

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР
СИБИРСКИЙ ФИЛИАЛ
ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

УДК 612.017.11:612.112.94:618.2

КОЛЕСНИКОВА
Ольга Петровна

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

140036 - Аллергология и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск
1978

Работа выполнена в лаборатории Иммунологии репродукции (рук. - доктор медицинских наук Л. А. Трунова) Института клинической и экспериментальной медицины Сибирского филиала АМН СССР (директор - академик АМН СССР В. П. Казначеев).

Научный руководитель: доктор медицинских наук Л. А. Трунова

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук М. Ш. Вербицкий
доктор биологических наук Е. В. Грунтенко

Ведущее предприятие:

Научно-исследовательская лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, г. Москва

Защита диссертации состоится "13" февраля, 1979г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета К 001.01.01 (Аллергология и иммунология) Института клинической и экспериментальной медицины СФ АН СССР (630091, г. Новосибирск-91, ул. Ядринцевская, 14)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института клинической и экспериментальной медицины СФ АМН СССР

Автореферат разослан "10" января 1979г.

Ученый секретарь
специализированного совета
доктор медицинских наук

Д. Н. Маянский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В течение последних лет сформировалось и бурно развивается новое научное направление - иммунология репродукции, которое все более выделяется в самостоятельный раздел иммунологии. Важность и необходимость изучения иммунологии репродукции имеет общетеоретические и прикладные (клинические) аспекты.

Клиническая актуальность проблемы иммунологии репродукции определяется возрастанием частоты осложнений беременности и заболеваний плода на почве изоиммунизации матери (Л. С. Персианинов, Л. С. Волкова, 1977). С иммунологических позиций в настоящее время рассматривается патогенез некоторых форм бесплодия, невынашивания и перенашивания беременности, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, поздних токсикозов беременных (Л. С. Волкова, 1970; М. А. Петров-Маслаков и соавт., 1971; М. Ш. Вербицкий, 1977; Д. Димитров, 1977). Однако многие важные разделы проблемы иммунологии репродукции остаются еще за гранью практической разработки.

Генетически детерминированная несовместимость по трансплантационным антигенам между матерью и плодом с необходимостью приводит в действие систему иммунологического надзора матери. Ведущая роль в осуществлении полноценного иммунологического надзора принадлежит Т-системе иммунитета. В тоже время полноценный иммунологический ответ обеспечивается путем взаимодействия различных типов Т-лимфоцитов (эффекторов, хелперов, супрессоров), а также их взаимодействием с В-лимфоцитами и другими клетками (Р. В. Петров и соавт., 1971; Б. Д. Бронда, 1977; Lance, 1971; Cantor, 1972). Современные методы определения функций иммунной системы человеческого организма позволяют оценивать ее изолированно по конкретным функциональным звеньям.

Обширные и разнообразные исследования по изучению В-системы иммунитета (антителообразования) при нормальной и патологической беременности проведены отечественными и зарубежными авторами. Результатом этих исследований является установление факта о наличии лимфоцитарной, лейкоцитарной и тканево-органной сенсибилизации беременной.

Изучение Т-системы иммунитета у женщин во время беременности представлено немногочисленными работами, имеющими в основном

феноменологический характер. Вместе с тем, исследованиями Р. А. Назаровой (1975), С. Д. Булиенко и соавт. (1976), М. Ш. Вербицкого (1977) при невынашивании беременности, бесплодии обнаружены существенные изменения функциональных свойств Т-лимфоцитов. По-видимому, понимание патогенетических основ иммунологических нарушений при осложненной беременности, в первую очередь, связано с установлением физиологических параметров функционирования Т- и В-систем иммунитета при нормальной беременности, физиологических механизмов иммунорегуляции, осуществляемой в системе мать-плацента-плод.

Теоретическая значимость исследований по иммунологии репродукции определяется уникальностью физиологических перестроек иммунной системы матери в ходе беременности, обеспечивающих физиологическое течение аллогенной беременности. Экспериментальные и клинические данные обнаруживают сложный механизм регуляции системы иммунологического надзора матери. В настоящее время активно изучается роль некоторых гормональных и белковых веществ плаценты и сыворотки беременных, как возможных естественных высокоактивных иммунодепрессантов, осуществляющих временное блокирование клеточных элементов системы иммунологического надзора. Несомненно, что решение этих задач явилось бы ценным вкладом не только в разработку вопросов иммунопатологии репродукции, но и способствовало бы пониманию и целенаправленному воздействию на развитие иммунных реакций при пересадке органов и тканей, злокачественном росте, аутоиммунных расстройствах.

