований, механизмы, лежащие в основе физиологической беременности, и их изменения, которые запускают патологические процессы, неполностью

поняты. Однако найдена значимая взаимосвязь между особенностями воспалительного ответа и неблагоприятными исходами беременности. Действительно, воспаление, обусловленное инфекцией, способно нарушить физиологические изменения, которые регулируют плацентарный кровоток и тонус миометрия.

У большинства женщин с отягощенным акушерским анамнезом обнаруживают смешанную персистентную вирусную инфекцию. Многие заболевания, часто встречающиеся в акушерской практике (самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды, эндометриты), связывают с широко распространенными вирусами, персистирующими в организме (вирусы простого герпеса, цитомегалии, энтеровирусы и др.). Известно, что хроническая вирусная инфекция может в свою очередь приводить к развитию иммунодефицитных состояний. Персистенция в эндометрии условно-патогенных микроорганизмов и вирусов вызывает активацию иммунопатологических процессов, повышенный синтез провоспалительных цитокинов. Это служит препятствием к созданию в предимплантационный период необходимой для формирования защитного барьера локальной иммуносупрессии, что может привести к прерыванию беременности. Инфекцию рассматривают как один из основных факторов развития привычного выкидыша. У женщин, страдающих привычным невынашиванием беременности, высока частота гистологически верифицируемого диагноза хронического эндометрита (60–70%). Следствием нарушенного равновесия между инфекционным агентом и защитными механизмами организма может быть угнетение или активация иммунных реакций. Изменение иммунного статуса приводит в свою очередь к активации инфекции и развитию аутоиммунных нарушений.

Предполагают, что продолжительная бессимптомная инфекция запускает иммунные реакции на микробные эпитопы, которые присутствуют у человека. Это может влиять на репродукцию человека, так как у многих пар с проблемами бесплодия или невынашивания беременности присутствует инфекция в генитальном тракте. Высокие титры антител к бактериальным и человеческим белкам теплового шока обнаруживают в сыворотке крови многих пациенток, подвергавшихся экстракорпоральному оплодотворению. На модели культивируемых мышинных эмбрионов показано, что эти антитела нарушают развитие эмбрионов. При их морфологическом анализе выявлено аномально большое количество клеток в стадии апоптоза. В присутствии антител к белкам теплового шока маркеры апоптоза выявлялись

в культурах эмбрионов более часто, чем в неэкспонированных с антителами эмбрионах. Отмечен неблагоприятный эффект иммунной сенсибилизации к белкам теплового шока на развитие эмбриона. Персистенция инфекционных агентов в эндометрии и развитие эндометрита могут, не оказывая прямого действия на плод, опосредованно через иммунную систему и/или систему гемостаза, влиять на развитие плода и стать причиной прерывания беременности.

У женщин с прерыванием беременности в I триместре уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ- β , ИФН- γ , ИЛ-6 значительно повышен. При патоморфологическом исследовании обнаруживают признаки хронического воспалительного процесса. Повышение уровней провоспалительных цитокинов под действием инфекции во II и III триместрах беременности приводит к увеличению синтеза амниотическими оболочками простагландина, способствующего преждевременному развитию родовой деятельности.

Преждевременные роды — частая причина пренатальной заболеваемости и смертности. Один из основных факторов риска, считающихся «точной» причиной преждевременных родов, — инфекционный (в частности, пиелонефрит). В эксперименте определяли роль цитокинов в индукции преждевременных родов при пиелонефрите. Измеряли высвобождение различных цитокинов в культуре спленоцитов, а в почках и плаценте определяли экспрессию мРНК ряда цитокинов. Клетки беременных мышей, инфицированных *E. coli*, несущими Dg-адгезин, продуцировали увеличенные количества ИФН- γ , ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α по сравнению с клетками мышей, инфицированных бактериями, лишенными адгезина (мутанты), или контрольных небеременных мышей. Наличие мРНК в плаценте и почках подтвердило важную роль ИФН- γ , ИЛ-6 и ФНО- α в индукции преждевременных родов на данной модели. Увеличенная экспрессия мРНК ИЛ-15, наблюдаемая в плацентах мышей, инфицированных Dg⁺ *E. coli*, позволила предположить важную роль этого цитокина в индукции инфекцией преждевременных родов.

Хориоамниониты — одно из проявлений внутриутробной инфекции — идентифицировались у 20–33% женщин с преждевременными родами гистологическим анализом плаценты после родов. Однако антенатальный диагноз хориоамнионита труден в связи со специфическими клиническими симптомами. Растущее понимание важной роли цитокинов в патогенезе инфекционных заболеваний нацеливает репродуктивных иммунологов на изучение их при преждевремен-

ных родах, связанных с хориоамнионитами. Показано существенное увеличение содержания воспалительных и близких им цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-8) в сыворотке крови матерей с хориоамнионитом или без. Выявлена положительная корреляционная связь между уровнями ИЛ-8 в сыворотке крови матери и пуповинной крови. Проводили титрование уровней цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-6 и ИЛ-8) в сыворотке крови матерей с хориоамнионитом или без и исследовали возможность предсказания гистологически выявленного хориоамнионита. По уровню ИЛ-8 эти группы существенно различались, но наблюдалась положительная корреляционная связь между содержанием в материнской и пуповинной крови.

По сравнению с другими маркерами, такими как лейкоцитоз и белки острой фазы, клиническое обнаружение уровней ИЛ-8 в материнской сыворотке крови было более чувствительным и специфичным для обнаружения хориоамнионита. Механизм вызванных хориоамнионитом преждевременных родов, опосредованных цитокинами, неизвестен. Ответ материнского организма на инфекцию, специфическая генерация цитокинов могут быть ключевыми в этом механизме. ИЛ-1 и ФНО- α влияют на степень продукции простагландина Е-2 (возможного мышечного контрактильного агента) амниотическими клетками, клетками хориона и децидуальными клетками. Исследовали ответ трофобластных клеток *in vitro* на ЛПС путем экспрессии цитокинов, обнаруживаемой с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР). ЛПС дозозависимо увеличивал экспрессию ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ИЛ-10. Сделано заключение, что трофобластные клетки не только синтезируют и секретируют гормоны, существенные для поддержания беременности, но и продуцируют провоспалительные цитокины, уровни которых повышаются в ответ на бактериальный эндотоксин.

Плацента человека конститутивно продуцирует ИЛ-8, который служит хемотаксическим и активирующим фактором для нейтрофилов, играющих важную роль в защитных механизмах организма матери. При хориоамнионите его продукция увеличивается. Клетки плаценты продуцируют ИЛ-8 дозозависимым образом при стимуляции культур ЛПС. Экспрессию генов ИЛ-8 в трофобласте в III триместре наблюдали с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР. Клетки плаценты в культуре высвобождали также ИЛ-8 дозозависимо в ответ на рекомбинантные ИЛ-1 α и ФНО- α , но не на рекомбинантный ИЛ-6. Более того, ЛПС-активированные клетки плаценты

спонтанно продуцировали намного большие количества ИЛ-8 и увеличивали ответ на рекомбинантные ИЛ-1 α и ФНО- α . Предполагается, что клетки плаценты, обладающие множественными эндокринными функциями, проявляют иммунологические функции посредством конститутивной продукции ИЛ-1 и ФНО- α , которые стимулируют высвобождение плацентарного ИЛ-8. При хориоамнионите этот цитокиновый каскад в плаценте может нарастать под воздействием ЛПС, способствуя усилению защитных механизмов против развития инфекционного процесса в организмах плода и матери.

ИЛ-8 может участвовать в процессе родов, созревании шейки матки и разрыве оболочек плода. Высвобождение ИЛ-8 хориодецидуальными эксплантатами, полученными у женщин с хориоамнионитом, было значительно большим, чем из эксплантатов, взятых из доношенной нормальной плаценты. Предполагают, что продукция ИЛ-8 при хориоамнионите предшествует появлению клинических симптомов.

Определяли наличие связи между уровнями цитокинов в амниотической жидкости и сосудистой инвазивной фазой внутриутробной инфекции, появлением перивентрикулярной лейкомаляции, корреляции между уровнем С-реактивного белка, признанным биологическим маркером воспаления в материнской сыворотке, и уровнем цитокинов в амниотической жидкости. Обнаружена значимая положительная корреляционная взаимосвязь между появлением гистологического хориоамнионита, сосудистого распространения инфекции в оболочках плода, материнского воспалительного синдрома и неонатального сепсиса. Сильная положительная связь была найдена между концентрацией С-реактивного белка и уровнями цитокинов в амниотической жидкости. ИЛ-1 β был признан наилучшим прогностическим критерием сосудистого распространения хориоамнионита, а ФНО- α — основным предвестником развития тяжелых ранних неонатальных инфекций. Не обнаружено никакой связи между уровнями цитокинов в амниотической жидкости и развитием перивентрикулярной лейкомаляции. Сделан вывод, что ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α продуцируются при внутриутробном воспалении и инфекции, но не могут непосредственно участвовать в развитии повреждений белого вещества головного мозга плода.

Показано, что провоспалительные цитокины (ФНО- α и ИФН- γ) стимулируют апоптоз ворсинчатого цитотрофобласта, тогда как эпидермальный ростовой фактор защищает клетки трофобласта.

Предположено, что ФНО- α , ИФН- γ и эпидермальный фактор роста регулируют апоптоз, в частности модулируя уровни клеточной экспрессии антиапоптотического гена Bcl-2. Установлена высокая экспрессия Bcl-2 в ворсинчатом цитотрофобласте, однако неизвестно, экспрессируется ли белок в культивируемом ворсинчатом цитотрофобласте, а если представлен, то функционирует ли. Показано, что мРНК Bcl-2 экспрессируется в культивируемом ворсинчатом цитотрофобласте и что белок сильно экспрессируется в цитотрофобласте I триместра и зрелой плаценты. Уровни экспрессии белка Bcl-2 были одинаковыми в цитотрофобласте I триместра и зрелой плаценты. Культивирование клеток с ФНО- α /ИФН- γ и эпидермальным фактором роста не изменяло экспрессии Bcl-2-белка или Bax — члена апоптотического семейства Bcl-2. Одновременное определение апоптоза и содержания Bcl-2 с помощью проточной цитометрии показало, что клетки, экспрессирующие низкие уровни Bcl-2, подвергаются апоптозу, индуцируемому ФНО- α /ИФН- γ , чаще, чем клетки, экспрессирующие более высокие его уровни. Сделано заключение, что экспрессия этого белка является конститутивной и что модуляция его уровней экспрессии не опосредуется регуляцией апоптоза в этих клетках цитокинами и ростовыми факторами.

Интересными представляются данные о роли ИЛ-18 — цитокина, причастного к механизмам иммунного ответа Th-1-типа, таким как активация НК-клеток, индукция эндотоксинового шока у мышей и повреждений печени ЛПС, индукция синтеза ИФН- γ . Исследовали роль ИЛ-18 в различных феноменах беременности, таких как начало родов, токсикоз или выкидыш, при которых преобладает Th-1-статус. ИЛ-18 не был обнаружен в сыворотках небеременных здоровых женщин и при физиологической беременности до родов. Однако с началом схваток сывороточный уровень ИЛ-18 увеличивается и продолжает оставаться на высоком уровне в течение родов, затем после родов возвращается к норме. Заметный подъем уровня ИЛ-18 наблюдался у беременных с токсикозом и сопутствующей жировой дистрофией печени. Исследовали эффект ИЛ-18 на поддержание беременности в эксперименте на мышах ДВА \times СВА. Внутривенное введение отдельно ИЛ-18 или ИЛ-12 не оказывало значительного влияния на этих беременных мышей. Однако комбинация ИЛ-12 и ИЛ-18 вызывала полную резорбцию зародышей, когда цитокины вводились на 6–8-й день после образования слизистой пробки. Введение этих цитокинов на 14–17-й день приводило к различным осложнениям гестационного

процесса, таким как задержка роста плода, плацентарное кровоотечение или преждевременные роды, которые происходили у каждой беременной мыши. Эти данные позволили предположить, что ИЛ-18 участвует в патогенезе различных осложнений беременности.

При длительной персистенции инфекционных агентов отмечают повышение ИЛ-6. Оценка уровня этого цитокина в околоплодных водах дает возможность предположить наличие внутриутробного инфицирования плода и оценить его тяжесть. Определение повышенного уровня ИЛ-6 в отделяемом цервикального канала сопровождается осложнением гестационного процесса хориоамнионитом, хронической внутриутробной гипоксией плода, отслойкой плаценты, преждевременными родами.

Таким образом, иммунные реакции вносят существенный вклад в патогенез осложнений гестационного процесса, связанных с инфекцией.

3.4. АУТОИММУННЫЕ АНТИТЕЛА И ИХ РОЛЬ В ОСЛОЖНЕНИИ ТЕЧЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Яркое проявление аутоиммунитета — антитела, вырабатываемые против антигенов собственного организма, так называемые «аутоантитела». С одной стороны, аутоантитела рассматривают как нормальный продукт иммунной системы, участвующий в поддержании гомеостаза в организме, с другой — как фактор патогенеза различных заболеваний. Отличия между нормой и патологией носят количественный характер. Считается, что к развитию патологических изменений в организме могут привести чрезмерное повышение концентрации и/или аффинности, или снижение этих параметров ниже допустимых значений. Характер патологии определяется конкретной антигенной специфичностью аутоантител.

Экспериментальным путем доказано, что в организме здоровых людей постоянно присутствует какое-то количество аутоантител к ДНК, гистонам, белкам цитоскелета клеток, компонентам межклеточного матрикса, ко многим ферментам и другим компонентам клеток собственного организма. Описано более 100 «естественных» аутоантител разной эпитопной направленности. Продуцируются эти антитела субпопуляцией В-лимфоцитов, несущих поверхностный

антиген CD-5. CD-5-позитивные лимфоциты составляют от 10 до 30% всех В-клеток. Синтез аутоантител начинается еще в раннем онтогенезе, причем раньше, чем синтез антител, направленных к чужеродным, бактериальным и вирусным антигенам. Начало активной продукции аутоантител совпадает во времени с началом важнейших этапов — дифференцировки и морфогенеза плода. Титры аутоантител повышаются при стрессе, беременности, старении и практически при всех заболеваниях.

В середине 80-х годов прошлого века было высказано мнение о существовании синдрома, сначала названного антикардиолипидным, а впоследствии — антифосфолипидным, в основе которого лежит развитие аутоиммунной реакции к фосфолипидам мембран тромбоцитов, эндотелиальных клеток и клеток нервной системы. В настоящее время считается, что антитела к фосфолипидам представляют собой семейство антител, распознающих антигенные детерминанты анионных и нейтральных фосфолипидов и комплексные эпитопы, образующиеся в процессе взаимодействия фосфолипидов и фосфолипид-связывающих белков. В это семейство антител включают реагины, обуславливающие ложноположительную реакцию Вассермана, активным комплексом в которой служит кардиолипид и антитела, способные замедлять фосфолипидзависимые реакции гемостаза *in vitro*, так называемый «волчаночный антикоагулянт».

Наличие одного или нескольких клинических симптомов, не относящихся к беременности (тромбозы, аутоиммунная тромбоцитопения, Кумбс-позитивная гемолитическая анемия, *Livedo reticularis*) и относящихся к беременности (спонтанные аборт, внутриутробная гибель плода, преждевременные роды, задержка внутриутробного развития плода, фетальный дистресс, преэклампсия), названо антифосфолипидным синдромом. Предполагается, что у женщин с антифосфолипидным синдромом плацентарная коагулопатия обуславливает потерю плода в основном после 10 нед гестации.

Антитела к кардиолипину, считающиеся наиболее диагностически значимыми при антифосфолипидном синдроме, комплексируются с 50 кДа белковым плазменным кофактором β 2-гликопротеином-1. Связывание антител с фосфолипидами может зависеть от белков, таких как протромбин, фактор Ха, протеины С и S. Предполагают, что антифосфолипидные аутоантитела могут быть смесью антител к β 2-гликопротеину-1 и эпитопам фосфолипидов, которые стабилизируются, взаимодействуя с другими белками.

Определяли, могут ли β 2-гликопротеин-1-зависимые антикардиолипидные антитела представлять лучший маркер выявления репродуктивного риска, чем обычные антифосфолипидные аутоантитела. При исследовании сыворотки крови 356 женщин продемонстрировано большое число случаев выявления β 2-гликопротеин-1-зависимых антикардиолипидных антител у пациенток (54%), отсутствии их в контрольной группе (0%). Не было отмечено никаких различий для β 2-гликопротеин-1-независимых антикардиолипидных или любых антител к фосфолипидам. Однако 2 или более среди 6 антифосфолипидных аутоантител, особенно к фосфатидилсерину и фосфатидилинозитолу, определялись значительно чаще, чем в контрольной группе. Более того, позитивность к 2-м из этих 3 антифосфолипидных аутоантител коррелировала в 59% случаев с позитивностью к β 2-гликопротеин-1-зависимым антикардиолипидным антителам. Сделано заключение о том, что как одиночный тест β 2-гликопротеин-1-зависимые антитела к кардиолипину превосходили β 2-гликопротеин-1-независимые антикардиолипидные и другие одиночные антифосфолипидные аутоантитела для обнаружения репродуктивных неудач, связанных с аутоантителами. Но при использовании широкой панели антифосфолипидных аутоантител, особенно включающей антитела к кардиолипину, фосфатидилсерину и фосфоинозидам, получены сходные результаты.

Частота обнаружения антифосфолипидных аутоантител в популяции варьируется от 0 до 14%, в среднем 2–4%, встречается чаще у женщин, чем у мужчин, увеличивается у лиц пожилого возраста, при стрессе, беременности, у больных с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, воспалительными процессами. Однако тромботические осложнения развиваются нечасто.

Только малая часть женщин с тремья и более выкидышами в анамнезе имеют аутоиммунные нарушения и аутоантитела к фосфолипидам. Данные о частоте антифосфолипидного синдрома противоречивы, так как зависят от метода измерения антифосфолипидных аутоантител и определения уровня положительной оценки. По хорошо определенным клиническим и лабораторным критериям частота антифосфолипидного синдрома <5% у женщин с привычным невынашиванием беременности. В 5–15% случаев потери плода у матерей встречается антифосфолипидный синдром. Причем самопроизвольные выкидыши наблюдаются в 82% случаев у женщин с IgG антителами и только в 40% — с IgM антителами к фосфолипидам.

К патофизиологическим механизмам, участвующим в антикардиолипин-зависимой потере беременности, относят увеличенную агрегацию тромбоцитов, сниженную активность тромбоцитов, увеличенный тромбоцитоз и вазоконстрикцию, являющиеся результатом связывания иммуноглобулинов, особенно IgG, с кардиолипином мембраны эндотелиальных клеток в плацентарной ткани.

Предполагают, что аутоиммунитет к другим фосфолипидам и клеточным компонентам также может быть механизмом привычного выкидыша, хотя в большинстве случаев причина и следствие неадекватно различаются, за исключением антител против фосфатидилсерина. Антитела, особенно IgM, против фосфатидилсерина угнетают межклеточное слияние клеток культивируемой *in vitro* трофобластной линии и повреждают продукцию гормонов трофобластом и его инвазию *in vitro*.

При сравнительных исследованиях патологии плацентарной ткани после первого прерывания беременности и результатов иммунологических тестов с использованием периферической крови у женщин со спонтанным выкидышем обнаружены такие гистопатологические находки, как виллит, хронический интервиллозит, сосудистый тромбоз и увеличенный фиброидный некроз. В 13 из 14 случаев на основе гистологических данных можно было предположить иммунологическую этиологию. При обследовании в течение 2 мес после прерывания беременности 10 из 13 женщин имели по меньшей мере один измененный иммунологический параметр (увеличенное количество НК-клеток у 6, антинуклеарные антитела — у 2, антифосфолипидные — у 3).

Экспрессия HLA-DR7 обнаружена у 40% женщин с необъяснимыми привычными выкидышами и антикардиолипиновыми антителами и только у 8,3% пациенток, не имевших антикардиолипидных антител. Имеется взаимосвязь между HLA-DR7 антигенами и присутствием антикардиолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием беременности неясного генеза, на основании чего предполагается, что HLA-DR-гены могут контролировать чувствительность к специфической продукции аутоантител. В проспективном исследовании генотипов II класса с помощью ПЦР показана значительно более высокая частота DRB1*0403 и DRB1*0410 в группе пациенток с антикардиолипидными антителами и привычными выкидышами. Предполагают, что система HLA может участвовать в генезе антикардиолипидного синдрома.

В связи с отсутствием у антифосфолипидных аутоантител органоспецифичности клинические проявления антифосфолипидного синдрома разнообразны:

- эндокринные расстройства;
- легочная гипертензия;
- поражения центральной нервной системы.

Молекулы фосфолипидов являются компонентами клеточной мембраны и участвуют в передаче клеточных сигналов, регулирующих клеточное деление и секрецию. Некоторые фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин служат молекулами адгезии, участвуя в слиянии клеток при развитии синцития. Высказано предположение о возможном участии в этиологии бесплодия и привычного невынашивания беременности антифосфолипидных аутоантител (препятствующих развитию цитотрофобласта в синцитиотрофобласт на ранних сроках беременности). Антитела к этим фосфолипидам препятствуют фетоплацентарному развитию *in vitro*, угнетая трофобластную инвазию и уменьшая его способность секретировать ХГЧ.

Клинические проявления антифосфолипидного синдрома связаны с синтезом антифосфолипидных аутоантител, относящихся к субклассу иммуноглобулина — IgG2. Это наблюдение представляется важным в связи с тем, что синтез IgG-антител является Т-независимым, иницируемым углеводсодержащими и полисахаридными антигенами, к которым относятся бактериальные капсульные и некоторые вирусные антигены. В акушерской практике встречаются такие проявления антифосфолипидного синдрома, как повторяющаяся гибель плодов на ранних сроках беременности, задержка внутриутробного развития плода, рано возникающая тяжелая преэклампсия.

Предполагают, что патофизиологическими механизмами, приводящими к гибели плода, могут быть влияние аутоантител на эндотелий сосудов, вызывающее снижение его антитромбогенной активности, и действие на тромбоциты, приводящее к гиперагрегации. У пациенток с антифосфолипидным синдромом могут развиваться тромбозы кровеносных сосудов различной локализации, плацентарные инфаркты, фетоплацентарная недостаточность. Все это приводит к ухудшению оксигенации и питания плода в связи с недостаточным маточно-плацентарным кровотоком, тромбозом сосудов плаценты и нарушением имплантации эмбриона. Повреждение плаценты способствует трансплацентарному переходу материнских антител к плоду.

Развитие инфарктов плаценты связывают также со снижением экспрессии анексина V на поверхности плацентарных ворсин и синтезом антител к трофобласту.

IgG, выделенные из сыворотки крови пациентов с циркулирующим волчаночным антикоагулянтом, в эксперименте увеличивают синтез плацентарного тромбосана без компенсаторного увеличения продукции простациклина. Это может иметь значение в развитии акушерской патологии во II триместре беременности. Инфаркты в плаценте возникают в связи с децидуальной и плацентарной васкулопатией, предполагаемый механизм которой заключается в угнетении антифосфолипидными антителами синтеза простациклина I_2 , активации тромбомодулин-протеина C и плазминогена в эндотелиальных клетках и активации тромбоцитов. Для обеспечения нормального тромбообразования необходимо поддержание определенного соотношения простациклина I_2 и тромбосана As , которое нарушается у беременных с антифосфолипидным синдромом при снижении уровня простациклина I_2 и повышении тромбосана As , обладающего выраженным сосудосуживающим действием, и стимулирует агрегацию тромбоцитов. Изменяется также состояние и свойства стенок капиллярной сети. Поликлональные антикардиолипидные антитела, кроме того, ингибируют синтез плацентарного ХГЧ.

Обсуждается возможное влияние иммунных комплексов на серотонин и калликреин-кининовую систему. Действие брадикинина приводит к отрыву от эндотелия осколков клеточных мембран, которые обладают свойствами тканевого тромбопластина. Это ускоряет свертывание крови. Под влиянием брадикинина из эндотелия высвобождается активатор плазминогена тканевого и урокиназного типа, что стимулирует внешний механизм активации фибринолиза.

Для объяснения того, как антифосфолипидные аутоантитела вызывают репродуктивные потери, предложено много возможных механизмов, в том числе влияние антифосфолипидных антител на развитие плаценты или секрецию гормонов. Предполагают возможность взаимодействия циркулирующего волчаночного антикоагулянта с активированной формой протеина C. Показано уменьшение антикоагулянтного действия активированного протеина C и протеина S при добавлении плазмы, содержащей волчаночный антикоагулянт. Сделан вывод, что антифосфолипидные аутоантитела влияют на антикоагулянтный потенциал системы протеин C—протеин S *in vitro*.

По данным отделения невынашивания ФГУ «НЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития РФ частота обнаружения волчаночного антикоагулянта у пациенток с привычным невынашиванием составляет 27,5–31% (Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., 2010). Исследовали антитела к кардиолипину в популяции у 259 женщин сотягощенным анамнезом (самопроизвольные выкидыши, антенатальная гибель плода или смерть новорожденного в раннем неонатальном периоде, связанные с задержкой внутриутробного развития, преэклампсией или отслойкой плаценты). Установлено, что частота встречаемости антител среди этих пациенток составляет 25%, а при сочетании привычного невынашивания и антенатальной гибели плода в анамнезе эта цифра увеличивалась до 33%. Кроме того, отмечена частота спонтанных абортс у женщин с антителами к кардиолипину — 25%.

Осложненный и неэффективный процесс репродукции человека связан отчасти с влиянием некоторых других аутоантител. Установлено, что антитела к полинуклеотидам и гистонам имеют сходную корреляционную зависимость с антителами к кардиолипину. Кроме того, сделан вывод, что изменения в В-лимфоцитарном звене, наблюдаемые у этих больных, связаны с поликлональной активацией. Это заключение подтвердилось, когда были представлены данные о том, что органоспецифические аутоантитела, такие как анти-треоидные, связаны с риском прерывания беременности и бесплодием. Предполагается, что наличие аутоантител реже, чем инфекция, приводят к репродуктивным неудачам. Они скорее служат маркером неидентифицированного Т-лимфоцитарного дефекта у этих пациентов.

Проводившийся нами субпопуляционный анализ лимфоцитов периферической крови показал, что во время беременности у женщин с антифосфолипидным синдромом происходят значительные изменения в Т-клеточном звене иммунной системы (высокое содержание Т-лимфоцитов, особенно активированных — HLA-DR⁺, и цитотоксических клеток — CD57⁺ и CD16⁺). Эти изменения наиболее выражены у женщин с неблагоприятным исходом беременности. Лучший исход беременности чаще наблюдался при более низком, приближенном к норме содержании CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов.

Основные различия в средних показателях содержания Т-лимфоцитов, их субпопуляций и доли активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺DR⁺) наблюдались между группой с благополучным исходом беременности и группами женщин, у которых беременность закончи-

лась рождением ребенка с явными признаками гипотрофии и, особенно, выкидышем. У женщин, родивших детей с гипотрофией, наиболее высокое содержание цитотоксических клеток ($CD16^+$, $CD57^+$) отмечалось в I триместре, затем несколько снижалось во II триместре. Содержание НК-клеток в крови женщин, беременность которых закончилась гибелью плода, было достоверно выше, чем у беременных, родивших живых детей.

Некоторые исследователи, анализируя субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, характеризуют репродуктивный иммунофенотип, по которому можно прогнозировать будущую потерю беременности. У пациенток с иммунологическими причинами бесплодия и привычными выкидышами содержание тотальных Т-клеток ($CD3^+$) и Т-хелперов ($CD4^+$) часто выше границы нормы, что свидетельствует об активации иммунной системы. Выраженная активация иммунной системы (увеличенное содержание $CD3^+$ - и $CD4^+$ -клеток и экспрессия рецептора для ИЛ-2 на более чем 10% $CD3^+$ -лимфоцитов) связана с наличием аутоиммунного заболевания, такого как тиреоидит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит. Количество цитотоксических Т-клеток ($CD8^+$) редко бывает выше нормы, чаще снижено. Содержание В-лимфоцитов ($CD19^+$) обычно увеличено (выше 12%). У этих женщин обнаруживают увеличение количества НК-клеток ($CD56^+CD16^+$). Уровни выше 18% коррелируют с репродуктивной неудачей, что объясняется способностью этих клеток (благодаря наличию на их поверхности молекул адгезии) прилипать к клеткам плаценты и оказывать цитотоксическое действие с помощью продуцируемого ФНО- α . Значительное увеличение содержания $CD19^+CD5^+$ -клеток (в норме 2–10%) сопровождается продукцией поликлональных антител к гормонам, рецепторам для гормонов и нейротрансмиттерам.

Одно из проявлений антифосфолипидного синдрома — рано возникающая тяжелая преэклампсия. Преэклампсия остается наиболее распространенным и тяжелым осложнением, опасным для жизни и здоровья женщины, ее плода и новорожденного. Показано, что у 29,4% женщин с преэклампсией в анамнезе были высокие титры IgG и/или IgM аутоантител к кардиолипину.

В проведенном нами проспективном исследовании течения беременности и уровня антител к 6 фосфолипидам у 74 женщин с отягощенным акушерским анамнезом (тяжелая преэклампсия, перинатальные потери) и с различной степенью выраженности преэклампсии

при данной беременности (Пономарева И.В. и соавт., 1999; Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е., 2010) были получены данные о выраженной активации продукции антител обоих изотипов — IgM и IgG — ко всем исследованным фосфолипидам у 47 (63,5%) женщин на протяжении всей беременности. Только у 27 (36,5%) пациенток уровень антифосфолипидных аутоантител не отличался от такового при физиологической беременности.

У беременных с преэклампсией и патологическим содержанием антифосфолипидных аутоантител достоверно чаще выявляют:

- заболевания сердечно-сосудистой и мочеполовой систем;
- нарушение жирового обмена;
- эндокринные заболевания;
- патологию нервной системы;
- инфекционные заболевания в анамнезе;
- воспалительные заболевания гениталий;
- хроническую вирусную инфекцию.

Результаты, полученные в ходе исследования, подтвердили, что немаловажную роль в повышенной продукции антител играют перенесенные инфекционные заболевания. Более высокую частоту встречаемости хронических воспалительных заболеваний и вирусной инфекции у женщин с патологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител, чем в группе с их физиологическим содержанием, можно объяснить тем, что в основе аутоиммунного процесса лежит нарушение толерантности к собственным антигенам. Развитие последнего опосредовано сложным взаимодействием иммунной системы с различными инфекционными агентами.

У женщин с патологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител наблюдают более раннее развитие преэклампсии на сроках 20–24 нед беременности — у 34 (45,9%) пациенток, в то время как в группе с физиологическим содержанием антифосфолипидных аутоантител только у 14,9% преэклампсия развивалась в эти сроки. Преэклампсия средней и тяжелой степени чаще встречается среди беременных с патологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител. Хроническая плацентарная недостаточность и внутриутробная гипотрофия плода гораздо чаще встречаются у беременных с патологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител, чем в группе с физиологическим уровнем аутоантител.

Высокая частота встречаемости антител к фосфатидилсерину при преэклампсии и/или внутриутробной гипотрофии плода,

по-видимому, может быть объяснена тем, что в процессе развития плаценты клетки трофобласта экспрессируют фосфатидилсерин на поверхности мембраны. В результате этого распределения фосфолипидов клетка становится доступной повреждающему воздействию антифосфолипидных аутоантител, такие же изменения происходят при активации тромбоцитов. При изучении уровней аутоантител к фосфолипидам при преэклампсии и/или внутриутробной гипотрофии плода установлено значительное повышение активации продукции антител класса IgM с I триместра беременности. Эти результаты были достоверно выше ($p < 0,001$, $p < 0,05$), чем при физиологической беременности и в группе с преэклампсией, но с физиологическим содержанием антифосфолипидных аутоантител. Уровни IgM антител сохранялись патологическими на протяжении всей беременности, и не было тенденции к их снижению в III триместре. Уровень антифосфолипидных IgG-антител также был значительно повышен с I триместра беременности и сохранялся таковым до родов (в отличие от результатов, полученных при физиологической беременности и у пациенток с физиологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител, у которых антифосфолипидные IgG-антитела отсутствовали).

Установлено, что у женщин, родивших детей с признаками внутриутробной гипотрофии плода, уровни IgM и IgG антител ко всем определяемым фосфолипидам были незначительно выше во II и III триместрах и достоверно выше в I триместре по отношению к подгруппе женщин, родивших детей с нормальными весоростовыми показателями. Полученные результаты совпадают с данными других исследователей — у женщин, родивших детей с признаками внутриутробной гипотрофии плода, наиболее выражена поликлональная активация продукции антител к мембранным фосфолипидам, а по частоте встречаемости преобладают антитела к фосфатидилинозитолу и фосфатидилсерину.

Наличие выраженной активации продукции антифосфолипидных IgM- и/или IgG-антител с I триместра беременности можно использовать в прогнозировании не только тяжелой преэклампсии, но и внутриутробной гипотрофии плода уже с ранних сроков беременности. Обычно высокий уровень антифосфолипидных аутоантител во время беременности уже с I триместра сочетается с выраженной гиперкоагуляцией, не соответствующей сроку беременности, активацией функции тромбоцитов, повышением протромбинового индекса и концентрации фибриногена, которые сохраняются на протяжении всей беременности.

Антифосфолипидные аутоантитела, играя важную роль в развитии гиперкоагуляции и активации функции тромбоцитов, способствуют повышенному образованию тромбозов, как венозных, так и артериальных.

Таким образом, достоверное увеличение активации продукции антифосфолипидных IgM- и/или IgG-антител при преэклампсии и внутриутробной гипотрофии плода с I триместра беременности свидетельствует о том, что определение уровня антифосфолипидных аутоантител может служить методом доклинической диагностики данных осложнений гестационного процесса. Выявлена прямая взаимосвязь между степенью тяжести преэклампсии и уровнем антифосфолипидных антител обоих классов: при преэклампсии тяжелой степени отмечаются достоверно более высокие уровни антифосфолипидных аутоантител, чем при физиологической беременности и преэклампсии легкой степени. Отсутствие динамики снижения продукции антифосфолипидных антител во время беременности — неблагоприятный прогностический признак, который можно использовать для оценки эффективности проводимой терапии.

Важную роль играет также дисбаланс цитокинов. Снижается уровень ИЛ-3, причем введение его при антифосфолипидном синдроме уменьшает фетальные потери. Изменение баланса Th-1/Th-2 может вносить вклад в эффект антиидеотипических антител. Уровни ФНО- α у пациенток с антифосфолипидным синдромом значительно выше, чем у здоровых женщин контрольной группы. У пациенток с антифосфолипидным синдромом обнаружено повышение уровней ИЛ-6 и ФНО- α , а также тенденция к снижению ИФН- γ .

В настоящее время не вызывает сомнений важность механизмов иммунорегуляции в становлении и развитии беременности. Если распознавание материнскими клетками экспрессированного на трофобласте неклассического антигена I класса происходит в отсутствие антигенов II класса, иммунный ответ развивается по Th-2-пути, т.е. начинается продукция супрессорных факторов и блокирующих антител, а также синтез цитокинов и ростовых факторов, способствующих росту плаценты. При этом нет увеличения уровня продукции цитотоксических факторов или аутоантител. Привычные выкидыши у женщин могут происходить вследствие распознавания отцовских трофобластных HLA-G-антигенов вместе с собственными антигенами II класса. При определенных условиях, например, совпадении по этим антигенам клеток матери и отца (DQ A1) или при местном

воспалительном процессе, вызванном внутриклеточными инфекционными агентами, это приводит к развитию ответа по Th-1-пути. В таком случае отсутствует синтез блокирующих антител, супрессорных факторов, ростовых факторов и цитокинов, но продуцируются цитотоксические факторы, а также аутоантитела (к фосфолипидам, ДНК, гормонам, нейротрансмиттерам). Создаются условия, при которых происходит повреждение или замедление образования синцитиотрофобласта, задержка роста трофобласта и продукции им гормонов, его гибель.

Есть сведения о роли аутоантител к гормонам как возможным факторе нарушения репродуктивной функции. Особое внимание уделяется исследованию репродуктивной функции у женщин с высоким уровнем антител, способных связывать ХГЧ — один из ключевых гормонов, определяющих становление и развитие беременности, особенно в ранние сроки. С этим свойством ХГЧ связана настойчивость исследователей, пытавшихся, несмотря на малую иммуногенность ХГЧ и большую перекрестную реактивность индуцируемых им антител с другими пептидными гормонами, создать вакцину для контрацепции, используя эффект антител, блокирующий биологическую активность ХГЧ, для прерывания беременности на ранних сроках.

Антитела, способные связывать ХГЧ, могут быть обнаружены без введения экзогенного ХГЧ как у небеременных, так и во время беременности. Однако вопрос, что индуцировало их образование, мало изучен. Трудно однозначно утверждать, что эти антитела синтезированы в ответ на антигенные детерминанты именно молекулы ХГЧ, даже если они распознают β -субъединицу, так как она близка по антигенной структуре с β -субъединицами гонадотропинов лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, а также тиреотропного гормона. Однако факт частого выявления у женщин с невынашиванием беременности высокого уровня антител, способных связывать ХГЧ, представлялся важным независимо от того, вносят ли они вклад в патогенез прерывания беременности или просто служат одним из маркеров аутоиммунных процессов, сопровождающих патологию беременности. Проведенные исследования показали, что спектр выявляемых антител представлен антителами как к нативной молекуле ХГЧ, так и к ее субъединицам (α и β). Выявляются иммуноглобулины классов М и G, более часто — класса М. Характерными сроками повышения уровня антител к ХГЧ считают 12–14, 22–24 и 32–34 нед гестации. Антитела к ХГЧ длительно циркулируют в крови

и вне беременности. Они могут появляться при использовании гонадотропных гормонов. Наличие антител к ХГЧ часто сопутствуют другие аутоиммунные состояния, в частности, антифосфолипидный синдром.

Установлены факторы, предрасполагающие к развитию сенсibilизации к ХГЧ:

- инфекционные заболевания;
- отягощенный аллергологический анамнез;
- использование с целью стимуляции овуляции гонадотропных препаратов;
- искусственные аборты и самопроизвольные репродуктивные потери, особенно в I триместре.

Показан волнообразный характер динамики уровней антител к ХГЧ во время беременности с тремя характерными пиками, что позволило патогенетически обосновать усиление глюкокортикоидной терапии в эти сроки. У женщин с высоким уровнем антител к ХГЧ отмечают раннее (3–8 нед гестации) развитие хронической формы синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, что, по-видимому, является одной из основных причин внутриутробной гибели эмбриона и плода.

Именно поэтому при подготовке к предстоящей беременности этих женщин используют антиагреганты и малые дозы гепарина. На протяжении всей беременности осуществляют контроль уровня антител к ХГЧ и показателей системы гемостаза с периодичностью 2–5 нед. Высокие титры антител часто сохраняются и в послеродовом периоде, тогда как нарушения гемостазиологических параметров выявляются реже по сравнению с таковыми при антифосфолипидном синдроме.

Обсуждается вопрос о роли антител к нейротрансмиттерам в готовности матки к имплантации. Необходима регуляция механизмов синтеза и деградации в гладких мышцах и соединительной ткани матки при подготовке к беременности, во время беременности и родов, а также при инволюции после родов. Для моделирования и ремоделирования этой системы *in vitro* и *in vivo* необходим серотонин. Продукция прогестерона в постовуляторный период предотвращает действие механизма деградации. После родов серотонин начинает снова индуцировать продукцию коллагеназы, в результате чего происходит инволюция матки. Показана необходимость взаимодействия гладких мышц с серотонином для их функционального развития.

Серотонин-зависимая продукция ИЛ-1 мышечными клетками необходима для синтеза коллагеназы при моделировании и ремоделировании матки. Введение в экспериментах животным антисеротониновых антител перед беременностью препятствует адекватному для беременности развитию матки. Введение этих антител после родов предотвращает инволюцию матки. Введение нормального иммуноглобулина человеческого женщинам с повышенным уровнем антител к серотонину приводит к снижению уровня антисеротониновых антител приблизительно через 3 мес.

3.5. ИММУНОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСЕ ЛЕЧЕБНЫХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

В акушерской практике уже достаточно хорошо зарекомендовало себя назначение в период беременности преднизолона, аспирина* и гепарина пациенткам с антифосфолипидным синдромом (В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих, 2010). Уменьшение потерь беременности значительно, хотя не всегда, коррелирует со снижением уровня антител. Применение преднизолона и аспирина* способствует выживанию плода, однако, такое лечение в течение нескольких месяцев может оказывать серьезное побочное действие на мать и плод, в частности, в связи с изменениями в иммунной системе матери, происходящими в результате заболевания и лечения.

Lunghi L. и соавт. (2007) рисуют перспективу дальнейшего исследования молекул, участвующих в физиологической и патологической беременности, что должно наметить путь к их использованию, а также их агонистов и антагонистов в качестве терапевтических агентов. В частности, контроль материнского воспалительного ответа и его влияния на сосудистую и миометральную функции может сопровождаться введением прогестерона и других глюкокортикоидов. Установлено, что гормоны влияют на Th-1/Th-2 баланс при ранней беременности, угнетая Th-1 ответ, и таким образом благоприятствуя продукции противовоспалительных цитокинов. В случае привычного выкидыша преобладание Th-1-типа ответа увеличивает количество периферических НК-клеток и инфильтрацию ими эндометрия (Qenby S., Farquharson R., 2006).

