

УДК: 618.39-021.3: 571.27

## ИММУННЫЕ АСПЕКТЫ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ РАННИХ СРОКОВ: РОЛЬ CD16+

Лебедева О. П., Жукова И. О., Ивашова О. Н., Пахомов С. П.

Кафедра акушерства и гинекологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, Россия

**Для корреспонденции:** Лебедева Ольга Петровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,  
E-mail: safonova2@yandex.ru

**For correspondence:** Olga P. Lebedeva, MD, professor of the department of obstetrics and gynecology, Belgorod National Research University, E-mail: safonova2@yandex.ru

### Information about authors:

Lebedeva O. P., <http://orcid.org/0000-0002-7188-6780>

Zhukova I. O., <http://orcid.org/0000-0002-8393-2852>

Ivashova O. N., <http://orcid.org/0000-0003-1480-2234>

Pakhomov S. P., <http://orcid.org/0000-0001-8113-4788>

### РЕЗЮМЕ

У 22 пациенток с неразвивающейся беременностью, 22 пациенток с самопроизвольным выкидышем и 57 пациенток контрольной группы (медицинский аборт) на сроке 6–10 недель изучена экспрессия мРНК CD16 (FcγRIII). Материалом для исследования являлась ткань эндометрия, полученная при выскабливании полости матки. Выявлено достоверное снижение экспрессии мРНК CD16 (FcγRIII) как у пациенток с неразвивающейся беременностью, так и с самопроизвольными выкидышами ранних сроков. Данные изменения могут играть роль в нарушении баланса Th1/Th2, способствуя прерыванию беременности.

**Ключевые слова:** невынашивание, самопроизвольный выкидыш, неразвивающаяся беременность, CD16, Fc-рецептор III, моноциты, макрофаги, натуральные киллеры, эндометрий, местный иммунитет.

### IMMUNE ASPECTS OF EARLY STAGE MISCARRIAGES: THE ROLE OF CD16+

Lebedeva O. P., Zhukova I. O., Ivashova O. N., Pakhomov S. P.

Department of obstetrics and gynecology, Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

### SUMMARY

22 patients with missed abortion, 22 – with miscarriages and 57 patients from control group were studied in gestational age of 6–10 weeks. Expression of CD16 (FcγRIII) mRNA was studied by quantitative PCR. Significant decrease of CD16 (FcγRIII) mRNA expression was discovered in patients with missed abortion and spontaneous miscarriages compared with control group during early stages of pregnancy. These changes can contribute into disturbance of Th1/Th2 balance, which may lead to miscarriage.

**Key words:** miscarriages, spontaneous abortion, missed abortion, CD16, Fc-receptor III, monocytes, macrophages, natural killers, endometrium, local immunity.

Среди причин невынашивания беременности одно из лидирующих мест занимают воспалительные заболевания [1, 2]. В 20–50% случаев причину самопроизвольного выкидыша установить не удается [3]. Так как отторжение плодного яйца обусловлено иммунными механизмами, их изучение может способствовать более ясному пониманию патогенеза невынашивания беременности ранних сроков. Тем не менее, в настоящее время большинство иммунных механизмов, регулирующих беременность, изучены недостаточно [4].

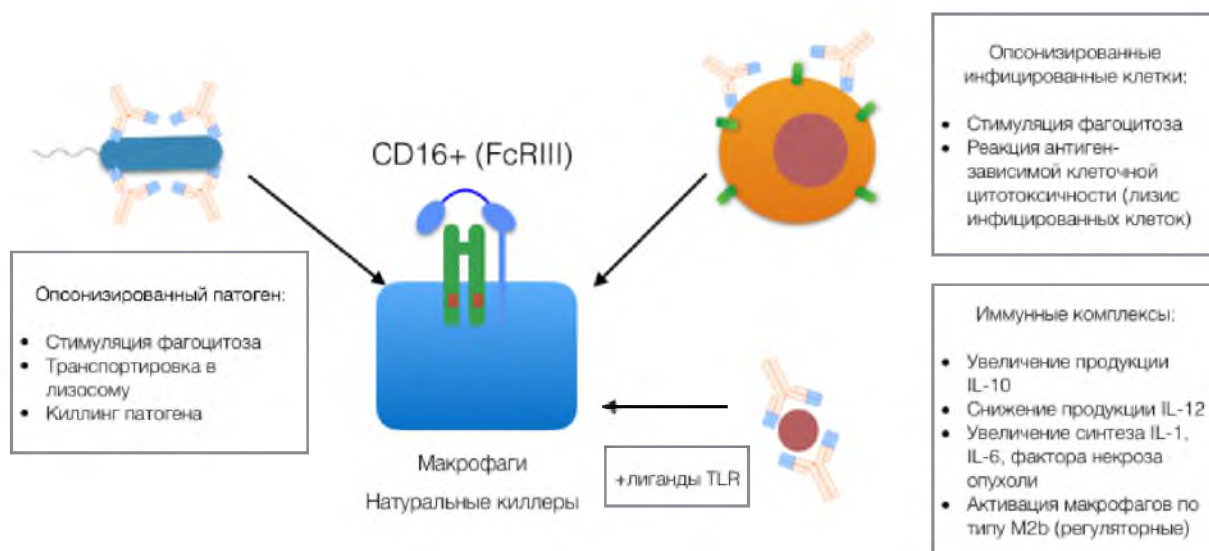
Известно, что клетки врожденного (неспецифического) иммунитета первыми осуществляют распознавание чужеродных микроорганизмов, а также осуществляют презентацию антигенов клеткам адаптивного (приобретенного) иммунитета.