Цель и задачи исследования. Вышеизложенные положения позволили считать актуальным данное исследование, целью которого являлось изучение количества и функционального состояния иммунных лимфоцитов и некоторых сторон физиологической регуляции, осуществляемой факторами плазмы беременных, у женщин при физиологически протекающей беременности.

Для выполнения указанной цели были поставлены задачи:

1. Определить количественное содержание Т- и В-лимфоцитов в крови у беременных и родильниц.
2. Изучить влияние аутологичной плазмы беременных и сыворотки доноров на бласттрансформацию лимфоцитов беременных женщин при стимуляции фитогемагглютинином.
3. Изучить состояние цитотоксической активности лимфоцитов крови беременных и родильниц на фибробластах эмбрионов челове-

ка, а также влияние плазмы беременных на течение данной реакции.

Научная новизна и практическая ценность результатов исследования. Впервые изучено состояние клеточного иммунитета у женщин в ходе нормально протекающей беременности и послеродового периода с использованием комплекса современных иммунологических тестов. Установлено наличие изменений в распределении субпопуляций Т-, В- и "О"-лимфоцитов, характеризующееся появлением относительной Т-лимфоцитопении и повышенного содержания "нулевых" клеток у беременных I триместра и родильниц 1-х суток послеродового периода. Указанные изменения отсутствуют у беременных III триместра и незначительны у женщин на 6-8-е сутки после родов.

Аутологичная плазма беременных оказывает обратимое изменение функционального состояния лимфоцитов (по ФГА-тесту) у беременных I и III триместра. Бласттрансформационная активность лимфоцитов в присутствии аллогенной донорской сыворотки у беременных I триместра оказывается сниженной по сравнению с беременными женщинами III триместра.

Лимфоциты беременных женщин и родильниц проявляют выраженный киллерный эффект на аллогенных и полуаллогенных клетках-мишенях эмбрионального происхождения. Аутологичная плазма беременных I триместра ингибирует цитотоксическую активность лимфоцитов при взаимодействии с клетками-мишенями собственного плода.

Полученные результаты раскрывают механизм физиологической регуляции системы иммунологического надзора матери, способствующей нормальному протеканию аллогенной беременности, и открывают перспективы для изучения нарушений, возникающих при осложненном течении беременности.

Критерии нормальных показателей абсолютного и относительного количества Т-, В- и "О" субпопуляций лимфоцитов, ФГА-бласттрансформационной активности лимфоцитов беременных в сыворотке доноров, киллерной активности лимфоцитов в отношении эмбриональных клеток-мишеней могут быть использованы для оценки иммунного статуса беременных женщин с нормальным и патологическим течением беременности.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых ИКЭМ СФ АМН СССР (Новосибирск, 1975), отчетно-научной сессии ИКЭМ СФ АМН СССР (Новосибирск, 1976), Всесоюз-

ной конференции "Адаптация в системе мать-плод" (Новосибирск, 1975), Международной конференции аллергологов и клинических иммунологов (Прага, 1974), III, IV международном симпозиуме "Современные проблемы иммунологии размножения" (Варна, Болгария, 1975, 1978), I Всесоюзном симпозиуме "Современные проблемы иммунологии репродукции" (Новосибирск, 1977).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 5 работ. Перечень работ приведен в конце автореферата.

Объем работы. Диссертация изложена на 165 страницах машинописи и состоит из введения, литературного обзора, результатов собственных исследований, обсуждения, изложенных в 4-х главах, выводов, литературного указателя. Таблиц 41, рисунков 14, библиография 327 наименований (63 отечественных и 264 иностранных).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего обследован 451 человек, из них: 162 беременные женщины I триместра (срок беременности 6-8 недель), 67 беременных III триместра (срок беременности 32 недели), 44 женщины на 1-е сутки после родов, 45 - на 6-8-е сутки после родов, 20 женщин на 1-е сутки после медицинского аборта, 76 здоровых небеременных женщин и 37 больных ревматизмом. Настоящая, предыдущие беременности, роды и послеродовый период у обследованных женщин протекали нормально.