Показано, что глюкокортикоиды в дозах, эквивалентных увеличивающим созревание легких плода, угнетают продукцию провоспалительных цитокинов в эксплантатах из нормальной и преэкламптической плацент без изменения освобождения противовоспалительных цитокинов. Кроме того, отмечено, что, по крайней мере, у мышей действие прогестерона осуществляется через взаимодействие с глюкокортикоидными рецепторами и что преднизолон в 10–100 раз более эффективен, чем прогестерон. Однако если прогестерон применяют как терапевтическое средство на ранних сроках беременности, использование глюкокортикоидов еще ограничено применением для предотвращения неонатального респираторного дистресс-синдрома, некротизирующего энтероколита и других тяжелых осложнений третьего триместра. Причины такого клинического подхода обусловлены большим опасением тератогенных эффектов глюкокортикоидов по сравнению с прогестероном. Показано, что низкие дозы глюкокортикоидов не только безопасны, но и эффективны в защите беременности в случаях привычных выкидышей неясной этиологии и обусловленных иммунологическими нарушениями. Эффективность их применения подтверждается ежедневно (Lunghi L. et al., 2007).

Более того, есть данные о благоприятном влиянии на исход беременности назначения преднизолона перед зачатием у женщин с привычными выкидышами неясной этиологии в анамнезе и с повышенным уровнем НК-клеток в эндометрии до лечения. Во всех этих случаях количество НК-клеток снижалось при введении преднизолона. Поскольку рекрутирование маточных НК-клеток — гормонально контролируемая материнская функция и увеличенное количество этих клеток связано с привычным выкидышем, НК-клеточная цитотоксичность может представлять часть механизма, с помощью которого отторгается зародыш. Возможно, в то время как прогестерон необходим для подготовки эндометрия в самой ранней фазе имплантации, последующие стадии плацентации зависят от адекватной продукции глюкокортикоидов в материнском организме. Последнее необходимо для контроля факторов, участвующих в воспалительном ответе, который имеет место при любом тканевом ремоделировании. Введение глюкокортикоидов в ранние сроки беременности может быть полезным для создания соответствующей цитокиновой материнской среды. Так роль глюкокортикоидов в защите от воспалительной потери усиливается данными о том, что мифепристон, используемый для индукции медицинского аборта, является возможным антиглюкокортикоидом.

Клиническая польза гепарина и аспирина*, назначаемых беременным при антифосфолипидном синдроме, признается большим количеством авторов. Эффективность использования низких доз этих препаратов при ведении дисфункции ранней беременности подкрепляется их благоприятным влиянием на дифференцировку вневорсинчатого цитотрофобласта и процесс апоптоза.

Такие клинические симптомокомплексы, как угроза прерывания беременности, преэклампсия, идиопатическая форма синдрома задержки развития плода и плацентарная недостаточность, являющиеся следствием нарушения иммунных взаимосвязей в системе мать—плацента—плод, как правило, лежат в основе патологии перинатального периода. Проведение общепринятой терапии далеко не всегда оказывает выраженное влияние на нарушенный иммунный гомеостаз.

Количество данных, подтверждающих роль иммунологических нарушений у женщин с некоторыми формами осложнений беременности, все увеличивается. Неудивительно, что акушеры-гинекологи и иммунологи интенсивно занимаются развитием методов, позволяющих изменить состояние иммунной системы у матери с целью повышения шансов родить живого и здорового ребенка.

Существует мало научных данных об эффективности различных подходов, хотя понимание того, насколько данный способ воздействия на иммунную систему эффективен, важно для возможности сделать информированный выбор. В настоящее время выбирать приходится в основном между двумя формами иммунотерапии:

- активной — иммунизацией аллогенными лимфоцитами;
- пассивной — введением иммуноглобулинов.

При проведении иммуноцитотерапии (ИЦТ) вводят 40–100 млн лимфоцитов мужа внутрикожно, подкожно, внутримышечно или внутривенно. Лучшим способом введения клеток считают внутрикожный. Стандарты процедуры иммуноцитотерапии до сих пор не разработаны. Дозы, количество повторных иммуноцитотерапий, эффективность варьируют в разных исследованиях. Вопрос о механизме действия иммуноцитотерапии до сих пор окончательно не решен. Предполагают, что образующиеся блокирующие антитела, связываясь с клетками трофобласта, защищают их от цитотоксического действия клеток матери, тем самым предотвращая отторжение плода. Блокирующие антитела также нейтрализуют увеличенную активность НК-клеток, снижая их способность продуцировать ФНО- α , и угнетают аутоиммунные реакции у матери.

Становится все более распространенной точка зрения, согласно которой для нормального развития беременности важно распознавание иммунной системой матери антигенов спермы и бластоцисты на ранних сроках гестации. Иммунизация же матери аллогенными лимфоцитами, реактивируя ослабленный местный иммунный ответ матери, активизирует синтез интерлейкинов и ростовых факторов, которые стимулируют развитие плаценты и обеспечивают нормальное развитие эмбриона. Установлено, что иммунотерапия влияет на функциональное состояние трофобласта и плаценты, а также служит эффективным методом профилактики тяжелых форм и лечения легких форм преэклампсии.

Наблюдали реальные эффекты иммунизации многие авторы. Однако метод требует соблюдения предосторожности для минимизации риска передачи вирусной инфекции. Именно поэтому перед процедурой иммуноцитотерапии супруги должны пройти тесты на инфекционные заболевания, такие как инфекция вирусом иммунодефицита человека, цитомегалия, гепатиты А, В и С. Для предотвращения генерирования нежелательного иммунного ответа на антигены тромбоцитов мужа, гранулоцитов и эритроцитов рекомендуется тщательно проводить выделение из крови лимфоцитов и отмывки.

Иммуноцитотерапию не имеет смысла назначать женщинам, у которых привычные выкидыши происходили при беременности от разных партнеров, а также тем, у кого абортированный плод имел хромосомные нарушения. Применение же иммуноцитотерапии у женщин, абортированный плод которых обычно не имел хромосомных аномалий, было эффективно более чем в 90% случаев.

Вторая форма иммунотерапии включает внутривенное вливание нормального иммуноглобулина человека. Это препарат нормальных полиспецифических иммуноглобулинов, полученных из пула сывороток нескольких тысяч доноров. Коммерческие препараты представляют собой интактный IgG с таким же распределением по субклассам, как и в нормальной сыворотке, и периодом полужизни около 3-х недель. В их состав входят антитела к экзогенным антигенам, естественные антитела и антиидиотипические антитела. Препараты иммуноглобулинов для внутривенного введения обработаны таким образом, что 50% и более IgG лишены Fc-фрагментов и представлены Fab-фрагментами, отсюда их минимальная способность связываться с Fc-рецепторами клеток (моноцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и др.), образовывать агрегаты, связывать комплемент.

Эффективность этого метода иммунотерапии может быть объяснена различными иммунологическими механизмами:

- модуляция супрессорной и хелперной активности Т-лимфоцитов;
- обратимая блокада IgG Fc-рецепторов клеток ретикулоэндотелиальной системы;
- блокада Fc-рецепторов лейкоцитов, лимфоцитов;
- пассивная нейтрализация сывороточных аутоантител антиидиотипическими антителами, содержащимися в препарате нормального иммуноглобулина человека.

Такая терапия, очевидно, может иметь ряд преимуществ по сравнению с иммуноцитотерапией: нет риска иммунизации против HLA-антигенов, а при наличии уже имеющихся антител к HLA данный препарат не повлечет развития дополнительной реакции, снижается до минимума риск передачи вирусной инфекции, так как препарат инактивируется в процессе технологической обработки.

Применение нормального иммуноглобулина человека полезно при лечении иммунных нарушений, связанных с беременностью. Это лекарственное средство может производиться из пула плазм многих доноров — женщин с предварительными успешными беременностями. Показано, что введение нормального иммуноглобулина человека может препятствовать привычному выкидышу у женщин и самок-мышей, таким образом, его можно использовать для лечения привычного выкидыша. Специализированный протокол должен включать определение уровня антифосфолипидных аутоантител, оценку системы коагуляции (включая уровни гомоцистеина, протеины S и C, уровни фактора XII) и исследования клеток и цитокинов в эндометрии. Лечение не может быть усовершенствовано, пока не будет улучшена диагностика.

Опубликовано много работ, посвященных успешному применению нормального иммуноглобулина человека в комплексе лечебно-профилактических мероприятий привычного невынашивания у женщин с антифосфолипидным синдромом.

Иммуномодуляция, связанная с введением нормального иммуноглобулина человека, — результат пассивного переноса блокирующих или антиидиотипических антител, угнетающих синтез аутоантител, блокады Fc-рецептора, блокады транспорта через плаценту материнских эндогенных цитотоксических IgG, увеличения супрессорной функции Т-клеток, угнетения В-клеточной функции и/или редукции активации компонентов комплемента, NK-клеточной активности и продукции цитокинов.

Лечение нормальным иммуноглобулином человека показано женщинам с бесплодием или привычными выкидышами, у которых выявлены высокие уровни НК-клеток и/или их повышенная цитотоксическая активность. В некоторых случаях нормальный иммуноглобулин человека предписывают женщинам с риском развития задержки внутриутробного роста плода, маловодия, токсикоза, тяжелых эффектов от стероидных гормонов. Некоторые врачи назначают введение нормального иммуноглобулина человека, чтобы повысить низкие уровни материнских блокирующих антител независимо от уровня НК-клеток.

Нормальный иммуноглобулин человека вводят внутривенно капельно в течение 2–4 ч от 1-го до 3-х последующих дней, один раз в месяц перед и в течение беременности.

Показаниями для введения этого лекарственного средства считают вирусоносительство или обострение вирусной инфекции у беременных. Противопоказание — наличие в анамнезе анафилактической или тяжелой системной реакции на человеческий иммуноглобулин. Для уверенности перед введением нормального иммуноглобулина человека желательно сделать количественный тест на чувствительность к иммуноглобулину. Появились данные об эффективности использования этого лекарственного средства для модуляции иммунной системы у больных с аутоиммунными нарушениями.

Наши исследования влияния проведенной иммуноцитотерапии или/и введения нормального иммуноглобулина человека в комплекс терапевтических мероприятий у женщин с преэклампсией и патологическим уровнем антифосфолипидных аутоантител позволили сделать вывод об эффективности использования данных видов терапии для коррекции иммунологических нарушений, что сопровождалось снижением частоты тяжелых форм преэклампсии, преждевременных родов и рождения детей с гипотрофией.

Предполагают, что механизм терапевтического воздействия иммуноцитотерапии связан с привнесением дополнительного антигенного стимула, образованием антител, реагирующих с антигенами трофобласта, активацией продукции цитокинов и ростовых факторов, ускорением процессов плацентации, нормализацией гормональной и иммунорегуляторной функции трофобласта, блокадой цитотоксических и усилением супрессорных локальных иммунных механизмов. Аутоиммунные нарушения способствуют повышению активации гуморального иммунитета, выражающегося в повышении

активации В-клеток, и параллельно с этим наблюдается снижение CD8⁺Т-лимфоцитов, нарушение в сети идиотип-антиидиотипических антител, а именно — снижение антиидиотипических антител к аутоантителам. Введение нормального иммуноглобулина человека способствует модуляции регуляторной активности Т-лимфоцитов, ингибированию синтеза аутоантител В-лимфоцитами, пассивной нейтрализации сывороточных аутоантител антиидиотипическими антителами, содержащимися в препарате нормального иммуноглобулина человека.

Наиболее значимыми основаниями для назначения комплексной иммунотерапии считают следующие:

- увеличенное или сниженное содержание общих Т-лимфоцитов (CD3⁺) и субпопуляции Т-хелперов (CD4⁺), увеличенного количества NK-клеток (CD56⁺CD16⁺), высокое содержание В-1-клеток (CD19⁺CD5⁺);
- повышенный уровень аутоантител к фосфолипидам, ДНК/гистонам, гормонам или волчаночного коагулянта;
- высокий уровень естественной цитотоксической активности *in vitro* лейкоцитов крови;
- совместимость пары по DQ-антигенам, особенно по DQ- α 2 и DQ- α 4;
- выявление низких количеств блокирующих антител.

Методы иммунотерапии, применение которых позволяет достигнуть успешной беременности многим парам с бесплодием или привычным невынашиванием беременности, включены в репродуктивные медицинские программы крупных центров.

Ценным методом является оценка цитотоксической активности NK-клеток. В тесте оценки *in vitro* естественной цитотоксической активности лейкоцитов крови можно определить также дозу нормального иммуноглобулина человека, угнетающую цитотоксическую активность NK-клеток. В ряде акушерских центров считают необходимыми лабораторными тестами, которые следует проводить во время лечения, количественную оценку иммуноглобулинов и репродуктивное иммунофенотипирование (оценка количества NK-клеток и их активности). Если уровень и активность NK-клеток остаются надежно угнетены, можно больше не вводить нормальный иммуноглобулин человека. Многим женщинам из тех, которым вводили это лекарственное средство до зачатия, требуется дополнительная инфузия во время беременности, так как уровни NK-клеток часто

повышаются. Введение нормального иммуноглобулина человека снижает относительное количество CD56⁺ с 24 до 10% и CD19/CD5⁺-клеток — с 90 до 58%.

Кроме того, определяют содержание аутоантител к фосфолипидам, ДНК/гистонам, гормонам, волчаночного антикоагулянта. Выявление повышенного уровня аутоантител или волчаночного коагулянта в комплексе с другими показаниями служит основанием для назначения иммунотерапии.

Таким образом, условие физиологического течения беременности — формирование полноценного иммунного ответа на антигены плодного яйца на фоне перестройки эндокринной системы женщины. В настоящее время в распоряжении клиницистов появился инструмент, с помощью которого можно в определенной степени изменить реакцию материнского организма на плод. Однако применение иммунотерапии требует проведения дополнительных исследований как до лечения, так и во время него.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ряд осложнений беременности связан с нарушением регулирующей роли иммунной системы. Такой вывод позволяют сделать как многочисленные литературные данные, так и результаты собственных исследований, проводившихся совместно с сотрудниками клинических отделений НЦ АГиП им. В.И.Кулакова в течение более 20 лет (Сухих Г.Т., Ванько Л.В., 2003; Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., 2010; Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е., 2010). Развивающийся на разных этапах гестации избыточный или недостаточный иммунный ответ на аллоантигены отца, а иногда на антигены микроорганизмов и собственные антигены, может иметь отношение к развитию таких осложнений беременности, как спонтанные выкидыши, тяжелая преэклампсия, внутриутробная задержка роста плода и преждевременные роды.

Очевидно, что и осложнения беременности, и защита плода от повреждающего материнского иммунного ответа основаны на сложных механизмах. Среди предполагаемых иммунологических механизмов, участвующих в патогенезе прерывания беременности, выделяют:

- аллоиммунные (NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, эмбриотоксические факторы и др.);

- аутоиммунные (аутоантитела к фосфолипидам, к гормонам, нейротрансмиттерам и др.).

В генезе привычного выкидыша важная роль принадлежит материнскому иммунному ответу, развивающемуся путем активации материнских макрофагов и НК-клеток и изменения уровня продуцируемых цитокинов. При беременности, осложненной преэклампсией, также выявляют значительные изменения функций иммунной системы.

У женщин с прерыванием беременности в I триместре уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ- β , ИФН- γ , ИЛ-6 значительно повышается. При патоморфологическом исследовании выявляют признаки хронического воспалительного процесса. Повышение уровней провоспалительных цитокинов под действием инфекции во II и III триместрах беременности приводит к увеличению синтеза амниотическими оболочками простагландина, способствующего преждевременному развитию родовой деятельности.

Осложненный и неэффективный процесс репродукции человека связан отчасти с влиянием некоторых аутоантител. Аутоиммунитет к фосфолипидам и другим клеточным компонентам может играть важную роль в этиологии привычного невынашивания беременности. В акушерской практике встречаются такие проявления антифосфолипидного синдрома, как повторяющаяся гибель плодов на ранних сроках беременности, рано возникающая тяжелая преэклампсия, задержка внутриутробного развития плода.

Наличие нескольких провоцирующих факторов (тяжелая экстрагенитальная патология, носительство вирусной инфекции, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез) является риском повышенной продукции антифосфолипидных аутоантител и развития преэклампсии. Показано достоверное увеличение активации продукции IgM и/или IgG антифосфолипидных антител при преэклампсии и внутриутробной гипотрофии плода с I триместра беременности. Выявлена прямая взаимосвязь между тяжестью преэклампсии и уровнем антифосфолипидных аутоантител обоих классов. Отсутствие динамики снижения продукции антифосфолипидных антител во время беременности — неблагоприятный прогностический признак, который можно использовать для оценки эффективности проводимой терапии.

Такие клинические симптомокомплексы, как угроза прерывания беременности, ранние токсикозы и преэклампсия, идиопатическая форма синдрома задержки развития плода и плацентарная недоста-

точность, возникающие вследствие нарушения иммунных взаимосвязей в системе мать—плацента—плод, как правило, лежат в основе патологии перинатального периода. Проведение общепринятой терапии далеко не всегда оказывает выраженное влияние на нарушенный иммунный гомеостаз.

Течение беременности будет физиологическим, только если формируется полноценный иммунный ответ на антигены плодного яйца на фоне перестройки эндокринной системы женщины.

akusher-lib.ru

Глава 4

Роль оксидативного стресса в развитии осложнений беременности и послеродового периода

Привычный выкидыш и преэклампсия — осложнения беременности, связанные с нарушениями развития и формирования плаценты. Поскольку в настоящее время с помощью ультразвукового исследования возможно наблюдение *in vivo* с ранних сроков беременности, возникает новое понимание материнско-фетальных взаимоотношений и новый взгляд на патогенез этих нарушений. Оба состояния объединены концепцией **плацентарного оксидативного стресса** с ассоциированными некрозом и апоптозом трофобластического эпителия плацентарного ворсинчатого дерева (Jauniaux E. et al., 2006). При нормальной беременности ранние стадии развития эмбриона происходят в низком окружении кислорода (O_2). Эта физиологическая гипоксия раннего гестационного мешка защищает плод от вредных и тератогенных воздействий свободных радикалов кислорода.

Оксидативный стресс рассматривают как дисбаланс между продукцией АФК и удаляющими их антиоксидантами, приводящий к общему или локальному накоплению АФК. Повышенная их продукция оказывает вредное влияние на клетки, вызывая повреждение ДНК, белков и перекисное окисление липидов, влияющее на структуру и функции мембран. Однако в аэробных условиях существует уникальная защитная система против АФК: Cu,Zn-СОД, локализованная в цитозоле и СОД, локализованная в митохондриях. Строго регулируемый баланс между интенсивностью генерации АФК и активностью ферментов—«ловушек АФК» в физиологических условиях может нарушаться при избыточной продукции АФК или повреждении защитной антиоксидантной системы, что и приводит к оксидативному стрессу. Этот механизм вносит вклад в патогенез таких осложнений беременности, как выкидыш, задержка внутриутробного роста плода, преэклампсия и преждевременные роды.

Для беременности характерно состояние оксидативного стресса, основой которого считают увеличенную активность митохондрий плаценты и чрезмерную продукцию АФК, особенно супероксидного анион-радикала. Плацента продуцирует и другие метаболиты кислорода, включая оксид азота, монооксид углерода и пероксинитрит, которые влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток трофобласта, а также реактивность сосудов. Гиперпродукция АФК может наблюдаться на определенных этапах развития плаценты и при патологической беременности, такой как осложненная преэклампсией и/или задержкой внутриутробного развития плода, когда происходит преодоление антиоксидантной защиты с вредоносным исходом.

В I триместре усиление кровотока в межворсинчатом пространстве сопровождается вспышкой оксидативного стресса. Неспособность создать эффективную антиоксидантную защиту приводит к ранней потере беременности. Увеличенный оксидативный стресс наблюдают на поздних сроках при беременности, осложненной сахарным диабетом, задержкой внутриутробного развития плода и преэклампсией. Это сопровождается повышенным апоптозом клеток трофобласта и измененной реактивностью сосудов плаценты. Об оксидативном стрессе свидетельствуют повышение содержания липидных пероксидов и изопростанов, а также сниженная экспрессия и активность антиоксидантов.

4.1. ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И НАРУШЕНИЕ ПЛАЦЕНТАЦИИ

Исследование роли плацентарного оксидативного стресса в патофизиологии осложнений беременности вызывает большой интерес. Причины оксидативного стресса плаценты недостаточно изучены, однако многие осложнения беременности сопровождаются недостаточной конверсией маточных спиральных артерий (Cindrova-Davies T. et al., 2007).

Недостаточная конверсия спиральных артерий приводит к тому, что в стенках их остается больше гладких мышц, чем в норме, что приводит к чрезмерным перерывам в кровоснабжении плаценты. Предполагают, что нарушенное кровоснабжение плаценты служит фактором, инициирующим дальнейшие повреждения. В экспериментах с гипоксией-реоксигенацией эксплантатов ворсин *in vitro* продемонстрирована возможность быстрой индукции ишемией-реперфузией плацентарного оксидативного стресса. Генерация оксидативного стресса ассоциируется с активацией p38 и SAPK MAPK, сигнальных путей ядерного фактора NF-κB, увеличенной продукцией и секрецией ФНО-α и ИЛ-1β и апоптотических изменений, локализованных в синцитиотрофобласте (Tjoa M-L. et al., 2006). Возможность блокирования этих изменений антиоксидантами *in vitro* (Cindrova-Davies T. et al., 2007) позволяет предположить, что они являются ответом на увеличенную продукцию АФК.

Раннее развитие плаценты характеризуется быстрой дифференцировкой и миграцией клеток цитотрофобласта, ангиогенезом и ремоделированием сосудов и матрикса. В сигнальные пути, регулирующие эти процессы, вовлечены ферменты, в частности NADPH-оксидаза, которая служит источником большого количества супероксидных анионов. Предполагают также, что они включены в кислородное восприятие и регуляцию экспрессии антиоксидантных генов (Raijmakers M.T. et al., 2006).

Циркуляция материнской крови в плаценте до 12 нед гестации ограничена. Вскоре после имплантации эндovasкулярные трофобластные клетки мигрируют в просвет спиральных артерий. В I триместре межворсинчатое пространство отделено от маточного кровотока пробками из трофобластных клеток, закупоривающими верхушки маточно-плацентарных артерий и ограничивающими материнский

кровоток в плаценте. При нормальной беременности только в конце I триместра эти пробки смещаются, что позволяет материнской крови свободно циркулировать в межворсинчатом пространстве. Развитие межворсиночной циркуляции крови начинается на периферии плаценты и полностью устанавливается в течение II триместра.

До тех пор, пока окончательно не сформируется плацента (8–9 нед), зародышевый мешок чрезвычайно чувствителен к любому дисбалансу между развитием маточного кровотока и трофобластного роста внутри плаценты и снаружи нее. При ранней беременности материнско-эмбриональное взаимодействие может необратимо нарушаться недостаточным поступлением материнской крови в межворсинчатое пространство. В наибольшей степени редуцированная трофобластическая инвазия оказывает влияние в центре имплантационного места. Преждевременное поступление материнской крови, вытесняющее ворсины, индуцирует избыточный оксидативный стресс в ворсинчатом трофобласте.

Таким образом, эмбрион развивается в условиях низкого напряжения кислорода, которое защищает дифференцирующиеся клетки от повреждения свободными радикалами. Когда эмбриогенез завершается, материнская межворсиночная циркуляция полностью устанавливается и внутриплацентарная концентрация кислорода повышается в 3 раза. Начало циркуляции является нормальным прогрессивным феноменом «периферия-центр», но высокие уровни оксидативного стресса на периферии могут индуцировать образование участков отслойки хориона.

При осложненной беременности инвазия эндометрия вневорсинчатым трофобластом значительно снижена, закупорка спиральных артерий менее полная, что предрасполагает к раннему началу циркуляции материнской крови. Наиболее часто встречаются два связанных с нарушением плацентации осложнения беременности, выкидыш и преэклампсия. Они проявляются на разных стадиях беременности, однако оба происходят из-за дефицита трофобластной инвазии в течение ранней гестации.

При тяжелом повреждении инвазии трофобласта закупорка спиральных артерий неполная, а начало материнской межворсинной циркуляции преждевременное. Наблюдается обширное оксидативное повреждение синцитиотрофобласта, которое, вероятно, в значительной мере способствует выкидышу. Между двумя крайностями могут быть найдены различные степени согласованности трофобластной

инвазии с течением беременности, но приводящие к дефициту конверсии спиральных артерий и типу феномена ишемия-реперфузия. Плацентарная перфузия будет повреждаться в большей или меньшей степени, генерируя соразмерный оксидативный стресс, который вносит большой вклад в преэклампсию. Выкидыш, пропущенный выкидыш, раннее и позднее начало преэклампсии представляют спектр нарушений, вторичных по отношению к дефициту трофобластной инвазии.

Raijmakers M.T. и соавт. (2006) исследовали активность NADPH-оксидазы в плацентарных тканях во время ранней беременности и после родов и определяли корреляцию с антиоксидантной способностью. В доношенной плаценте присутствовала существенная базальная NADPH-оксидазная активность, но в ткани плаценты ранних сроков гестации она была в 3 раза выше, как и общая антиоксидантная емкость, тканевая концентрация глутатиона и глутатион-S-трансферазная активность. Авторы предполагают, что генерация супероксида NADPH-оксидазой может быть важным модулятором антиоксидантной защиты при ранней беременности.

NADPH-оксидаза — главный источник АФК в нейтрофилах и макрофагах. Фермент состоит из нескольких субъединиц, включающих связанные с мембраной компонент $gp91^{phox}$ и регуляторную субъединицу $p22^{phox}$, а также цитозольные регуляторные субъединицы $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ и Rac-ГТФ-азу. Из соматических клеток были клонированы гены, кодирующие гликопротеины, гомологичные субъединице $gp91^{phox}$, в том числе NOX-1. Было показано, что NOX-1 активируется ростовыми факторами, такими как эпидермальный ростовой фактор (ЭРФ), и ангиотензином II. Включаясь в рост сосудов и ремоделирование, NOX-1 играет важную роль в формировании сосудистой патологии, такой как артериальная гипертензия и атеросклероз.

Причиной оксидативного стресса при осложнениях беременности у человека считается нарушенная перфузия плаценты, ведущая к высвобождению провоспалительных цитокинов и антиангиогенных факторов в материнскую циркуляцию (Cindrova-Davies T. et al., 2007). Известно, что сокращения матки во время родов сопровождаются прерывистым маточно-плацентарным кровотоком. Авторы исследовали, увеличиваются ли оксидативный стресс, содержание провоспалительных цитокинов и ангиогенных регуляторов в плацентах после стремительных (<5 ч) и длительных (>15 ч) родов по сравнению

с плацентами женщин после кесарева сечения. Широкие изменения в генных транскриптах были оценены с помощью анализа микропроб. После родов увеличивались оксидативный стресс, активация пути NF- κ B, ФНО- α , повышался уровень ИЛ-1 β в плацентарной ткани. Наблюдалась стабилизация индуцированного гипоксией фактора-1 α и увеличение растворимого рецептора-1 фактора роста эндотелия сосудов. Напротив, тканевые уровни плацентарного ростового фактора снижались. В плацентах рожавших женщин апоптоз активировался. Многие изменения относились к течению родов. После родов экспрессия 55 генов увеличилась, а 35 — уменьшилась, некоторые изменения отражались на белковом уровне.

Таким образом, **роды — сильный индуктор плацентарного оксидативного стресса, провоспалительных цитокинов, ангиогенных регуляторов.** Иницирующей причиной считают прерывистый кровоток. Плаценты, подвергавшиеся родам, не отражают нормальное *in vivo* состояние на молекулярном уровне.

Во время беременности значительные количества свободной внеклеточной ДНК циркулируют в материнской крови. Тjoа M.L. и соавт. (2006), предположив, что плацента является ее принципиальным источником, проверяли гипотезу о том, что она освобождается из синцитиотрофобласта после индукции апоптотических изменений. Эксплантаты ворсин из нормальных плацент после кесарева сечения культивировали в условиях нормальной оксигенации (10% кислорода) до 20 ч или в условиях гипоксии (0,5% кислорода) в течение часа с последующей реоксигенацией. Концентрация внеклеточной ДНК в супернатанте, измеренная с помощью ПЦР в реальном режиме времени, значительно увеличивалась через 20 ч после гипоксии-реоксигенации. Высвобождение ДНК сопровождалось повышенным апоптозом, подтверждалось повышенной активацией каспазы-3, определяемой Вестерн-блотом и иммунолокализацией в синцитиотрофобласте; некроз выявлялся по высвобождению лактатдегидрогеназы. И высвобождение ДНК из клеток, и апоптоз значительно уменьшались при добавлении антиоксидантов, витаминов С и Е, в культуральную среду. Результаты показали механистическую и количественную связь между плацентарным апоптозом/некрозом и освобождением бесклеточной ДНК, подтверждая, что материнская сывороточная/плазменная концентрация свободной ДНК может действовать как биомаркер благополучия трофобласта в течение беременности.

4.2. РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ РАННИХ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ

По данным Lash G.E. и соавт. (2008), от 11 до 20% всех клинически распознаваемых беременностей прерываются до 20 нед гестации. Этому сопутствуют огромные финансовые потери и личные драмы. Предполагают, что иммунные механизмы принимают участие в необъяснимых потерях беременности. Особое внимание уделяют популяциям эндометриальных лейкоцитов при привычном выкидыше, хотя патогенез остается во многом необъясненным. Еще менее понятны механизмы, лежащие в основе спорадических выкидышей, хотя анеуплоидию считают наиболее распространенной определяемой причиной, вызывающей ранний (≤ 12 нед гестации) спорадический выкидыш.

Нарушения плацентации вносят существенный вклад в патогенез преэклампсии и выкидышей (Agarwal A. et al., 2008). Преэклампсию наблюдают только у человека, у животных различных видов выкидыши очень редки. Предполагают, что механизмом, включенным в этиопатогенез выкидыша, служит несовершенная плацентация, ведущая к плацентарному оксидативному стрессу с повреждающим эффектом на синцитиотрофобласт. Острый пик в экспрессии маркеров оксидативного стресса в трофобласте был обнаружен и при нормальной беременности. В случае избыточного проявления этого оксидативного взрыва он становится причиной ранних потерь беременности.

Ранние потери беременности, или выкидыши I триместра, — наиболее частые осложнения репродукции у человека. 2/3 этих случаев сочетаются с наличием тонкого фрагментированного трофобластического слоя и сниженной инвазией цитотрофобласта в верхнюю часть спиральных артерий. Это приводит к неполной закупорке на ранних сроках беременности, преждевременной циркуляции материнской крови через плаценту. Избыточное поступление материнской крови в межворсинчатое пространство оказывает прямое механическое воздействие на ворсинчатую ткань и не прямое влияние посредством оксидативного стресса, который вносит вклад в клеточную дисфункцию и/или повреждение. Данные, полученные *in vivo* и *in vitro*, показывают, что непреодолимый оксидативный стресс плацентарных тканей представляет общий патофизиологический механизм для ранней потери беременности различной этиологии. Многие авторы

находят слабую связь между морфологической характеристикой ворсин и хромосомными аномалиями, за исключением частичной триплоидии при пузырьном заносе. Сравнение ультразвуковых находок и данных гистологических исследований плаценты указывает, что изменение ворсин, за которым следует гибель плода *in utero*, может объяснить низкую прогностическую ценность одного гистологического исследования плаценты в идентификации анеуплоидии или других нарушений нехромосомной этиологии.

До настоящего времени во многих случаях причина привычного выкидыша остается неясной. Она многофакторна и включает генетические факторы и факторы окружающей среды. В развитии привычного выкидыша необъяснимой этиологии оксидативный стресс может играть определенную роль. При выкидыше развитие плаценти-децидуальной зоны сильно повреждается, что ведет к раннему и распространенному началу материнского кровотока и большой оксидативной дегенерации. Этот механизм считают общим для всех выкидышей, встречающихся в I триместре, независимо от этиологии. Снижение уровня прогестерона вызывает образование супероксидных радикалов в цитозоле стромальных клеток эндометрия посредством снижения экспрессии Cu,Zn-SOD. Супероксидные радикалы, в свою очередь, стимулируют экспрессию циклооксигеназы-2 и последующий синтез простагландина F_{2α} (PGF_{2α}), активируя транскрипционный фактор NF-κB. Простагландин F_{2α} — сильный индуктор сокращения матки — участвует в развитии спонтанного выкидыша (Sugino N. et al., 2007).

В этиологии и развитии привычного выкидыша важную роль могут играть хроническое воспаление при наличии локального оксидативного микроокружения. В присутствии провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-1) и высоких уровней АФК могут повреждаться липиды, белки и ДНК. Окисленные мембранные липиды и некоторые их продукты химически модифицируют белки. Модифицированные белки могут изменять свою антигенность и вовлекаться в иммунологические реакции, приводящие к воспалительным и/или аутоиммунным повреждениям. Белки с измененными свойствами и присутствие циркулирующих антител к новым эпитопам, вероятно, имеют отношение к блокированию антигенов с рецепторной функцией на поверхностной мембране клеток. Этот механизм может вносить вклад в нарушение имплантации эмбриона, которое возникает вследствие оксидативного стресса и хронического воспаления.

Предполагают, что повреждения, вызванные оксидативным стрессом, играют роль в спонтанном аборте, идиопатической привычной потере беременности, дефективном эмбриогенезе. Некоторые исследователи полагают, что в патофизиологии аборта и привычной потери беременности принимает участие оксидативный стресс на системном и плацентарном уровнях. Индуцированные им повреждения, нарушенный плацентарный кровоток и иммунная недостаточность могут играть роль в патофизиологии идиопатической привычной потери беременности. Плацентарная дисфункция, вызванная оксидативным стрессом, может быть общей причиной многофакторной и полигенной этиологии этого осложнения беременности. Кроме того, модификация фосфолипидов, индуцированная оксидативным стрессом, связана с образованием аутоантител при антифосфолипидном синдроме.

Рассматривается вовлечение фагоцитов в патогенез спонтанной потери беременности. При ранних спонтанных выкидышах наблюдается воспалительная реакция в пределах материнской части *d. parietalis* и *d. basalis*, где выявляют многочисленные материнские макрофаги, большие гранулярные лимфоциты и Т-клетки. Обнаружено изменение функциональной активности лейкоцитов периферической крови у женщин с привычным невынашиванием беременности. В нашем исследовании показано, что гранулоциты небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе имели значительно более высокий уровень спонтанной продукции АФК по сравнению с таковым в гранулоцитах здоровых небеременных фертильных женщин (табл. 2).

Таблица 2. Действие ингибиторов на изолированные гранулоциты крови здоровых небеременных фертильных женщин (I группа) и небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе (II группа)

Измеряемые параметры	I группа			II группа		
	Базовый уровень	Максимальная амплитуда ответа		Базовый уровень	Максимальная амплитуда ответа	
Концентрации μMLF , μM	0	1	50	0	1	50
Параметры интактных клеток (усл. ед.)	4,31±0,78	48,3±13,7	48,6±13,6	6,4±2,2*	28,8±8,3*	31,3±7,7*
Эффект ¹ 0,1 мМ ортованадата натрия	1,32±0,10	1,77±0,20	1,82±0,16	1,17±0,17	1,52±0,37**	1,73±0,32

Окончание таблицы 2

Измеряемые параметры	I группа			II группа		
	Базовый уровень	Максимальная амплитуда ответа		Базовый уровень	Максимальная амплитуда ответа	
Концентрации fMLF, μM	0	1	50	0	1	50
Эффект 10 μM тирфостина 51	0,45 \pm 0,11	0,61 \pm 0,17	0,54 \pm 0,09	0,89 \pm 0,09***	0,81 \pm 0,12*	0,79 \pm 0,12***
Эффект 1 μM SB 203580	0,75 \pm 0,07	1,61 \pm 0,20	1,22 \pm 0,12	0,85 \pm 0,06*	1,33 \pm 0,25*	1,72 \pm 0,17***

fMLF — хемотаксический пептид N-формил-Met-Leu-Phe;

1 — эффект (отн. ед.) рассчитан как отношение параметра, полученного от обработанных ингибитором клеток к параметру интактных клеток, принятому за 1; 2 — достоверные различия между параметрами в I и II группах;

* — $p < 0,01$;

** — $p < 0,05$;

*** — $p < 0,001$

Максимальная амплитуда ответов на хемотаксический пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) была меньше в группе с привычными выкидышами (рис. 12). Уменьшенный ответ на fMLF при повышенном уровне спонтанной активности свидетельствует о дисбалансе между системами генерации и удаления АФК, что считается признаком окислительного стресса (Martindale J.L., Holbrook N.J., 2002). Как было описано в разделе 1.5., АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул в разных клетках и статус фосфорилирования, который регулируется соотношением активностей киназ и фосфатаз, изменяется в клетках крови при окислительном стрессе (Droge W., 2002).

Ранее было показано, что высокая активность цитозольной низкомолекулярной фосфотирозинового фосфатазы (ACP-1-cLMWPTase) у матери, сопряженная с низкой или умеренной активностью у плода, предпочтительнее для роста и развития плода. S- и F-изоформы данного фермента по-разному проявляют себя в этом отношении: для F-изоформы не выявлено значительных различий между группами. У женщин с повторяющимися спонтанными абортными обнаружено специфическое уменьшение концентрации S-изоформы ACP-1 по сравнению с нормальными беременными (Gloria-Bottini F. et al., 2008).

Мы обнаружили, что гранулоциты, изолированные из периферической крови здоровых фертильных небеременных женщин (группа сравнения) и небеременные женщины с привычными выкидышами

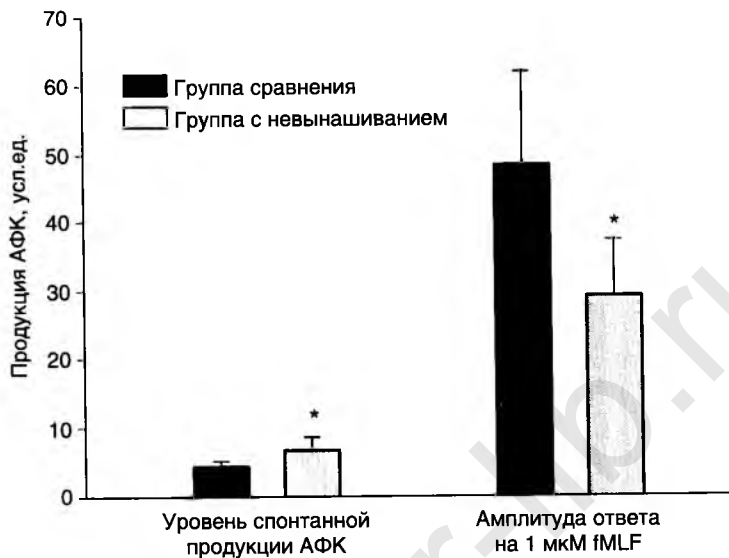


Рис. 12. Спонтанная и вызванная 1 мкМ fMLF продукция АФК в гранулоцитах периферической крови небеременных женщин.

Исследованы гранулоциты, изолированные из периферической крови здоровых небеременных фертильных женщин (группа сравнения) и небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе (группа с невынашиванием). Продукция АФК оценена с помощью хемилюминесцентного анализа. * — $p < 0,01$

в анамнезе (группа с невынашиванием) демонстрировали разную степень вовлеченности тирозиновых протеинкиназ в спонтанную и вызванную продукцию АФК. Активированные 50 мкМ fMLF нейтрофилы женщин с привычным невынашиванием беременности сильнее реагировали на угнетение компонента каскада митоген-активируемых протеинкиназ p38 MAPK, чем нейтрофилы фертильных женщин. Об этом свидетельствуют табл. 2 и рис. 13, 14, где показаны различия в действии ингибиторов тирозиновых протеинкиназ, протеинфосфатаз и митоген-активируемой протеинкиназы с молекулярной массой 38 кДа (p38 MAPK), активность которой может регулироваться тирозиновым и серин/треониновым фосфорилированием.

Таким образом, признаки окислительного стресса, наблюдаемые в крови небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе, связаны с фосфорилированием белков, вовлеченных в генерацию АФК в гранулоцитах.