В свою очередь, система адаптивного иммунитета осуществляет регуляцию врожденного иммунитета путем выработки цитокинов (Т-лимфоциты) или продукции антител (В-лимфоциты). Большинство клеток врожденного иммунитета имеет на своей поверхности Fc-рецепторы, распознающие Fc-фрагменты иммуноглобулинов. Киллинг инфицированных клеток нейтрофилами и натуральными киллерами (NK) осуществляется после опсонизации иммуноглобулином G (IgG) – процесс, который носит название антителозависимой клеточной цитотоксичности [5].

Рецептор CD16 (FcγRIII) расположен на натуральных киллерах, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах. Он способен связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG),

который, в свою очередь, связан с антигеном (комплекс антиген-антитело). Это связывание усиливает фагоцитоз, переваривание патогена

в лизосомах, реакции антиген-зависимой цитотоксичности (лизис инфицированных клеток) (рис.) [5].



**Рис. Эффекты активации CD16 (FcγRIII) на натуральных киллерах и макрофагах**  
(по Guilliams W. et al., 2014).

Целью работы было оценить особенности экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) CD16 (FcγRIII) в эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами ранних сроков.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были обследованы 22 женщины с неразвивающейся беременностью (I группа) и 22 – с самопроизвольными выкидышами (II группа) на сроке 6–10 недель. Контрольную (III) группу составили 57 пациенток, которым был произведен медицинский аборт на том же сроке беременности.

Сбор материала производили с помощью выскабливания полости матки. Полученную ткань эндометрия помещали в консервирующий раствор RNAlater («Ambion», Соединённые Штаты Америки (США)). Выделение РНК и обратную транскрипцию проводили по ранее описанной методике [6]. Экспрессию мРНК CD16 (FcγRIII) определяли

с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно рекомендациям MIQE [7]. Для подбора праймеров генов использовали базу данных нуклеотидов BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Для количественной ПЦР в режиме реального времени применяли qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия). В качестве генов-нормировщиков были выбраны стабильно экспрессируемые гены – пептидилпролилизомераза А (PPIA) и b-актин. Последовательность праймеров и температура отжига указаны в таблице.

Для амплификации использовали амплификатор «CFX96» («Biorad», США). Полученные результаты выражали в относительных единицах (relative units), вычисляя их по формуле:

$$R = 2^{-\frac{(Cq_{target} - (Cq_{ref1} + Cq_{ref2})/2)}{}}$$

где R – нормализованная экспрессия мРНК исследованных генов, Cq target – Cq исследованного гена, Cq ref – Cq генов-нормировщиков [8].

Таблица

**Последовательность праймеров для определения экспрессии мРНК CD16 методом количественной ПЦР**

№ п/п	Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Температура отжига, °С
	CD16	CCAG ACAА ACCT CTCC ACCC	TTTACTCCCAACAAGCCCC	55
	PPIA	CCGC CGAG GAAA ACCG TGTA CT	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT	64
	b-актин	CAGG CACC AGGG CGTG ATGG	GATGGAGGGGCCGACTCGT	64

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» лицензия № АХХR505С705306FAN12 (Statsoft, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Результаты представляли как медиану (нижний квартиль; верхний квартиль), достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Было установлено, что у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК CD16 в эндометрии была достоверно ниже, чем в группе контроля.

Так, у пациенток с неразвивающейся беременностью экспрессия мРНК CD16 в эндометрии была в 2 раза ниже (837,53 (313,00; 1082,39)), чем у пациенток с прогрессирующей беременностью (1692,57 (1243,34; 2759,13)) ( $p < 0,00001$ ).

У пациенток с самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК CD16 в эндометрии была в 1,6 раза ниже (1077 (510,23; 1541,37)), чем в контрольной группе (1692,57 (1243,34; 2759,13)) ( $p < 0,001$ ).