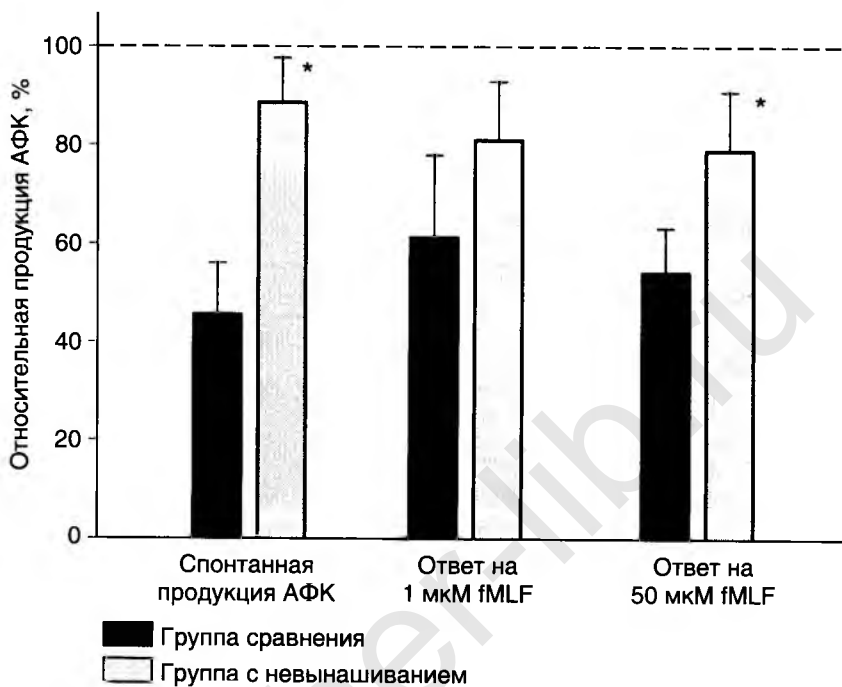


Рис. 13. Роль тирозинового фосфорилирования в генерации АФК гранулоцитами. Спонтанная и вызванная 1 и 50 мкМ fMLF продукция АФК исследована в гранулоцитах, изолированных из периферической крови здоровых небеременных фертильных женщин (группа сравнения) и небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе (группа с невынашиванием). Относительная продукция АФК рассчитана по отношению параметра клеток, обработанных 10 мкМ тирфостином, ингибитором тирозиновых протеинкиназ, к параметру интактных клеток, принятому за 100%. * — $p < 0,001$

4.3. ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В ПЛАЦЕНТЕ В ПОЗДНИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Преэклампсия — специфическое для человека потенциально фатальное осложнение беременности, которое диагностируют при появлении артериальной гипертензии и протеинурии после 20 нед гестации. Рождение плаценты вызывает разрешение этой ситуации, что указывает на плаценту как на главную подозреваемую в патогенезе

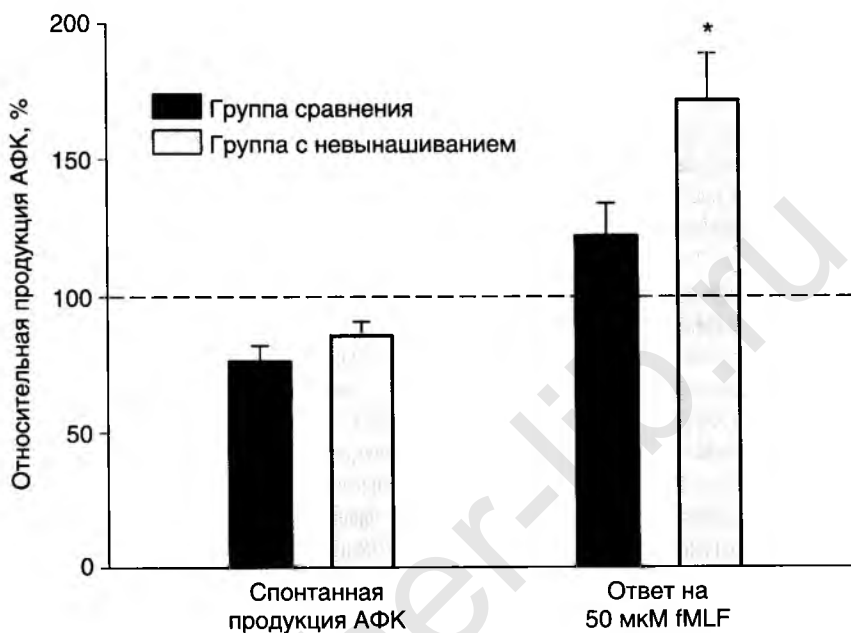


Рис. 14. Роль p38MAPK в генерации АФК гранулоцитами.

Приведено сравнение реакции на 1 мкМ SB 203580, специфический ингибитор p38MAPK, гранулоцитов, изолированных из периферической крови здоровых небеременных фертильных женщин (группа сравнения) и небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе (группа с невынашиванием). Относительная продукция АФК рассчитана по отношению параметра клеток, обработанных ингибитором, к параметру интактных клеток, принятому за 100%. * — $p < 0,001$

преэклампсии. Неадекватная инвазия трофобласта в материнские спиральные артерии при преэклампсии приводит к недостаточному кровоснабжению плаценты и последующей плацентарной ишемии. Это ведущая причина перинатальной заболеваемости и смертности, и только роды являются вмешательством, которое эффективно предотвращает синдром.

Широко распространена точка зрения, согласно которой преэклампсия развивается вследствие нарушенной на ранних сроках беременности плацентации. Существует гипотеза, что дизрегуляция глобальной экспрессии генов происходит в I триместре беременности в плаценте

женщин, у которых позже проявится преэклампсия (Founds S.A. et al., 2009). Дизрегуляцию генной экспрессии в плаценте выявляют за 6 мес до развития преэклампсии. Предполагают, что плацентация при преэклампсии сочетается с материнской и фетальной иммунной дизрегуляцией, ненормальной децидуализацией или обоими факторами, которые таким образом нарушают трофобластную инвазию.

Некоторые из генов представляют потенциальные мишени для установления клинических биомаркеров в крови беременных в I триместре.

В патогенезе преэклампсии оксидативный стресс плаценты считают ключевым фактором. Оксидативный стресс может играть определенную роль при выкидыше, когда развитие плаценти-децидуальной зоны сильно повреждается, что ведет к раннему началу материнского кровотока и выраженной оксидативной дегенерации. Однако если этот механизм считают общим для всех выкидышей, встречающихся в I триместре, независимо от этиологии, то при преэклампсии, напротив, трофобластическая инвазия более специфична. Она бывает достаточной для осуществления ранней фазы беременности — плацентации. Однако плацентация бывает поверхностной, инвазия — недостаточной для полной трансформации артерий. Развивается артериальная маточно-плацентарная циркуляция, предрасполагающая к повторяющемуся феномену ишемии-реперфузии, он вторичен по отношению к дефициту трофобластной инвазии в эндометриальные артерии. В статье Hung T.H. и Burton G.J. (2006) представлены данные, показывающие, что возможно, ток крови в межворсинчатом пространстве прерывистый и при всех нормальных беременностях. Прерывистость кровотока будет обостряться поврежденной конверсией спиральных артерий или наличием атеросклеротических изменений, которые уменьшают их калибр.

Повреждения, вызываемые гипоксией-реоксигенацией в результате прерывистой плацентарной перфузии, — возможная причина оксидативного стресса плаценты, считающегося ключевым промежуточным шагом в патогенезе преэклампсии. Плацентарный оксидативный стресс может быть следствием флуктуаций в концентрации кислорода после гипоксии/реоксигенации через действие АФК. На этой основе происходит полный спектр плацентарных изменений как в норме, так и при позднем и раннем начале преэкламптического состояния.

Несмотря на многочисленные данные, подтверждающие, что оксидативный стресс в плаценте служит ключевым элементом разви-

тия преэклампсии, механизм его остается неясным. Показано, что NADPH-оксидаза гиперактивна в материнских гранулоцитах и моноцитах у пациентов с преэклампсией. В лимфоцитах у беременных с преэклампсией и с нормальным артериальным давлением выявлена более высокая NADPH-оксидазная активность при преэклампсии.

Из сыворотки крови женщин с преэклампсией были выделены антитела, которые проявили свойства агонистов рецептора ангиотензина I (AT-I-AA). Они, как и ангиотензин II, увеличивали продукцию АФК и экспрессию компонентов $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ (Dechend R. et al., 2003), активировали NADPH-оксидазу в изолированных клетках трофобласта и гладкомышечных клетках. Установлено также, что увеличенная экспрессия цитозольных субъединиц, относящихся к NADPH-оксидазе фагоцитов, в плацентах женщин с преэклампсией коррелирует с увеличенной генерацией АФК. У таких женщин экспрессия $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ была выше, чем у женщин с неосложненной беременностью. Кроме того, транскрипционный фактор NF- κ B был активирован, а его ингибитор I- κ B α подавлен в плацентах женщин с преэклампсией. Таким образом, NADPH-оксидаза как источник АФК потенцирует NF- κ B при преэклампсии. Антитела к рецептору ангиотензина I через активацию NADPH-оксидазы способствуют увеличению продукции АФК и поддержанию воспалительного процесса.

Обнаружено, что нейтрофилы беременных женщин с преэклампсией (в III триместре) проявляют повышенную чувствительность к рецепторным (fMLF) и нерепторным (форболовый эфир) активаторам NADPH-оксидазы. Клетки имеют более высокий уровень продукции АФК по сравнению с клетками женщин с нормальным артериальным давлением. Различий по содержанию компонентов NADPH-оксидазы (phox-белков) обнаружено не было. Следовательно, важность нейтрофилов в окислительном стрессе при преэклампсии определяется увеличенной продукцией АФК и связанной с ней дисфункцией эндотелия (Lee V.M. et al., 2003).

Белок NOX-1 на иммуногистохимическом уровне найден в синцитиотрофобласте, вневорсинчатом цитотрофобласте, эндотелиальных клетках сосудов и стромальных клетках. Экспрессия NOX-1 в нормальной плаценте не меняется в течение беременности, по меньшей мере от 26 до 41 нед. Наблюдали статистически значимое увеличение в экспрессии белка NOX-1 в синцитиотрофобласте и эндотелиальных клетках сосудов пациенток с преэклампсией по сравнению

с нормотензивным контролем. Кроме того, уровни экспрессии белка коррелировали с тяжестью преэклампсии в синцитии и эндотелии ворсин. Авторы полагают, что NOX-1 может быть ключевым ферментом, вносящим вклад в увеличенный оксидативный стресс в плаценте при преэклампсии (Cui X.-L. et al., 2006).

Преэклампсия — сложный связанный с беременностью синдром. Предполагают двухшаговую модель развития преэклампсии:

- поврежденная инвазия трофобласта на ранних сроках беременности;
- аномальная материнская воспалительная реакция в поздние сроки.

При раннем начале преэклампсия скорее будет более тяжелой, с сопутствующей патологией плаценты, бедной трофобластной инвазией или даже отсутствием ее. При позднем начале преэклампсии течение будет среднетяжелым, представляющим материнский компонент заболевания.

Jauniaux E. и соавт. (2006) предполагают, что преэклампсия — трехстадийное нарушение с первичной причиной, заключающейся в избыточном или атипичном материнском иммунном ответе. Этот поврежденный процесс плацентации ведет к хроническому оксидативному стрессу в плаценте и, в конечном результате, — к диффузной материнской эндотелиальной клеточной дисфункции. **Плацентарный оксидативный стресс вызывает продукцию факторов, индуцирующих провоспалительные цитокины и образование апоптотического детрита, что в свою очередь активизирует материнский эндотелий.** Промежуточные молекулярные механизмы, лежащие в основе этого, неизвестны, но они могут представлять потенциальные мишени для терапевтических вмешательств.

В кровотоке матери высвобождаются различные факторы, которые вызывают широко распространенную активацию или дисфункцию эндотелия. Факторы в материнском кровотоке могут индуцировать оксидативный стресс и/или вызывать воспалительный ответ в материнском эндотелии, являющийся результатом измененной экспрессии некоторых генов, включенных в регуляцию сосудистого тонуса. В обзоре Sankaralingam S. и соавт. (2006) описаны возможные циркулирующие факторы и молекулярные механизмы, вовлеченные в изменение функции сосудов, которое происходит при преэклампсии. Продукты активации нейтрофилов и системы комплемента могут вызывать эндотелиальную дисфункцию, которую считают основной

причиной преэклампсии. Активность миелопероксидазы, каталазы и уровень аскорбиновой кислоты значительно выше у женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой. Уровни продуктов окисленных белков у них не были значительно изменены.

Преэклампсия — гипертензивное осложнение беременности, характеризующееся генерализованной активацией материнских эндотелиальных клеток. Предполагают, что ключевую роль играет циркуляция провоспалительных цитокинов, происходящих из плаценты. Hung T.H. и Burton G.J. (2006) обнаружили, что гипоксия/реоксигенация плацентарных тканей *in vitro* вызывает эквивалент оксидативного стресса, наблюдаемого при преэклампсии. Показано, что концентрация мРНК, кодирующей ФНО- α , была значительно выше в плацентарной ткани, подвергнутой гипоксии/реоксигенации по сравнению с гипоксическим или нормооксическим контролями. Не было различий в концентрации ФНО- α белка в тканевых гомогенатах, но уровни его в среде были значительно выше после гипоксии-реоксигенации по сравнению с контрольной группой, что указывает на увеличенную секрецию. Более того, кондиционированная среда из образцов, подвергнутых гипоксии-реоксигенации, вызывала увеличенную экспрессию E-селектина эндотелиальными клетками, и добавление анти-ФНО- α антител значительно редуцировало эту активацию. Эти данные соответствуют гипотезе, что прерывистая перфузия плаценты, вторичная к сниженной трофобластной инвазии, вызывает увеличенную секрецию ФНО- α , и это вносит вклад в активацию материнских эндотелиальных клеток, которая характерна для преэклампсии.

Преэклампсия и задержка внутриутробного развития плода связаны с увеличением апоптоза в ворсинчатом трофобласте. При этом чрезмерно повышается экспрессия p53, способствующая остановке клеточного цикла или апоптозу посредством снижения таких протеинов, как p21 или Вах. Эти нарушения в апоптозе и экспрессии p53 возникают в результате изменения кислородного напряжения. Heazell A.E. и соавт. (2008) делают это заключение на основании полученных данных об увеличении экспрессии p53 после экспозиции эксплантатов ворсин трофобласта к гипоксическим условиям. Показано, что эпидермальный ростовой фактор редуцирует апоптоз трофобласта, вызванный гипоксией (Moll S.J. et al., 2007). Действие 1,0 мкМ пероксида водорода в течение 48 ч индуцировало апоптоз в плацентарных эксплантатах, преимущественно в ядрах синцитиотрофобласта,

и снижало пролиферацию клеток цитотрофобласта. Уровень апоптоза снижался до контрольного, восстанавливалась пролиферация клеток при добавлении 10 и 100 нг/мл эпидермального фактора роста. Авторы полагают, что для сохранения нормальной беременности важным является антиапоптотический эффект эпидермального фактора роста в трофобласте, снижающий апоптотическое действие АФК.

Показано, что у женщин с преэклампсией уровень циркулирующего в крови пероксида водорода был увеличен и коррелировал с высоким уровнем ХГЧ. Предполагается, что оксидативный стресс модулирует плацентарный гормональный синтез в зависимости от концентрации H_2O_2 . Установлено, что H_2O_2 может иметь двойное действие на плацентарную активность: действовать не только как цитотоксический медиатор, но также как сигнальная молекула, способная индуцировать *de novo* секрецию ХГЧ и быть защитным антиоксидантом, высвобождаемым плацентой, против низкого вызова оксидативного стресса (Kharfi A.A. et al., 2007).

Преэклампсию относят к категории воспалительных заболеваний, связанных с дисфункцией иммунной системы. Факторы, содержащиеся в плазме женщин с преэклампсией, стимулируют транс-эндотелиальную миграцию нейтрофилов, которая обуславливает индукцию оксидативного стресса и продукцию ИЛ-8. В сосудах женщин с преэклампсией значительно большее количество нейтрофилов прилипало к эндотелию и инфильтрировало внутреннее пространство по сравнению с женщинами с физиологически протекающей беременностью или небеременными (Cadden K.A., Walsh S.W., 2008). Значительных различий в инфильтрации лимфоцитами не наблюдалось. Моноциты и макрофаги были найдены в жировой ткани, а не в сосудах. Предполагают, что именно нейтрофилы представляют собой класс лейкоцитов, вызывающих дисфункцию клеток сосудов у женщин с преэклампсией.

Патогенез преэклампсии связан с активацией нейтрофилов, оксидативным стрессом, нейтрофильной инфильтрацией сосудистой системы, а также повышенным уровнем в плазме линолевой кислоты, предшественника арахидоновой кислоты и их метаболитов. У женщин с преэклампсией активируется экспрессия транскрипционного фактора NF- κ B и циклооксигеназа 2 в сосудистом русле, что показывает связь воспаления с инфильтрацией нейтрофилами. Экспозиция нейтрофилов женщин с физиологически протекаю-

щей беременностью к условиям, создающимся у беременных с преэклампсией, вызывает активацию нейтрофилов с высвобождением токсических веществ, таких как АФК, ФНО- α и тромбоксан, которые могут быть ответственными за констрикцию и дисфункцию сосудов (Shah T.J., Walsh S.W., 2007).

Повышенный уровень пероксинитрита в крови, вероятно вследствие повышенной активности NADPH-оксидазы, приводит к усилению экспрессии рецептора для липопротеина низкой плотности в окисленной форме в сосудистой системе женщин с преэклампсией. Это сопровождается развивающийся при преэклампсии окислительный стресс в сосудах (Sankaralingam S. et al., 2009).

Вновь синтезированный тромбоксан зависит от циклооксигеназы 2 и играет роль в ответе продукцией ФНО- α . Предполагают следующий механизм материнской вазоконстрикции и сосудистого воспаления при преэклампсии. Активированные нейтрофилы, секретирующие тромбоксан, мигрируют через эндотелий в микроокружение сосудов, в котором они способствуют вазоконстрикции, тогда как освобождение ФНО- α может вызывать сосудистое воспаление.

Исследовали роль микрочастиц в сосудистой дисфункции мульти-системных нарушений в артериях женщин с преэклампсией (Meziani F. et al., 2006). Наблюдали увеличенные уровни циркулирующих микро-частиц, происходящих из лейкоцитов и тромбоцитов. Микрочастицы беременных с преэклампсией индуцировали *in vitro* гипореактивность сосудов на серотонин. Гипореактивность предотвращалась ингибитором NO-синтазы и сопровождалась увеличением продукции оксида азота (NO). В присутствии ингибитора циклооксигеназы 2 обусловленные серотонином сокращения частично редуцировались в артериях, обработанных микрочастицами здоровых женщин, но отменялись после обработки микрочастицами женщин с преэклампсией, что ассоциировалось с продукцией 8-изопростана. Микрочастицы женщин с преэклампсией индуцировали увеличение экспрессии NO-синтазы и циклооксигеназы, вызванной активацией NF- κ B, и повышение оксидативного и нитрозативного стрессов.

Bhatnagar S. и соавт. (2007) исследовали взаимосвязь между генотипами iNOS и преэклампсией. Измеряли концентрации ФНО- α , NO и СОД у пациенток с преэклампсией и в контрольной группе с целью оценки их связи с одиночным нуклеотидным полиморфизмом. У пациенток с преэклампсией на 36 нед беременности найдено значительное увеличение уровня NO в сыворотке крови и снижение активности

СОД. Двукратное увеличение ФНО- α после родов снижалось. Два из 4-х наблюдаемых одиночных нуклеотидных полиморфизмов (G300A экзон 8 и ассоциация G274T экзон 16) проявляли значительную связь с преэклампсией. Также показана ассоциация G274T экзона 16 с уровнями ФНО- α и активностью СОД при преэклампсии. Предполагается, что NO, ФНО- α , активность СОД и полиморфизм индуцибельной NO-синтазы 2A (NOS2A) могут совместно играть роль в развитии преэклампсии.

При культивировании эндотелиальных клеток пупочного канатика беременных с преэклампсией выявлены фенотипические изменения, такие как сниженная экспрессия конститутивной эндотелиальной NO-синтазы, ассоциированная с дезорганизованным белковым распределением в эндотелиальных соединениях и увеличенной эндотелиальной проницаемостью (Gu Y. et al., 2006). Определение экспрессии мРНК и белка теплового шока 90, способного защищать эндотелиальную функцию, показало увеличение количества клеток, позитивных на окраску дигидроэтидиумом. Экспрессия белка теплового шока 90 была значительно снижена в эндотелиальных клетках женщины с преэклампсией. Угнетение белка теплового шока 90 ингибитором галданамицином вызывало увеличение генерации супероксида и снижение белковой экспрессии eNOs. Предполагается, что увеличенный эндотелиальный оксидативный стресс может также иметь место в фетальном компартменте при преэклампсии.

Cindrova-Davies T. и соавт. (2007) исследовали активацию сигнальных путей в течение гипоксии-реоксигенации эксплантатов ворсин трофобласта *in vitro*. Гипоксия/реоксигенация активировала стресс-активированную протеинкиназу, р38 митоген-активируемую протеинкиназу и путь NF- κ B с последующим увеличением тканевых концентраций и секреции ФНО- α и ИЛ-1 β , экспрессии циклооксигеназы 2 и уровня апоптоза. Добавление к эксплантатам антиоксидантов (витаминов С и Е) блокировало активацию р38 MAPK, стресс-активируемую протеинкиназу и пути NF- κ B. Введение витаминов или угнетение пути р38 также редуцировало экспрессию циклооксигеназы 2, секрецию ФНО- α и ИЛ-1 β и уровень апоптоза. Сделан вывод о том, что оксидативный стресс служит возможным индуктором синтеза и высвобождения провоспалительных факторов в плаценте. Большинство этих эффектов опосредовано р38 MAPK и NF- κ B. Они могут быть эффективно блокированы витаминами С и Е *in vitro*.

С учетом того, что оксидативный стресс и воспаление являются чертами, присущими преэклампсии, комбинация низких доз аспирина и антиоксидантов, подобных витаминам С и Е, должна способствовать управлению синдромом, хотя возможная польза такой терапии еще ожидает адекватного клинического исследования и подтверждения.

Антиоксиданты защищают белки и ферменты от окисления и разрушения свободными радикалами и помогают поддерживать интеграцию клеточной мембраны. Антиоксиданты делятся на две категории:

- ловушки свободных радикалов, которые улавливают и нейтрализуют свободные радикалы;
- внутри и внеклеточные ферменты, которые угнетают пероксидазные реакции, включенные в продукцию АФК.

Ловушки АФК включают витамины С и Е, каротиноиды и глутатион. Антиоксидантные ферменты включают глутатионпероксидазу, СОД и каталазу, активность которых зависит от присутствия кофакторов, таких как селен, цинк и железо. Антиоксидантные ферменты важны для внутриклеточной защиты, ферментные антиоксиданты — важный защитный механизм вне клетки.

Следствиями ненормального развития плаценты могут быть сниженная плацентарная перфузия, сверхпродукция АФК и истощение запасов антиоксидантов. Оксидативный стресс в совокупности с воспалением может вызывать высвобождение материнских факторов, которые становятся причиной активации и повреждения эндотелиальных клеток, что приводит к появлению клинических признаков преэклампсии (артериальной гипертензии и протеинурии). Факторами риска оксидативного стресса и ответа на него считают высокое содержание в крови липопротеинов низкой плотности, гипергомоцистеинемию, генетически обусловленную низкую резистентность к оксидативному стрессу и дефицит антиоксидантов в пище. В связи с этим проводили многочисленные исследования, целью которых было увеличить резистентность пациенток к оксидативному стрессу и предотвратить системное и утероплацентарное повреждение эндотелия при использовании антиоксидантов для возможной профилактики преэклампсии. Поскольку антиоксиданты — относительно недорогие препараты, использование их особенно важно для женщин низкого социальноэкономического уровня. Однако наблюдается значительная гетерогенность относительно профилактической эффективности применения антиоксидантов. Представлены результаты

анализа рандомизированных исследований, оценивающих пользу и вред использования антиоксидантов для предотвращения преэклампсии (Rumbold A., et al., 2008). Гетерогенность в отношении исходов могла быть связана с различиями в типах антиоксидантов. Величина эффекта антиоксидантов на относительный риск преэклампсии была много больше для женщин, которым назначали один из наиболее мощных каротиноидов-антиоксидантов — ликопен (снижение на 52%), а для женщин, которым назначали витамины С и Е, комбинированные с аспирином* и рыбьим жиром (снижение на 93%), по сравнению с женщинами, которым назначали одни витамины С и Е (снижение на 8%). Авторы обзора не рекомендуют рутинное применение антиоксидантов во время беременности для снижения риска преэклампсии и других серьезных осложнений беременности. Однако использование антиоксидантов может быть полезным по меньшей мере у некоторых женщин при индивидуальном подходе.

Плацентарный оксидативный стресс вносит вклад во многие осложнения беременности, включая выкидыш, преэклампсию и преждевременные роды. Сейчас общепризнано, что АФК могут индуцировать спектр изменений, следующих от гомеостатической индукции ферментов к апоптотической клеточной гибели. Burdon С. и соавт. (2007) предполагают, что индукция циклооксигеназ является физиологическим ответом на оксидативный стресс и может играть роль в инициации родов.

Задержка внутриутробного развития плода обычно обусловлена материнскими, плодовыми или плацентарными факторами, но многие случаи не имеют определенной причины. Исследуют новые факторы, которые могут влиять на развитие плода и рождение, такие как время и тип питания плода, психосоциальный стресс у матери, плацентарная активность 11 β -гидроксистероид-дегидрогеназы-2, активность нейроэндокринной системы, которая обуславливает эффекты психосоциального стресса, роль провоспалительных цитокинов и оксидативного стресса (Valsamakis G. et al., 2006). Показано, что задержка внутриутробного развития плода связана с увеличением распространенности метаболического синдрома в позднем периоде жизни, условиями ассоциирования ожирения с артериальной гипертензией, сахарным диабетом 2-го типа и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Есть данные, что смертность, связанная с сахарным диабетом, непропорционально концентрирована среди лиц с ненормальным весом при рождении.

Увеличенный риск преэклампсии представляет ожирение, особенно у молодых женщин. Неизвестно, почему ожирение является фактором риска развития преэклампсии, но это может иметь отношение к оксидативному стрессу, воспалению и изменению функции сосудов. Показана интенсивная инфильтрация сосудов нейтрофилами и воспаление сосудов у женщин с преэклампсией и у женщин с ожирением (Walsh S.W., 2007). Так как у женщин с ожирением обнаружены воспалительные изменения сосудов, у них может быть увеличен риск развития преэклампсии, когда они подвергаются дополнительной нагрузке и влиянию плацентарных факторов во время беременности. Подобно преэклампсии диабетические состояния (гестационный и сахарный диабет) характеризуются дисфункцией эндотелия и вкладом АФК в развитие заболевания. Присутствие нитротирозина свидетельствует о повреждении сосудов в плаценте женщин с сахарным диабетом вследствие действия пероксинитрита, образованного в результате усиленного выброса супероксида при активации NADPH-оксидазы и NO активированной NO-синтазы (см. рис. 11).

Одной из причин преждевременных родов является хориоамнионит. Показано, что при хориоамнионите активируется NADPH-оксидаза, фермент, продуцирующий АФК и тесно связанный с оксидативным стрессом. Маркер окислительного стресса 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE) повышает в плаценте уровень модифицированных белков, которые могут играть важную роль при преждевременных родах. Активность NADPH-оксидазы на поверхности цитоплазматической мембраны и ворсин трофобласта при хориоамнионите возрастает в 2 раза. Ферментная активность появлялась на плазматической и ворсинчатой мембранах, а также на фагосомальных мембранах и везикулярных и тубулярных структурах. Предполагают, что активность NADPH-оксидазы важна для защиты плаценты от инфекций и является фактором патогенеза преждевременных родов, связанных с хориоамнионитом.

Оценивали связь гистологических повреждений плаценты с врожденными матрикс/внутрижелудочковыми геморрагиями у новорожденных менее 32 нед гестации. Повреждения у новорожденных ассоциировались с воспалением амниона, были связаны с нарушениями оксигенации, перфузии и эффективного кровоснабжения. Внутриамниотическая инфекция приводит к преждевременным родам, может повышать чувствительность новорожденных к послеродовым стрессам или инициировать ранние врожденные матрикс/внутрижелудочковые



Рис. 15. Участие NADPH-оксидазы фагоцитов и ее гомологов в патогенезе заболеваний, сопряженных с окислительным стрессом у беременных женщин

геморрагии *in utero* посредством цитокиновых воздействий, вызывающих сердечно-сосудистую нестабильность.

Деградация фибриллярного коллагена участвует в разрыве фетальных оболочек при нормальных родах и при преждевременном разрыве оболочек. Ключевым ферментом, принимающим участие в обмене внеклеточного матрикса, служит матриксная металлопротеиназа-1 (MMP-1). Генетические вариации промотора MMP-1 связаны с риском преждевременного разрыва оболочек. Wang H. и соавт (2008) исследовали возможность вклада эпигенетических факторов в контролирование экспрессии MMP-1 в амнионе человека. Угнетение метилирования ДНК 5-аза-2'-дезокситидином в фибробластах амниона вызывало значительное увеличение генной транскрипции MMP-1 и сопровождалось значительным увеличением продукции MMP-1. Сделано заключение, что в дополнение к генетической вариации метилирование ДНК

играет роль в контроле экспрессии MMP-1 и риске неблагоприятного исхода беременности.

Предполагают, что нарушение развития плаценты на ранних сроках беременности может привести к формированию плацентарного оксидативного стресса и вследствие этого к таким синдромам, как привычная потеря беременности и преэклампсия. Разнообразие результатов исследований этих состояний разными авторами связано с различиями биологических маркеров и методов, применяемых для оценки оксидативного стресса, в основе которых лежит определение конечных продуктов оксидативного стресса. Недавно предложен новый подход — измерение редокс-статуса тиолов или оценка генерации супероксида, когда распознавалась роль фаза 1/фаза 2 путей биотрансформации в оксидативном стрессе. Тиоловый редокс-статус и вовлечение этих систем в оксидативный стресс связаны с нарушениями репродукции и беременности с акцентом на синдроме преэклампсии.

Таким образом, возникновение и развитие осложнений беременности, таких как преэклампсия, задержка внутриутробного развития плода, хориоамнионит, могут быть опосредованы оксидативным стрессом, в значительной степени связанном с повышением активности NADPH-оксидаз (рис. 15).

4.4. ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ

Клинические особенности материнского синдрома преэклампсии могут объясняться генерализованной дисфункцией эндотелиальных клеток, которая является частью более глобального системного воспалительного ответа. Reddy A. и соавт. (2008) поддерживают точку зрения, что эти эффекты сопровождаются слушиванием клеточного детрита, включая **микрочастицы синцитиотрофобласта**, внеклеточные ДНК и РНК, с поверхности плаценты в материнский кровоток. При исследовании влияния сокращения матки обнаружили значительное увеличение слушивания микрочастиц синцитиотрофобласта у женщин с преэклампсией при вагинальных родах (увеличение содержания в плазме), которое отсутствовало у женщин с физиологическим течением беременности, и небольшое увеличение при плановом

кесаревом сечении. Не отмечено значительного увеличения уровня фетальной или тотальной ДНК при родах, но уровни тотальной ДНК (материнской и фетальной) были увеличены при преэклампсии по сравнению с нормальными родами. Увеличенный шеддинг микро-частиц синцитиотрофобласта при вагинальных родах может играть роль в развитии тяжелых клинических проявлений преэклампсии в послеродовом периоде.

Беременность — состояние более высокого оксидативного стресса по сравнению с послеродовым периодом. Kressig P. и соавт. (2008) проводили исследование оксидативного стресса в течение 48 часов после родов у женщин с нормально протекавшей беременностью и у женщин с преэклампсией или задержкой внутриутробного развития плода. Из всех исследованных продуктов оксидативного стресса в крови и моче выявлено повышение концентрации только малонового диальдегида (МДА) в плазме крови женщин с преэклампсией или с задержкой внутриутробного развития плода по сравнению с нормальной беременностью через 24 ч после родов. Через 48 ч различий в уровне малонового диальдегида не наблюдали. Неконтролируемое перекисное окисление вызывают АФК, которые продуцируются вследствие реоксигенации тканей во время родов. Продолжительные роды могут вызывать более выраженный материнский оксидативный стресс.

Показано, что в течение беременности концентрация витамина С и тиола в периферической крови снижалась, в то время как концентрация витамина Е, окисленного цистеинил-глицина и отношение свободного гомоцистеина к окисленному линейно увеличивалась (Roes E.M. et al., 2006). После родов уровни цистеина и витамина С и отношение свободного цистеина к окисленному и уровни цистеина, витамина С, цистеинил-глицина и глутатиона были значительно ниже по сравнению с таковыми до зачатия, в то время как уровни окисленного цистеина, цистеинил-глицина и глутатиона, а также гомоцистеина были значительно выше через 6 нед после родов. Таким образом, при нормальной беременности существует баланс между концентрациями антиоксидантов и оксидантов, несмотря на увеличенный уровень оксидативного стресса. При беременности, сопровождающейся артериальной гипертензией, может формироваться резко выраженный дисбаланс оксидативного статуса.

Известно, что полиненасыщенные жирные кислоты (особенно омега-3-жирные кислоты) угнетают активность циклооксигеназы и синтез провоспалительных цитокинов, активируют парасимпатическую нервную систему, действие которой редуцирует риск сосудистых

нарушений. Слабо выраженное системное воспаление, наблюдаемое при артериальной гипертензии, имеет такую природу в перинатальном периоде, поэтому адекватные количества полиненасыщенных жирных кислот в течение критических периодов развития головного мозга предотвращают развитие артериальной гипертензии. Предполагают, что превентивная стратегия, цель которой — снижение частоты артериальной гипертензии и связанных с ней состояний, таких как атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания у взрослых, должна проводиться в течение перинатального периода, чтобы быть эффективной (Das U.N., 2006).

Для поддержания внутриклеточного гомеостаза и редокс-баланса окисляются глутатион и глутатионтрансфераза — семейство ферментов, являющихся антиоксидантами, которые нейтрализуют свободные радикалы и липидные пероксиды (см. гл. 1). Для оценки глубины оксидативного стресса используют соотношение между восстановленными и окисленными тиолами. Roes E.M. и соавт. (2006) анализировали послеродовые внутриклеточные и внеклеточные концентрации антиоксидантов у женщин с неосложненной беременностью. Большинство тиолов в цельной крови значительно увеличивалось в обеих группах (с вагинальными родами и с кесаревым сечением) в первые дни после родов. Однако в группе с кесаревым сечением уровни восстановленного и окисленного цистеина, гомоцистеина и глутатиона в плазме значительно снижались после 24 ч, тогда как железовосстанавливающая способность увеличивалась. Уровни витамина E в плазме снижались значительно в обеих группах в течение 24–48 ч после родов. Сниженные уровни витамина E в плазме вскоре после родов ассоциировались со снижением пероксидного окисления липидов. Независимо от способа родоразрешения уровни тиолов в цельной крови и в плазме значительно увеличивались, а витамина E — снижались в течение 3 мес после родов, тогда как уровни в плазме витамина C и железовосстанавливающей способности не менялись по сравнению с родовым периодом.

Установлено, что у женщин с преэклампсией показатели оксидативного стресса выше и сохраняются таковыми в послеродовом периоде. Уровни свободных тиолов и соотношение свободных тиолов к окисленным были ниже при преэклампсии и у беременных с нормальным артериальным давлением по сравнению с соответствующими послеродовыми значениями (Raijmakers M.T. et al., 2008). Более того, отношение свободных тиолов к окисленным (цистеина,

гомоцистеина и цистеинглицина) было значительно снижено у женщин с преэклампсией (по сравнению с женщинами с нормальным артериальным давлением) в течение беременности и после родов.

Нарушение защитных барьеров и целостности ткани матки у женщин во время операции или родов, а также снижение иммунореактивности способствуют развитию инфекционных осложнений. Большую часть инфекций половых путей у женщин вызывают условно-патогенные возбудители. За счет привлечения полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитарных клеток к месту воспаления происходит перераспределение популяционного состава клеток периферической крови. Синтез различных факторов воспаления может приводить к нарушению клеточного гомеостаза и влиять на функциональную активность разных типов клеток.

Как правило, на локальном уровне наблюдаются выраженные изменения интенсивности продукции различных цитокинов, что сопровождается выраженной воспалительной инфильтрацией и активацией макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и клеток других популяций непосредственно в очаге воспаления. Острое течение воспалительных заболеваний нередко приводит к значительным изменениям в состоянии иммунитета не только на локальном, но и на системном уровне. Это находит отражение в перестройке функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови.

Присутствие нейтрофилов в эпителии эндометрия считают одним из гистологических признаков эндометрита. Выявлены изменения функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в цервикальных и эндометриальных секретах у женщин с эндометритом и сальпингоофоритом. Присутствие нейтрофилов в верхних отделах полового тракта имеет важное прогностическое значение для диагностирования инфекции. При эндометрите нейтрофилы выявлены в жидкости полости матки. Показано, что повышенный уровень бактерицидных пептидов гранул нейтрофилов (дефенсинов), но не самих нейтрофилов, в вагине женщин, инфицированных *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* или *Chlamydia trachomatis*, связан с наличием эндометрита.

Инфекционные осложнения в послеродовом периоде связаны с увеличением продукции провоспалительных цитокинов и генерации клетками АФК в организме родильниц. Определение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и в лохиях подтвердило, что чем выше число факторов риска развития инфекционных

осложнений, тем более выраженным становился рост уровней цитокинов в периферической крови и лохиях. У рожениц с инфекционным риском отмечалось достоверное повышение уровней ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α . Наиболее показательным в этом отношении параметром считают ИЛ-1 β . Содержание данного цитокина у пациенток с высоким инфекционным риском повышалось в 2 раза по сравнению с контрольной группой (Сухих Г.Т. и соавт., 2005). Наиболее выраженным было повышение уровней цитокинов (ИЛ-1 β — в 3,4 раза, ФНО- α — в 4,2 и ИЛ-6 — в 1,6 раз) в подгруппе рожениц с эндометритом и активацией вирусной инфекции по сравнению с контрольной группой.

Нами проведено исследование с целью выявления изменений в генерации АФК в периферической крови и в изолированных гранулоцитах у женщин с послеродовым эндометритом, а также для исследования особенностей регуляции респираторного взрыва изолированных гранулоцитов. Данные, полученные при исследовании генерации АФК лейкоцитами периферической крови, свидетельствуют, что базовый уровень продукции АФК был значительно выше в крови женщин из группы сравнения (роженицы с нормально протекающим послеродовым периодом) и женщин с послеродовым эндометритом, чем в крови женщин контрольной группы (здоровые небеременные женщины с нормальной репродуктивной функцией). Острый воспалительный процесс у женщин с послеродовым эндометритом характеризуется усилением продукции АФК клетками крови (рис. 16).

В пробах крови женщин с послеродовым эндометритом наблюдалось увеличение более чем в 3 раза амплитуды ответа на опсонизированный зимозан. Соотношение спонтанной и вызванной продукции АФК клетками крови, характеризующее индекс активации, отражает дисбаланс между системами генерации и удаления АФК, т.е. признаки окислительного стресса. Избыточность продукции АФК клетками крови у женщин с эндометритом показывает также суммарная продукция АФК клетками крови. Следовательно, у женщин с послеродовым эндометритом защитная функция нейтрофилов не реализована. Характеристика клеток, циркулирующих в кровеносном русле, важна для диагностики и мониторинга лечения. После проведенного лечения уже на вторые сутки показатели значительно снижались, тогда как индекс активации возрастал, однако не достигал уровня, определяемого в группе контроля. При многих заболеваниях, сопровождающихся окислительным стрессом, нейтрофилы сами становятся мишенью АФК, что приводит к изменениям их функционирования.

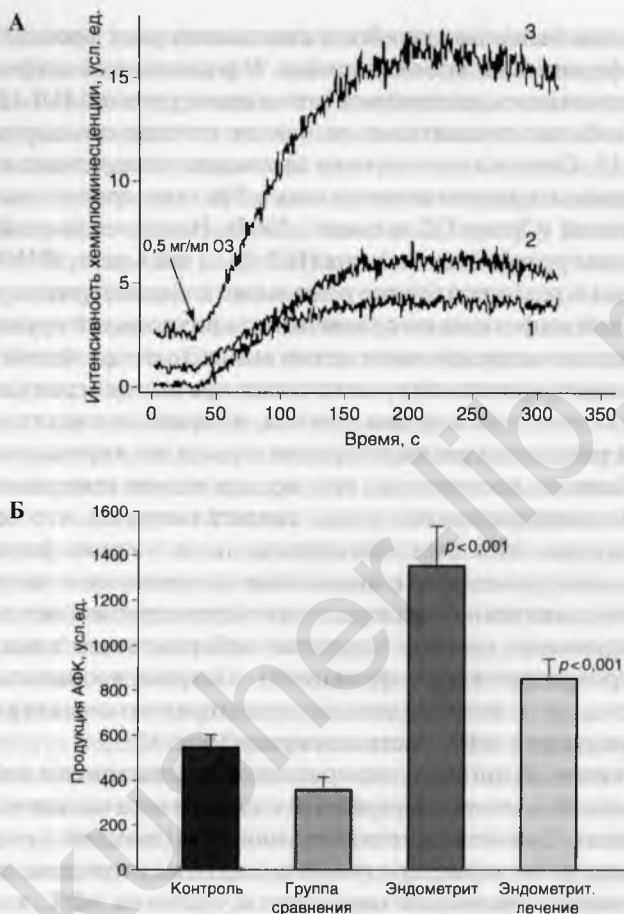


Рис. 16. Усиление продукции АФК клетками крови у женщин с послеродовым эндометритом.

Показана продукция АФК в нефракционированной крови здоровых небеременных женщин, рожениц без осложнения послеродового периода, женщин с послеродовым эндометритом до и на фоне лечения. А — оригинальная запись спонтанной и вызванной опсонизированным зимозаном (0,5 мг/мл) продукции АФК клетками цельной крови у здоровых небеременных женщин (1), рожениц без осложнения послеродового периода (2) и рожениц с послеродовым эндометритом (3). Б — продукция АФК в ответ на опсонизированный зимозан клетками нефракционированной периферической крови здоровых небеременных фертильных женщин (контроль), рожениц без инфекционных осложнений послеродового периода (группа сравнения), женщин с послеродовым эндометритом (эндометрит) и женщин на фоне лечения эндометрита. Измерения проведены с помощью метода хемилюминесцентного анализа

Амплитуда ответа на 1 мкМ fMLF значительно различалась в выделенных гранулоцитах периферической крови женщин (в условных единицах): 112 ± 39 в контрольной группе; $34,6 \pm 10,3$ — в группе сравнения; $46,4 \pm 13,4$ — в группе женщин с эндометритом ($p < 0,01$). Известно, что при связывании fMLF с рецептором происходит активация сигнальных каскадов с участием митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), тирозиновых протеинкиназ и фосфатаз, фосфатидилинозит-3-киназы (Hallett M.B., Lloyds D., 1997, Paclet M.-H. et al., 2004). С помощью специфических ингибиторов мы провели исследование сигнальных систем, которые участвуют в передаче сигнала с рецептора fMLF на NADPH-оксидазу. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3. Влияние ингибиторов на респираторный взрыв, вызванный 1 мкМ fMLF, в изолированных гранулоцитах крови у здоровых небеременных женщин с нормальной репродуктивной функцией (группа контроля), у родильниц без инфекционных осложнений послеродового периода (группа сравнения) и женщин с послеродовым эндометритом ($M \pm m$)

Ингибиторы	Группы		
	Контрольная	Сравнения	Основная
SB 203580 1 мкМ	$1,2 \pm 0,1^a$	$0,7 \pm 0,1^{sb}$	$0,1 \pm 0,1^{s*}$
Ортованадат натрия, 0,1 мМ	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2^{sss*}$
Вортманнин, 0,1 мкМ	$0,3 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,03^s$	$0,4 \pm 0,1^{sss}$

a — эффект (отн. ед.) рассчитан как отношение параметра, полученного от обработанных ингибитором клеток, к параметру интактных клеток, принятому за 1;

b — достоверное отличие от эффекта ингибитора в контрольной группе (s — $p < 0,001$; ss — $p < 0,02$; sss — $p < 0,01$);

v — достоверное отличие от эффекта ингибитора в группе сравнения (* — $p < 0,01$; ** — $p < 0,02$).

Ингибитор р38МАРК 1 μ М SB 203580, усиливал респираторный взрыв, вызванный 1 мкМ fMLF, в нейтрофилах женщин контрольной группы, значительно уменьшал в клетках женщин группы сравнения, тогда как в нейтрофилах женщин с эндометритом не оказывал какого-либо действия. Эффект 0,1 мкМ ортованадата натрия, ингибитора тирозиновых протеинфосфатаз, на респираторный взрыв изолированных клеток был значительно слабее в группе женщин с послеродовым эндометритом по сравнению с эффектом в двух других группах. Ингибитор фосфатидилинозит-3-киназы 0,1 мкМ вортманнин значительно

сильнее подавлял респираторный взрыв в гранулоцитах женщин контрольной группы, чем в гранулоцитах родильниц обеих групп.

Таким образом, послеродовой эндометрит сопровождается усилением продукции АФК клетками периферической крови как при активации специфическим агентом, так и при отсутствии активации. У родильниц без осложнений послеродового периода и родильниц с эндометритом наблюдается изменение эффективности ингибирования компонентов внутриклеточных сигнальных систем, вовлеченных в трансдукцию сигнала с рецептора fMLF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для беременности характерно состояние оксидативного стресса, в основе которого — увеличенная активность митохондрий плаценты и повышенная интенсивность продукции АФК. Эмбрион развивается в низкоокислородном окружении, защищающем дифференцирующиеся клетки от повреждения свободными радикалами.

На определенных этапах развития плаценты может происходить избыточная продукция АФК. Непреодолимый оксидативный стресс плацентарных тканей представляет общий патофизиологический механизм для различных этиологий ранней потери беременности. Острый пик в экспрессии маркеров оксидативного стресса в трофобласте был обнаружен и при нормальной беременности. В I триместре усиление кровотока в межворсинчатом пространстве сопровождается вспышкой оксидативного стресса. В случае избыточного проявления «оксидативного взрыва» и неспособности создать эффективную антиоксидантную защиту он становится причиной ранних потерь беременности.

На поздних сроках увеличенный оксидативный стресс наблюдают при беременности, осложненной гипергликемией, задержкой внутриутробного развития плода и преэклампсией, что сопровождается повышенным трофобластным апоптозом и измененной реактивностью сосудов плаценты. Причиной оксидативного стресса при осложнениях беременности у человека, ведущих к освобождению провоспалительных цитокинов и антиангиогенных факторов в материнский кровоток, считается снижение перфузии межворсинчатого пространства, которое приводит к гипоксическим изменениям в плаценте и формированию синдрома ишемии-реперфузии.

Наиболее часто встречающиеся связанные с нарушением плацентации два осложнения беременности — выкидыш и преэклампсия — проявляются на разных стадиях беременности, однако оба они имеют корни в дефиците трофобластной инвазии на ранних стадиях гестации. В патогенез преэклампсии и выкидышей вносит существенный вклад нарушение плацентации.

В этиологии привычного выкидыша важную роль может играть хроническое воспаление при наличии локального оксидативного микроокружения. Присутствие провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-1) и высоких уровней АФК повреждает липиды, протеины и ДНК.

Неадекватная инвазия трофобласта в материнские спиральные артерии при преэклампсии — причина недостаточного кровоснабжения плаценты и последующей плацентарной ишемии. Дефицит трофобластной инвазии эндометриальных артерий приводит к развитию артериальной маточно-плацентарной циркуляции, предрасполагающей к повторяющемуся феномену ишемии-реперфузии, и повреждениям, которые могут стать причиной оксидативного стресса плаценты.

Плацентарный оксидативный стресс может быть следствием флуктуаций концентрации кислорода после гипоксии/реоксигенации через действие АФК. В кровоток матери высвобождаются различные факторы, вырабатываемые плацентой. Они вызывают широко распространенную активацию или дисфункцию материнского эндотелия, которая играет ведущую роль в этиологии преэклампсии.

Исследование сигнальных путей показало, что гипоксия/реоксигенация активировала p38 MAPK и стресс-активированную протеинкиназу, митоген-активированную протеинкиназу и путь NF- κ B с последующим увеличением тканевых концентраций и секреции ФНО- α и ИЛ-1 β , экспрессии циклооксигеназы 2 (COX 2) и уровня апоптоза.

Антиоксиданты защищают белки и ферменты от окисления и разрушения свободными радикалами и помогают поддерживать интеграцию клеточной мембраны. Антиоксидантные ферменты важны для внутриклеточной защиты, неферментные антиоксиданты — важный защитный механизм во внеклеточном пространстве. При нормальной беременности существует баланс между концентрациями антиоксидантов и оксидантов, несмотря на увеличенный уровень оксидативного стресса. При беременности, сопровождающейся артериальной гипертензией, обнаружен резко выраженный дисбаланс оксидативного статуса.

Преэклампсия — ведущая причина перинатальной заболеваемости и смертности, и только роды эффективно предотвращают этот синдром.

Роды — сильный индуктор плацентарного оксидативного стресса, провоспалительных цитокинов, ангиогенных регуляторов. Прерывистое кровоснабжение рассматривают в качестве иницирующей причины. Продолжительные роды могут вызывать более выраженный оксидативный стресс в организме матери.

Послеродовой период — состояние меньшего оксидативного стресса по сравнению с беременностью. Однако при воспалительных осложнениях послеродового периода происходит выраженная активация лейкоцитов и увеличение продукции АФК. Острый послеродовой эндометрит сопровождается усилением продукции АФК клетками периферической крови как при активации специфическим агентом, так и при отсутствии активации. Наблюдают изменение состояния внутриклеточных сигнальных систем, вовлеченных в трансдукцию сигнала с рецептора fMLF, как у родильниц без осложнений послеродового периода, так и у родильниц с эндометритом.

Глава 5

Становление иммунной системы плода и особенности иммунитета новорожденного, зависимость функционального состояния лейкоцитов новорожденных от физиологического или осложненного течения беременности

Основной причиной распространенности инфекционных заболеваний у новорожденных считают незрелость их иммунной системы. В настоящее время активно изучают механизмы, определяющие особенности иммунной защиты новорожденного ребенка.

5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТАНОВЛЕНИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДА ЧЕЛОВЕКА

Процесс становления иммунной системы человека, в основном протекающий в период пренатального онтогенеза, инициируется появлением полипотентных **стволовых кроветворных клеток**, их пролиферацией и дифференцировкой во все категории зрелых клеток:

- моноциты/макрофаги;
- гранулоциты;
- эритроциты;
- тромбоциты;
- естественные цитотоксические клетки (NK-клетки);
- Т- и В-лимфоциты.

Развитие кроветворения тесно связано с формированием стромы образующихся органов гемопоэза, которая представляет микроокружение для развивающихся кроветворных клеток. Стволовые кроветворные клетки появляются во внеэмбриональной мезенхиме на 3-й неделе развития эмбриона в желточном мешке. Внеэмбриональный этап становления гемопоэза начинается в желточном мешке, пупочном канатике, хорионе. Здесь происходит их пролиферация, а затем — миграция в генеративные органы: печень, тимус, селезенку, костный мозг, где проходят эмбриональный и фетальный этапы становления гемопоэза (с 5-й недели до конца гестационного периода).

В процессе эмбриогенеза формируются центральные (генеративные) и периферические органы иммунитета. К **центральному органам иммунитета** относят тимус и костный мозг, к **периферическим** — селезенку, лимфатические узлы, миндалины, групповые лимфоидные узелки пищеварительного тракта. В исследовании клеток иммунной системы в разных органах в процессе эмбриогенеза человека достигнут значительный прогресс благодаря развитию гибридной технологии и получению большого спектра моноклональных антител, которые позволяют охарактеризовать различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток по экспрессии ими дифференцировочных мембранных антигенов (Хлыстова З.С., 1987; Хлыстова З.С. и соавт., 2002). Так было установлено, что первыми из иммунокомпетентных клеток в процессе эмбриогенеза человека появляются макрофаги, затем — нейтрофилы и NK-клетки, на более поздних этапах — лимфоциты.

По мере развития и созревания плода происходит смена очагов гемопоэза, что является особенностью эмбрионального кроветворения. На ранних стадиях гестации важную роль в иммуногенезе играет печень.

Кроветворение в печени. На 4-й неделе развития происходит закладка **печени** — активного органа гемопоэза у эмбриона человека. Этот орган становится центром гемопоэза начиная с 5–6-й недели внутриутробного развития эмбриона человека. На ранних стадиях эмбрионального развития в печени наиболее выражен эритропоэз. Максимальная активность процесса кроветворения развивается к 20-й неделе, после чего гемопоэз в печени затухает, сменяясь костномозговым. После прекращения функционирования желточного мешка на 7–8-й неделе гестации **печень становится главным источником стволовых клеток.**

Высокий процент недифференцированных стволовых кроветворных клеток, являющихся источником клеток-предшественников лимфоцитов, гранулоцитов, макрофагов, эритроцитов и других клеточных элементов кроветворной и лимфоидной систем, определяется в печени 6-недельного плода, в последующем их количество уменьшается.

Первичные макрофаги развиваются из стволовых клеток желточного мешка уже на 2–3-й неделе гестации, активно мигрируют и обнаруживаются в легких, головном мозге и других органах. До 70% гемопоэтических клеток к началу гемопоэза в печени представлены купферовскими клетками. К 6–7-й неделе преобладают быстро делящиеся эритроидные предшественники. Уже на начальных этапах печеночного гемопоэза макрофаги экспрессируют Fc-рецептор, что делает их способными к антителозависимому фагоцитозу. Купферовские клетки экспрессируют также рецепторы к ЛПС. Они способны инактивировать циркулирующий эндотоксин, попадающий из амниотической жидкости в организм плода при заглатывании околоплодных вод. Макрофаги играют важную роль в морфогенезе плода, уничтожая обломки клеток, подвергшихся апоптозу в процессе замещения одной эмбриональной ткани другой.

Кроветворение в печени носит **экстравазкулярный** характер, происходит вне сосудов по ходу капилляров. В печени эмбриона находится значительное количество клеток-предшественников гранулоцитов и макрофагов. **Гранулоцитопоэз** в печени начинается на 9-й неделе, а на 10-й — в ней содержится до 4,6% миелоидных элементов среди всех кроветворных клеток. Около 40% гемопоэтических клеток к 14-й

неделе составляют **нейтрофилы**. К 20-й неделе в печени значительно уменьшается количество очагов кроветворения. По мере затухания кроветворения в печени эмбриона оно активизируется в костном мозге. Кроветворение в печени может происходить у ребенка в период новорожденности и даже в течение первого года жизни.

На более поздних этапах эмбриогенеза макрофаги способны в качестве специализированных АПК участвовать в развитии реакций приобретенного иммунитета, в частности, продуцируя определенные монокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α), усиливать функциональную активность лимфоцитов.

НК-клетки появляются в печени плода через 5 нед от начала гестации. Их доля за период с 6-й по 18-ю недели возрастает с 5–8% до 15–25%. Позже они образуются и в костном мозге. НК-клетки плода обладают способностью к антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Усиление цитотоксической функции лимфоцитов в ответ на инфицирование вирусами простого герпеса было выявлено у плодов между 17-й и 24-й неделями гестации. Тем не менее уровень естественной цитотоксичности был значительно ниже, чем у взрослых доноров, что, по-видимому, является одной из причин повышенной восприимчивости плодов и новорожденных к ряду инфекций, особенно вирусной этиологии.

В печени 5–6-недельного плода были обнаружены **T-лимфоциты** — свидетельство того, что печень плода человека содержит T-лимфоциты еще до проявления лимфопоэтической функции тимуса. Уже на 8-й неделе развития эмбриона лимфоциты печени способны отвечать бласттрансформацией на стимуляцию фитогемагглютинином и аллогенными лимфоцитами. Данные о появлении зрелых T-лимфоцитов в эмбриональной печени до формирования функционально активного тимуса указывали на возможность созревания этих клеток без непосредственного влияния тимусных факторов. Однако позже было сделано заключение о первичности эндокринной функции тимуса. Постулировано положение о том, что объединение эндокринной и лимфоцитопоэтической функций тимуса происходит на 7,5–8-й неделе пренатального онтогенеза человека (Хлыстова З. С. и соавт., 2002).

Менее 5% лимфоцитов, выделенных из печени плодов от 8 до 16 нед развития, взаимодействовали с моноклональными антителами к CD3, CD2, CD4, CD8 и CD1a. Около 30% лимфоцитов имели маркер клеток-предшественников — CD38. Уровень каждой из определяемых субпопуляций T-лимфоцитов (CD3⁺, CD2⁺, CD4⁺ и CD8⁺) в печени плода

после 16 нед развития повышался, достигая 10–26%. Содержание CD38⁺-клеток достигало 30–60%. Появление первых **пре-В-клеток** идентифицировано на 7–8-й неделе гестации, когда были выявлены **внутриклеточные μ -цепи** иммуноглобулинов. В период 16–20 нед внутриутробного развития обнаружено 30–40% В-клеток. Пре-В-клетки экспрессируют на поверхностной мембране антигены I (HLA-A,B) и II (HLA-DR) классов МНС. В-лимфоциты с поверхностными иммуноглобулиновыми рецепторами можно обнаружить в печени на 9-й неделе. На 10–11-й неделе гестации около 0,6% мононуклеарных клеток печени имеют поверхностные IgM, на 11-й неделе число их увеличивается до 1,5%. На 12-й неделе в печени обнаруживают В-лимфоциты с иммуноглобулинами двух классов (М и D), на 13-й — появляются В-клетки с IgG и IgA. К 16-й неделе количество В-клеток достигает 11%.

Таким образом, печень на ранних этапах эмбриогенеза служит органом гемопоэза, играя важную роль в развитии и становлении иммунной системы человека.

Лимфопоэз в тимусе плода. После 4 нед внутриутробного развития человека обнаруживается закладка одного из наиболее важных органов иммунной системы, центрального органа лимфоидного кроветворения и иммуногенеза — тимуса (вилочковой железы). В нем происходит «обучение» и созревание Т-лимфоцитов с одновременной реализацией эндокринной функции путем выработки гуморальных факторов. Паренхима тимуса развивается из эпителия кожного типа (прехордальная пластинка), а строма — из мезенхимы. Тимус окончательно формируется раньше других лимфоидных органов.

На 8-й неделе гестации происходит заселение тимуса клетками-предшественниками лимфоцитов и начинается активный лимфопоэз. К 9–10-й неделе доля лимфоцитов увеличивалась до 34,8%, к 12-й неделе гестации достигала 82,6% и затем практически не изменялась до рождения.

В течение периода с 11-й по 20-ю недели эмбрионального развития среди клеток развивающегося тимуса отмечено присутствие в нем ряда субпопуляций лимфоцитов уже на 11-й неделе гестации. При этом Т-лимфоциты в количественном отношении преобладали над В-клетками, на долю которых в это время приходилось менее 5%. В сроки гестации, соответствующие 11–20 нед, антиген CD3 экспрессировало 28–66% лимфоцитов. Все тимоциты несли маркеры Т-хелперов (CD4), Т-цитотоксических клеток (CD8), малодифференцированных

кортикальных тимоцитов (CD1a), а также рецептор к эритроцитам барана (CD2). Около 30% лимфоидных клеток тимуса одновременно реагировали с моноклональными антителами к CD3 и CD1a.

Фенотипическая характеристика тимоцитов плодов человека более раннего периода развития (7–13 нед гестации) на 7-й неделе не выявила антигены лимфоидных клеток на клетках тимуса. Однако в срок 8,5 нед общий лейкоцитарный антиген (CD45) и общий маркер Т-клеток (CD7) были обнаружены более чем на 50% клеток тимуса. Часть этих клеток экспрессировали также антиген Т-хелперов (CD4) и моноцит/макрофагальный антиген (CD14). CD4⁺CD8⁺ «двойные позитивные» тимоциты перемещаются в глубокие слои коры тимуса, где при их контакте с эпителиальными тимическими клетками происходит позитивная селекция по экспрессии собственных антигенов МНС.

При исследовании клонов тимоцитов показано, что все Т-клеточные предшественники в тимусе плода с фенотипом CD44⁺CD25⁻FcγRII/III⁻ имеют НК-клеточный потенциал, что в этой популяции также присутствуют коммитированные предшественники НК-клеток (пре-НК). Коммитированные к Т-клеточной линии предшественники (пре-Т), которые не способны генерировать НК-клетки, сначала появляются на стадии CD44⁺CD25⁻FcγRII/III⁺ на 12-й день гестации. Доля пре-Т заметно увеличивается в процессе перехода от CD44⁺CD25⁻ стадии к CD44⁺CD25⁺ стадии на 14-й день. С другой стороны, количество пре-НК-клеток преимущественно увеличивается на CD44⁺CD25⁻ стадии между 12-м и 14-м днями гестации. Продукция пре-НК продолжается до CD44⁺CD25⁺ стадии, но прекращается перед реаранжировкой генов β-цепи Т-клеточного рецептора. В дальнейшем было показано, что популяция CD44⁺CD25⁻CD122⁺ на 14-й день представлена исключительно пре-НК-клетками. Эти результаты указывают, что самая ранняя миграция предшественника Т-клеток в фетальный тимус является Т/НК бипотентной, и позволяют предположить, что бипотентный предшественник постоянно продуцирует пре-НК и пре-Т-клетки до стадии CD44⁺CD25⁺ клетки.

Таким образом, для лимфоидных клеток развивающегося тимуса характерно обилие обнаруживаемых на их поверхности антигенов и их способность экспрессировать одновременно несколько антигенов, в частности антигены и молодых, и зрелых Т-лимфоцитов.

После 12-й недели тимоциты начинают распознавать аллоантигены в смешанной культуре лимфоцитов. Стимуляция тимоцитов пло-

дов на 18–39-й неделях гестации фитогемагглютинином совместно с форболмиристатацетатом инициировала синтез ИЛ-2, уровень которого был невысоким, но достаточным для регистрации. Создается впечатление, что лимфоидные клетки тимуса к моменту рождения ребенка уже достаточно зрелые фенотипически и функционально и способны проявлять относительно высокую функциональную активность в ранние периоды постнатальной жизни.

Гемопоз в селезенке плода. Гемопоз в селезенке человека совершается только в период эмбрионального развития, но она сохраняет потенциальную способность к формированию клеток крови и у взрослого индивидуума. В селезенке происходит преимущественно лимфопоз. Этот орган выполняет защитную функцию, реализуемую захватом и нейтрализацией токсичных веществ и выработкой специфических антител. Кроме того, в селезенке постоянно происходит физиологический распад (гемолиз) эритроцитов, осуществляемый ретикулярными клетками и макрофагами. Селезенка участвует также в обмене железа, эритропозе, образовании эритропоэтина и др.

На 4-й неделе развития плода человека селезенка определяется в виде плотного скопления мезенхимных клеток внутри большого сальника. На 5–6-й неделе в ней встречаются единичные крупные элементы — бласты и макрофаги. На 11-й неделе в строме селезенки появляются островки эритробластов, гранулоцитов, но лимфоэпителиальная ткань еще не обнаруживается. Эритроидное и гранулоцитарное кроветворение определяется в селезенке на 11–15-й неделях, затем лимфоцитоз становится преобладающим. На 11-й неделе в селезенке плода обнаруживают 1,5% клеток с поверхностными IgM. На 13–14-й неделе развития плода в ней формируются лимфоидные фолликулы (Хлыстова З.С., 1987). На 13–22-й неделе гестации в селезенке определяется до 20–30% лимфоцитов с поверхностными IgM; 4–15% лимфоцитов имеют на мембране IgA. На 14-й неделе гестации содержание В-клеток с поверхностными IgM, IgG, IgA или IgD в селезенке приближается к их уровню у взрослых. Выявлены в селезенке CD4⁺- и CD8⁺-клетки у плода 12 нед развития, В-лимфоциты в этот срок составили 25%. Большая часть клеток селезенки реагирует с моноклональными антителами к CD38, что характерно для клеток-предшественников. Клеточный состав селезенки уже к 22-й неделе на 70% представлен лимфоцитами.

Кроветворение в костном мозге плода. Костный мозг состоит из васкуляризованного стромального матрикса, происходящего из

перихондриальных областей разрывающейся кости, и гемопоэтической паренхимы, формирующейся в результате колонизации матрикса мигрирующими стволовыми клетками. В период эмбрионального развития заселение костного мозга стволовыми клетками происходит позднее, чем заселение печени, тимуса и селезенки. **У взрослого человека костный мозг — основной орган кроветворения.**

Как орган гемопоэза костный мозг начинает функционировать на 10–12-й неделе развития, когда появляются первые очаги кроветворения в диафизах трубчатых костей. Макрофаги (фагоцитирующие остеокласты) уже на 8-й неделе внутриутробного развития начинают участвовать в заполнении костномозгового пространства, в котором с 10–11-й недели активно протекают гемопоэтические процессы, первоначально направленные преимущественно в сторону гранулоцитарного ростка кроветворения. Начиная с этого периода гестации, по мере роста организма и костной системы постепенно активизируется колониеобразование в костном мозге, появляются элементы миелоидного, эритроидного и лимфоидного рядов, но печень все еще остается основным органом кроветворения. А с 20-й недели внутриутробного развития таким органом становится костный мозг. К 20–24-й неделе гестации клетки миелоидного ряда в костном мозге начинают преобладать над другими клеточными элементами. К 26-й неделе число гранулоцитов составляет $2 \times 10^9/\text{л}$, быстро увеличивается и достигает к моменту рождения $6 \times 10^9/\text{л}$.

Количество Т-лимфоцитов в костном мозге плода приближается к таковому у взрослого человека. В течение всего периода внутриутробного развития оно в среднем не превышает 1,8% с индивидуальными колебаниями от 0 до 8%. В костном мозге плода человека в период с 12-й до 20-й недели развития более 80% клеток имеют фенотип предшественников миелоидного и лимфоидного кроветворения, являясь CD38⁺-клетками. Доля клеток с маркерами малодифференцированных тимоцитов (CD1a⁺), Т-хелперов (CD4⁺), Т-цитотоксических клеток (CD8⁺) и зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) в период с 12-й по 20-ю неделю внутриутробного развития плода не превышает 5%. Относительное содержание В-лимфоцитов (CD19⁺) в период с 12-й до 16-й недели гестации варьирует от 10% до 20%, в сроки 16–20 нед — от 20 до 30%. Общее число лимфоцитов в костном мозге плода к 20-й неделе составляет около 2/3 их содержания у доношенного новорожденного, постепенно увеличивается и достигает к моменту рождения $2 \times 10^9/\text{л}$.

Лимфо- и миелопоэз в лимфатических узлах плода. Первые закладки лимфатических узлов появляются на 7–8-й неделе эмбриогенеза

(З.С. Хлыстова, 1987). Формирование и развитие лимфатических узлов у человека происходят на протяжении всего внутриутробного периода. На 8-й неделе эмбрионального развития закладываются бифуркационные и паратрахеальные лимфатические узлы, на 12-й неделе — шейные. Представлены данные о том, что заселение мезенхимного зачатка лимфатического узла клетками миелоидного и лимфоидного ряда происходит на 12-й неделе эмбриогенеза, а замена грануло- и эритропоэза на лимфопоэз в корковом веществе начинается одновременно с дифференцировкой паренхимы лимфоузла на корковое и мозговое вещество (14-я неделя). Т-зоны в лимфатических узлах формируются на 13-й неделе развития плода.

Сравнительный анализ цитотоксической активности НК-клеток лимфатических узлов плода и взрослого человека выявил сходные функциональные возможности клеток этого типа в период как эмбрионального, так и постнатального онтогенеза человека. Показана значительная индивидуальная вариабельность индекса цитотоксичности: от 2 до 33% с максимальным значением в группе передних средостенных и латеральных глубоких шейных лимфатических узлов. Уже в эмбриональном периоде пренатального развития прослеживается связь лимфатических узлов с другими органами иммунной системы, свидетельствующая о включении их в общую систему иммуногенеза плода человека.

Лимфатические узлы — интегральный компонент иммунной системы и место антигензависимой клеточной пролиферации и дифференцировки. С помощью разработанной модели для успешной имплантации фетальных лимфоузлов человека мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (*Severe Combined Immunodeficiency — SCID*) анализировали фенотипы и функциональную способность клеток лимфатических узлов и селезенки человеческих плодов 18–24-й недели гестации. Мезентериальные лимфоузлы плода содержали высокий процент CD45RA⁺ Т-клеток и мало В-лимфоцитов и моноцитов, тогда как клетки селезенки — равные количества Т- и В-клеток, а также моноцитов/макрофагов. Функциональный анализ Т-клеток выявил отсутствие пролиферативного ответа на фитогемагглютинин или CD3-специфические моноклональные антитела, несмотря на индукцию экспрессии активационного маркера CD69. Пролиферацию клеток лимфатических узлов и тимоцитов наблюдали при добавлении ИЛ-2.

Особенностью фетальной иммунной системы является то, что ее клеточная основа представлена «наивными» клетками, которые еще

не вступали в процесс распознавания чужеродных антигенов, что отражается в экспрессии маркеров, репрезентативных для наивных лимфоцитов, и возможном отсутствии аксессуарных клеток в различных лимфоидных органах.

Лимфопоэз в лимфоэпителиальных органах пищеварительного тракта. Выполняющие барьерную функцию небная миндалина, аппендикс и пейеровы бляшки относятся к лимфоэпителиальным органам пищеварительного тракта. В пищеварительном тракте существует защитная система в виде одиночных лимфоидных фолликулов и их скоплений, которые по строению отличаются от тимуса, селезенки и лимфатических узлов.

Установлено, что закладка червеобразного отростка происходит на 8-й неделе внутриутробного развития плода, небной миндалины — на 9-й. В аппендиксе, пейеровой бляшке и миндалине лимфоидные скопления выполняют местные защитные функции еще в период эмбрионального развития. Однако заселение их Т- и В-лимфоцитами происходит позднее, чем в кроветворных органах плода. Миграция лимфоцитов в лимфоэпителиальные органы пищеварительной системы осуществляется из кровеносных сосудов. Местное значение лимфоидных образований проявляется только в определенных участках, в которых создаются особые взаимоотношения эпителия и лимфоидной ткани.

Заселение лимфоцитами небной миндалины выявлено на 11–12-й неделе гестации, аппендикса — на 15–16-й, тонкого кишечника — на 11-й (Хлыстова З.С., 1987). Суспензию мононуклеарных клеток в достаточном для исследования количестве из небной миндалины можно было получить только на 14-й неделе гестации, из аппендикса — на 17-й, а из пейеровых бляшек — на 20-й. Именно поэтому данные о характере дифференцировки лимфоидных клеток в процессе эмбриогенеза в этих органах и их количественная характеристика были представлены автором лишь с этих сроков гестации. Начиная с 20-й недели основной популяцией лимфоцитов в небной миндалине служат Т-клетки (56–60%), количество В-лимфоцитов не превышает 3,8%. В это время в аппендиксе выявлено 18,7% Т-лимфоцитов и 16% В-клеток. Доля Т-клеток практически не меняется до момента рождения, а В-лимфоцитов увеличивается до 26% к 32-й неделе гестации. В пейеровых бляшках содержание Т- и В-лимфоцитов меньше, чем в аппендиксе: к 20-й неделе — соответственно 5,9% и 2,1%, к 27-й — 12% и 8,1% (Хлыстова З.С., 1987).

Считается, что эмбриональный кишечник — один из первых органов, который заселяется клетками из тимуса. В эмбриональном кишечнике Т-цитотоксические клетки ($CD8^+$) преобладают над хелперами ($CD4^+$). В связи с тем, что эмбриональный кишечник свободен от бактериальной флоры и пищевых антигенов, скопление $CD8^+$ -клеток в эпителии обусловлено скорее их усиленным заселением, а не ответом на специфический антиген. Происходит агрегация Т-лимфоцитов в слизистой оболочке эмбрионального кишечника. Предполагается, что скопления лимфоидных клеток есть начало формирования пейеровых бляшек, которые макроскопически определяются на 24-й неделе гестации.

Кишечник содержит участки с истонченным покровным эпителием, где лимфоциты, минуя сосуды, мигрируют на поверхность слизистой оболочки. Вторым путем миграции — через лимфатические сосуды — лимфоциты попадают в общий лимфоток, а затем в кровоток. Лимфоидные образования лимфоэпителиальных органов пищеварительной системы плода человека, являясь звеном единой системы иммуногенеза, способны осуществлять и местную иммунную защиту.

Лейкоциты периферической крови плода. Лимфоциты и макрофаги в крови плода обнаружены после 7-й недели гестации, нейтрофилы позже — на 12-й. Способность периферических лимфоцитов отвечать пролиферацией на митогены определяется на 14-й неделе гестации. Сывороточные IgM выявляются у 11-недельных плодов, инфицированных вирусом краснухи, а IgG — в 17 нед гестации, также при инфекции.

Циркулирующие Т-лимфоциты плода значительно отличаются от лимфоцитов взрослого человека как по фенотипическим характеристикам, так и по уровню функциональной активности. Пуповинная кровь плода, полученная в результате кордоцентеза, содержала 85% фетальных Т-клеток, которые экспрессировали на своей поверхности $CD38$ -антигены, тогда как у взрослых $CD38^+$ -лимфоциты составляли лишь 5%. Проведенные сравнительные фенотипические исследования (Schultz С. et al., 2002) показали, что среди лимфоцитов пуповинной крови преобладают «наивные» $CD4^+CD45RO^-CD45RA^+CD29^{тук, лим}T$ -клетки и практически полностью отсутствуют $CD4^+CD45RO^+CD45RA^-CD29^{пркис}T$ -клетки памяти. Свидетельством незрелости фетальных клеток считают более низкий уровень экспрессии на них рецепторов к ИЛ-2.

А.В. Макогон и соавт. (2005) исследовали онтогенетические особенности клеточных основ иммунитета человека путем сравнительного анализа показателей гемоиммунограмм здоровых плодов 22–26 нед гестации, новорожденных детей и взрослых доноров крови. Фетальную кровь получали из пуповинной вены плода с помощью кордоцентеза. Установлено, что иммунная система плода и новорожденного ребенка на начальных этапах онтогенетического развития существенно отличается от таковой взрослого человека, во-первых, количественными диспропорциями и, во-вторых, функциональной незрелостью иммунокомпетентных клеток.

В периферической крови плодов у беременных II триместра зарегистрирован относительный и абсолютный лимфоцитоз, тогда как содержание полиморфноядерных лейкоцитов резко снижено и составляет в среднем 20% (Макогон А.В. и соавт., 2005). Результаты оценки клеточного состава пуповинной крови плодов свидетельствовали, что лимфопоэз — доминирующее направление кроветворения на этапе эмбриогенеза, в то же время активность гранулоцитарно-макрофагальных предшественников снижена. Преобладание лимфоцитов у плода представляется закономерным явлением онтогенеза иммунной системы.

По сравнению со здоровыми донорами в периферической крови плодов снижено процентное содержание общей субпопуляции CD3⁺T-лимфоцитов, вследствие количественного дефицита CD8⁺T-клеток увеличен иммунорегуляторный индекс, резко снижено содержание CD16⁺-NK-клеток, а также моноцитов с высоким уровнем экспрессии HLA-DR-антигенов. В то же время зарегистрировано 2-кратное увеличение относительного содержания CD20⁺-B-клеток и HLA-DR⁺-лимфоцитов (Макогон А.В. и соавт., 2005). Тем не менее, абсолютное количество клеток во всех субпопуляциях T- и B-лимфоцитов в крови плодов значительно превышает параметры взрослых доноров и свидетельствует о большей интенсивности T- и B-лимфопоэза на ранних этапах онтогенеза.

При изучении способности к синтезу ИЛ-2 в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином лимфоцитов крови плодов 16–22 нед гестации обнаружен достаточно высокий уровень синтеза ИЛ-2, на основании чего сделано заключение, что формирование «системы ИЛ-2» у плода начинается рано, до 16-й недели гестации. В отличие от взрослых доноров, концентрация иммуноглобулинов класса G, M и A была резко снижена. Спонтанная пролиферация и уровни пролифера-

тивного ответа фетальных мононуклеарных клеток при стимуляции моноклональными анти-CD3-антителами и митогеном (кон А), соответственно, по классическому (через CD3-T-клеточный рецепторный комплекс) и альтернативному (через адгезивные молекулы) путям активации также были снижены. Важно отметить, что дефект пролиферативного ответа T-клеток при стимуляции анти-CD3-антителами сохраняется также и в раннем постнатальном периоде. Исследование пролиферативной активности мононуклеарных клеток в культуре *in vitro* и оценка сывороточного уровня иммуноглобулинов показали функциональную незрелость циркулирующих T- и B-лимфоцитов плодов.

Выявленные особенности свидетельствуют о **физиологической незрелости иммунной системы плода/новорожденного**, которая не позволяет обеспечить достаточный уровень эффективной противoinфекционной защиты в антенатальном и раннем постнатальном периоде.

Лимфоидные клетки в легких плода. Легочная патология у новорожденных детей — актуальная проблема, которая занимает в структуре причин перинатальной заболеваемости и смертности одно из главных мест. Нарушение формирования местной иммунной защиты в эмбриогенезе приводит к снижению иммунной реактивности новорожденных, в чем и состоит одна из возможных причин инфекционной патологии легких.

Лимфоидные образования, осуществляющие местную защиту в легких, являются звеном единой системы иммунитета. О защитных функциях этого органа свидетельствуют интенсивный местный синтез антител и высокая эффективность аэрогенной иммунизации против ряда бактериальных и вирусных инфекций. Клеточную основу местного иммунитета легких составляют лимфоидные образования в слизистой оболочке стенок бронхов — **бронхоассоциированная лимфоидная ткань** (БАЛТ-система), лимфоидные элементы паренхимы легких и альвеолярные макрофаги.

Бронхоассоциированная лимфоидная ткань представляет собой плотные скопления лимфоцитов, располагающиеся между бронхами и артерией, и находящиеся в тесном контакте с эпителием (лимфоэпителием). Анатомически в бронхоассоциированной лимфоидной ткани выделяют 3 области:

- центральную;
- окружающую ее (периферический ободок);
- область, непосредственно прилегающую к лимфоэпителию (субэпителиальная).

Каждая из них содержит популяции лимфоидных клеток разных типов.

Центральная область состоит из плотно упакованных лимфоцитов (преимущественно В-клеток) и ДК. Последние участвуют в регуляции дифференцировки лимфоцитов и выполняют аксессуарную (вспомогательную) функцию.

Периферическая зона бронхоассоциированной лимфоидной ткани состоит из свободно расположенных Т-лимфоцитов, причем Т-цитотоксические клетки преобладают над Т-хелперами. В периферической области определяются также ДК, экспрессирующие на своей поверхности антигены II класса МНС.

Субэпителиальная область представлена плотной сетью клеточных элементов с большим количеством ДК и макрофагов. Среди них встречаются немногочисленные Т-лимфоциты.

Лимфоэпителий, в отличие от бронхоэпителия, характеризуется интенсивным связыванием антител с антигенами II класса МНС и негативной реакцией на общий лейкоцитарный антиген. Преимущественное содержание под лимфоэпителием ДК и макрофагов позволяет предположить способность лимфоэпителия к транспорту антигена из бронхиального просвета в основание бронхоассоциированной лимфоидной ткани. Клетки с молекулами II класса МНС на поверхностной мембране включаются в представление антигена Т-клеткам-хелперам. Возможно, эти поверхностные молекулы участвуют в захвате антигена из просвета бронха. В альвеолярных стенках также выявляются Т-хелперы. Все клетки в значительных количествах экспрессируют антигены II класса МНС. Клетки с маркером Т-цитотоксических клеток отсутствуют.

Находящиеся в альвеолах клетки экспрессируют на поверхностной мембране общий лейкоцитарный антиген. В большом количестве выявляются Т-лимфоциты и плазматические клетки. Клеток, экспрессирующих антигены II класса МНС, обнаруживается мало.

Окончательное формирование бронхоассоциированных лимфоидных тканей легкого у человека происходит в постнатальном периоде. Помимо бронхоассоциированных лимфоидных тканей, в легких существуют одиночно расположенные клетки, способные реализовать местные иммунные реакции. **Нарушение формирования местных защитных механизмов на этапе эмбриогенеза приводит к снижению иммунной реактивности новорожденных, что способствует развитию пре- и постнатальной инфекционной патологии легких.**

Нами совместно с сотрудниками лаборатории пульмонологии, руководимой профессором Л.К. Романовой (Институт морфологии человека РАМН), было изучено становление клеточных основ иммунной системы в легких плода человека. Результаты этих исследований были представлены в ряде публикаций.

В развитии легкого выделяют три основных стадии:

- псевдожелезистую;
- каналикулярную;
- альвеолярную.

Основное проявление псевдожелезистой стадии (5–16-я неделя гестации) — развитие бронхиального дерева, крупных легочных и бронхиальных артерий и вен. Для каналикулярной стадии (17–24-я недели гестации) характерно формирование мелких бронхов, терминальных и респираторных бронхиол, интенсивное образование кровеносных капилляров, входящих в контакт с эпителием бронхов. В альвеолярной стадии происходят окончательная дифференцировка клеточных элементов легкого (клеток альвеолярного эпителия), развитие кровеносных капилляров и сурфактантной системы.

Присутствие в легких плода человека лимфоидных клеток, экспрессирующих CD2-антиген, обнаружено уже на 8–9-й неделе гестации (псевдожелезистая стадия), их доля составляла $5,25 \pm 1,37\%$. С увеличением срока гестации содержание CD2⁺-клеток в легких быстро возрастает, достигая 27% в каналикулярной стадии (16–24-я недели гестации) и 37% в начале альвеолярной стадии (25–28-я недели). Количество CD3⁺-клеток в легком плода на 9–15-й неделях варьирует от 0,3 до 7,7%, т.е. близко к таковому в печени и костном мозге (около 5%) в данный период гестации. В каналикулярной стадии развития легких число CD3⁺-клеток значительно увеличивается, достигая $29,2 \pm 9,5\%$, и остается стабильным в начале альвеолярной стадии.

Малодифференцированные кортикальные тимоциты (CD1a⁺) выявлены в легких плода на 9-й неделе внутриутробного развития. Их содержание во время псевдожелезистой стадии развития легких составляет в среднем $3,9 \pm 0,9\%$. Оно значительно увеличивается в каналикулярной стадии, достигая $23,6 \pm 5,4\%$. В начале альвеолярной стадии количество этих клеток составляет $34,75 \pm 15,2\%$, что превышает содержание их в печени, костном мозге и селезенке, но является более низким, чем в тимусе. Очевидно, особенности микроокружения легкого способствуют дифференцировке в направлении лимфоидная клетка-предшественник → CD1a⁺-лимфоцит. Доля основных регуляторных

клеток иммунного ответа — (CD4⁺ и CD8⁺) — в псевдожелезистой стадии развития легкого составляет 3,9% и 2,9% соответственно. В каналикулярной стадии она достигает 26,3 и 32,1% соответственно и остается стабильной в начале альвеолярной стадии. Таким образом, содержание CD4⁺- и CD8⁺-клеток в легких плода человека до 20-й недели гестации приблизительно такое же, как в печени.

Содержание В-лимфоцитов на псевдожелезистой стадии развития легких составляет в среднем $1,7 \pm 0,7\%$. С увеличением срока гестации оно возрастает до 20,1% в каналикулярной и до 30,5% — в начале альвеолярной стадии. Динамика содержания В-лимфоцитов в легких плода не совпадает с таковой в тимусе, печени, селезенке и костном мозге. При нормальном развитии плода плазматические клетки в легком не обнаруживаются. Они появляются при инфекционных заболеваниях матери, когда инфекционный агент проникает через плаценту.

Процент клеток, экспрессирующих антигены II класса МНС, во время псевдожелезистой стадии развития легких сравнительно невелик — 2,3%. Однако на каналикулярной стадии он резко возрастает, достигая 33,6%, и в начале альвеолярной стадии еще несколько увеличивается.

В паренхиме легкого взрослого человека содержание CD20⁺-лимфоцитов составляет 8%, CD3⁺-клеток — 37%, CD4⁺ — 22%, CD8⁺ — 22%. Очевидно, что **субпопуляционный состав лимфоцитов тканевой стромы легких плода человека 25–28 нед гестации близок к таковому у взрослого индивидуума.**

Tigouvanziam R. и соавт. (2002) предложили для изучения развития иммунокомпетентных клеток бронхов новую *in vivo* модель иммунитета слизистых оболочек человека, основанную на имплантации слизистой оболочки бронхов плода и аутологичных перибронхиальных лимфоузлов мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). В организме SCID-мышей человеческие имплантаты одних фетальных бронхов сохраняли макрофаги и тучные клетки, но теряли Т-клетки. Напротив, при совместном культивировании бронхов плода с перибронхиальными лимфоузлами, кроме макрофагов и тучных клеток, обнаруживается много Т- и В-лимфоцитов, часто образующих кластеры — внутрислизистую бронхоассоциированную лимфоидную ткань. Никакие другие аутологичные лимфоидные органы (костный мозг, тимус, печень) не способствовали развитию лимфоидных клеток в бронхоассоциированной лимфоидной ткани при совместной имплантации с бронхами, что говорит о специальных

онтогенетических и функциональных отношениях между внеслизистыми перибронхиальными лимфоузлами и внутрислизистой лимфоидной тканью.