Различия в экспрессии мРНК CD16 в группе пациенток с неразвивающейся беременностью и в группе с самопроизвольными выкидышами не были достоверными ( $p > 0,05$ ).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

По-видимому, основными клетками в эндометрии, экспрессирующими CD16, являются моноциты и макрофаги. Маточные натуральные киллеры, в отличие от натуральных киллеров периферической крови, имеют фенотип CD56+CD16- [9]. Рецептор CD16 на нейтрофилах не обладает сигнальной функцией, так как его структура не содержит цитоплазматической части [10].

Связывание иммунных комплексов с CD16 (FcγRIII) макрофагов значительно усиливает фагоцитоз, перенаправляет связанный антиген в фаголизосомы для переваривания, стимулирует процессинг антигенов [5]. Кроме того, в присутствии липополисахаридов, стимулирующих TLR4, связывание иммунных комплексов, содержащих IgG, с CD16 (FcγRIII) приводит к активации макрофагов по регуляторному типу (M2) [11]. Такие макрофаги способствуют созреванию Th2 клеток, обладают противовоспалительным действием за счет стимуляции выработки IL-10 и угнетения синтеза IL-12 [12]. Ранее в наших исследованиях было выявлено, что экспрессия мРНК TLR4 в эндометрии у пациенток с невынашиванием также снижается [6], что в сочетании со снижением экспрессии CD16

может влиять на дифференцировку регуляторных макрофагов и созревание Th2 лимфоцитов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно предположить, что снижение экспрессии CD16 в эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами способствует уменьшению активности фагоцитоза, переваривания патогенов, снижает дифференцировку макрофагов по типу регуляторных (M2). Указанные изменения могут играть значительную роль в невынашивании беременности ранних сроков.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ МД-2326.2017.7.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Доброхотова Ю.Э., Озерова Р.И., Мандрыкина Ж.А., Рора Л.С. Некоторые аспекты этиологии и патогенеза эмбриональных потерь в I триместре гестации. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2008;8(5):15–18.
2. Kitaya K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 2011;95(3):1156–1158. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.061.
3. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303(5663):1529–1531. doi: 10.1126/science.1093616.
4. Айрапетов Д., Ордынец И. Иммуногенетическая причина ранних репродуктивных потерь. *Врач*. 2011;1:39–40.
5. Williams M., Bruhns P., Saey Y., Hammad H., Lambrecht B.N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(2):94–108. doi: 10.1038/nri3582.
6. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Ивашова О.Н., Старцева Н.Ю., Чурносков М.И. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета в индукции апоптоза при невынашивании беременности ранних сроков. *Акушерство и гинекология*. 2015;2:39–43.
7. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
8. Pfaffl M.W. Relative quantification. In: Dorak T. *Real-time PCR*. Munich: International University Line; 2002:63–82.
9. Tang A.W., Alfirevic Z., Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with

recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum. Reprod.* 2011;26(8):1971–1980. doi: 10.1093/humrep/der164.

10. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология: атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.

11. Gerber J.S., Mosser D.M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 2001;166(11):6861–6868.

12. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(12):958–969. doi: 10.1038/nri2448.

## REFERENCES

1. Dobrokhotova Yu.E., Ozerova R.I., Mandrykina Zh.A., Rora L.S. Some aspects of the etiology and pathogenesis of embryonic depletions in the first trimester of gestation. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa.* 2008;8(5):15–18. (In Russ).

2. Kitaya K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 2011;95(3):1156–1158. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.061.

3. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004;303(5663):1529–1531. doi: 10.1126/science.1093616.

4. Airapetov D., Ordiyants I. An immunogenetic reason for early reproductive losses. *Vrach.* 2011;1:39–40. (In Russ).

5. Williams M., Bruhns P., Saeys Y., Hammad H., Lambrecht B.N. The function of Fcγ receptors in

dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(2):94–108. doi: 10.1038/nri3582.

6. Lebedeva O.P., Pakhomov S.P., Ivashova O.N., Starceva N.Yu., Churnosov M.I. Innate immunity signaling receptors in the induction of apoptosis in early miscarriage. *Akusherstvo i ginekologija.* 2015;2:39–43. (In Russ).

7. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

8. Pfaffl M.W. Relative quantification. In: Dorak T. *Real-time PCR.* Munich: International University Line; 2002:63–82.

9. Tang A.W., Alfirevic Z., Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum. Reprod.* 2011;26(8):1971–1980. doi: 10.1093/humrep/der164.

10. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология: атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. (In Russ).

11. Gerber J.S., Mosser D.M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 2001;166(11):6861–6868.

12. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(12):958–969. doi: 10.1038/nri2448.