Хронические заболевания легких и бронхолегочная дисплазия сопровождаются выраженным воспалительным ответом воздухоносных путей и интерстициума легких. Кроме клеток воспаления, различные цитокины, липидные медиаторы, протеолитические ферменты и токсичные кислородные радикалы могут играть существенную роль в патогенезе этого заболевания. Показано, что внутриутробная экспозиция к хориоамниониту или провоспалительным цитокинам индуцируют легочный или системный воспалительный ответ у плода. Контакт с антенатальной инфекцией может приводить к таким изменениям в легких, что минимальные повреждающие постнатальные события провоцируют чрезмерный воспалительный ответ в воздухоносных путях и легочной ткани. Воспаление и повреждения легочной ткани определенно влияют на нормальную альвеолизацию и развитие легочных сосудов у преждевременно рожденных детей с хроническими заболеваниями легких.

Несмотря на совершенствование методов ухода за новорожденными и их лечения, частота случаев бронхолегочной дисплазии в последнее десятилетие не уменьшилась. Более того, хронические легочные заболевания выявляют у глубоко недоношенных детей, которым не требовалась вентиляционная поддержка после рождения. Lacaze-Masmon-teil T. и Thebaud B. (2001) подготовили обзор, в котором проанализировали эпидемиологические, экспериментальные и клинические данные, убеждающие в том, что случаи воспалительной реакции, запущенной *in utero* или сразу после рождения, приводят к последующему развитию хронического легочного заболевания. Стимуляторы воспаления или специфические провоспалительные цитокины могут быть полезны для легочного созревания. Необходимо лучше понимать, как провоспалительные медиаторы вмешиваются в легочное созревание и альвеоляризацию, для того чтобы наметить пути для новых иммуномодуляторных стратегий в предотвращении хронических легочных заболеваний у глубоко недоношенных детей.

Антителообразование у плода. Плод синтезирует собственные антитела, в основном полиреактивные IgM. Способность клеток плода синтезировать IgM обнаруживают на 11–12-й неделе гестации, IgG — на 12–20-й, IgA — на 12–30-й. К 17-й неделе гестации концентрация IgM в фетальной сыворотке достигает 5–20% от содержания этого

иммуноглобулина в материнской сыворотке. Продукцию IgA (малые количества) выявляют позже — на 30-й неделе гестации. На 6-й неделе гестации в сыворотке плода в результате транспорта через плаценту появляется материнский IgG (до 5–6% от уровня его у матери). Переход IgG в ранние сроки гестации происходит в основном пассивно. В поздние сроки активный транспорт устанавливается благодаря экспрессии на мембране клеток плаценты рецептора к Fc-фрагменту IgG. Пассивный перенос материнских клеток и инфекционных агентов может стимулировать защитные механизмы плода. Активный перенос материнских IgG в существенных количествах начинается с 26-й недели гестации, в результате их уровень у плода достигает материнского уровня. Синтез IgE в легких и печени определяется с 11-й недели беременности, в селезенке — с 21-й, концентрация IgE в сыворотке плода незначительна.

Синтез компонентов комплемента также начинается рано: C3, C2 и C5-компонентов — на 8-й неделе гестации, C4-компонента — на 11-й. На 14-й неделе эмбрионального развития в селезенке, кроме перечисленных фракций комплемента, обнаруживают C1q, а еще позже (на 16-й неделе) — C7- и C9-компоненты комплемента.

Таким образом, становление иммунной системы организма у человека в значительной степени происходит в период пренатального онтогенеза. Уже к 16–20-й неделе гестации Т- и В-системы иммунитета в значительной степени сформированы. Это свидетельствует о значительных возможностях плода реализовать иммунные реакции.

Основной функцией иммунной системы плода считают защиту от потенциально агрессивных материнских клеток и инфекционных агентов. Успех этой борьбы зависит от состояния реактивности как специфических, так и неспецифических защитных механизмов. Раннее и достаточно полное созревание Т-клеток, с одной стороны, благоприятствует элиминации материнских иммунокомпетентных клеток или микроорганизмов, попадающих в циркуляцию плода, с другой — увеличивает риск сильной реакции клеток плода против антигенов матери. Именно поэтому благоприятные условия развития плода возможны только при сбалансированности эффекторных и регуляторных (преимущественно иммуносупрессорных) функций иммунокомпетентных клеток и действия механизмов, контролирующих иммуносупрессивное влияние.

5.2. ИММУНИТЕТ НОВОРОЖДЕННЫХ

Ребенок, попадая при рождении в новое, необычное окружение, испытывает повышенную антигенную нагрузку. Успех необходимой адаптации к внеутробной жизни и перестройки системы защиты зависит от состояния реактивности как специфических (приобретенных), так и неспецифических (врожденных) механизмов.

В момент рождения ребенка функциональная активность систем, обеспечивающих его защиту от воздействий новой окружающей среды, еще не подверглась модулирующему влиянию внешних факторов и, по-видимому, является отражением внутриутробных условий развития плода и его взаимодействий с иммунной системой матери. В последние годы увеличилась частота инфекционной патологии и состояний, связанных с ante- и интранатальной гипоксией, в связи с чем изменяется состояние различных звеньев иммунной системы ребенка. Новые условия существования требуют изменений прежде всего характера регуляции многих ответных реакций, в частности перехода с преимущественно иммуносупрессивного типа на иммуностимулирующий.

К моменту родов гемопоэз новорожденного приобретает характеристики, приближающиеся к таковым здорового человека. Однако в раннем постнатальном периоде интенсивность процессов кроветворения высокая, о чем свидетельствует повышенное содержание в пуповинной крови лейкоцитов, лимфоцитов и эритроцитов. Сохраняется абсолютный лимфоцитоз, однако по относительному составу основных популяций клеток крови (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов) новорожденные уже не отличаются от взрослых доноров. Количество эритроцитов и уровень гемоглобина в сыворотке крови у новорожденных детей повышено.

Сравнительная оценка показателей иммунного статуса здоровых доноров крови, новорожденных детей и плодов показала, что по своим количественным и функциональным параметрам иммунная система на ранних этапах онтогенеза (в антенатальном и в раннем постнатальном периоде) существенно отличается от иммунитета взрослого человека (Макогон А.В. и соавт., 2005).

5.2.1. Факторы врожденного иммунитета у новорожденных

На пути проникших в организм человека микроорганизмов стоят факторы защиты:

- клеточные (тканевые макрофаги, нейтрофилы и естественные киллеры);
- гуморальные (естественные IgG-антитела и комплемент).

Следует подчеркнуть, что естественная и приобретенная иммунная защита обеспечивается кооперацией различных клеток при развитии эффекторных функций, взаимной мобилизацией и регуляцией.

Врожденная иммунная система использует TLR, которые способны распознавать консервативные структуры, повторяющиеся в различных патогенных микробах, грибах и вирусах. Эти рецепторы экспрессируются макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами, дендритными и эпителиальными клетками. При их взаимодействии с лигандами, представленными на инфекционных агентах, в клетках активируются гены, кодирующие синтез цитокинов и их рецепторов.

Распознавание происходит путем связывания множества рецепторов в комбинации с активацией множества сигнальных путей, что приводит к высоко специфическому сигналу, инициирующему немедленный ответ на микробную угрозу. TLR инициируют противовирусный иммунитет при экспозиции клеток к поли (I:C), индуктору ИФН. TLR индуцируют такие процессы врожденного иммунитета, как воспаление, лихорадка и фагоцитоз, а также участвуют в реакциях приобретенного иммунитета, генерируя сигналы, необходимые для гуморального и клеточного ответа.

При исследовании врожденного иммунитета у новорожденных детей установлена нормальная базовая экспрессия TLR и мембранного CD14-антигена (Levy O., 2005). Иммунный ответ мононуклеарных клеток на ЛПС заметно редуцирован, о чем свидетельствовало пониженное высвобождение Th-1-цитокинов ФНО- α и ИФН- γ с относительным сохранением противовоспалительных Th-2-цитокинов. Растворимые факторы, присутствующие в плазме, угнетали уровень высвобождения ФНО- α (агониста TLR) из моноцитов.

Известно, что преждевременно родившиеся дети высокочувствительны к некоторым инфекциям, что частично обусловлено их незрелой врожденной иммунной системой, снижением активности нейтрофилов и моноцитов и пониженной концентрацией факторов

комплемента. Однако могут быть также важны дополнительные механизмы. В течение последних пяти лет большое внимание придают распознающим доменам, таким как TLR.

Макрофаги относят к главным клеточным элементам организма, экспрессирующим на поверхностной мембране функционально активные продукты, кодируемые генами МНС, которые необходимы для представления антигенов Т-клеткам и включения последних в антигенспецифический ответ. На поверхности макрофагов при созревании, дифференцировке и активации экспрессируются десятки других рецепторов, которые обеспечивают их связь с различными механизмами резистентности организма. Макрофаги — уникальные секреторные клетки. Они продуцируют множество растворимых глобулинов, которые всесторонне действуют на тканевой гомеостаз в ходе развития патологического процесса и иммунного ответа (ИЛ-1, ФНО- α , простагландины, цитолитические нейтральные протеазы и их ингибиторы, фибронектин, активатор плазминогена и ингибитор фибринолиза, ряд компонентов комплемента, лизоцим, ИФН- γ , цитокины, колониестимулирующие факторы и др.).

Активированные цитотоксические макрофаги играют важную роль в защите организма от опухолей и инфекций. Наиболее эффективный путь запуска макрофагальной цитотоксичности — активация лимфокинами (фактор, активирующий макрофаги, или ИФН- γ) в комбинации с малыми количествами ЛПС. Прямой контакт с клетками-мишенями или растворимым ФНО- α также активирует макрофаги. ФНО- α не только секретируется, но и присутствует как клеточно-ассоциированная молекула, которая действует при прямом контакте клеток в процессе убивания клетки-мишени в отсутствие секретированного ФНО- α .

Моноциты пуповинной крови продуцируют ИЛ-1 — фактор, активирующий лимфоциты, что имеет большое значение в запуске специфического иммунного ответа. Продукция ИФН- α моноцитами пуповинной крови после неспецифической индукции вирусами парагриппа (*Sendai virus*) и простого герпеса сходна с таковой при стимуляции моноцитов крови взрослых. Эффекторная функция моноцитов новорожденных нормальна. Моноциты новорожденных и взрослых убивают клетки *Toxoplasma gondii* одинаково эффективно. Но ответ макрофагов новорожденных на активацию лимфокинами слабее, чем клеток взрослых. Снижение иммунной защиты новорожденных может обуславливаться дефицитом продукции Т-клетками новорожденных

ИФН- γ , который активизирует макрофаги, увеличивая их цитотоксичность, внутриклеточное уничтожение патогена и окислительный метаболизм, а также экспрессию антигенов II класса МНС.

В пуповинной крови новорожденных большая доля моноцитов (предшественников макрофагов) являются зрелыми клетками, хотя в этой популяции снижено количество клеток, которые экспрессируют антигены II класса (АПК), и обеспечивают иммунную адгезию α -цепи LFA-антигена. Эти особенности моноцитов у новорожденных могут обуславливать некоторое снижение их функциональной активности. Показано снижение относительного содержания HLA-DR^{ярких}-моноцитов в крови плодов и новорожденных (Макогон А.В., 2005). Следствием этого считают преимущественно непрофессиональное представление антигенов Т-клеткам.

Организм новорожденных чрезвычайно чувствителен к вирусной инфекции и часто не развивает температурной реакции на нее. Однако несмотря на значительную индивидуальную вариабельность, взрослые и неонатальные мононуклеарные клетки и Т-клетки продуцируют сходные количества мРНК для ФНО- β и ФНО- α со сходной кинетикой, а также и самих цитокинов.

Преждевременные роды часто связаны с внутриутробным инфицированием плода. В свою очередь, недоношенные дети составляют группу высокого риска в связи с повышенной чувствительностью к инфекциям. Ранее мы обнаружили, что в сыворотке пуповинной крови некоторых новорожденных с подозрением на внутриутробное инфицирование в биологическом тесте выявлена активность ФНО- α , тогда как у подавляющего большинства практически здоровых доношенных новорожденных активность этого фактора не отмечена. Активность ФНО- α в сыворотке пуповинной крови, по нашим данным, выявлялась приблизительно у 40% недоношенных новорожденных.

Дегтярева В.Г. и соавт. (2000) показали, что концентрация ИЛ-1 β и ФНО- α в сыворотке пуповинной крови здоровых новорожденных детей достоверно ниже, чем в сыворотке периферической крови взрослых доноров. Результаты исследования свидетельствовали о существенной роли этих цитокинов в патогенезе осложнений неонатального периода, их влиянии на интенсивность воспалительных реакций.

ИЛ-1 β вызывает лихорадку и оказывает влияние на развитие острофазных реакций, воздействуя на гипоталамические и гипофизарные центры и избирательно активируя симпатическую нервную

систему. У новорожденных с клинической картиной сепсиса в крови имело место достоверное повышение в крови уровня ФНО- α и в меньшей степени ИЛ-1 β .

У новорожденных с перинатальными поражениями центральной нервной системы на 1-й неделе жизни концентрация ИЛ-1 β в крови незначительная и достоверно повышается на 2–3-й неделях жизни. В дальнейшем уровень ИЛ-1 β в сыворотке крови постепенно снижается, что соответствует выраженности клинической симптоматики перинатального поражения центральной нервной системы. Увеличение концентрации ИЛ-1 β и ФНО- α в пуповинной крови может служить ранним диагностическим признаком гипоксических изменений в организме новорожденного и свидетельствует об участии этих цитокинов в патогенезе транзиторных нарушений гемоликвородинамики в раннем периоде адаптации.

Повышение уровня ИЛ-6 и гнойное воспаление плаценты — маркеры неонатального сепсиса. Определяли связь между острыми хориоамнионитом и фунизитом плаценты и уровнями ИЛ-6 в пуповинной крови у своевременно и преждевременно родившихся новорожденных. Наблюдалось прогрессирующее увеличение уровней ИЛ-6 с увеличением тяжести этих заболеваний. У детей, родившихся в срок, отмечен некоторый подъем ИЛ-6 при легкой степени тяжести острого хориоамнионита и одиночном васкулите. Этот показатель увеличивался, если воспаление становилось тяжелым. Напротив, уровень ИЛ-6 у преждевременно родившихся новорожденных не увеличивался значительно до развития тяжелого острого хориоамнионита или трехсосудистого васкулита. Статистически значимые различия в уровнях ИЛ-6, обнаруженные при сравнении своевременно и преждевременно родившихся детей, связывали с относительной незрелостью иммунной системы. Уровни ИЛ-6 в пуповинной крови коррелировали с тяжестью острого плацентарного воспаления. У своевременно родившихся детей наблюдали больший подъем ИЛ-6 по сравнению с преждевременно родившимися до развития тяжелого воспаления.

Проведено исследование с целью оценки врожденного инфекционного риска на основе определения ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α в сыворотке крови и амниотической жидкости беременных женщин и пуповинной крови новорожденных. В группе женщин с подозрением на внутриутробную инфекцию обнаружена статистически значимая более высокая концентрация ИЛ-6 и ФНО- α в амниотической жидкости по сравнению с таковой у женщин с нормальной беременностью.

Определение повышенной концентрации этих цитокинов во второй стадии родов, главным образом ИЛ-6, имеет прогностическое значение. Поэтому полезно проводить исследование амниотической жидкости, полученной во второй стадии родов.

Система макрофагов принимает активное участие в реализации иммунного ответа у новорожденных. Поглощение микроорганизмов повышается в присутствии специфических антител, поскольку сенсибилизированные антителами и компонентами комплемента они активно присоединяются к Fc-рецепторам фагоцитов. Последующее микробоцидное действие обусловлено гидролитическими ферментами и бактерицидным анион-радикалом кислорода и другими АФК. У недоношенных новорожденных моноциты зачастую не завершают фагоцитоз из-за сниженной потенции уничтожения поглощенных бактерий, что, по-видимому, обусловлено недостатком гуморальных факторов, необходимых для опсонизации частиц.

Большую роль в защите от инфекции играют **полиморфноядерные лейкоциты**, которые используют сходные механизмы бактерицидного действия. Как и макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты увеличивают связывание и поглощение микроорганизмов в присутствии опсонизирующих факторов (антител и компонентов комплемента). Конечная фаза уничтожения и деградации микроорганизмов фагоцитами сопровождается серией сложных метаболических событий — активацией гликолитических путей, генерацией АФК, увеличенным потреблением кислорода («дыхательный взрыв»).

Одними из главных защитников организма от внеклеточных микробов на стадии раннего ответа считаются **нейтрофилы**. Они поглощают и убивают бактерии. Этот процесс резко усиливается при опсонизации возбудителей: С3b и IgG или белками острой фазы, а также при активации нейтрофилов цитокинами, продуцируемыми макрофагами и НК-клетками. Кроме того, они сами продуцируют цитокины — ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО α , гранулоцит/моноцитарный колониестимулирующий фактор, ИФН- α , фактор активации тромбоцитов и другие. С помощью этих цитокинов активируются и вовлекаются в борьбу с возбудителем новые клетки, прибывающие в очаг воспаления.

При индукции воспалительной реакции патогенами полиморфноядерные лейкоциты накапливаются *in situ* в ответ на хемотаксические стимулы. Полиморфноядерные лейкоциты — предельно дифференцированные клетки, не способные к пролиферации, с коротким сроком

жизни (по сравнению с лимфоцитами и макрофагами). Некоторые функции полиморфноядерных лейкоцитов стимулируются цитокинами. ИФН- γ увеличивает фагоцитарную активность этих клеток, благодаря индукции экспрессии на них Fc-рецептора, напоминающего высокоаффинный Fc-рецептор для мономерного IgG на моноцитах. Другие цитокины (колониестимулирующие факторы, ФНО- α и ФНО- β) не индуцируют экспрессии такого рецептора. ИФН- γ увеличивает фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов. ФНО- α и ИФН- γ индуцируют 5–10-кратное увеличение хемотаксиса и реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности.

Ответ фагоцитов начинается с выхода клеток из кровеносного русла или места локализации к месту воспаления, откуда поступают сигналы в виде хемотаксических факторов, инициируемых присутствием микроорганизмов. У новорожденных обнаружен дефект хемотаксиса, коррелирующий с дифференцировкой полиморфноядерных лейкоцитов. Менее дифференцированные нейтрофилы пуповинной крови имеют сниженный хемотаксический ответ, мигрируя на малые расстояния и реагируя на хемоаттрактанты в более высокой концентрации. Сыворотка крови новорожденных обладает меньшей способностью генерировать хемотаксические факторы (50% от уровня в сыворотке крови взрослых). Отмечена сниженная продукция лимфоцитарных хемотаксических факторов. Создается впечатление, что у новорожденных и хемотаксический ответ, и генерация хемоаттрактантов недостаточно зрелые.

У новорожденных детей отмечают тенденцию к гранулоцитопении при сепсисе и стрессе. Определяли уровень апоптоза в неонатальных гранулоцитах и сравнивали его с таковым во взрослых гранулоцитах. Найдено, что спонтанный и ФНО- α -индуцированный апоптоз был более выраженным в гранулоцитах новорожденных по сравнению с клетками взрослых. Уровни CD95 лигандов и ФНО- α значительно выше в клетках новорожденных. Экспрессия рецептора-1 для ФНО была ниже на гранулоцитах новорожденных, чем на клетках взрослых, что может быть связано с более высоким уровнем ФНО- α в плазме крови. Экспрессия анти-апоптотических молекул Bcl-2 в неонатальных гранулоцитах также была ниже, как и другого антиапоптотического сигнала, NF- κ B. Более высокое содержание в плазме лигандов смерти, ассоциированное с низкой экспрессией антиапоптотических молекул в гранулоцитах, может играть важную роль в запуске апоптоза в неонатальных гранулоцитах.

Ennaciri J. и соавт. (2006) изучали влияние инфицирования вирусом простого герпеса на апоптоз нейтрофилов взрослых и новорожденных. Показано, что вирус простого герпеса 1 усиливает апоптоз нейтрофилов новорожденных, не действуя на клетки взрослых. При этом увеличивалась экспрессия и Fas, и Fas-лигандов на поверхности нейтрофилов новорожденных. Обработка анти-Fas антителами и ингибиторами Fas-лигандов значительно снижала индукцию апоптоза, вызванную вирусом простого герпеса 1. С помощью иммуноферментного анализа установлено, что инфицирование вирусом простого герпеса 1 также ведет к увеличенному высвобождению растворимых FasL из инфицированных вирусом простого герпеса 1 неонатальных нейтрофилов. По-видимому, увеличенный апоптоз нейтрофилов новорожденных вследствие инфицирования вирусом простого герпеса 1 представляет важный механизм снижения противовирусного ответа этих клеток, что объясняет по меньшей мере отчасти тяжесть герпетической инфекции у новорожденных детей.

Функциональные свойства лейкоцитов новорожденных. Количество нейтрофилов в пуповинной крови доношенных детей значительно превышает таковое в крови взрослых — $(5,1 \text{ и } 2,0) \times 10^9/\text{л}$, соответственно (Nurpponen I. et al., 2002). Новорожденные человека, как и новорожденные других млекопитающих, имеют уменьшенное количество клеток-предшественников гранулоцитов и моноцитов и уменьшенный пул запасенных предшественников, что может приводить к дефекту количества нейтрофилов в условиях стресса (например, при сепсисе) (Levy, 2007). Считается, что высокая предрасположенность новорожденных детей к инфекции обусловлена функциональной незрелостью лейкоцитов и неполноценностью взаимодействий клеток в формировании иммунного ответа.

Адгезивные свойства и миграция. Эффективной защите от инфекции у новорожденных детей в неонатальный период может препятствовать задержанная миграция нейтрофилов в очаг воспаления, так как нейтрофилы новорожденных (по сравнению с нейтрофилами взрослых) имеют ослабленную способность прикрепляться к эндотелию и мигрировать в градиенте хемотаксических молекул. С количественной точки зрения нейтрофилы новорожденных демонстрируют ослабление многих функций, включая хемотаксис, роллинг, миграцию через стенки сосудов, образование псевдоподий (Henneke P., Berner R., 2006). Функциональная незрелость нейтрофилов новорожденных в неонатальном периоде проявляется в ослабленной подвижности и низкой способности к деформации.

Прикрепление нейтрофилов к поверхности эндотелия — ранний шаг в мобилизации клеток, оно опосредовано адгезионными молекулами на поверхности нейтрофила. Продемонстрирована ослабленная экспрессия L-селектина в нейтрофилах новорожденных. В покоящихся нейтрофилах здоровых детей в течение неонатального периода и через 4 нед после рождения экспрессия L-селектина значительно ниже, чем в нейтрофилах взрослых. Активированная fMLF экспрессия L-селектина также значительно ниже в нейтрофилах новорожденных (на первой неделе жизни). Предполагают, что это связано с распадом L-селектина под действием растворимых протеаз. В период новорожденности уровень растворенного в сыворотке L-селектина низкий, однако он монотонно возрастает в течение первого месяца жизни.

Что касается экспрессии интегринов, то лейкоциты новорожденных имеют ослабленную экспрессию и функцию рецептора комплемента 3-го типа ($CR3 - \alpha_M: \beta_2$), также известного как CD11b/CD18 или Mac-1, лигандом которого является фрагмент компонента комплемента iC3b и адгезивная молекула ICAM-1. Экспрессия CD11b, члена суперсемейства интегринов, была сходной у покоящихся нейтрофилов новорожденных и взрослых, тогда как в клетках новорожденных наблюдалось более слабое потенцирование экспрессии при активации по сравнению с клетками взрослых, также на уровне взрослых была экспрессия CD11b в ответ на ЛПС.

Причиной ослабленного хемотаксиса нейтрофилов у новорожденных детей при своевременных вагинальных родах считают также ослабленный ответ белка цитоскелета F-актина.

Ослабленное привлечение нейтрофилов в очаг воспаления вызвано не только пониженной экспрессией интегрин и селектина, но и предрасположенностью моноцитов и АПК новорожденных продуцировать в больших количествах цитокин, который ингибирует миграцию нейтрофилов, а именно ИЛ-6 (Angelone D.F. et al., 2006).

Бактерицидная кислороднезависимая активность. Противомикробные механизмы лейкоцитов, в том числе нейтрофилов, новорожденных детей имеют меньшую потенцию по сравнению с клетками взрослых вследствие нескольких причин:

- дефицит специфических гранул, ферментов и бактерицидных белков;
- отсутствие сформированных механизмов опосредованной рецепторами регуляции активности клеток.

Нейтрофилы пуповинной крови характеризуются более низкой дегрануляцией вследствие пониженного содержания специфических (вторичных) гранул, они содержат всего лишь около 50% от уровня в клетках взрослых таких бактерицидных белков, как лизоцим и лактоферрин, хотя количество дефенсинов в клетках новорожденных практически такое же, как в клетках взрослых (Levy O., 2007).

Ослабленная способность нейтрофилов новорожденных инактивировать грамотрицательные бактерии возникает из-за уменьшения экспрессии бактерицидного белка, увеличивающего проницаемость мембран (BPI) и общего внутриклеточного содержания белка в нейтрофилах новорожденных. BPI (55 кДа) находится в азурофильных (первичных) гранулах, связывается с высоким сродством с ЛПС бактерий и вызывает их гибель. BPI конкурирует с белком, связывающим ЛПС (*Lipopolysaccharide-Binding Protein* — LBP) за связывание эндотоксина и действует как антагонист взаимодействия LBP с эндотоксином. В месте инфицирования присутствия BPI достаточно для нейтрализации ЛПС. Общее содержание белка в нейтрофилах новорожденных на 30% меньше, чем в нейтрофилах взрослых. Концентрация BPI в плазме пуповинной крови здоровых доношенных детей примерно на 20% ниже, чем в плазме крови взрослых, но через 2–5 дней концентрация белка в крови детей становилась выше концентрации у взрослых примерно на 20% (Nurpponen I. et al., 2002). Это означает, что при стимуляции форболовым эфиром (форбол 12-миристат 13-ацетатом) культивируемых образцов крови концентрация BPI увеличивалась пропорционально количеству нейтрофилов, удельный выброс BPI в пересчете на одну клетку у доношенных детей и взрослых не различался. Определено, что выброс в среду миелопероксидазы, также содержащейся в азурофильных гранулах, был значительно выше при культивировании образцов крови новорожденных по сравнению с образцами крови взрослых, но удельный выброс сопоставим. Это означает, что для клеток новорожденных характерна уменьшенная способность запасать BPI, но не глобальное ослабление выброса содержимого азурофильных гранул.

Кислородзависимая цитотоксичность: продукция АФК и ее регуляция. По сравнению с нейтрофилами здоровых взрослых в нейтрофилах новорожденных увеличены продукция супероксида и активность гексозомонофосфатного шунта. Количество супероксид анион радикала, генерированного интактными нейтрофилами новорожденных, изолированными из пуповинной крови при

активации растворимыми стимулами было равным или увеличенным по сравнению с нейтрофилами взрослых. Это связано с особенностями организации NADPH-оксидазы. Определено повышенное содержание цитохрома b_{558} в плазматической мембране и низкий уровень цитоплазматических компонентов $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$ (Chudgar U.H. et al., 2005). Миелопероксидаза — фермент, содержащийся в азурофильных гранулах нейтрофилов, — обеспечивает образование гипохлорной кислоты, мощного бактерицидного агента. Выброс миелопероксидазы нейтрофилами новорожденных ниже, чем у взрослых, но существенно не различается у доношенных и недоношенных детей (Nurpponen I. et al., 2002).

Среди факторов, влияющих на активность NADPH оксидазы, следует особо выделить ЛПС грам-отрицательных бактерий. Он является мощным воспалительным медиатором, вызывает продукцию провоспалительных цитокинов и потенцирует функции гранулоцитов, в том числе способность генерировать АФК. Клинические проявления действия ЛПС связаны со стимуляцией выброса хемотаксических факторов или провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ) эндотелиальными клетками и с праймированием иммунных клеток, что способствует усиленному выбросу провоспалительных цитокинов и АФК. Кроме того, показано, что ЛПС углубляет окислительный стресс, подавляя экспрессию антиоксидантных генов, таких как цитохром $b561$, глутатион s -трансфераза $a4$ и протеинкиназа C -эпсилон (Yue G. et al., 2008).

ЛПС активирует продукцию АФК в высоких концентрациях (0,01–10 мкг/мл), в более низких концентрациях он модифицирует ответ клеток на последующую активацию. В этом случае для описания действия ЛПС на генерацию АФК фагоцитами необходимо обратиться к феномену праймирования (от англ. «*priming*» — подготовка, «натаскивание»). Считается, что воздействие определенных факторов переводит клетку в состояние готовности к ответу, но не к активации. Образно говоря, праймирование — это желтый свет светофора: клетка подготавливается и при действии соответствующего стимула отвечает более интенсивно по сравнению с интактной клеткой. Группа агентов, обладающих праймирующим действием, довольно обширна и включает цитокины, липидные производные, хемотаксические факторы, гормоны, факторы роста и компоненты вирусов. Механизмы праймирования разнообразны: активация тирозинового фосфорилирования, увеличение $[Ca^{2+}]_i$, активация каскада MAPK и др. Действие некоторых агентов может включать несколько механизмов.

Праймирование ЛПС и ФНО- α для усиленной оксидазной активности (в ответ на вторичный стимул) в нейтрофилах новорожденных ослаблено. Одной из причин может быть ослабление экспрессии и регуляции мCD14, связанного с мембраной адаптерного белка, существенного для сигнализации ЛПС. Обнаружено заметное отличие в количестве ЛПС, которое связывают мембраны нейтрофилов взрослых и новорожденных. Клетки новорожденных имеют пониженное количество сайтов общего и специфического связывания. Кроме того, дефект праймирования возникает из-за того, что в клетках новорожденных не сформированы механизмы трансдукции сигнала с рецептора и его внутриклеточной регуляции. Обнаружено, что у новорожденных на нейтрофил приходится примерно такое же количество TLR-4, как у взрослых, но понижено количество адаптерного белка MyD88, участвующего в передаче сигнала от рецептора к ядру (Al-Hertani W. et al., 2007). Кроме того, в нейтрофилах новорожденных ослаблено фосфорилирование p38MAPK в ответ на ЛПС, хотя у взрослых и новорожденных сравнимый уровень данного белка в клетке. Авторы предполагают, что с этим связано отсутствие в фагоцитах новорожденных дегрануляции, процесса, зависящего от активации p38MAPK. О незрелости регуляции говорит присутствие тирозиновой протеинкиназы p53/56 Lyp во фракциях мембран гранул нейтрофилов новорожденных, тогда как в нейтрофилах взрослых фермент локализован в цитозоле (Yan S.R. et al., 2004). Локализация фермента в мембранах гранул может ограничивать его мобильность, что приводит к уменьшению праймирования ЛПС нейтрофилов новорожденных. Незрелость механизма праймирования также обнаруживается при действии хемотаксического пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF). Пептид в подпороговых концентрациях способствует усилению продукции АФК при соответствующей активации. Однако по нашим данным он не проявляет своего действия в гранулоцитах здоровых новорожденных в отличие от гранулоцитов из периферической крови матери, в которых ответ значительно усиливается (рис. 17).

Экспрессия рецепторов на плазматической мембране и опосредованные ими процессы. Активность клеток иммунной системы регулируется посредством лиганд-рецепторных взаимодействий. Последовательность событий включает:

- связывание лиганда;
- трансмембранную и внутриклеточную передачу рецепторного сигнала на эффекторные молекулы;
- осуществление клеткой соответствующей функции рецепторов.

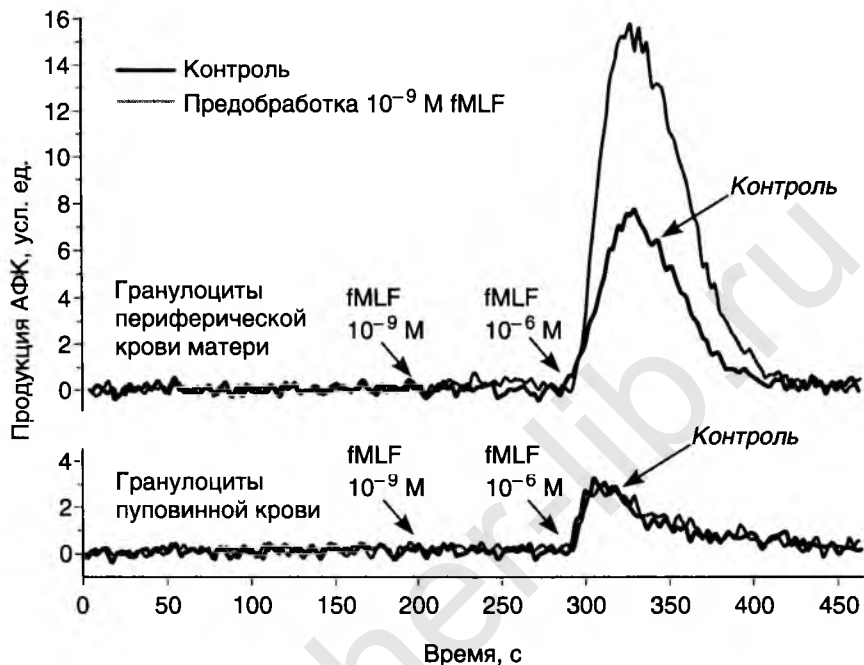


Рис. 17. Сравнение реакции гранулоцитов матери и новорожденного на праймирование.

Гранулоциты, изолированные из периферической крови матери, при предварительном воздействии 10^{-9} М fMLF (подпороговая концентрация) усиливают ответ на активацию 10^{-6} М fMLF, тогда как гранулоциты, изолированные из пуповинной крови, не реагируют на предварительную обработку

По связыванию агонистов, производимых бактериальными клетками, мембранные рецепторы нейтрофилов пуповинной крови значительно отличаются от рецепторов клеток взрослого человека. Сведения об организации сигнальных путей рецепторов в нейтрофилах новорожденных довольно ограничены. Считают, что продукция супероксиданион радикала усиливается на уровне рецептор fMLF–протеинкиназа С (Chudgar U.H. et al., 2005), что характерно также и для клеток взрослых.

Рецепторы формилированных пептидов (FPR — *Formyl-Peptide Receptor*) относятся к суперсемейству 7-доменных трансмембранных

белков, сопряженных с гетеротримерными ГТФ-связывающими белками. Биологическое назначение рецепторов — обеспечение защитных реакций организма против инфекций и возможное участие в тканеспецифической дифференцировке, так как они присутствуют на мезенхимальных стволовых клетках (Viswanathan A. et al., 2007). Их физиологическая важность в том, что при активации они инициируют адгезию и миграцию фагоцитов в очаг воспаления (хемотаксис) и цитотоксические функции клеток (дегрануляцию, продукцию АФК и цитокинов). Экспрессия FPR в клетках различных тканей (ДК, фибробласты) и в онкотрансформированных клетках (астроцитомы, глиомы с высоким метастатическим потенциалом) указывает на то, что они вовлечены в патофизиологические процессы, аутоиммунные реакции и воспаление.

Наиболее мощным стимулятором рецепторов считают fMLF — продукт деградации белков бактерий и митохондрий. Важным аспектом роли рецепторов в воспалении считают то, что помимо fMLF они связывают провоспалительные агенты — липоксин A₄, амилоидные пептиды, сывороточный амилоид А, аннексин I, катепсин G, фрагмент LL-37 кателицидина и др. Обнаружение эндогенных антагонистов и синтез пептидных ингибиторов рецепторов позволяет рассматривать FPR в качестве фармакологической мишени при воспалительных заболеваниях. Следует отметить, что упомянутые агенты имеют отношение к окислительному стрессу, некоторые из них являются ранними маркерами воспаления или сепсиса у новорожденных, например сывороточный амилоид А (Arnon S. et al., 2007).

У человека на сегодняшний день описаны три гена — fpr1, fpr11 и fpr12, которые кодируют специфические подтипы рецепторов:

- FPR с высоким сродством ($K_d < 1$ нМ);
- FPRL1R (FPR like 1 receptor) с низким сродством к fMLF ($K_d > 100$ нМ);
- FPRL2R (FPR like 2 receptor).

Экспрессия рецепторов с разным сродством к fMLF существенна — она дает возможность фагоцитам функционировать в широком диапазоне концентраций (10^{-12} – 10^{-4} М). Однако их роль в реализации разных функций в норме и при патологии остается неизученной. Считают, что высоко- и низкоаффинные рецепторы действуют через гетеротримерный G_i-белок и систему вторых посредников, включающую фосфатидилинозит и кальций. Было обнаружено, что высоко- и

низкоаффинные рецепторы fMLF нейтрофилов человека используют разные сигнальные компоненты при фосфорилировании белка цитоскелета I-пластина (Paclet M.-H. et al., 2004).

Присутствие рецепторов с высоким и низким сродством к fMLF показано на нейтрофилах новорожденных (Komatsu H. et al., 2001). Функциональная значимость подтипов рецепторов семейства FPR в нейтрофилах пуповинной крови была исследована нами (Сафронова В.Г. и соавт., 2008). Гранулоциты функционируют в градиенте хемотаксических факторов, при этом активация их функций (адгезия, хемотаксис, дегрануляция и «респираторный взрыв») происходит в значительной степени последовательно. Наиболее высок порог активации «респираторного взрыва», во время которого продуцируются АФК, токсичные как для вторгшихся микроорганизмов, так и для самого организма-хозяина. Из известных хемотаксических факторов пептид fMLF считают наиболее сильным.

Концентрационные зависимости ответов на fMLF гранулоцитов из пуповинной крови детей и гранулоцитов из периферической крови взрослых (рис. 18) представляют собой кривые с насыщением, пороговые концентрации близки и составляют менее 10^{-8} М, тогда как значения EC_{50} составляют $4,5 \times 10^{-8}$ и $2,0 \times 10^{-7}$ М соответственно. Во всем диапазоне концентраций ответы гранулоцитов пуповинной крови ниже, чем гранулоцитов взрослых. Характерно, что в диапазоне 10^{-6} – 5×10^{-5} М ответ клеток пуповинной крови менялся мало.

При оценке параметров связывания fMLF гранулоцитами пуповинной крови доношенных детей было выявлено присутствие на их мембране высоко- и низкоаффинных рецепторов fMLF, причем константы диссоциации для обоих типов рецепторов превышали почти в два раза константы, определенные для рецепторов гранулоцитов периферической крови взрослых (Komatsu H. et al., 2001). Количество высокоаффинных рецепторов у новорожденных было ниже, чем у взрослых, а низкоаффинных — выше. Предполагается, что модуляция вызванной хемоаттрактантами продукции АФК происходит на уровне рецептора.

Клетки-эффекторы естественной цитотоксической активности (NK-клетки) играют существенную роль в противовирусной и противопухоловой защите. Важной особенностью NK-клеток считают способность немедленно, без предварительной сенсibilизации

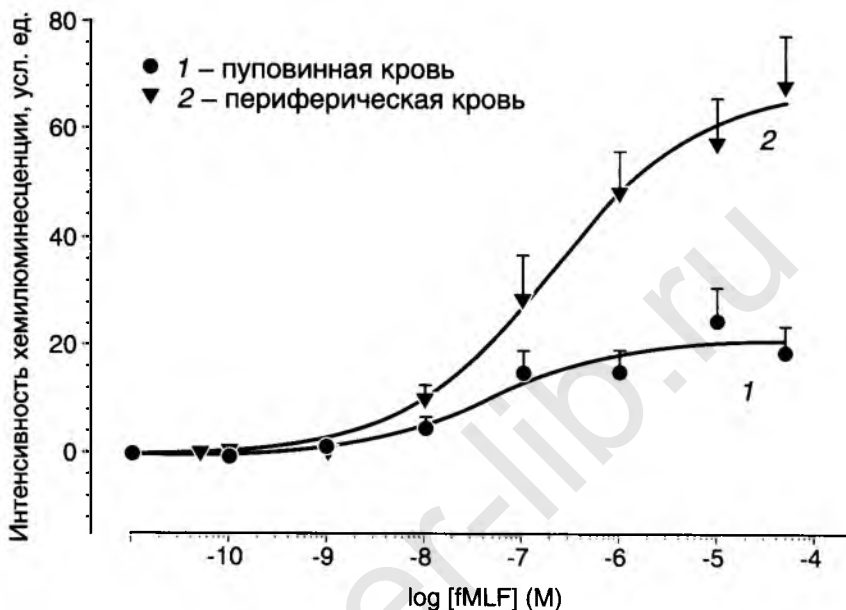


Рис. 18. Концентрационные зависимости ответов на формилпептид. Зависимость интенсивности респираторного взрыва от концентрации fMLF гранулоцитов из пуговинной крови детей с нормальным течением неонатального периода от матерей с физиологическим течением беременности (1) и гранулоцитов из периферической крови взрослого человека (2). Интенсивность продукции АФК оценена с помощью хемилюминесцентного анализа

антигеном лизировать трансформированные клетки. Реализация цитотоксического действия НК-клеток в отношении зараженных вирусом или опухолевых клеток возможна значительно раньше, чем успевают сформироваться специфические клеточные и гуморальные звенья иммунитета. Кроме того, предполагают важную роль НК-клеток в регуляции пролиферации и дифференцировки нормальных клеток в организме, т.е. в поддержании его клеточного гомеостаза.

У новорожденных определен низкий процент клеток, реагирующих с HNK-1 (Leu 7) — моноклональными антителами, распознающими наиболее зрелые НК-клетки среди мононуклеарных клеток взрослых. Не было обнаружено статистически значимых различий

с взрослыми в процентном содержании НК-клеток, реагирующих с другими мембранными маркерами, в частности с антителами, распознающими Fc-рецептор. Уровень функциональной активности НК-клеток новорожденных составляет лишь 50% уровня активности клеток взрослых людей.

НК-клетки новорожденных высокочувствительны к ИФН, они активно генерируются при инкубации с ИЛ-2. Распределение субпопуляций НК-клеток у новорожденных иное, чем у взрослых. Около 1/3 неонатальных не-Т-клеток (CD3⁻) являются CD8⁺. Этот необычный фенотип ассоциируется с функциональной активностью НК-клеток, чувствительных к ИФН- γ .

Неонатальные CD8⁺CD3⁻-клетки обладают некоторыми фенотипическими и функциональными чертами и Т-лимфоцитов, и НК-клеток. Меньшая функциональная активность НК-клеток у новорожденных по сравнению со взрослыми может быть отражением их незрелости или отсутствия условий для развития в другом клеточном окружении, которое способно генерировать цитокины, необходимые для активации НК-клеток. Фракция CD57⁺-лимфоцитов включает клетки CD3⁺ (не ограниченные по МНС цитотоксические лимфоциты) и CD3⁻ (истинные НК-клетки). Клетки CD57⁺CD8⁺ отсутствуют при рождении, у взрослых их до 29%. Предполагают, что причиной увеличения с течением времени процента CD57⁺-клеток служит индукция хронической вирусной стимуляции. Например, экспрессия CD57-молекул на поверхностной мембране лимфоцитов увеличивается после инфицирования цитомегаловирусом.

Субпопуляция НК-клеток, которые реагируют на инфицированные вирусом простого герпеса клеточные элементы, главным образом, имеет фенотип CD16⁺CD57⁺. Детерминанты, которые они распознают, являются, по-видимому, гликопротеинами, кодированными вирусом. У новорожденных CD16⁺-клетки составляют в среднем 5% мононуклеарных клеток (у взрослых — 12%). НК-клетки новорожденных менее эффективны при уничтожении классических мишеней для этих клеток, чем НК-клетки взрослых. Мононуклеарные клетки новорожденных не угнетают бляшкообразование вирусом простого герпеса *in vitro*. Однако преактивация ИЛ-2 или ИФН- α иногда повышает их активность до уровня взрослых в тесте угнетения вирусных бляшек. Мононуклеарные клетки новорожденных могут продуцировать ИФН- γ в ответ на вирус простого герпеса и в меньшем количестве — ИЛ-2. Процент CD16⁺-клеток у больных с кожными проявлениями

герпеса нормальный (6–12), но способность угнетать бляшки вируса простого герпеса снижена и повышается при выздоровлении. В течение вирусной инфекции НК-клетки активируются и пролиферируют. Перенос *in vivo* клонированных НК-клеток из расчета 3×10^5 клеток на мышь обеспечивает существенную защиту от летальной инфекции вирусом простого герпеса.

Таким образом, к факторам, увеличивающим чувствительность новорожденных к некоторым инфекциям, относят:

- дефицит функции НК-клеток;
- более низкую способность связывания этих клеток с клетками-мишенями;
- меньший уровень продукции ИФН- α и ИФН- γ .

Врожденный иммунитет включает защитные механизмы:

- первичные (комплемент, гранулоциты, моноциты/макрофаги, НК-клетки);
- вторичные (прекалликреин, коагуляция, фибринолиз, цикл арахидоновой кислоты).

Первые прямо коммитированы для элиминации патогенов, вторые принимают большее участие в воспалительном процессе. Возможность поддержания гомеостаза обеспечивается тем, что каждая система включает инертный предшественник, который наблюдает нормальный «статус» и рекрутирует другие системы защиты при активации возмущающими агентами.

Каждая система производит ряд эффекторов и медиаторов, которые защищают или атакуют хозяина в зависимости от ситуации. Множественные взаимодействия медиаторов генерируют различные эффекты: сбалансированный, повреждающий или амплифицированный ответ. Они контролируются системами, включающими специфические ингибиторы и цикл дезактивации. Неспецифическая активация защитных механизмов у новорожденных происходит, главным образом, в универсальной строме, которую составляют сосудистый эндотелий и микроциркуляция. Развивающиеся гипоксемия, ацидоз, ишемия, ионный и метаболический дисбаланс служат возмущающими стимулами для клеточных мембран. Из поврежденных клеток освобождаются ферменты, протеазы, пептиды и другие продукты, которые запускают инертные предшественники воспалительных ответов. У недоношенных новорожденных дополнительными факторами считают анатомические повреждения структур и нестабильность гомеостатического баланса. Коллаген, ЛПС и тканевые фер-

менты служат пусковыми факторами образования из прекалликреина калликреина, который освобождает кинины и плазмин. Тканевые протеазы и каллекреин запускают комплементный каскад, расщепляя C1r и C1s, а плазмин — расщепляя C1s.

Важные биологические функции защиты организма хозяина от инфекции выполняют высокополимерные белки сыворотки крови с энзиматической активностью, составляющие систему комплемента. При активации комплементного каскада регулируются воспалительный ответ, лизис бактерий, растворение иммунных комплексов и опсонизация микроорганизмов. Активация C3-компонента комплемента антителозависимым классическим путем (C1, C2 и C4) или антителонезависимым альтернативным путем (факторы В и D) вызывает последовательную активацию терминальных компонентов (C5–C9) и отложение C3 на клеточной поверхности. Происходит сборка макромолекулярного мембранного канала. В результате нарушается мембранная интеграция клетки или микроорганизма. Отложение C3b на клеточной поверхности обеспечивает опсонины для гранулоцитов и моноцитов. Активация комплемента вызывает освобождение малых пептидов C3a, C4a и C5a (8–10 кДа) с важным воспалительным и иммунорегуляторным действием. Эти анафилатоксины увеличивают сосудистую проницаемость, повышают тонус гладких мышц и обеспечивают стимулы для направленной миграции лейкоцитов.

В условиях, когда содержание трансплацентарно приобретенных IgG и белков классического пути ограничено, состояние новорожденного зависит от белков альтернативного пути как эффекторов защиты от инфекции. В пуповинной крови плодов разных сроков гестации присутствуют белки комплемента в более низких концентрациях, чем в соответствующей сыворотке крови матери или объединенной сыворотке взрослых.

Нами совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии Центра здоровья ребенка в Варшаве, руководимой К. Мадалиньски, проведено исследование динамики активности системы комплемента у ребенка на первом году жизни. Средняя величина общей гемолитической активности комплемента при классическом пути его активации (CH_{50}) в сыворотке крови новорожденных была низкой (28 ± 8 ед/мл), у детей в возрасте 2–3 мес повышалась почти в 2 раза (49 ± 8 ед/мл) и сохранялась на этом уровне до 1 года жизни, составляя 83% от уровня у здоровых взрослых доноров. Активность комплемента при альтернативном пути его активации (AP_{50}) также возрастала в течение первого

года жизни ребенка и к году составляла 66% от уровня взрослых. По уровню активности компоненты комплемента у детей первого года жизни можно разделить на 2 группы:

- фракции, уровень которых с момента рождения равен уровню у взрослых (C1-INH, C5);
- фракции, концентрация которых у новорожденных составляет около 40–50% от содержания у взрослых и постепенно увеличивается в течение первого года жизни (C1g, C4, C3, C9, фактор В).

Более низкие концентрации фактора В у новорожденных могут ограничивать опсонизирующую активность и тем самым увеличивать чувствительность к системной инфекции. У недоношенных новорожденных значительно снижена активность комплемента по альтернативному пути. У доношенных новорожденных нарушена способность к опсонизации в основном грамотрицательных бактерий, тогда как у недоношенных в связи с выраженной недостаточностью компонентов комплемента нарушена опсонизация и грамположительных микроорганизмов.

Первичный источник белков комплемента — печень. Клетки моноцитарно-макрофагального ряда представляют экстрагепатический источник продукции комплемента и важны в локальной продукции компонентов комплемента, играющих критическую роль в инициации и поддержании воспалительного ответа до изменений сосудистой проницаемости, которая позволяет увеличить приток растворимых и клеточных элементов из крови. Скорости конститутивного синтеза C3 и факторов В, С2, лизоцима и общего белка клетками пуповинной крови и моноцитами взрослых сравнимы, а ответ на ЛПС отличается. Моноциты новорожденных не отвечают на ЛПС увеличением синтеза C3 и фактора В, тогда как у взрослых их продукция увеличивается (соответственно в 15 и 3 раза).

Преждевременно рожденные дети высокочувствительны к тяжелым бактериальным инфекциям. Это частично обусловлено незрелостью их врожденной иммунной системы, характеризующейся сниженной активностью нейтрофилов и моноцитов, также как сниженной концентрацией факторов комплемента. Однако могут быть важны и дополнительные механизмы естественной резистентности, такие как TLR. E. Forster-Waldl и соавт. (2005) исследовали экспрессию TLR-4 на моноцитах и секрецию цитокинов, индуцированную ЛПС, клетками новорожденных очень малого веса и рожденных после 30-й недели гестации, а также взрослых лиц. У маловесных новорожденных экспрессия TLR-4 поверхностного белка, обнаруженного про-

точной цитометрией, и TLR4-специфической мРНК, определенной обратной транскрипцией с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), были значительно ниже в сравнении с доношенными детьми или взрослыми людьми. Обнаружена также значительно сниженная ЛПС-стимулированная *in vitro* секреция ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α . Сделано заключение, что у маловесных новорожденных пониженная экспрессия TLR-4 вносит вклад в чувствительность их к инфекции грам-отрицательными бактериями, что обусловлено отсутствием цитокинов, важных для развития первичного иммунного ответа.

5.2.2. Состояние Т-клеточного компонента иммунной системы у новорожденных

Клеточный иммунитет в основном формируется до рождения, о чем свидетельствует способность новорожденного ребенка отторгать чужеродный трансплантат. Количество Т-лимфоцитов в пуповинной крови может быть выше такового у взрослых людей, хотя процентное содержание этих клеток у новорожденных ниже. Нивелирование разницы происходит за счет физиологического лимфоцитоза, наблюдаемого у новорожденных.

Процессы развития Т-клеток в основном завершаются задолго до рождения и не представляют серьезных ограничений в узнавании антигенов в неонатальном периоде. Т-клеточное клональное разнообразие к моменту рождения уже сформировано, но взрослый репертуар клеток памяти устанавливается только в результате антигенной стимуляции. Т-клеточный репертуар новорожденных формируется через рекомбинацию V-, D- и g- сегментов варибельной области α - и β -цепей Т-клеточного рецептора. Процесс происходит в тимусе и связан с развитием толерантности или с элиминацией самореактивных (реагирующих на собственные антигены) клеток. Необходимая для экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) инициация генной реаранжировки и определение индивидуального репертуара в отношении собственных антигенов I и II классов МНС происходят в процессе внутритимусной дифференцировки. В тимусе осуществляется и функциональная диверсификация тимоцитов на субпопуляции.

Самая ранняя лимфоидная клетка в коре тимуса лишена маркеров зрелых Т-лимфоцитов (за исключением CD2-рецептора к эритроцитам барана), но экспрессирует CD71 и CD38 антигены (стадия I). Дальнейшая

дифференцировка тимоцитов связана с потерей CD71 (рецептора для трансферрина) и приобретением специфических антигенов CD1a, конкурентной коэкспрессией CD4- и CD8-антигенов (стадия II). В процессе созревания тимоциты теряют CD1a, экспрессируют CD3 и разделяются на субпопуляции CD4⁺CD8⁻ и CD4⁻CD8⁺ (стадия III). Иммунная компетентность не развивается полностью, пока тимоциты не покинут тимус. Покоящиеся Т-клетки у взрослых не экспрессируют больше CD38-антиген.

В пуповинной крови здоровых доношенных новорожденных детей преобладают зрелые Т-лимфоциты, экспрессирующие CD3 и CD2-антигены. Наличие этих антигенов важно для клетки, так как CD3 и CD2 — рецепторы для активационных сигналов. Содержание этих клеток, по данным разных авторов, составляет от 46 до 88%. У недоношенных детей в пуповинной крови отмечают признаки незрелости иммунокомпетентной системы — уменьшение числа зрелых Т-лимфоцитов при сохранении соотношения субпопуляций CD4⁺/CD8⁺ равным 2.

У новорожденных детей абсолютное содержание Т-лимфоцитов выше, чем у взрослых людей, но процент Т-лимфоцитов ниже. Однако уже к 5–7-му дню жизни процент CD3⁺-клеток в венозной крови новорожденных увеличивается.

Циркулирующие лимфоциты новорожденных включают клетки с фенотипом CD3-CD4-CD8⁺. Существенных различий в проценте CD4⁺- и CD8⁺-клеток у взрослых и у новорожденных нет, но их абсолютное количество значительно различается (у новорожденных этих клеток в единице объема крови больше).

В пуповинной крови новорожденных в большем количестве, чем в периферической крови взрослых, обнаруживают менее зрелые клетки, присутствующие в тимусе взрослых, с такими маркерами, как CD38, хотя эти маркеры характерны и для активированных клеток. Совместная экспрессия CD4 и CD8 также относится к признакам активации лимфоцитов. Эти клетки могут одновременно экспрессировать и другие маркеры (CD71, CD38), а также рецептор для ИЛ-2 (CD25).

Большее содержание в крови новорожденных лимфоцитов с маркерами, характерными для незрелых клеток, возможно, связано с интенсивным притоком на периферию посттимических предшественников из первичных лимфоидных органов. У новорожденных большая фракция циркулирующих Т-лимфоцитов покидает тимус незрелыми и завершает созревание на периферии в отсутствие тимусного микроокружения.

Проведенные А.В. Макогон и соавт. (2005) исследования подтверждают, что иммунная система плода и новорожденного ребенка на начальных этапах онтогенетического развития существенно отличается от иммунитета взрослого человека:

- количественными диспропорциями (по сравнению с донорами у новорожденных достоверно снижено относительное содержание CD3⁺- и CD8⁺Т-лимфоцитов);
- функциональной незрелостью иммунокомпетентных клеток.

Полученные данные о физиологической незрелости иммунной системы здоровых новорожденных согласуются с результатами других авторов.

Сравнительные фенотипические исследования показали, что среди лимфоцитов пуповинной крови новорожденных (в отличие от периферической крови взрослых доноров) преобладают «наивные» CD4⁺CD45RO⁻CD45RA⁺CD29^{тук.лме}Т-клетки и практически полностью отсутствуют CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻CD29^{яркме}Т-клетки памяти. Свидетельством незрелости клеток новорожденных считают также более низкий уровень экспрессии на них рецепторов к ИЛ-2 (CD25).

При острой и хронической гипоксии у новорожденных детей в пуповинной крови обнаружено до 12% лимфоцитов с маркерами тимусных клеток, что свидетельствует о нарушении дифференцировки Т-клеток. Однако положительная динамика состава Т-лимфоцитов периферической крови детей 2–4-го дня жизни свидетельствует о сохранении компенсаторных способностей Т-лимфоцитарной системы.

Антигены II класса МНС играют важную роль в индукции иммунного ответа. Они не экспрессируются на покоящихся Т-клетках, но при активации экспрессия этих антигенов у взрослых людей индуцируется на большинстве зрелых Т-лимфоцитов. Т-клетки из пуповинной крови, однако, остаются HLA-DR-негативными даже при активной пролиферации. Процент Т-клеток, экспрессирующих такие активационные маркеры, как CD25 и HLA-DR-антигены, при рождении относительно невысок (2 и 8 соответственно) и с возрастом прогрессивно увеличивается. Присутствие ограниченного количества активированных Т-клеток в пуповинной крови может отражать антигенную экспозицию *in utero* или эндогенный клеточный ответ на собственные антигены.

Большая доля (около 90%) CD4⁺Т-клеток в пуповинной крови экспрессируют CD45R (маркер «наивных», нестимулированных Т-клеток) и L-селектин (молекула адгезии, LECAM-1). Неонатальные

Т-лимфоциты имеют низкую хелперную способность. Это может зависеть от двух причин: либо $CD4^+$ -клеток с хелперной функцией меньше, либо у новорожденных угнетена хелперная активность Т-лимфоцитов. $CD4^+CD45RA^+$ Т-клетки пуповинной крови, активированные фитогемагглютинином или культивированные с ИЛ-2, приобретают способность стимулировать продукцию иммуноглобулина В-клетками. Этот процесс соответствует конверсии Т-клеток к $CD4^+CD45RA^-$ фенотипу (клетки памяти) и экспрессии CD25 (α -цепь рецептора для ИЛ-2). Индуцированную митогеном потерю L-селектина также считают признаком активации.

В последнее время пуповинную кровь считают альтернативой костному мозгу при использовании для восстановления гемопоэза в связи с низким риском острой или хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) у реципиента. Фенотипически $CD3^+$ -клетки пуповинной крови, главным образом, «наивные» ($CD45RA^+$) и представляют промежуточную популяцию между тимоцитами и взрослыми Т-клетками. Показано, что эти клетки ($CD4^+CD45RA^+$) способны начать пролиферацию в результате ранней продукции ИЛ-2 при стимуляции через TCR, но в противоположность взрослым клеткам большая доля их подвергается апоптозу.

Т-лимфоциты новорожденных:

- пролиферируют в ответ на поликлональные Т-клеточные активаторы и чужеродные антигены;
- оказывают помощь в продукции:
 - иммуноглобулинов В-клетками в ответ на В-клеточные активаторы;
 - антител к специфическим антигенам;
- угнетают В- и Т-клеточные механизмы и освобождают супрессорные молекулы;
- обеспечивают цитотоксический ответ на специфические антигены.

Исследовали цитокиновый профиль лимфоцитов пуповинной крови и венозной крови взрослых людей с помощью проточной цитометрии. Клетки стимулировали форбол-12-миристан-13-ацетатом и иономицином в присутствии монензина. После 4–24 ч инкубации измеряли продукцию ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН- γ и ФНО- α с помощью трехцветной проточной цитометрии. Показано, что лимфоциты пуповинной крови продуцируют меньше ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН- γ и ФНО- α , чем лимфоциты взрослых. Большинство клеток пуповинной крови, про-

дуцирующих цитокины, были $CD4^+CD45RA^+$, тогда как продуцирующие цитокины клетки взрослых были двух типов — $CD4^+CD45RO^+$ и $CD8^+CD45RO^+$.

Одной из причин иммунной недостаточности у новорожденных может быть низкая способность их лимфоцитов синтезировать ИФН- γ , около 20% от уровня синтеза у взрослых. Кроме антивирусного и иммунорегуляторного, ИФН- γ оказывает активирующее воздействие на макрофаги, увеличивая их цитотоксичность, внутриклеточное уничтожение микроорганизмов и окислительный метаболизм, а также экспрессию антигенов II класса МНС в моноцитах человека. Поэтому дефицит продукции ИФН- γ может иметь серьезные последствия для иммунитета. Возможно, этот дефект вносит вклад в необычно высокую чувствительность новорожденных к инфекции.

Е. Protonotariou и соавт. (2003) определяли постнатальные изменения в сывороточной концентрации цитокинов ИФН- γ (Th-1) и ИЛ-4 (Th-2). Авторы показали, что концентрация ИФН- γ в пуповинной крови была существенно ниже, чем у здоровых взрослых (контрольная группа), и значительно увеличивалась к 5-му дню жизни. В сыворотке крови матерей и пуповинной крови концентрация ИФН- γ зависела от способа родоразрешения. Уровень ИЛ-4 в пуповинной и венозной крови новорожденных 1-го и 5-го дней жизни был значительно выше, чем в крови матери и доноров. Авторы сделали вывод о более раннем развитии системы продукции ИЛ-4 по сравнению с ИФН- γ в онтогенезе иммунной системы.

Чтобы исследовать функциональные свойства клеток пуповинной крови, эффект ИЛ-18 на продукцию ИФН- γ Т-клетками или НК-клетками, проводилось сравнение между мононуклеарными клетками пуповинной крови и периферической крови взрослых. Т-клетки, субпопуляцию $CD45RA^+$ Т-клеток и НК-клетки выделяли, используя флуоресцентно меченые антитела и магнитные бусы или клеточный сортер. Измеряли концентрацию ИФН- γ после стимуляции с или без ИЛ-18 в присутствии ИЛ-12 в течение 48 ч (НК-клетки) или 72 ч (Т-клетки или $CD45RA^+$ Т-клетки). Хотя ИЛ-18 индуцировал значительную продукцию ИФН- γ и пуповинными, и Т-клетками периферической крови взрослых в присутствии ИЛ-12, уровни ИФН- γ из культур пуповинной крови Т-клеток были ниже, чем таковые из Т-клеток взрослых. Однако $CD45RA^+$ Т-клетки новорожденных и взрослых продуцировали сходные уровни ИФН- γ после стимуляции ИЛ-18 и ИЛ-12. С другой стороны, пуповинные НК-клетки проявляли

более высокую продукцию ИФН- γ и экспрессию CD69, чем НК-клетки взрослых после стимуляции ИЛ-18+ИЛ-12. Цитолитическая активность пуповинных НК-клеток увеличивалась до уровня, сравнимого с уровнями взрослых НК-клеток после такой же стимуляции. Предполагают, что низкий ответ Т-клеток пуповины на ИЛ-18 обусловлен более высокой пропорцией наивных CD45RA⁺Т-клеток в пуповинной крови. Они могут быть одним из факторов, ответственных за неонатальную незрелость иммунной системы, так же как за низкую частоту болезни, обусловленной реакцией трансплантат против хозяина, у пациентов, получающих трансплантацию стволовых клеток из пуповинной крови. С другой стороны, высокий ответ НК-клеток пуповинной крови на ИЛ-18 может вносить вклад в защиту хозяина в течение неонатального периода и противоопухолевые эффекты при трансплантации стволовых клеток из пуповинной крови.

Накопление мРНК ИФН- γ и синтез самого белка в стимулированных Т-клетках из пуповинной крови значительно ниже, чем в Т-клетках взрослых. Получены данные, позволяющие предположить, что экспрессия ИФН- γ в Т-клетках из крови пуповины угнетается на уровне транскрипции.

В последнее время большое внимание уделяют изучению CD4⁺CD25⁻-регуляторных (супрессорных) Т-клеток, играющих существенную роль не только в нормальной регуляции иммунного ответа, но и в предотвращении аутоиммунной патологии (Ярилин А.А., Донецкова А.Д., 2005). Супрессорную активность этих клеток связывают с наличием локализуемого внутриклеточно транскрипционного фактора Foxp3, по которому их можно дифференцировать от активированных CD4⁺-клеток. Развитие и созревание Т-регуляторных клеток (Tr) происходит в тимусе. Показана способность CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток из тимуса человека и пуповинной крови угнетать антигенспецифический Т-клеточный ответ. Tr-клетки из тимуса не угнетали пролиферацию, но угнетали продукцию цитокинов, тогда как Tr из пуповинной крови (а также из периферической крови более старших детей) были способны угнетать и пролиферацию клеток, и продукцию цитокинов. Сделано заключение о способности CD25⁺-регуляторных Т-клеток проходить дальнейшее созревание на периферии после выхода из тимуса и приобретать более широкую супрессивную способность.

К проявлениям функциональной незрелости лимфоцитов в пуповинной крови относят:

- более низкое содержание цитокинпродуцирующих клеток (CD4⁺- и CD8⁺Т-лимфоцитов, НК-клеток);
- отсутствие в сыворотке ростовых факторов, необходимых для усиления митогенной реактивности Т-клеток;
- низкий уровень естественной цитотоксической активности лимфоцитов;
- неэффективное межклеточное взаимодействие, обусловленное низкой экспрессией HLA-DR и CD40 молекул на АПК и В-лимфоцитах соответственно.

G. Hodge и соавт. (2004) установили «нормальные» ранги активационных маркеров каждой лейкоцитарной популяции для новорожденных 1–7 и 7–14 дней жизни, менее 35 нед и 35–40 нед гестации. Выявлено значительное увеличение процента Т-клеток, экспрессирующих CD25, в периферической крови детей 14 дней жизни. Экспрессия HLA-DR на Т-клетках, CD25 и CD69 на моноцитах и HLA-DR — на НК-клетках также увеличивалась значительно в периферической крови детей 14 дней жизни и могла отражать созревание этих функциональных поверхностных молекул. Увеличение CD69 на НК-клетках было наиболее чувствительным маркером неонатального сепсиса (позитивен у 13 из 16 пациентов). Экспрессия CD69 и CD25 увеличена значительно на Т-клетках у 11/17 и 10/17 пациентов соответственно. Комбинация CD45RA/CD45RO и CD45RO идентифицирована у 11 из 16 инфицированных пациентов. Измерение CD69 экспрессии на НК-клетках и CD45RA, CD45RO, CD25 и CD69 экспрессии на Т-клетках показало значительное увеличение по меньшей мере 2-х маркеров активации у инфицированных пациентов. Сделано заключение, что экспрессия CD69 на НК-клетках — чувствительный маркер неонатальной инфекции. Комбинацию его с экспрессией CD45RA, CD45RO, CD25 и CD69 на Т-клетках периферической крови считают наиболее чувствительным и специфическим тестом неонатальной инфекции.

5.2.3. Состояние В-клеточного звена иммунитета у новорожденных

Содержание В-клеток (CD19⁺, CD20⁺) у новорожденного выше, чем у взрослого, особенно абсолютное ($0,8 \times 10^9/\text{л}$ и $0,25 \times 10^9/\text{л}$ соответственно). Доля В-клеток, экспрессирующих CD5-антиген — маркер рано отвечающих клеток, в основном на полисахариды, синтезирующих

преимущественно IgM класс антител, — в пуповинной крови больше (72% CD20⁺-клеток), а В-клеток, связывающих Leu-8 (L-селектин⁺), меньше, чем у взрослого (57% CD20⁺-клеток), что свидетельствует о большей доле «наивных», не встречавшихся с антигеном клеток в крови новорожденных. С возрастом происходит уменьшение экспрессии CD5 и увеличение экспрессии L-селектина на В-клетках. Эти маркеры важны для характеристики созревания циркулирующих В-лимфоцитов человека. Около 50% В-клеток пуповинной крови экспрессируют еще один активационный маркер — CDw78.

В-клетки новорожденного (даже недоношенного) уже могут реагировать на обширный ранг специфичностей. Это — следствие генетической реаранжировки, происходящей задолго до рождения. Последовательные события происходят, по меньшей мере, на 3-х хромосомах. Реаранжировка VD-генов на хромосоме 14 предшествует началу последовательной и параллельной селекции генов константной области иммуноглобулиновой молекулы. В-клеточная функция новорожденных преимущественно развита и заключается в продукции IgM в течение неонатального периода. Уровни IgG в сыворотке у доношенных детей приближаются к таковым у взрослых. Это материнские IgG, которые обеспечивают новорожденным хорошую защиту от многих инфекций. Но на таком фоне трудно определить вклад IgG самого новорожденного.

В ответ на различные антигены у новорожденных образуются антитела с сильным доминированием IgM. Выявлена замедленная способность к переключению с синтеза IgM на продукцию IgG. Отмечают неспособность новорожденных отвечать на определенные антигены, главным образом полисахаридной группы, дифтерийный токсин, полиомиелитную вакцину. Слабый ответ новорожденных на полисахаридные антигены может быть связан с замедленным приобретением способности продуцировать IgG₂, который преобладает в продукции антител в ответ на углеводные антигены. В-лимфоциты новорожденных с фенотипом CD5⁺ способны синтезировать IgG₁ и IgG₃, но не синтезируют антитела IgG₂ и IgG₄ изотипов, к которым принадлежат антитела к капсулярным полисахаридам бактерий.

Механизм дефицитной В-клеточной дифференцировки может действовать на разных стадиях — ранней В-клеточной активации, клональной экспансии активированных В-клеток или конечной дифференцировки В-клеток. Пролиферация В-клеток новорожденных на митогены *in vitro* мало отличается от уровня пролифера-

ции В-клеток взрослых. Ответ антителами ограничивается главным образом продукцией IgM. Прямой В-клеточный активатор — живые вирусы Эпштейна—Барр индуцируют высокий уровень продукции IgM В-клетками пуповинной крови. Убитые *St. aureus* Cowan тип I (Т-независимый митоген) тоже могут индуцировать продукцию этими клетками IgM и IgA, но уровень иммуноглобулинов при этом ниже, чем при стимуляции данным митогеном В-клеток взрослых.

Стимуляция Т-зависимым В-клеточным митогеном лаконоса вызывает сильный пролиферативный ответ мононуклеарных клеток пуповинной крови, но минимальную продукцию иммуноглобулинов. Добавление Т-клеток взрослых существенно увеличивает индуцированную митогеном лаконоса продукцию IgM клетками новорожденных, но IgG- и IgA-ответы остаются низкими. По-видимому, дефицит хелперной функции Т-клеток и незрелость В-клеточной функции ограничивают IgG- и IgA-ответы плазматических клеток новорожденных.

Однако неонатальные В-клетки с фенотипом «наивных» (IgD⁺) способны генерировать не только IgM, но и IgG- и IgA-продуцирующие клетки в присутствии CD45RO⁺CD4⁺Т-клеток памяти, экспрессирующих L-селектин (CD62L) в культурах, стимулированных митогеном лаконоса. Используя эту систему, выделяли из крови новорожденных детей и взрослых доноров «наивные» В-клетки на основе IgD-позитивности. Выделенные В-клетки культивировали с CD45RO⁺CD4⁺CD62L⁺Т-клетками взрослых. Показаны различия в профилях подклассов IgG и IgA, продуцируемых «наивными» В-клетками новорожденных детей и взрослых доноров. В-клетки новорожденных продуцировали преимущественно IgG₁ и IgG₃, а IgG₂ и IgG₄ отсутствовали. «Наивные» В-клетки взрослых также секретировали главным образом IgG₁ и IgG₃, хотя были обнаружены и очень низкие уровни IgG₂ и IgG₄, тогда как IgD⁺ В-клетки взрослых секретировали все подклассы IgG. В-клетки новорожденных продуцировали исключительно IgA₁, а клетки взрослых — оба изотипа. Предполагают, что дальнейшее переключение «наивных» В-клеток к синтезу IgG₂, IgG₄ и IgA₂ могут контролироваться их собственным возрастзависимым процессом созревания.

В генерации специфического антителообразования Т-клетки кооперируются с В-клетками путем прямого взаимодействия, которое ограничено антигенами II класса и специфическим антигеном, а также с помощью лимфокинных сигналов, влияющих на В-клеточную активацию, пролиферацию и дифференцировку. К последним относят

такие Т-клеточные факторы, как В-клеточный ростовой и стимулирующий дифференцировку В-клеток, а также изотиппереключающий фактор. В раннем неонатальном периоде для функции В-клеток характерны следующие черты:

- полисахаридные антигены не индуцируют синтез иммуноглобулинов в нормальных количествах;
- ответ на белковые антигены ограничен IgM-изотипом;
- относительно медленная прогрессия от IgM к продукции IgG;
- IgA-ответы неполноценные.

Отставание в антителообразовании не обусловлено отсутствием В-клеточных предшественников — у новорожденных количество циркулирующих В-клеток, несущих поверхностные IgM, IgG и IgA, нормально. При стимуляции В-лимфоцитов новорожденных митогенами *in vitro* наблюдают пролиферативный ответ, сходный по уровню с ответом клеток взрослых, но при дальнейшей дифференцировке В-клетки новорожденных продуцируют только IgM при почти полном отсутствии синтеза иммуноглобулинов других классов.

Существует несоответствие между уровнем развития способности лимфоцитов реагировать на антиген и способностью эффективно кооперироваться в генерации нормальных ответов на антиген продукцией антител. HLA-DR экспрессируются и на В-, и на пре-В-клетках. Эти гликопротеины — генетически полиморфные распознающие молекулы, которые облегчают взаимодействие Т- и В-лимфоцитов и последующую В-клеточную активацию. При В-клеточной дифференцировке экспрессируются рецепторы для С3b- и С3d-компонентов комплемента. Активированные антигеном или митогеном В-клетки увеличиваются, пролиферируют и экспрессируют рецепторы для растворимых ростовых и дифференцировочных факторов, вырабатываемых Т-клетками. Как только в результате пролиферации и конечной дифференцировки плазматические клетки становятся зрелыми, экспрессия поверхностных иммуноглобулинов, HLA-DR и рецепторов для комплемента уменьшается, поскольку начинаются синтез и секреция иммуноглобулинов с высокой скоростью (более 10^3 молекул в секунду).

Субпопуляции активированных антигеном В-клеточных клонов не до конца подвергаются клеточной дифференцировке, превращаясь в клетки памяти. Для В-клеток памяти характерны длительный период жизни и высокий антительный ответ на вторичную экспозицию с данным антигеном. У новорожденных популяция клеток памяти

малочисленна, так как при нормальной беременности не происходит контакта с большим числом антигенов.

Тем не менее, иммунная система плода перед рождением уже достаточно зрелая, на что указывает способность реагировать на врожденную инфекцию. В организме инфицированного плода вырабатываются специфические антитела к инвазивным микроорганизмам, преимущественно IgM-изотипа. Во время иммунного ответа происходит медленное переключение на продукцию IgG-антител при воздействии антигенов в постнатальном периоде. Конгенитальная инфекция может также индуцировать увеличение продукции специфических IgA клетками плода. Важна роль сигналов, обусловленных связыванием антигенов поверхностными иммуноглобулиновыми рецепторами и другими рецепторами растворимых белковых медиаторов, продуцируемых Т-клетками.

Антитела IgG класса у новорожденного способны активировать связывание комплемента по классическому пути. IgM синтезируются на ранних стадиях иммунного ответа, эффективно агглютинируют антигены, эффективно запускают связывание комплемента по классическому пути, но их мало, так как материнские антитела этого класса не могут проникать через плаценту из-за высокой молекулярной массы.

IgE в пуповинной крови отсутствуют или присутствуют в малом количестве. При обнаружении в крови новорожденного IgE в концентрации выше 0,5 МЕ/мл следует ожидать раннего начала atopической болезни — генетически детерминированной склонности к аллергическим реакциям. Семейный анамнез и базальный уровень IgE в сыворотке — критерии включения ребенка в группу риска раннего начала atopической болезни, так как развитие IgE находится под генетическим контролем (84% случаев atopических болезней наследственные).

Инфекция у новорожденных остается серьезной проблемой, так как быстро поставить диагноз трудно и лечение не всегда эффективно. Высокая чувствительность новорожденных к инфекции обусловлена, главным образом, дефектами защиты с помощью антигенспецифического и неспецифического компонентов иммунной системы. Наиболее важным считают дефицит антител. Уровень антител IgG, приобретенных от матери через плаценту, низок. Слабую защиту новорожденного от инфекции объясняют:

- дефицитом выработки антител на ЛПС и стрептококки группы В;
- замедленным переключением синтеза с IgM на другие изотипы иммуноглобулинов;

- отсутствием IgA и IgM, которые не проходят через плаценту;
- дефицитом опсонизации для эффективного фагоцитоза и разрушения микроорганизмов.

В последнее время все чаще предпринимают попытки коррекции этого возрастного иммунодефицита с помощью γ -глобулина иммунной сыворотки или иммуноглобулинов нормальной сыворотки человека как с лечебной, так и с профилактической целью.

В раннем периоде постнатальной адаптации здоровых доношенных детей отмечают увеличение сывороточного уровня провоспалительных цитокинов и изменение концентрации белков острой фазы воспаления, не сопровождающееся развитием клинической картины системного воспаления, инфекционного токсикоза и полиорганной недостаточности. Это объясняют тем, что иммунный гомеостаз в организме новорожденного поддерживает целый комплекс иммунных механизмов, важнейшими из которых считают активацию, пролиферацию и дифференцировку клеток-продуцентов провоспалительных цитокинов, а также увеличение концентраций противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, баланс которых обуславливает клиническое состояние ребенка.

В случае развития осложнений неонатального периода нарушение этого баланса может приводить к клиническому проявлению заболевания. Авторы установили, что у детей с клиническими признаками внутриутробной инфекции в первые сутки жизни наиболее чувствительные и специфичные параметры — нейтрофильный индекс, сывороточные уровни гаптоглобина, $\alpha 1$ -кислого гликопротеина, С-реактивного белка, преальбумина и ИЛ-8. При этом низкие концентрации ИЛ-6, преальбумина, С-реактивного белка, $\alpha 1$ -кислого гликопротеина и малое количество эозинофилов у этих детей носят неблагоприятный прогностический характер.

Снижение относительного содержания общей популяции $CD3^+T$ -лимфоцитов в сочетании с повышенным количеством $CD19^+B$ -клеток считают свидетельством незрелости иммунной системы новорожденных. В раннем неонатальном периоде сохраняется функциональная незрелость лимфоцитов, проявляющаяся низким уровнем цитокин-продуцирующих клеток, а также неэффективное межклеточное взаимодействие, обусловленное низкой экспрессией HLA-DR и CD-40 молекул на АПК и В-лимфоцитах соответственно. Вследствие этого происходит несовершенное представление антигенов Т-лимфоцитам и снижение способности В-лимфоцитов новорожденных к изотипиче-

скому переключению классов иммуноглобулинов, а Т-лимфоцитов — к дифференцировке в Т-хелперы 1-го типа.

Совокупность представленных данных позволяет сделать вывод, что в периферической крови плода к моменту рождения присутствуют практически все субпопуляции зрелых иммунокомпетентных клеток, способных обеспечить иммунный ответ новорожденного на большой спектр антигенов. В то же время реакция этих клеток своеобразна, что, очевидно, отражает особенности иммунной системы плода.

5.3. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Нами совместно с сотрудниками отделения физиологии новорожденных ФГУ «НЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрав-соцразвития РФ проведено сравнительное клинко-иммунологическое исследование способности клеток пуповинной крови новорожденных генерировать АФК. С помощью метода хемилюминесцентного анализа, показано, что спонтанная продукция АФК лейкоцитами здоровых новорожденных у матерей с физиологическим течением беременности и детей с нормальным течением неонатального периода от матерей с осложненным течением беременности была практически одинаковой. В пуповинной крови новорожденных с риском развития инфекционных заболеваний и с клиническим проявлением бактериальной инфекции спонтанная продукция АФК была значительно снижена, но проявляла тенденцию к нормализации при антибактериальной терапии. Амплитуда ответа клеток крови на опсонизированный зимозан, который характеризует их фагоцитарную активность, была значительно ниже в группах детей, рожденных у матерей с осложненным течением беременности, по сравнению с данным параметром в группах, характеризующихся нормальным течением беременности у матери и раннего неонатального периода у ребенка.

Латентная и длительная активация воспалительного процесса может не проявляться легко обнаруживаемыми клиническими признаками, но влиять на артериальное давление или свертывающую систему крови. Следствием продолжительного воздействия радикалов кислорода и протеаз считают повреждение многих органов,

особенно легких, сетчатки, центральной нервной системы. В плазме и бронхиальных секретах при оксидативном стрессе у новорожденных обнаружены АФК, протеазы, лейкотриены и другие продукты. Острая и сильная активация некоторых защитных процессов в неонатальном периоде может приводить к развитию шока, который считают следствием различных нарушений. Присутствие в крови и тканях большого количества биологических метаболитов, протеаз, продуктов разрушения в крови и тканях нарушает гомеостаз. Более ограниченная острая активация приводит к шоку легких вследствие повреждения терминальной эндотелий-альвеолярной единицы, вызываемого, главным образом, массивной внутрисосудистой агрегацией гранулоцитов. Это может быть связано с аутоокислением компонентов гранулоцитарной мембраны избытком свободных радикалов при стрессе у новорожденных.

Изменение метаболизма нейтрофилов у новорожденных, прошедших все стадии родов, характеризуется:

- уменьшением потребления кислорода;
- дефицитом активности гексозомонофосфатного шунта;
- снижением фагоцитарной активности.

При кесаревом сечении эти изменения отсутствуют. По-видимому, роды действуют как первичный стимул (изменение концентраций эпинефрина, глюкокортикоидов, жирных кислот и производных арахидоновой кислоты), а затем следует гипореактивность по схеме функциональной дезактивации. Сам переход к богатому кислородом внematочному окружению и к легочному дыханию может активировать окислительный метаболизм фагоцитов, так как в них увеличивается синтез антиоксидантных ферментов. При рождении естественным путем сохраняется интегральность фагоцитарных ответов. Аномалии беременности и родов, влияя на многие органы и функции, изменяют течение воспалительного процесса.

Неонатальное инфицирование может модулировать защитные механизмы, снижая функции и метаболические ответы циркулирующих нейтрофилов из-за истощения или повреждения рекрутирования. При локализованных инфекциях встречается преходящее увеличение индекса хемотаксиса, а при сепсисе — его полное угнетение. После выздоровления эти показатели нормализуются. Взаимодействие нейтрофилов с эндотоксином вызывает гиперадгезию, высвобождение ферментов и окислительный взрыв в нейтрофилах с последующей дезактивацией. Кроме инфекций и некоторые другие болезни новорожденных (асфиксия, болезнь гиалиновых

мембран, пороки сердца) часто сопровождаются изменением ионных механизмов.

NADPH-оксидазу фагоцитов активируют фрагменты компонента и свертывающей системы, производные арахидоновой кислоты и жирных кислот. Активация сопровождается открытием ионных каналов плазматической и фагосомальной мембран и увеличением проницаемости для протона и ионов кальция, калия, хлора, что приводит к изменению pH и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Уменьшенное парциальное давление кислорода при гипоксемии и ишемии нарушает баланс компонентов электронно-транспортных цепей. Диссоциировавший из промежуточных продуктов коэнзим Q реагирует со свободным кислородом. Свободный кислород проникает внутрь митохондриальной мембраны благодаря высокой растворимости в неполярных липидных структурах. Запускается цепь генерации свободных радикалов. Следующая за этим активация воспалительных клеток приводит к продолжительному синтезу простаглицлина, тромбксана и лейкотриена, оказывающих сосудосуживающее и агрегирующее действие.

Возможен и альтернативный путь генерации свободных радикалов. Гипоксия и ишемия снижают синтез аденозинтрифосфата, способствуя анаэробному метаболизму. Снижение АТФ-зависимого метаболизма приводит к выходу ионов Ca^{2+} в цитозоль и повышению активности Ca^{2+} -зависимых изоформ протеинкиназы С.

5.4. ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ МАТЕРИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА НОВОРОЖДЕННОГО

Развитие плода происходит в сложных условиях взаимоотношения с материнским организмом. Наличие инфекционного очага у матери и нарушения в иммунной системе считают факторами риска развития патологических состояний у плода и новорожденного. Большую роль в предотвращении серьезных последствий у новорожденных играют ранняя диагностика и адекватное лечение.

Диагноз врожденной или неонатальной инфекции часто основан на клинических признаках. Однако симптомы инфекций зачастую не являются специфичными, поэтому ранний диагноз ставится на основе

не полностью адекватных лабораторных тестов. По мнению G. Hodge и соавт. (2004), более приемлемый метод обнаружения инфекции — оценка активации лимфоцитов, проведенная быстро, до выделения инфекционного организма. Для установления чувствительности скринирующего теста неонатальной инфекции и идентификации типов лейкоцитов, включенных в иммунный ответ на инфекционный агент, исследовали ранг поверхностных активационных маркеров на Т-клетках, моноцитах и НК-клетках в группе 17 новорожденных с позитивными культурами, 40 пациентов с подозрением на инфицированность (на основе клинических признаков) и контрольной группы. Авторы показали, что обнаружение на Т-клетках увеличения экспрессии CD45RO, изоформы CD45, характерной для активированных лимфоцитов или клеток памяти, — чувствительный скрининговый тест для выявления неонатальной инфекции. Показано также, что двойная экспрессия CD45RA/CD45RO увеличивается рано в течение инфекционного процесса у новорожденных с доказанной инфекцией. Т-лимфоциты у здоровых новорожденных преимущественно «наивны», но при встрече с антигеном происходит конверсия Т-клеточных поверхностных молекул CD45 из «наивных» CD45RA⁺ к CD45RO⁺. CD45RO⁺Т-лимфоциты экспрессируют специфические активационные и адгезивные молекулы и, мигрируя в ткани, могут индуцировать апоптоз, который считают важным механизмом повреждений. Поскольку такая конверсия *in vitro* происходит к 10-му дню, авторы пришли к заключению, что экспозиция к антигену *in vivo* у недоношенных новорожденных с повреждениями головного мозга происходила по меньшей мере за несколько дней до родов. Наиболее вероятным источником антигена считают утероплацентарную инфекцию.

В течение инфекционного процесса также активируются и другие лейкоциты, в том числе гранулоциты и моноциты.

Преждевременные роды часто сопровождаются перивентрикулярными-интравентрикулярными геморрагиями, некротизирующими энтероколитами, хроническими легочными заболеваниями и ретинопатией у новорожденных, что связано с чрезмерной продукцией АФК и пониженной емкостью антиоксидантных систем, нарушением соотношения избыточного оксидативного стресса и антиоксидантной защиты («болезни кислородных радикалов»). Для оценки повреждений, вызванных свободными радикалами, используют 8-изопростан — продукт перекисного окисления липидов (см. Приложение). Повышенный уровень 8-изопростана в крови из пуповинной вены, но не из артерии,

связаны со смертностью или развитием одной или более болезни кислородных радикалов (Weinberger B. et al., 2006). Уровень 8-изопростана не зависит от возраста матери, метода родоразрешения, введения магния сульфата или стероидных гормонов, индуцированной беременностью артериальной гипертензии или реанимационных мероприятий. Выявление повышенного уровня 8-изопростана дает основание ожидать неблагоприятный неонатальный исход вследствие оксидативных повреждений материнских и плацентарных тканей.

В настоящее время с целью развития методик для ранней диагностики инфекционного риска плода сделаны попытки среди большого числа биомаркеров определить те, которые наиболее строго соотносятся с воспалительным ответом плода при инфекционных осложнениях беременности. Так, было установлено, что из 27-ми традиционных маркеров в крови только 3 маркера избирательно ассоциированы с воспалительным ответом плода при внутриматочном инфицировании: ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 (Mestan K. et al., 2009). Повышенный титр этих маркеров свидетельствует о распространенном внутриматочном инфицировании и плохом исходе для плода. С помощью **протеомного анализа** оценена взаимосвязь присутствия в амниотической жидкости биомаркеров воспаления с воспалительным статусом плода при рождении (Buhimschi C.S. et al., 2009). Установлено, что у женщин с внутриамниотическим воспалением, родивших в раннем гестационном сроке, определялся наиболее высокий уровень ИЛ-6 в амниотической жидкости. При рождении дети женщин с тяжелым внутриамниотическим воспалением имели наиболее высокий уровень ИЛ-6 в пуповинной крови и наибольшую частоту раннего проявления сепсиса. Тяжесть нейтрофильной инфильтрации в хориальной пластинке, в пуповинной крови, но не в амнионе, была независимым предсказательным параметром отношения уровней ИЛ-6 в пуповинной крови и в амниотической жидкости. Авторы делают заключение, что даже минимальное внутриамниотическое воспаление приводит к повышенному воспалительному статусу плода при рождении. Также в амниотической жидкости с помощью протеомного анализа, включающего ступенчатый алгоритм (mass restricted score), было определено, что белок S100A12 наиболее сильно ассоциирован с гистологическим хориоамнионитом и фунизитом (Buhimschi C.S. et al., 2009). Белок S100A12, лиганд для рецептора гликозилированных окисленных конечных продуктов, является, как известно, маркером окислительного стресса. Присутствие в амниотической жидкости

двух протеомных маркеров S100A12 и S100A8, кальций-связывающих структурных белков семейства калгранулинов, свидетельствует о повышенном воспалительном статусе плода при рождении и является ранним предсказательным признаком неонатального сепсиса и неблагоприятного развития нервной системы.

При сравнительном исследовании с помощью набора транскриптов (мРНК) плацент с вилитом неизвестной этиологии и без него после своевременных родов была выявлена различная экспрессия 206 генов, связанных с относящимися к воспалению сигнальными путями (Kim M.J. et al., 2009). Экспрессия мРНК подгруппы хемокинов и их рецепторов (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CCL4, CCL5, CXCR3, CCR5) была выше в плацентах с вилитом, чем в нормальных. Анализ мРНК клеток крови показал повышенную экспрессию CXCL9 и CXCL13 у матерей, тогда как у плода в случае вилита был повышен уровень экспрессии CXCL11 и CXCL13. Средние концентрации CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в материнской и фетальной плазме также были выше при вилите. Авторы также определили увеличенные концентрации CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13 в плазме крови недоношенных детей без и в присутствии острого хориоамнионита, но не в материнской плазме. Системное нарушение в продукции хемокинов семейства CXС в материнском и фетальном кровообращении позволяет отличить вилит неизвестной этиологии от острого хориоамнионита. Это исследование является первой работой по оценке транскриптома плаценты при вилите неизвестной этиологии.

Связь состояния нейтрофилов с протеканием родов. Оксидативный стресс связан с такими заболеваниями новорожденных, как респираторный дистресс-синдром, бронхолегочная дисплазия, гипоксически-ишемическая энцефалопатия и синдром внезапной смерти. Недостаточно ясным остается вопрос о том, в какой степени плод подвергается стрессу во время спонтанных вагинальных родов и при кесаревом сечении. Показано, что в артериальной пуповинной крови новорожденных при вагинальных родах или экстренном кесаревом сечении определяются более высокие концентрации малонового диальдегида, конечного продукта перекисного окисления липидов, чем при плановом кесаревом сечении. Однако неясно, происходит ли это в результате связанного с родами оксидативного стресса или отражает пренатальный оксидативный статус.

Оценка влияния способа родоразрешения на тотальный антиоксидантный статус и уровень в сыворотке крови биомаркера окисления

ДНК, 8-гидрокси-дезоксигуанозина, обнаружила сходство у матерей и новорожденных показателей тотального антиоксидантного статуса во всех группах (независимо от способа родов) в начале родов и в пуповинной крови (Schulpis K.H. et al., 2007). Сразу после родов показатели были значительно ниже в группах с экстренным кесаревым сечением и с затянувшимися вагинальными родами (по сравнению с нормальными родами и плановым кесаревым сечением). Уровни 8-гидрокси-дезоксигуанозина, наоборот, были более высокими в этих группах. Уровень 8-гидрокси-дезоксигуанозина был низким в пуповинной крови независимо от способа родов. Низкий уровень показателей тотального антиоксидантного статуса и высочайшие концентрации 8-гидрокси-дезоксигуанозина в группах с экстренным кесаревым сечением и с затянувшимися вагинальными родами, по мнению авторов, возможно обусловлены длительной активностью материнских скелетных и маточных мышц, тогда как уровень 8-гидрокси-дезоксигуанозина был низким независимо от способа родов, возможно, вследствие антиоксидантного действия плацентарных факторов и/или низкого уровня липидов в сыворотке пуповинной крови.

Способ родов и рождения, сопровождаемый изменением тотального антиоксидантного статуса, влиял также на концентрацию белка S100B в сыворотке матерей и их новорожденных. У матерей с длительными родами увеличивался уровень S100B, что, вероятно, обусловлено оксидативным и/или психогенным стрессом при затяжных родах. Наблюдаемый у их новорожденных заметно повышенный уровень S100B мог быть обусловлен влиянием компрессии на головной мозг плода в течение родов.

В качестве показателя оксидативного стресса используют уровень малонового диальдегида (MDA), который считают одним из многих продуктов разрушения окисленных липидов. Однако по мнению Fogel I. и соавт. (2005), он не отражает баланса между активаторами перекисного окисления липидов и антиоксидантами. Комплексное исследование влияния родов на оксидативный стресс в фетальном кровообращении проводили *ex vivo* на уровне прооксидантов и антиоксидантов (Fogel I. et al., 2005). Использовали метод, основанный на взаимодействии ионов меди с липидами сыворотки крови с образованием гидроксильных радикалов (OH[•]). Далее развивается цепная реакция с образованием липидных гидропероксидов, которые регистрируются спектроскопически. Наличие антиоксидантов в сыворотке угнетает образование гидропероксидов в присутствии ионов меди.

Показано, что липиды в сыворотке артериальной крови пуповины более чувствительны к перекисному окислению, чем липиды в сыворотке венозной крови. Наличие признаков оксидативного стресса у плода не только при спонтанном вагинальном рождении, но и при плановом кесаревом сечении свидетельствует о высоком оксидативном стрессе в фетальном кровообращении, независимо от способа родов. Hrascsko Z. и соавт. (2007) также пришли к заключению, что кесарево сечение не имеет преимуществ перед вагинальными родами в отношении предотвращения оксидативного стресса.

Как мы упоминали (глава 1), окислительный стресс сопряжен с активированным состоянием фагоцитов, поэтому оценка функционального статуса фагоцитов в зависимости от протекания родов важна. Установлена зависимость содержания F-актина в нейтрофилах в ответ на fMLF от течения родов. При нормальных вагинальных родах и elective (по желанию) кесаревом сечении без родов его содержание не различается, при кесаревом сечении в родах оно увеличивается, что говорит о важности данной реакции в «аварийной» ситуации. Дети, рожденные с помощью кесарева сечения, имеют значительно более высокие показатели продукции АФК, хемотаксиса и экспрессии CD11b по сравнению с детьми после вагинального рождения.

Если при своевременных вагинальных родах экспрессия CD11b на клетках новорожденных и апоптоз в ответ на ЛПС на уровне взрослых, то при elective кесаревом сечении на нейтрофилах обнаруживается уменьшенная экспрессия CD11b, отсутствует ответ на ЛПС, хотя базовый уровень TLR-4 повышен (Molloy I.J. et al., 2004).

Абсолютное количество нейтрофилов, их прикрепление на нейлоновых волокнах, восстановление нитросинего тетразолия (НСТ), фагоцитоз латексных частиц в пуповинной крови значительно повышаются при плановом кесаревом сечении по сравнению с вагинальными родами, экстренным кесаревым сечением. При оперативном родоразрешении в нейтрофилах новорожденных уменьшается продукция АФК, вызванная *E. coli*, экспрессия рецепторов CD11b/CD18 и продукция ИЛ-8 по сравнению с клетками новорожденных после своевременных вагинальных родов (Gessler P., Dahinden C., 2003).

Спонтанная и вызванная ИЛ-8 способность к трансмиграции у нейтрофилов новорожденных после нормальных вагинальных родов значительно выше по сравнению с нейтрофилами у новорожденных

после кесарева сечения или у взрослых (Yektaei-Karin E. et al., 2007). С прогрессивным увеличением стресса плода наблюдается увеличение общего количества лейкоцитов в крови, в частности нейтрофилов и моноцитов, так же как и увеличение уровня ИЛ-8, растворимого L-селектина и ИФН- γ . Выявлены значимые прямые корреляции между количеством нейтрофилов и моноцитов и уровнем кортизола, β -эндорфина и пролактина в сыворотке крови. Уровень ИФН- γ прямо соотносился с уровнем дофамина, так же как и со счетом лимфоцитов и моноцитов. Подъем нейро-эндокринных иммуномодулирующих факторов усиливает антимикробную защиту новорожденных. Авторы предполагают, что ИЛ-8 при нормальных родах может служить праймирующим фактором для усиления хемотаксиса посредством преактивации эндотелия плода. Вероятно, роды с оперативным родоразрешением могут активировать избыточное привлечение дополнительных воспалительных клеток в очаг воспаления и усиливать выброс ИФН- γ .

Особенности лейкоцитов новорожденных при преждевременных родах. Количество нейтрофилов в пуповинной крови недоношенных детей было значительно ниже, чем у доношенных детей и взрослых (Nurpponen I. et al., 2002). Недоношенные дети более подвержены инфицированию по сравнению с доношенными детьми, хотя и у последних наблюдается дефицит защитных механизмов. В общем, как и в отношении других аспектов иммунной функции, дефекты нейтрофилов более выражены в неонатальном периоде и при недоношенности, в первые недели жизни они начинали исправляться (Carr R., 2000).

Нейтрофилы пуповинной крови недоношенных детей имеют значительно более низкую способность выбрасывать бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость мембран (BPI), в среду инкубации по сравнению с нейтрофилами доношенных детей, что связано с пониженным содержанием белка в клетках (Nurpponen I. et al., 2002).

В моноцитах пуповинной крови недоношенных детей значительно снижена продукция супероксид-аниона и более низкий уровень дегрануляции по сравнению с клетками доношенных детей. Это не является следствием дефектов или отсутствия компонентов бактерицидного ответа. Возможно, причина кроется в регуляторных процессах, так как указанные различия характерны для культивируемых прикрепленных клеток, но не для свежеизолированных. Также для прикрепленных стимулированных ЛПС моноцитов недоношенных

детей характерна уменьшенная секреция ФНО- α , но не ИЛ-1 β и ИЛ-6 и пониженная экспрессия CD11b/CD18 субъединиц рецептора адгезии.

При сравнении способности нейтрофилов пуповинной крови доношенных и недоношенных детей генерировать супероксид обнаружено, что параметры генерации супероксид-аниона зависят от стимула. Ответ клеток пуповинной крови доношенных детей на fMLF сопоставим с ответом клеток взрослых, а на форболовый эфир он ниже, тогда как нейтрофилы недоношенных детей на оба стимула отвечают слабо (Komatsu H. et al., 2001). Кроме того, нейтрофилы недоношенных детей отличаются низкой экспрессией высокоаффинных рецепторов fMLF при параметрах связывания и количеству рецепторов с низким сродством, близких к параметрам у клеток взрослых.

Нейтрофилы недоношенных новорожденных показывают ослабление up-регуляции оксидазной активности в ответ на стафилококк, который считают общим патогеном новорожденных (Bjorkqvist M. et al., 2004).

Связь состояния врожденного иммунитета новорожденных с течением беременности матери. Состояние иммунитета новорожденных детей в значительной степени связано с особенностями течения беременности у их матерей. Обнаружены особенности функционирования иммунных клеток пуповинной крови при физиологическом состоянии новорожденного и при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Инфекционно-воспалительные заболевания матери приводят к нарушению реактивности иммунной системы их новорожденных детей. Лейкоциты пуповинной крови новорожденных с бактериальной инфекцией имеют меньшую бактерицидную активность по сравнению с таковой у неинфицированных детей.

По результатам нашего исследования (Сафронова В.Г. и соавт., 2006), продукция АФК клетками цельной крови новорожденных от матерей с осложненным течением беременности (с нормальным течением неонатального периода, с инфекционным риском и назначением антибактериальной терапии, а также с проявлением бактериальной инфекции) отличалась от таковой у здоровых детей от матерей с физиологическим течением беременности (рис. 19).

Показатели продукции АФК изолированными клетками также отличались в группах новорожденных: уровень спонтанной продукции был значительно понижен в группах детей от матерей с осложненным течением беременности, тогда как ответ на хемотаксический

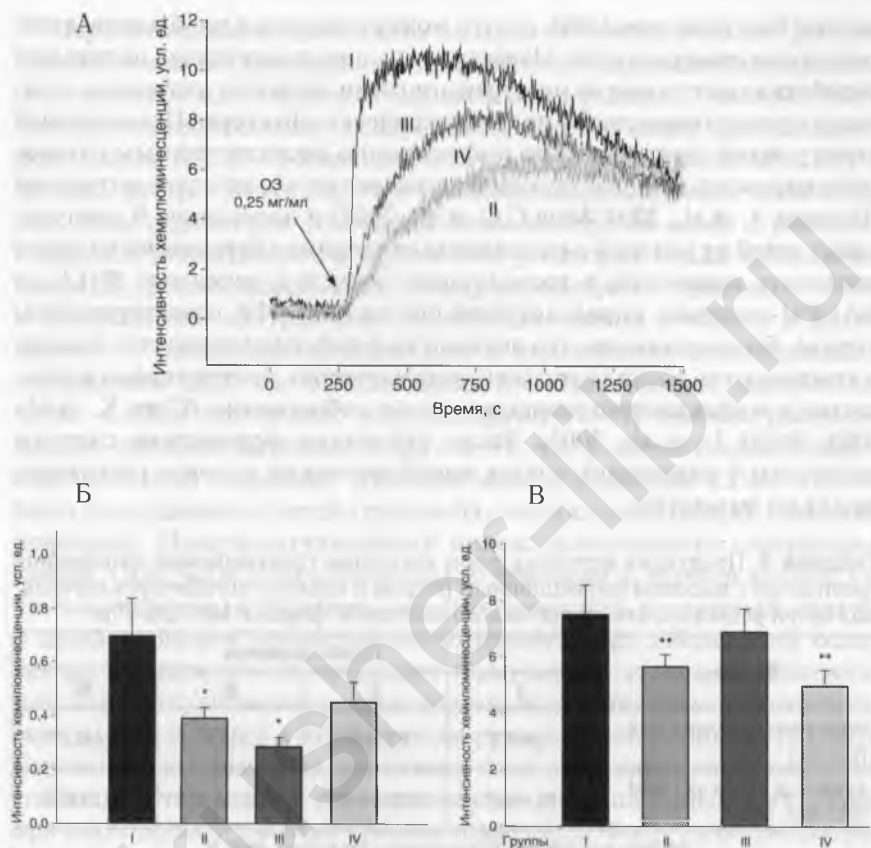


Рис. 19. Генерация АФК клетками нефракционированной пуповинной крови.

Группа I — здоровые дети от матерей с физиологическим течением беременности (I); группы II–IV — дети от матерей с осложненным течением беременности: с нормальным течением неонатального периода (II), с инфекционным риском и назначением антибактериальной терапии (III), с проявлением бактериальной инфекции (IV). Показаны: (А) оригинальные записи и (В) амплитуда ответа на 0,25 мг/мл опсонизированный зимозан (O3); Б — спонтанный уровень генерации АФК. Приведены средние значения параметра с указанием средней квадратичной ошибки и числа независимых измерений. Отличие от параметра в группе I статистически значимо: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

пептид был повышен (табл. 4), что может говорить о праймированном состоянии гранулоцитов. Известно, что предшествующая активации обработка гранулоцитов многими агентами, включая цитокины, приводит к усиленному ответу на хемотаксические факторы. Повышенный ответ у детей групп риска по инфекционно-воспалительным патологиям отражает предшествующее регистрации воздействие антигенов (Davoren A. et al., 2004; Wang C.C. et al., 2007) и цитокинов. В гранулоцитах детей от матерей с осложненным течением беременности могут возникать изменения в трансдукции сигнала с рецептора fMLF на NADPH-оксидазу, определяющую продукцию АФК в респираторном взрыве. Было показано, что активация фосфатидилинозит-3-киназы и компонентов каскада митоген-активируемых протеинкиназ вовлекается в инфекционно-воспалительные заболевания (Chen K. et al., 2005; Pollak L. et al., 2005). Также указанные ферментные системы вовлечены в созревание клеток периферической крови и регуляцию функций фагоцитов.

Таблица 4. Продукция активных форм кислорода гранулоцитами пуповинной крови детей с высоким инфекционным риском и влияние ингибиторов сигнальных путей рецептора хемотаксического пептида N-формил-Met-Leu-Phe

Параметр	Группы пациентов			
	I	II	III	IV
Спонтанная продукция АФК (усл. ед.)	6,1±1,8	3,1±0,6*	3,2±0,4*	2,2±0,6*
Амплитуда ответа на 1 мкМ fMLF (усл. ед.)	25,2±5,7	38,0±11,4**	41,5±11,6**	34,5±12,8
Эффект ингибиторов на спонтанную продукцию АФК, %				
1 мкМ SB203580	0,7±0,1	0,8±0,1**	0,6±0,2	1,5±0,6**
0,1 мкМ вортманнин	0,75±0,26	0,9±0,2	0,7±0,1	1,0±0,4
Эффект ингибиторов на вызванный 1 мкМ fMLF респираторный взрыв, %				
1 мкМ SB203580	0,9±0,1	0,64±0,1*	0,3±0,1*	1,5±0,1*
0,1 мкМ вортманнин	0,8±0,2	0,5±0,1*	0,7±0,4	1,04±0,1

fMLF — N-формил-Met-Leu-Phe.

АФК — активные формы кислорода.

Отличие от параметра в группе I статистически значимо:

* — $p < 0,01$;

** — $p < 0,05$.

Параметры, характеризующие иммунный статус, у детей с риском инфекционно-воспалительных заболеваний отличаются изменением соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток, сниженным относительным содержанием естественных цитотоксических клеток (CD16⁺) и повышенным уровнем В-лимфоцитов (CD19⁺). Однако следует отметить, что статистически значимое изменение всех этих параметров отмечается только в группе детей с реализовавшимся инфекционным процессом, у которых также существует высокий уровень корреляции между параметрами продукции АФК и содержанием натуральных киллерных клеток ($r=0,80$). У детей группы IV наблюдается тенденция к увеличению относительного содержания CD3⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. Пониженное содержание CD16⁺-клеток определено у детей групп II–IV, причем наиболее низкое значение выявлено в группе IV, т.е. у детей с проявлением бактериальной инфекции. Относительное содержание CD19⁺-клеток было пониженным у детей группы III, тогда как в группе IV оно было повышено. Иммунорегуляторный индекс (соотношение содержания клеток CD4⁺/CD8⁺) был значительно понижен у детей в группе IV. Таким образом, параметры, характеризующие иммунный статус, у детей с риском инфекционно-воспалительных заболеваний отличались изменением соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток, сниженным относительным содержанием цитотоксических клеток (CD16⁺) и повышенным уровнем В-лимфоцитов (CD19⁺). Статистически значимое изменение всех этих параметров отмечено только в группе детей с реализовавшимся инфекционным процессом, причем определен высокий уровень корреляции между уровнем продукции АФК и содержанием естественных киллеров. CD16⁺-NK-клетки — важный компонент врожденного иммунитета. В ответ на инфекцию они продуцируют ряд цитокинов, которые активируют или праймируют другие клетки, в том числе макрофаги и гранулоциты. Активация последних вызывает усиленную продукцию АФК. У детей группы IV, по-видимому, происходит снижение количества эффекторных клеток и их активации, что способствует развитию инфекционного процесса.

Выявленные отклонения в иммунном статусе, системе фагоцитоза и сопряженных с рецепторами системах регуляции «респираторного взрыва» нейтрофилов у новорожденных детей с высоким риском развития инфекционно-воспалительной патологии свидетельствуют о подавлении врожденного иммунитета, формируемого в неблагоприятных условиях осложненного течения беременности.

Мы оценили представительство рецепторов с высоким и низким сродством к хемотаксическому пептиду N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) в респираторном взрыве гранулоцитов пуповинной крови детей с риском развития инфекционно-воспалительной патологии (Сафронова В.Г. и соавт., 2008). Специфический ингибитор рецепторов fMLF с высокой аффинностью N-тербутоксикарбонил-Met-Leu-Phe (T-boc) концентрационно-зависимым образом подавлял «респираторный взрыв» в нейтрофилах взрослых и детей (рис. 20).

С помощью T-boc было оценено участие высоко- и низкоаффинных рецепторов в активации респираторного взрыва fMLF в различных концентрациях (рис. 20 и 21). В области низких концентраций fMLF наблюдали практически полное подавление ответов в гранулоцитах взрослых и детей группы I. В группе детей у матерей с осложненным течением беременности сохранялся довольно значительный ответ в клетках, обработанных T-boc (рис. 21, кривая 2), что говорит о вовлечении рецепторов с низким сродством. В гранулоцитах детей матерей с осложненным течением беременности (группа II) T-boc в данной концентрации вызывал полумаксимальное ингибирование при концентрации fMLF почти на 2 порядка ниже, чем в гранулоцитах детей от матерей с физиологическим течением беременности (группа I). Это означает, что в гранулоцитах детей группы II рецепторы с низким сродством вовлекаются в активацию респираторного взрыва при более низких концентрациях fMLF. Кроме того, в данной группе ответ, вызванный fMLF в высокой концентрации, частично подавлялся T-boc (рис. 21), что демонстрирует вклад высокоаффинных рецепторов.

Гранулоциты детей от матерей с осложненным течением беременности имеют повышенную реактивность, что проявляется в активации респираторного взрыва при значительно более низких концентрациях fMLF. Представительство рецепторов с высоким и низким сродством к fMLF в инициации респираторного взрыва гранулоцитов детей от матерей с осложненным течением беременности отличается от такового в гранулоцитах здоровых новорожденных от матерей с физиологическим течением беременности. Вероятно, обнаруженные различия — следствие повышенной функциональной экспрессии рецепторов с низким сродством и нарушения или незрелости механизмов, регулирующих процессинг рецепторов.

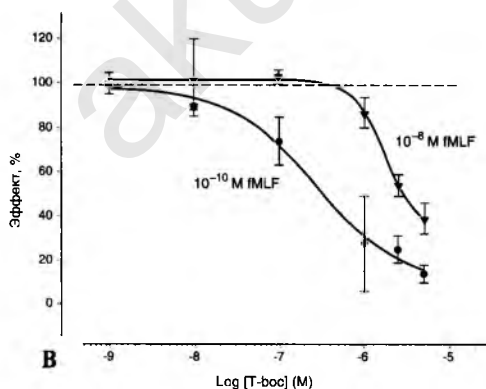
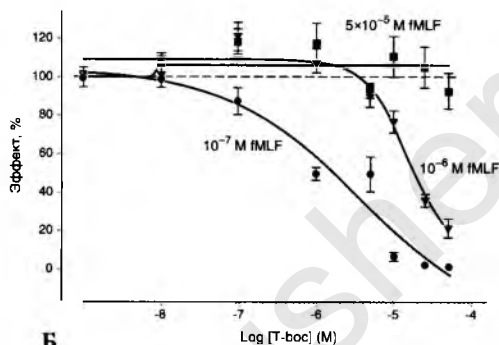
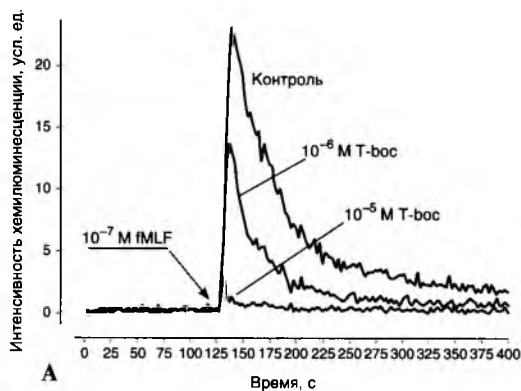


Рис. 20. Влияние ингибитора высокоаффинных рецепторов fMLF на респираторный взрыв гранулоцитов.

Показано зависимое от концентрации действие N-тербутоксикарбонил-Met-Leu-Phe (T-boc), ингибитора рецепторов с высоким сродством к fMLF. А — ингибирование ответа на 10^{-7} М fMLF при инкубации гранулоцитов из периферической крови взрослых с T-boc в возрастающих концентрациях. Б, В — концентрации зависимости действия T-boc на респираторный взрыв гранулоцитов из периферической крови взрослых и из пуповинной крови детей с нормальным течением неонатального периода от матерей с осложненным течением беременности соответственно. Эффект рассчитан по отношению амплитуды ответа на fMLF клеток, обработанных T-boc, к амплитуде ответа интактных клеток, принятой за 100%. Указаны концентрации fMLF, использованные для активации клеток

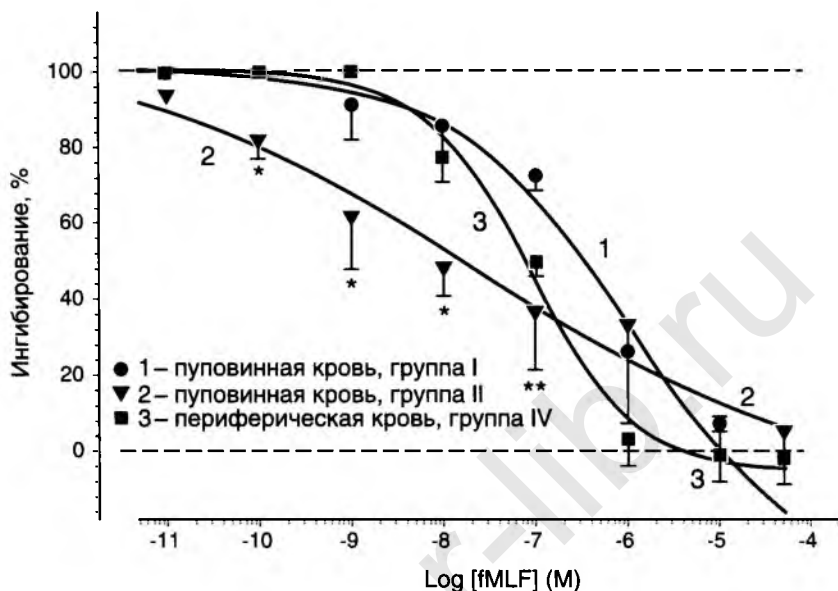


Рис. 21. Вклад низкоаффинных рецепторов fMLF в активацию респираторного взрыва в гранулоцитах пуповинной крови.

Гранулоциты инкубированы с 5×10^{-6} М Т-вос ингибитором высокоаффинных рецепторов, затем активированы fMLF в концентрациях 10^{-11} — 5×10^{-5} М. Ингибирование респираторного взрыва Т-вос зависело от концентрации fMLF и различалось в гранулоцитах из пуповинной крови (пуповинная кровь детей с нормальным течением неонатального периода от матерей с физиологическим и осложненным течением беременности, группы I и II соответственно) и гранулоцитах из периферической крови взрослых доноров (группа IV). Ингибирование (в %) рассчитано как отношение разности продукции АФК интактными клетками и клетками, обработанными Т-вос, к продукции АФК интактных клеток, принятой за 100%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Незрелость иммунной системы новорожденных считается основной причиной повышенной чувствительности к инфекции. В периферической крови плода к моменту рождения есть практически все субпопуляции иммунокомпетентных клеток, способных обеспечить иммунный ответ новорожденного на большой спектр антигенов. В то же время иммунная система плода и новорожденного ребенка на начальных этапах онтогенетического развития существенно отличается

от иммунитета взрослого человека количественными диспропорциями и функциональной незрелостью клеток. Естественная и приобретенная иммунная защита, которые при развитии эффекторных функций обеспечиваются кооперацией различных клеток, их взаимной мобилизацией и регуляцией, у новорожденных имеют выраженное своеобразие.

К моменту родов гемопоэз новорожденного приобретает характеристики, приближающиеся к таковым здорового человека. Однако в раннем постнатальном периоде отмечают высокую интенсивность процессов кроветворения. Сохраняется абсолютный лимфоцитоз, но по относительному составу основных популяций клеток крови (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов) новорожденные уже не отличаются от взрослых доноров.

Состояние иммунитета новорожденных детей в значительной степени связано с особенностями течения беременности их матерей. Обнаружены особенности функционирования иммунных клеток пуповинной крови при физиологическом состоянии новорожденного и при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Инфекционно-воспалительные заболевания матери приводят к нарушению реактивности иммунной системы их новорожденных детей. Лейкоциты пуповинной крови новорожденных с бактериальной инфекцией имеют меньшую бактерицидную активность по сравнению с таковой у неинфицированных детей.

Преждевременно родившиеся дети высоко чувствительны к некоторым инфекциям, что частично обусловлено их незрелой врожденной иммунной системой, снижением активности нейтрофилов и моноцитов, а также пониженной концентрацией факторов комплемента. Известно, что важную роль в защите от инфекции играют полиморфноядерные фагоциты, которые, используя сходные механизмы бактерицидного действия с макрофагами, увеличивают связывание и поглощение микроорганизмов в присутствии опсонизирующих факторов (антител и фрагментов комплемента). Конечную фазу уничтожения микроорганизмов фагоцитами сопровождает серия сложных метаболических событий, включая активацию гликолитических путей, генерацию АФК и увеличение потребления кислорода — «дыхательный взрыв».

На поверхностной мембране гранулоцитов пуповинной крови доношенных детей выявлено присутствие высоко- и низкоаффинных рецепторов к формилированному пептиду fMLF — продукту деградации белков бактерий и митохондрий. Эти рецепторы, помимо fMLF, способны связывать провоспалительные агенты. Количество

высокоаффинных рецепторов на гранулоцитах доношенных новорожденных было ниже, чем на гранулоцитах взрослых, а низкоаффинных — выше. По-видимому, модуляция вызванной хемоаттрактантами продукции АФК происходит на уровне рецептора. Нейтрофилы недоношенных детей отличаются низкой экспрессией высокоаффинных рецепторов fMLF при параметрах связывания и количеству рецепторов с низким сродством близких к параметрам у клеток взрослых.

Уровень спонтанной продукции АФК был значительно понижен у новорожденных от матерей с осложненным течением беременности, тогда как ответ на хемотаксический пептид был повышен, что может говорить о праймированном состоянии гранулоцитов. Гранулоциты детей, родившихся у матерей с осложненным течением беременности, обладают повышенной реактивностью, что проявляется в активации «респираторного взрыва» при значительно более низких концентрациях fMLF. Представительство рецепторов с высоким и низким сродством к fMLF в инициации «респираторного взрыва» гранулоцитов детей от матерей с осложненным течением беременности отличается от такового в гранулоцитах здоровых новорожденных от матерей с физиологическим течением беременности. Выявленные отклонения в иммунном статусе, системе фагоцитоза и сопряженных с рецепторами системах регуляции респираторного взрыва нейтрофилов у новорожденных детей с высоким риском развития инфекционно-воспалительной патологии свидетельствуют о подавлении врожденного иммунитета, формируемого в неблагоприятных условиях осложненного течения беременности у матери.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дегтярева М.В., Володин Н.Н., Бахтикян К.К. и др.* Особенности продукции цитокинов, субпопуляционного состава лимфоцитов и функционального состояния нейтрофилов при неонатальных пневмониях и способы иммунокоррекции // *Медицинская иммунология.* — 2000. — Т. 2. — № 1. — С. 69–76.
- Макогон А.В., Леплина О.Ю., Пасман Н.М. и др.* Онтогенетические особенности иммунитета плода во втором триместре беременности // *Бюлл. СО РАМН.* — 2005. — № 2. — С. 42–46.
- Пономарева И.В., Городничева Ж.А., Ванько Л.В. и др.* Нарушения в системе гемостаза у больных с патологическим уровнем антифосфолипидных антител при гестозе // *Акуш. гинекол.* — 1999. — № 3. — С. 20–23.
- Сафронова В.Г., Матвеева Н.К., Мальцева В.Н. и др.* Генерация активных форм кислорода клетками пуповинной крови и иммунный статус новорожденных детей с риском инфекционно-воспалительных заболеваний // *Бюлл. эксп. биол. мед.* — 2006. — № 142(9) — С. 304–308.
- Сафронова В.Г., Матвеева Н.К., Мальцева В.Н. и др.* Определение роли рецепторов хемотаксического пептида fMLF в гранулоцитах пуповинной крови новорожденных детей с риском инфекционно-воспалительных заболеваний // *Бюлл. эксп. биол. мед.* — 2008. № 145. — С. 431–437.
- Сафронова В.Г., Матвеева Н.К., Авхачева Н.В., Сидельникова В.М., Ванько Л.В., Сухих Г.Т.* Изменения в регуляции оксидазной активности гранулоцитов периферической крови у женщин с невынашиванием беременности // *БЭБиМ.* — 2003. — Т. 136. — № 3. — С. 257–260.
- Сидельникова В.М., Сухих Г.Т.* Невынашивание беременности. — Издательство «МИА», 2010. — 535 с.
- Сотникова Н.Ю., Посисеева Л.В., Анциферова Ю.С.* Цитокиновый профиль женщин с угрозой невынашивания беременности и его модуляция препаратом дюфастон // *Ж. акушерства и женских болезней.* — 2006. — № 2. — С. 42–46.
- Сухих Г.Т., Ванько Л.В.* Иммунология беременности. — М.: Издательство РАМН, 2003. — 399 с.
- Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др.* Соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в периферической крови и уровни провоспалительных цитокинов в лохиях родильниц с эндометритом // *БЭБиМ.* — 2005. — Т. 140. — № 12. — С. 622–624.

- Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е.* Преэклампсия: руководство. — М.: Издательство «ГЭОТАР-Медиа», 2010. — 576 с.
- Хлыстова З.С.* Становление системы иммуногенеза плода человека. — М., 1987.
- Хлыстова З.С., Шмелева С.П., Калинина И.И. и др.* Карта заселения органов иммунной системы эмбриона и плода человека Т- и В-лимфоцитами и начало эндокринной функции тимуса // Иммунология. — 2002. — № 2. — С. 80–84.
- Ярилин А.А., Донецкова А.Д.* Регуляторные Т-клетки, зависимые от фактора FOXP3, и перспективы их изучения при беременности // Сб. трудов Республ. науч. конф. «Иммунология репродукции». — Иваново, 2005. — С. 149–152.
- Abrahams V.M., Mor G.* Toll-like receptors and their role in the trophoblast // Placenta. — 2005. — Vol. 26. — P. 540–547.
- Agarwal A., Gupta S., Sekhon L., Shah R.* Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications // Antioxid. Redox Signal. — 2008. — Vol. 10(8). — P. 1375–403.
- Al-Hertani W., Yan S.R., Byers D.M., Bortolussi R.* Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide // Clin. Invest. Med. — 2007. — Vol. 30(2). — P. 44–53.
- Angelone D.F., Wessels M.R., Coughlin M. et al.* Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF- α production in vitro and in vivo // Pediatr. Res. — 2006 — Vol. 60. — P. 205–209.
- Arnon S., Litmanovitz I., Regev R.H. et al.* Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis // Perinatol. — 2007. — Vol. 27(5). — P. 297–302.
- Bedard K., Krause K.-H.* The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87. — P. 245–313.
- Bhatnagar S., Bhattacharjee J., Vaid M. et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: a pilot study in North India // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. — 2007. — Vol. 47(6). — P. 477–482.
- Biondi C., Pavan B., Lunghi L., Fiorini S., Vesce F.* The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy // Curr Pharm Des. — 2005. — Vol. 11. — P. 2075–2089.
- Björkqvist M., Jurstrand M., Bodin L. et al.* Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci // Pediatr. Res. — 2004. — Vol. 55(6). — P. 966–971.

- Buhimschi C.S., Bhandari V., Han Y.W. et al.* Using proteomics in perinatal and neonatal sepsis: hopes and challenges for the future // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 22(3). — P. 235–243
- Burdon C., Mann C., Cindrova-Davies T. et al.* Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta // *Placenta.* — 2007. — Vol. — 28(7). — P. 724–733.
- Cadden K.A., Walsh S.W.* Neutrophils, but not lymphocytes or monocytes, infiltrate maternal systemic vasculature in women with preeclampsia // *Hypertens Pregnancy.* — 2008. — Vol. 27(4). — 396–405.
- Carr R.* Neutrophil production and function in newborn infants // *Br. J. Haematol.* — 2000. — Vol. 110. — P. 18–28.
- Cerboni C., Zingoni A., Cippitelli M. et al.* Antigen-activated human T lymphocytes express cell surface NKG2D ligands via an ATM/ATR dependent mechanism and become susceptible to autologous NK cell lysis // *Blood.* — 2007. — Vol. 110. — P. 606–615.
- Chen K., Iribarren P., Gong W., Wang J.M.* The essential role of phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) in regulating pro-inflammatory responses and the progression of cancer // *Cell. Mol. Immunol.* — 2005. — Vol. 2. — P. 241–252.
- Chudgar U.H., Thurman G.W., Ambruso D.R.* Oxidase activity in cord blood neutrophils: a balance between increased membrane associated cytochrome b558 and deficient cytosolic components // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2005. — Vol. 45(3). — P. 311–317.
- Cindrova-Davies T., Yung H.W., Johns J. et al.* Oxidative Stress, Gene Expression, and Protein Changes Induced in the Human Placenta during Labor // *Am. J. Pathol.* — 2007. — Vol. 171(4). — P. 1168–1179.
- Croy A.B., van den Heuvel M.J., Borzychowski A.M., Tayade C.* Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 214. — P. 161–185.
- Cui X.-L., Brockman D., Campos B., Myatt L.* Expression of NADPH Oxidase Isoform 1 (Nox1) in Human Placenta: Involvement in Preeclampsia // *Placenta.* — 2006. — Vol. 27. — Issues 4–5. — P. 422–431.
- Das U.N.* Hypertension as a low-grade systemic inflammatory condition that has its origins in the perinatal period // *J. Assoc. Physicians India.* — 2006. — Vol. 54. — P. 133–142.
- Davoren A., Saving K., McFarland J.G. et al.* Neonatal neutropenia and bacterial sepsis associated with placental transfer of maternal neutrophil-specific autoantibodies // *Transfusion.* — 2004. — Vol. 44(7). — P. 1041–1046.

- Dechend R., Viedt C., Müller D.N. et al.* AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase // *Circulation* — 2003. — Vol. 107. — P. 1632–1639.
- Dietl J., Honig A., Kammerer U., Rieger L.* Natural killer cells and dendritic cells at the human fetomaternal interface: an effective cooperation? // *Placenta*. — 2006. — Vol. 27. — P. 341–347.
- Droge W.* Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol Rev.* — 2002. — Vol. 82. — P. 47–95.
- El-Benna J., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A. et al.* p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases // *Exp. Mol. Med.* — 2009. — Vol. 41(4). — P. 217–225.
- Ennaciri J., Menezes J., Proulx F., Toledano B.J.* Induction of apoptosis by herpes simplex virus-1 in neonatal, but not adult, neutrophils // *Pediatr. Res.* — 2006. — Vol. 59(1). — P. 7–12.
- Eriksson A., Lewensohn R., Nilsson A.* Expression and activity of DNA-dependent protein kinase in normal human leukocytes // *Anticancer Res.* — 2000. — Vol. 20. — P. 3051–3058.
- Faraci F.M., Didion S.P.* Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 1367–1373.
- Fest S., Aldo P.B., Abrahams V.M. et al.* Trophoblast-Macrophage Interactions: a Regulatory Network for the Protection of Pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2007. — Vol. 57 (1). — P. 55–66.
- Fischer H., Gonzales L.K., Kolla V.* Developmental regulation of DUOX1 expression and function in human fetal lung epithelial cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2007 — Vol. 292. — L. 1506–1514.
- Fogel I., Pinchuk I., Kupferminc M.J.* Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2005. — Vol. 193. — P. 241–246.
- Förster-Waldl E., Sadeghi K., Tamandl D.* Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging // *Pediatr. Res.* — 2005. — Vol. 58(1). — P. 121–124.
- Founds S.A., Conley Y.P., Lyons-Weiler J.F. et al.* Altered Global Gene Expression in First Trimester Placentas of Women Destined to Develop Preeclampsia // *Placenta*. — 2009. — Vol. 30, Issue 1. — P. 15–24
- Fujino G., Noguchi T., Takeda K., Ichijo H.* Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. // *Sem. Cancer Biol.* — 2006. — Vol. 16. — P. 427–435.

- Gal P., Barna L., Kocsis A., Zavodszky P.* Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences // *Immunobiol.* — 2007. — Vol. 212. — P. 267–277.
- Gessler P., Dahinden C.* Increased respiratory burst and increased expression of complement receptor-3 (CD11b/CD18) and of IL-8 receptor-A in neutrophil granulocytes from newborns after vaginal delivery // *Biol. Neonate.* — 2003. — Vol. 83(2). — P. 107–112.
- Girardi G., Yarilin D., Thurman J.M. et al.* Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction // *J. Exp. Med.* — 2006. — Vol. 203. — P. 2165–2175.
- Gloria-Bottini F., Meloni G.F., Nicotra M. et al.* Feto-maternal ACP1 activity ratio and intrauterine survival // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2008. — Vol. 140(1). — P. 12–16.
- Goldman-Wohl D., Yagel S.* Examination of distinct fetal and maternal molecular pathways suggests a mechanism for the development of preeclampsia // *J. Reprod. Immunol.* — 2007. — Vol. 76. — P. 54–60.
- Gu Y., Lewis D.F., Zhang Y. et al.* Increased superoxide generation and decreased stress protein Hsp90 expression in human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) from pregnancies complicated by preeclampsia // *Hypertens. Pregnancy.* — 2006. — Vol. 25(3). — P. 169–182.
- Hallett M.B., Lloyds D.* The Molecular and Ionic Signalling of Neutrophils // Austin, Texas, USA: Landes Bioscience. — 1997. — 211 p.
- Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y. et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface // *Nat. Med.* — 2006. — Vol. 12. — P. 1065–1074.
- Heazell A.E., Lacey H.A., Jones C.J. et al.* Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast // *Placenta.* — 2008. — Vol. 29(2). — P. 175–186.
- Henneke P., Berner R.* Interaction of neonatal phagocytes with group B streptococcus: recognition and response // *Infect. Immun.* — 2006. — Vol. 74(6). — P. 3085–3095.
- Hiby S.E., Walker J.J., O'shaughnessy K.M. et al.* Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success // *J. Exp. Med.* — 2004. — Vol. 200. — P. 957–965.
- Hodge G., Hodge S., Han P., Haslam R.* Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection // *Clin. Exp. Immunol.* — 2004. — Vol. 135(1). — P. 125–129.
- Hracsko Z., Safar Z., Orvos H. et al.* Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section // *In Vivo.* — 2007. — Vol. 21. — P. 703–706.

- Hung T.H., Burton G.J.* Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* — 2006. — Vol. 45(3). — P. 189–200.
- Jauniaux E., Poston L., Burton G.J.* Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution // *Hum. Reprod. Update.* — 2006. — Vol. 12(6). — P. 747–55.
- Kalkunte S., Chichester C.O., Gotsch F. et al.* Evolution of Non-Cytotoxic Uterine Natural Killer Cells // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2008. — Vol. 59. — P. 425–432.
- Kawahara T., Quinn M.T., Lambeth J.D.* Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes // *BMC Evolutionary Biology.* — 2007. — Vol. 7. — P. 109.
- Kazmierczak J.A., Korzeniewski J., Grybos M.* Evaluation of congenital infection risk on the basis of cytokines IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha levels in blood serum and amniotic liquid in pregnant women and in umbilical blood of neonates // *Ginekol. Pol.* — 2003. — Vol. 74. — P. 297–302.
- Khakoo S.I., Carrington M.* KIR and disease: a model system or system of models? // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 214. — P. 186–201.
- Keskin D.B., Allan D.S., Rybalov B. et al.* TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2007. — Vol. 104. — P. 3378–3383.
- Kharfi A.A., Leblanc S., Ouellet A., Moutquin J.M.* Dual action of H₂O₂ on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia // *Clin. Biochem.* — 2007. — Vol. 40(1–2). — P. 94–97.
- Kim M.J., Romero R., Kim C.J. et al.* Villitis of unknown etiology is associated with a distinct pattern of chemokine up-regulation in the fetomaternal and placental compartments: implications for conjoint maternal allograft rejection and maternal anti-fetal graft-versus-host disease // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 182(6). — P. 3919–3927.
- Kitaya K., Yamaguchi T., Yasuo T. et al.* Post-ovulatory rise of endometrial CD16(–) natural killer cells: In situ proliferation of residual cells or selective recruitment from circulating peripheral blood? // *J. Reprod. Immunol.* — 2007. — Vol. 76. — P. 45–53.
- Komatsu H., Tsukimori K., Hata K. et al.* The characterization of superoxide production of human neonatal neutrophil // *Early Human Develop.* — 2001. — Vol. 65. — P. 11–19.
- Kressig P., Beinder E., Schweer H. et al.* Post-delivery oxidative stress in women with preeclampsia or IUGR // *J. Perinat. Med.* — 2008. — Vol. 36(4). — P. 310–315.

- Lacaze-Masmonteil T., Thébaud B.* Effect of perinatal inflammation syndrome on lung maturation and development // *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* (Paris). — 2001. — Vol. 30(1 Suppl). — P. 21–26.
- Lash G.E., Postovit L.M., Matthews N.E. et al.* Oxygen as a regulator of cellular phenotypes in pregnancy and cancer // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 103–109.
- Laškarin G., Redžović A., Rubeša Ž. et al.* Decidual Natural Killer Cell Tuning by Autologous Dendritic Cells // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2008. — Vol. 59 (5). — P. 433–445.
- Lash G.E., Quenby S., Burton G.J. et al.* Gestational Diseases — A Workshop Report // *Placenta.* — 2008. — Vol. 29S. — P. 92–94.
- Lee V.M., Quinn P.A., Jennings S.C., Ng L.L.* NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models // *Hypertension.* — 2003. — Vol. 41. — P. 925–931.
- Levy O.* Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists // *J. Endotoxin Res.* — 2005. — Vol. 11. — P. 113–116.
- Levy O.* Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates // *Nature Rev. Immunol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 379–389.
- Lunghi L., Ferretti M.E., Medici S. et al.* Control of human trophoblast function // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 5. — P. 6.
- Manes S.* Human placental NAD(P)H oxidase: solubilization and properties // *Placenta.* — 2001 — Vol. 22(1). — P. 58–63.
- Martindale J.L., Holbrook N.J.* Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival // *J. Cel. Physiol.* — 2002. — Vol. 192. — P. 1–15.
- Matsubara S., Sato I.* Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy // *Histochem. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 116(1). — P. 1–7.
- Mestan K., Yu Y., Thorsen P. et al.* Cord blood biomarkers of the fetal inflammatory response // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* — 2009. — Vol. 22(5). — P. 379–387.
- Meziani F., Tesse A., David E. et al.* Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility // *Am. J. Pathol.* — 2006. — Vol. 169(4). — P. 1473–1483.
- Moffett A., Loke C.* Immunology of placentation in eutherian mammals // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 584–594.

- Moll S.J., Jones C.J., Crocker I.P. et al.* Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species // *Apoptosis*. — 2007. — Vol. 12(9). — P. 1611–1622.
- Molloy E.J., O'Neill A.J., Grantham J.J. et al.* Labor promotes neonatal neutrophil survival and lipopolysaccharide responsiveness // *Pediatr. Res.* — 2004. — Vol. 56(1). — P. 99–103.
- Mor G., Romero R., Aldo P.B., Abrahams V.M.* Is the trophoblast an immune regulator? The role of Toll-like receptors during pregnancy // *Crit. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 375–388.
- Myatt L., Cui X.* Oxidative stress in the placenta // *Histochem Cell Biol.* — 2004. — Oct; 122(4). — P. 369–82.
- Ordi J., Casals G., Ferrer B. et al.* Uterine (CD56+) natural killer cells recruitment: association with decidual reaction rather than embryo implantation // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2006. — Vol. 55. — P. 369–377.
- Nupponen I., Turunen R., Nevalainen T. et al.* Extracellular release of bactericidal/permeability-increasing protein in newborn infants // *Pediatr. Res.* — 2002. — Vol. 51(6). — P. 670–674.
- Paclat M.-H., Davis C., Kotsonis P.* N-Formyl peptide receptor subtypes in human neutrophils activate L-plastin phosphorylation through different signal transduction intermediates // *Biochem. J.* — 2004. — Vol. 377. — P. 469–477.
- Pollak L., Hanoch T., Rabey M.J., Seger R.* Infectious inflammation of the CNS involves activation of mitogen-activated protein kinase and AKT proteins in CSF in humans // *Neurol. Sci.* — 2005. — Vol. 26. — P. 324–329.
- Protonotariou E., Malamitsi-Puchner A., Rizos D. et al.* Alterations in Th1/Th2 cytokine concentrations in early neonatal life // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* — 2003. — Vol. 14(6). — P. 407–410.
- Quenby S., Farquharson R.* Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage // *Reprod Biomed Online*. — 2006. — Vol. 13. — P. 24–28.
- Raad H., Paclat M.H., Boussetta T. et al.* Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47ph-ox // *FASEB J.* — 2009. — Vol. 23(4). — P. 1011–1022.
- Rajmakers M.T., Burton G.J., Jauniaux E. et al.* Placental NAD(P)H oxidase mediated superoxide generation in early pregnancy // *Placenta*. — 2006. — Vol. 27. — P. 158–163.
- Rajmakers M.T., Roes E.M., Poston L. et al.* The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women

- with pre-eclampsia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2008. — Vol. 138(1). — P. 39–44.
- Raulet D.H., Vance R.E.* Self-tolerance of natural killer cells // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 520–531.
- Reddy A., Zhong X.Y., Rusterholz C. et al.* The effect of labour and placental separation on the shedding of syncytiotrophoblast microparticles, cell-free DNA and mRNA in normal pregnancy and pre-eclampsia // *Placenta.* — 2008. — Vol. 29(11). — P. 942–949.
- Richani K., Soto E., Romero R. et al.* Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* — 2005. — Vol. 17. — P. 239–245.
- Riley J.K., Yokoyama W.M.* NK Cell Tolerance and the Maternal-Fetal Interface // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2008. — Vol. 59. — P. 371–387
- Roes E.M., Hendriks J.C., Raijmakers M.T. et al.* A longitudinal study of antioxidant status during uncomplicated and hypertensive pregnancies // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 2006. — Vol. 85(2). — P. 148–155.
- Robillard P.-Y., Dekker G., Chaoua G., Hulsey T.C.* Etiology of preeclampsia: maternal vascular predisposition and couple disease — mutual exclusion or complementarity? // *JRI.* — 2007. — Vol. 76. — P. 1–7.
- Ruder E.H., Hartman T.J., Blumberg J., Goldman M.B.* Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility // *Hum. Reprod. Update.* — 2008. — Vol. 14. — P. 345–357.
- Rumbold A., Duley L., Crowther C.A., Haslam R.R.* Antioxidants for preventing pre-eclampsia // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* — 2008. — Issue 1. — Art. No.: CD004227. DOI: 10.1002/14651858.CD004227.pub3.
- Saito S., Shima T., Nakashima A. et al.* What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2007. — Vol. 24(9). — P. 379–386.
- Sallmyr A., Miller A., Gabdoulkhakova A. et al.* Expression of DNA-dependent protein kinase in human granulocytes // *Cell. Res.* — 2004. — Vol. 14. — P. 331–340.
- Sankaralingam S., Arenas I.A., Lalu M.M., Davidge S.T.* Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction // *Expert. Rev. Mol. Med.* — 2006. — Vol. 8(3). — P. 1–20.
- Sankaralingam S., Xu Y., Sawamura T., Davidge S.T.* Increased lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in the maternal vasculature of women with preeclampsia: role for peroxynitrite // *Hypertension.* — 2009. — Vol. 53(2). — P. 270–277.

- Sargent I.L., Borzychowski A.M., Redman C.W.* NK cells and human pregnancy—an inflammatory view // *Trends Immunol.* — 2006. — Vol. 27. — P. 399–404.
- Sasaki Y., Darmochwal-Kolarz D., Suzuki D. et al.* Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia // *Clin. Exp. Immunol.* — 2007. — Vol. 149. — P. 139–145.
- Schulpis K.H., Lazaropoulou C., Vlachos G.D. et al.* Maternal-neonatal 8-hydroxy-deoxyguanosine serum concentrations as an index of DNA oxidation in association with the mode of labour and delivery // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 2007. — Vol. 86(3). — P. 320–326.
- Schultz C., Rott C., Temming P. et al.* Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants // *Pediatr. Res.* — 2002. — Vol. 51(3). — P. 317–322.
- Segal A.W.* How neutrophils kill microbes // *Annu. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 197–223.
- Shah T.J., Walsh S.W.* Activation of NF-kappaB and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2007. — Vol. 196(1):48. e1–8.
- Steinman R.M.* Dendritic cells: versatile controllers of the immune system // *Nat. Med.* — 2007. — Vol. 13. — P. 1155–1159.
- Sugino N.* The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function // *Placenta.* — 2007. — Vol. 28. — P. 133–136.
- Sziller I., Babula O., Hupuczi P. et al.* Mannose-binding lectin (MBL) codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome and pre-eclampsia-associated intrauterine growth restriction // *Mol. Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 13. — P. 281–285.
- Taura M., Miyano K., Minakami R. et al.* A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in activation of the phagocyte NADPH oxidase // *Biochem. J.* — 2009. — Vol. 419(2). — P. 329–338.
- Than N.G., Abdul Rahman O., Magenheimer R. et al.* Placental protein 3 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome // *Virchows Arch.* — 2008. — Vol. 453(4). — P. 387–400.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L.* Reactive oxygen species in cell signalling // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* — 2000. — Vol. 279. — P. 1005–1028.

- Tirouvanziam R., Khazaal I., N'Sondé V. et al.* Ex vivo development of functional human lymph node and bronchus-associated lymphoid tissue // *Blood*. — 2002. — Vol. 99(7). — P. 2483–2489.
- Tjoa M.-L., Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O. et al.* Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA // *Am J Pathol*. — 2006. — Vol. 169. — P. 400–404.
- Trachootam D., Lu W., Ogasawara M.A. et al.* Redox regulation of cell survival // *Antiox. Redox. Signal*. — 2008. — Vol. 10. — P. 1343–1374.
- Ueyama T., Tatsuno T., Kawasaki T.* A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox // *Mol. Biol. Cell*. — 2007. — Vol. 18. — P. 441–454.
- Valsamakis G., Kanaka-Gantenbein C., Malamitsi-Puchner A., Mastorakos G.* Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome // *Ann. N Y Acad. Sci*. — 2006. — Vol. 1092. — P. 138–147.
- Vaughan J.E., Walsh S.W., Ford G.D.* Thromboxane mediates neutrophil superoxide production in pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol*. — 2006. — Vol. 195(5). — P. 1415–1420.
- Venkatesha S., Toporsian M., Lam C. et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia // *Nat. Med*. — 2006. — Vol. 12. — P. 642–649.
- Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism // *Cell. Mol. Life Sci*. — 2002. — Vol. 59. — P. 1428–1459.
- Viswanathan A., Painter R.G., Lanson N.A.Jr., Wang G.* Functional expression of N-formyl peptide receptors in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. — 2007. — Vol. 25(5). — P. 1263–1269.
- Walsh S.W.* Obesity: a risk factor for preeclampsia // *Trends Endocrinol. Metab*. — 2007. — Vol. 18(10). — P. 365–370.
- Wang C.C., Yim K.W., Poon T.C. et al.* Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia // *Clin. Chem*. — 2007. — Vol. 53. — P. 42–52.
- Wang H., Ogawa M., Wood J.R. et al.* Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes // *Hum. Mol. Genet*. — 2008. — Vol. 17(8). — P. 1087–1096.
- Weinberger B., Nisar S., Anwar M., Ostfeld B., Hegyi T.* Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome // *Pediatr. Int*. — 2006. — Vol. 48(5). — P. 479–483.

Xiao Q., Luo Z., Pepe A.E. et al. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂ // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2009. — Vol. 296(4). — P. 711–723.

Yan S.R., Byers D.M., Bortolussi R. Role of protein tyrosine kinase p53/56lyn in diminished lipopolysaccharide priming of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide production in human newborn neutrophils // *Infect. Immun.* — 2004. — Vol. 72. — P. 6455–6462.

Yektaei-Karin E., Moshfegh A., Lundahl J. et al. The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn // *Pediatr. Allergy Immunol.* — 2007. — Vol. 18(8). — P. 643–651.

Yue G., Shi G., Azaro M.A. et al. Lipopolysaccharide (LPS) potentiates hydrogen peroxide toxicity in T98G astrocytoma cells by suppression of anti-oxidative and growth factor gene expression // *BMC Genomics.* — 2008, 9:608 doi:10.1186/1471-2164-9-608. (Электронная версия BioMed Central).

Yokoyama W.M., Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 214. — P. 143–154.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Маркеры и тест-системы окислительного стресса с примерами клинического приложения к репродуктивным процессам

Группы маркеров	Вещества	Методы лабораторного определения	Проявление в физиологических и патологических процессах	Ссылки
Липидные	Метилированные алканы (ВМАС): ундекан, 6-метилтридекан, 2-метилпентаан и др.	Газовая хроматография и масс-спектрометрия	Присутствие в выдыхаемом воздухе при преэклампсии	[16]
	4-Гидрокси-2-ноненаль (HNE)	Иммуногистохимия	Высокая экспрессия HNE, как и МДА, в плацентах в I триместре беременности и после своевременных нормальных родов. Тенденция к возрастанию экспрессии в амниотических эпителиальных клетках с переходом от незрелого фенотипа к зрелому	[23]
	4-Малоновый диальдегид (МДА)	Проспективное исследование	На ранних сроках беременности концентрация МДА в плазме крови положительно коррелирует с риском последующей преэклампсии независимо от концентрации липидов	[24]
		ТИФА	Повышенный уровень в плаценте родильниц с гестозом	[13]
		Спектрофотометрия Реакция с тиобарбитуровой кислотой	Значительное повышение во II и III триместрах и во время родов. У новорожденных уровень ниже, чем у матерей	[14]
	8-Изопростан (8-изопроستاглендин F2a) изопростаны	ТИФА, метод ЭПР, газ/масс спектрометрия	Значительное повышение в периферической крови при преэклампсии	[9]
			Повышение в моче является указанием на ОС в ранние сроки беременности (12 нед) и на риск развития преэклампсии	[20]

Группы маркеров	Вещества	Методы лабораторного определения	Проявление в физиологических и патологических процессах	Ссылки
	Липидные гидропероксиды	ТИФА Флуоресцентные зонды (дигидрофлуоресцеиндиацетат — DCFDA)	Содержание увеличено в пуловинной крови детей женщин с преэклампсией	[11]
	Реактивные субстанции тиробарбитуровой кислоты	Тест-система TBARS (ThioBarbituric Acid-Reactive Substances)	Значительное увеличение в плазме при артериальной гипертензии, преэклампсии и сахарном диабете при беременности	[17]
			Значительное увеличение при нормальной беременности, максимальное — во II триместре	[4]
			Содержание увеличено в пуловинной крови детей у женщин с преэклампсией	[6]
Белковые	Карбонилы белков	ВЭЖХ, масс-спектрометрия, изоэлектрическая фокусировка, ТИФА	Содержание увеличено в пуловинной крови детей женщин с преэклампсией	[11]
	Гомоцистеин	Имуноферментный анализ, ВЭЖХ, масс-спектрометрия	Гипергомоцистеинемия связана с заболеваниями сосудов. При нормальной беременности концентрация падает по мере увеличения срока гестации. Нарушение метаболизма гомоцистеина у матери или плода приводит к дефектам развития нервной системы, васкулопатии, преэклампсии и эклампсии, спонтанному аборту и рецидивам потери беременности	[8]
	Отношение концентраций свободных и окисленных тиолов: цистеин, гомоцистеин и цистеинилглицин. Оценка ОС в реальном масштабе времени	ВЭЖХ	В предродовом и послеродовом периоде у женщин с преэклампсией отношение концентраций свободного и окисленного гомоцистеина ниже, чем у женщин с нормальным артериальным давлением	[21]
	Белки теплового шока (БТШ 70 и др.)	Имуногистохимия, ТИФА	В ворсинчатой ткани плаценты женщин с преэклампсией и внутриутробной задержкой роста плода выявляют локальные изменения интенсивности окрашивания в эндотелии сосудов	[10]

Продолжение таблицы

Углеводные и липидные модификации белков	Гликозилированные окисленные конечные продукты (карбосиметиллизин, пентозидин, МДА-лизин и др.)	Тест-система AGEs (Advanced Glycated End Products) Иммуногистохимия ТИФА	[19]
	Эндогенный растворимый рецептор гликозилированных окисленных конечных продуктов (esRAGEs)	ТИФА	[6]
Нуклеотидные	8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine)	ВЭЖХ/масс-спектрометрия ЭПР ТИФА Комета-тест	[20]
		Наиболее высокий уровень обнаружен в плазме крови женщин при неотложном КС и при затянувшихся родах в послеродовой период. В пуловинной крови уровень низкий вне зависимости от типа родоразрешения	[25]
		Уровень значительно понижается в моче маловесных детей при вскармливании грудным молоком, что указывает на его антиоксидантные свойства	[26]
Активные формы кислорода	Пероксид водорода H_2O_2	Хемилиюминесценция, флуоресцентные зонды (DCFDA, дигидроордамин-123 — DHR-123)	[12]
		Уровни H_2O_2 в крови увеличиваются и коррелируют с высоким уровнем хорионического гонадотропина (hCG) при преэклампсии. H_2O_2 оказывает двойное действие в плаценте: цитотоксический медиатор и сигнальная молекула, индуцирующая секрецию hCG	[2]
		Определена обратная корреляция между уровнями H_2O_2 и NO в крови и в плаценте на ранних (10–15 нед) и поздних (37–40 нед) сроках беременности. Предлагается использовать оба параметра для прогнозирования преэклампсии	[18]
	Метаболиты гидропероксида	Тест-система D-ROM (Diagon reactive oxygen Metabolites) на основе реакции Фентона Колориметрический метод	
		В пуловинной крови в общей популяции новорожденных значения ниже, чем в периферической крови здоровых взрослых. У новорожденных девочек значения ниже, чем у мальчиков, т.е. женский пол менее подвержен ОС в первый момент жизни	

Группы маркеров	Вещества	Методы лабораторного определения	Проявление в физиологических и патологических процессах	Ссылки
Продукты катаболизма	Мочевая кислота	Спектрофотометрия ВЭЖХ	Гиперуриемия — раннее клиническое проявление преэклампсии. Мочевая кислота подавляет транспорт аминокислот в плаценте, что ведет к задержке роста плода. Действие частично обратимо антиоксидантами	[3]
Антиоксидантная емкость и маркеры антиоксидантного статуса				
Антиоксидантный статус	Общая антиоксидантная емкость плазмы (оценивают по способности плазмы восстанавливать оксиды железа)	Тест-система FRAP (Ferric reducing ability of plasma)	Слабое повышение при преэклампсии	[9]
			Повышение у недоношенных новорожденных и значительное снижение у новорожденных от матерей с ослабленной функцией плаценты, указание на склонность к заболеваниям с ОС	[28]
Ферментные антиоксидантные системы	Общий антиоксидантный статус	Тест-система TAS (Total antioxidant status)	Значительное понижение в пуловинной крови детей у женщин с преэклампсией	[11]
			Наиболее низкий уровень обнаружен в плазме крови женщин при неотложном КС и при затянувшихся родах в послеродовый период	[25]
	Супероксиддисмутаза (СОД)	Спектральные	Повышение активности в эритроцитах при беременности	[4]
			Понижение активности при преэклампсии	[13]
Каталаза	Спектральные	Понижение экспрессии мРНК Cu,Zn-SOD в преэкламптической плаценте and GSH-Px	Понижение экспрессии мРНК Cu,Zn-SOD в преэкламптической плаценте and GSH-Px	[27]
		Двумерный протеомный анализ, ВЭЖХ/масс-спектрометрия	Экспрессия Cu,Zn-SOD в цервико-вагинальной жидкости при спонтанных родах значительно ниже, чем во II триместре	[5]
			Активность повышена в преэкламптической плаценте	[27]

Окончание таблицы

Ферментные антиоксидантные системы	Глутатион/глутатионпероксидаза (ГП)/селен	Спектрофотометрические	Понижение содержания глутатиона при преэклампсии	[13]
		Атомная абсорбционная спектроскопия (селен)	При физиологической беременности содержание селена и активности ГП в крови ниже, чем у небеременных женщин (минимальный уровень при родах). Показатели еще более низкие у женщин и их детей при преэклампсии. В преэкламптической плаценте — низкая активность ГП	[14, 15, 27]
Неферментные антиоксиданты	Тиоредоксин/тиоредоксинредуктаза	ПЦР	Понижение экспрессии мРНК глутатионпероксидазы в преэкламптической плаценте	[27]
	Пероксиредоксин 2	Двумерный протеймный анализ, ВЭЖХ/масс-спектрометрия	Экспрессия тиоредоксина в цервико-вагинальной жидкости за 1–2 дня до и во время спонтанных родов более низкая, чем во II триместре	[5]
			Экспрессия в цервико-вагинальной жидкости в 2 раза выше во время спонтанных родов, чем во II триместре	
	Аплатноин	Спектральные	У беременных женщин показан увеличенный уровень в трофообласте и сыловотке крови. Концентрация уменьшается в плаценте и увеличивается в сыворотке крови при развитии плацентарной недостаточности. Снижение уровня обнаружено при неразвивающейся беременности и поздних самопроизвольных абортах	[1]
Таурин, гипотаурин	Спектральные	Рассматриваются как компоненты антиоксидантной защиты в генитальных жидкостях, необходимые для развития гамет и эмбриона	[7]	
Витамин С		Колориметрия	Содержание снижено в пуловинной крови детей у женщин с преэклампсией	[11]
			Пониженная концентрация в плазме крови способствует задержке роста плода у тучных первородящих женщин	[22]
α-Токоферол и α-ТТР		Иммуногистохимия, ВЭЖХ	Уровень в плаценте понижен при преэклампсии	[27]
			Присутствие α-ТТР в плаценте после своевременных родов, а также в клетках вневорсинчатого трофообласта, синцитиотрофообласта и амниотическом эпителии в I триместре беременности указывает на антиоксидантную роль α-токоферола в этот период	[23]

Примечания

H_2O_2 — пероксид водорода;
hCG — хорионический гонадотропин;
HNE — 4-гидрокси-2-ноненаль;
NO — оксид азота;
 α -ТТР — α -токоферол переносящий белок;
АФК — активные формы кислорода;
БТШ — белки теплового шока;
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГП — глутатионпероксидаза;
КС — кесарево сечение;
МДА — 4-малоновый диальдегид;
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота;
ОС — оксидативный стресс;
ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени;
СОД — супероксиддисмутаза;
ТИФА — твердофазный иммуноферментный анализ;
ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

Ссылки

1. Степанов А.В., Шкурят Т.П., Микашинович З.И., Крыжановская И.О., Богачева М.А., Ломтева С.В., Прокофьев В.П., Гуськов Е.П. Биологические функции аллантаина. Усп. Акад. Наук. Биол. 2006 5:541-5.
2. Aris A., Benali S., Ouellet A., Moutquin J.M., Leblanc S. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta*. 2009 30(4):342-7.
3. Bainbridge S.A., von Versen-Höyneck F., Roberts J.M. Uric acid inhibits placental system A amino acid uptake. *Placenta*. 2009 30(2):195.
4. Casanueva E., Viteri F.E. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *J. Nutr.* 2003 133: 1700S–1708S.
5. Di Quinzio M.K., Georgiou H.M., Holdsworth-Carson S.J., Ayhan M., Heng Y.J., Walker S.P., Rice G.E., Permezel M. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid displays differential protein expression in association with labor onset at term. *J Proteome Res.* 2008 7(5):1916-21.
6. Fasshauer M., Seeger J., Waldeyer T., Schrey S., Ebert T., Lossner U., Blüher M., Stumvoll M., Faber R., Stepan H. Endogenous soluble receptor for advanced glycation endproducts is increased in preeclampsia. *J Hypertens.* 2008 26(9):1824-8.
7. Guérin P., El Mouatassim S., Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001 7(2):175-89.
8. Guven M.A., Coskun A., Ertas I.E., Aral M., Zencirci B., Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy.* 2009 28(2):190-200.

9. Harsem N.K., Braekke K., Staff A.C. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 128(1-2):209-15.
10. Hnat M.D., Meadows J.W., Brockman D.E., Pitzer B., Lyall F., Myatt L. Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 193(3 Pt 1):836-40.
11. Howlader M.Z., Parveen S., Tamanna S., Khan T.A., Begum F. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Neonates Born to Pre-eclamptic Mother. *J Trop Pediatr.* 2009 55(6):363-7.
12. Kharfi A.A., Leblanc S., Ouellet A., Moutquin J.M. Dual action of H₂O₂ on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia. *Clin Biochem.* 2007 40(1-2):94-7.
13. Madazli R., Benian A., Aydin S. et al. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaec* 2002; 22: 477—80.
14. Mihailović M., Cvetković M., Ljubić A., Kosanović M., Nedeljković S., Jovanović I., Pesut O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res.* 2000 73(1):47-54.
15. Mistry H.D., Wilson V., Ramsay M.M., Symonds M.E., Broughton Pipkin F. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. *Hypertension.* 2008 52(5):881-8.
16. Moretti M., Phillips M., Abouzeid A., Cataneo R.N., Greenberg J. Increased Breath Markers of Oxidative Stress in Normal Pregnancy and in Preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004 191: 1184-90.
17. Orhan H., Onderoglu L., Yücel A., Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003 267(4):189-95.
18. Parmigiani S., Payer C., Massari A., Bussolati G., Bevilacqua G. Normal values of reactive oxygen metabolites on the cord-blood of full-term infants with a colorimetric method. *Acta Biomed Ateneo Parmense.* 2000 71(1-2):59-64.
19. Pertyńska-Marczewska M., Głowacka E., Sobczak M., Cypryk K., Wilczyński J. Glycation endproducts, soluble receptor for advanced glycation endproducts and cytokines in diabetic and non-diabetic pregnancies. *Am J Reprod Immunol.* 2009 61(2):175-82.
20. Peter Stein T., Scholl T.O., Schluter M.D., Leskiw M.J., Chen X., Spur B.W., Rodriguez A. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res.* 2008 42(10):841-8.
21. Rajmakers M.T., Roes E.M., Poston L., Steegers E.A., Peters W.H. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 138(1):39-44.
22. Rajasingam D., Seed P.T., Briley A.L., Shennan A.H., Poston L. A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 200(4):395.e1-9.

23. Rotzoll D.E., Scherling R., Ettl R., Stepan H., Horn L.C., Pöschl J.M. Immunohistochemical localization of alpha-tocopherol transfer protein and lipoperoxidation products in human first-trimester and term placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 140(2):183-91.
24. Rudra C.B., Qiu C., David R.M., Bralley J.A., Walsh S.W., Williams M.A. A prospective study of early-pregnancy plasma malondialdehyde concentration and risk of preeclampsia. *Clin Biochem.* 2006 39(7):722-6.
25. Schulpis K.H., Lazaropoulou C., Vlachos G.D., Partsinevelos G.A., Michalakakou K., Gavriili S., Gounaris A., Antsaklis A., Papassotiriou I. Maternal-neonatal 8-hydroxy-deoxyguanosine serum concentrations as an index of DNA oxidation in association with the mode of labour and delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007 86(3):320-6.
26. Shoji H., Shimizu T., Shinohara K., Oguchi S., Shiga S., Yamashiro Y. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004 89(2):F136-8.
27. Wang Y., Walsh S.W. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J Soc Gynecol Investig.* 1996 3(4):179-84.
28. Wijnberger L.D., Krediet T.G., Visser G.H., van Bel F., Egberts J. Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early Hum Dev.* 2003 71(2):111-6.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

- Аборт спонтанный 88
- Адаптация постнатальная 218
- Адгезия лейкоцитов 149
- Аддукт 14
 - Амароди 14
 - Михаэля 15
- Активная форма кислорода 7
- Ангиопэтин 56
- Анион-радикал супероксидный 136

Антикоагулянт волчаночный 113

Антиоксидант 136

- неферментный 47

Антитела новорожденных 166

Антитело аутоиммунное 85

Антителообразование у плода 185

Апоптоз 14, 54

Аппендикс 178

Артрит ревматоидный 14

Аутоантитело 85

Аутоиммунитет 96, 112

Б

Баланс оксидативный при беременности 44

Белок

- NOX 39
- ГТФ-связывающий 16, 32, 36
- теплового шока 75, 107

Беременность 50, 53, 59

- осложнение течения 87

Бляшка пейерова 178

В

Взрыв респираторный 27, 29

Вирус

- простого герпеса 106, 172
- Эпштейна-Барр 106, 215

Водорода пероксид 8

Волчанка системная красная 96

Волчаночный антикоагулянт 113

Выкидыш

- привычный 87, 88
- спонтанный 82, 86, 87
- угрожающий 91

Г

Генерация активных форм кислорода 27

Гибель клеток запрограммированная 24, 54

Гидроксильный радикал 9

Гипотеза несовершенной иммуногенетической адаптации 74

Гипотрофия плода внутриутробная 121

Главный комплекс гистосовместимости 52

Глутаредоксин 18

Глутатионпероксидаза 31, 57

Гонадотропин человека хорионический 56, 116

Гормон тиреотропный 123

Гранулоцитопоз 171

Д

Децидуализация 52, 55, 83

Диальдегид малоновый 14, 160

Дидрогестерон 93

Дисплазия бронхолегочная 185

Дистресс-синдром респираторный 126, 225

Дисфункция плацентарная 143

- Е**
Естественный киллер 51, 97
- З**
Задержка роста плода 86
Зона взаимодействия матери и плода 51
- И**
Иммунитет
– В-клеточный 214
– врожденный 50
– новорожденных 187, 188
– Т-клеточный 158
Иммунотерапии формы 127
Иммуноцитотерапия 125
Импантация 51
Инвазия 56, 61
Инволюция матки 124
Ингибитор белков апоптоза 27
- К**
Кардиолипидин 113
Каскад МАРК 17, 198
Каспаза 24
Киллер
– лимфокин-активированный 90
Кислород синглетный 8
Кислота
– гипохлорная 8, 9
– сульфеновая 13
Клетка
– В 129, 131
– В пуповинной крови 164
– НК 51, 53, 55, 67, 192, 203
– Т 73, 129
– Т пуповинной крови 159
– $\gamma\delta$ T 75
– антиген-презентирующая 70
– дендритная 53
– децидуальная 57, 60
– естественная киллерная 51
– стволовая кроветворная 55, 170
– фагоцитарная 61
– Хофбауэра 34
- Комплекс
– IкВ киназный 20
Комплемент 36, 48, 62, 186
Конверсия спиральных артерий недостаточная 53, 102
Костный мозг 170
Кроветворение в печени 171
- Л**
Легкие плода 44, 126
Лейкоцит 137
– новорожденных 169
– полиморфноядерный 66, 78, 192
Лектин, связывающий маннозу 105
Лимфопоэз у плода 173
Лимфоцит
– В 177, 178
– Т 174, 178
– в легких плода 181
Лимфоэпителий 182
Ловушка для свободных радикалов 155
- М**
Макрофаг 20, 42, 45, 61, 63, 133, 139
Мертворождение 87
Металлопротеиназа-1 матриксная 158
Микрочастица сцинтиотрофобласта 159
Миндалина 178
Митохондрия 10, 136
Моноцит 20, 61, 152
– пуповинной крови 189

Н

- Нарушение плацентации 137
- Недостаточная конверсия спиральных артерий 137
- Недостаточность
 - истмико-цервикальная 87
 - плацентарная 86, 120, 127
- Нейтрофил 14, 23, 28, 128, 207

О

- Овуляция 52
- Озон 8
- Окисление
 - аминокислот и полипептидов 15
 - липидов 14

Оксидаза NADPH 29, 32

Опсонизация 63

Органы иммунной системы 130

Основание Шиффа 14

П

- Пейерова бляшка 178
- Перегруппировка Амароди 14
- Период послеродовый 47, 124
- Пероксид водорода 8
- Пероксинитрит 8
- Пероксиредоксин 11
- Перфузия плацентарная прерывистая 139
- Печень 170
- Плацента 42
- Плод 42
- Потеря беременности первичная идиопатическая 82, 113
- Презклампсия 86, 96, 113, 119, 134, 146, 151
 - пути развития 99
- Прогестерон 52, 71

Р

- Радикал свободный 8
- Реакция
 - трансплантат против хозяина 160
 - Фентона 30
 - Хабера-Вейсса 30
- Реаранжировка генов 174
- Редокс-регуляция 16
- Рекомбинация 23
- Репарация 23
- Респираторный взрыв 27, 29, 48
- Рецептор Toll-подобный 65, 68, 99, 188
- Роды 140, 190, 221
- Роды преждевременные 86, 107, 108

С

- Селезенка 42, 175
 - плода 44, 175
- Семейство белков NOX 39
- Сепсис неонатальный 110
- Синглетный кислород 8
- Синдром
 - X 101
 - антикардиолипиновый 115
 - антифосфолипидный 96, 101, 113
 - внезапной смерти 225
 - гемолитическо-уремический 96
 - задержки развития плода 133
 - ишемии-реперфузии 148, 166
 - метаболический 156
 - нейродегенеративный 14
- Система
 - калликреин-кининовая 117
 - комплемента 102
 - мать-плацента-плод 85, 127
 - фагоцитарная 61
- Система антиоксидантная 7

Стресс

- окислительный 7, 13, 153
- окислительный плацентарный 134

Супероксиддисмутаза 10

Супероксидный анион-радикал 8, 29

Синцитиотрофобласта 42, 55, 138
микрочастица 159

Т

Теория полуаллогенная 50, 64

Теория развития свободнорадикальная 58

Тимоцит 173

Тимус 170

Тиоредоксин 10

Ткань

- децидуальная 66, 74
- лимфоидная бронхоассоциированная 181

Токсикоз беременных 111

Толерантность иммунологическая 76

Тромбоз маточно-плацентарных сосудов 137

Трофобласт 42, 45, 51, 55, 109

У

Удаление активных форм кислорода 7

Узел лимфатический 170, 176, 177

Ф

Фагоцит 27, 32

Фагоцитоз 45, 61

Фактор

- p40^{phox} 34
- p47^{phox} 34
- p67^{phox} 34
- аллоиммунный 85
- апоптоз-индуцирующий 26
- аутоиммунный 85

– блокирующий прогестерон-индуцированный 92

– роста гепатоцитарный 103

– роста плацентарный 102

– роста при имплантации 40

– роста сосудистого эндотелия 43

– роста эпидермальный 111

– ядерный кВ 20

Феномен

– ишемии-реперфузии 106, 148, 166

– периферия-центр 138

– праймирования 198

Форма кислорода активная 7

Фосфатаза фосфотирозиновая цитозольная 144

Фосфатидилинозит-3-киназа 19

Х

Хемотаксис лейкоцитов 193

Хориоамнионит 108, 185

Ц

Цитотоксичность

– кислородзависимая 196

– клеточная антителозависимая 67, 148

Цитотрофобласт вневорсинчатый 55, 86, 97

Цитохром

– b₅₅₈ 33

– С 38

Э

Эндометрий 51

Эндометрит

– послеродовой 166, 168

– хронический 93

Энцефалопатия гипоксически-ишемическая 225