Тест Е- и ЕАС-розеткообразования

В наших исследованиях по определению количества Т- и В-лимфоцитов за основу принимался метод, предложенный Mendes и соавт. (1973). Т-клетки идентифицировали по их способности образовывать спонтанные розетки с эритроцитами барана (Е-РОК), В-клетки - по наличию на их поверхности рецепторов для C_3 компонента комплемента (ЕАС-РОК). Исследование проводили с использованием всех клеток белой крови, выделяемых по методике, описанной И. Л. Гольдман, Н. И. Брауде (1966). В реакции использовали концентрацию клеток $2 \cdot 10^6$ /мл. Эритроциты барана, получаемые из одного источника, хранили не более 3-х недель в консерванте при $+4^\circ$.

Для постановки Е-розеткообразования взвесь клеток крови в объеме 0.5мл смешивали с таким же объемом 2% взвеси эритроцитов барана, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре и далее инкубировали при $+4^\circ$ в те-

чение одного часа. После инкубации осадок клеток осторожно ресуспендировали и микроскопически под иммерсией подсчитывали количество розеткообразующих лимфоцитов. За розетку принимали лимфоцит, окруженный не менее, чем тремя эритроцитами барана. Процент розеткообразующих клеток определяли как отношение числа РОК к общему числу лимфоцитов. Общее число лимфоцитов в количестве 300 подсчитывали в нескольких полях зрения.

Для реакции ЕАС-рокеткообразования использовали сухую гемолитическую кроличью сыворотку против эритроцитов барана (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва) и стандартный сухой комплемент морской свинки. Сыворотку и комплемент разводили на среде 199. Сыворотка применялась в субагглютинационных титрах с конечным разведением 1:6000-1:7000, установленных опытным путем. Конечное разведение комплемента составляло 1:100.

Вычисление абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов производили на основании данных об абсолютном содержании лейкоцитов и относительном количестве лимфоцитов (в мазке) из венозной крови.

Тест бласттрансформации лимфоцитов при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА)

Реакцию бласттрансформации лимфоцитов периферической крови в культуре с ФГА ставили по методу, в котором за основу была принята пропись Н. Л. Самойлиной (1970). Исследование проводили с использованием всех клеток белой крови, выделяемых по методике И. Л. Гольдман и соавт. (1966). Культивирование клеток производили на среде 199 с добавлением аутологичной плазмы или пулированной аллогенной сыворотки, составляющей 20% от общего объема питательной среды. Концентрация лейкоцитов составляла $1-1,5 \cdot 10^6$ в объеме 4 мл питательной среды. В работе использовали ФГА-Р фирмы "Дифко". Во флакон вносили 0.1 мл ФГА на 1 мл питательной среды (конечное разведение ФГА составило 1:100). Культуру лейкоцитов инкубировали при $+37^{\circ}$ в течение 72 часов. Окраску мазков, фиксированных в метаноле, проводили по Романовскому-Гимзе. При оценке результатов реакции бласттрансформации подсчитывали суммарный процент бластов, клеток находящихся в митозе и переходных форм лимфоцитов. Подсчитывали 300-500 клеток по всей площади мазка.

В серии опытов изучено влияние аллогенной сыворотки от здоровых лиц на ФГА-бласттрансформацию лимфоцитов беременных жен-

щин. Для этой цели забирали кровь от 6 здоровых доноров-мужчин с АВ(1У) группой крови. Сыворотку инактивировали при + 55° в течение 30 мин и в дальнейшем хранили при - 20°.

Тест цитотоксического действия лимфоцитов периферической крови человека на клетки-мишени

В опытах использовали трипсинизированную культуру клеток из одного и нескольких эмбрионов человека. Фибробласты выращивали на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах. Исследование проводили с использованием всех клеток белой крови, выделяемых по методике, описанной И. Л. Гольдман и соавт. (1966). Лимфоциты в количестве $1 \cdot 10^5$ /мл в объеме 2 мл среды 199 вносили во флакон с фибробластами. Совместную инкубацию лимфоцитов и клеток-мишеней проводили в бессывороточной среде при соотношении 5:1 в течение 24-х часов при + 37°. Регистрацию результатов проводили по методу Б. В. Горского (1967). В связи с тем, что каждая проба лимфоцитов испытывалась на 2-4 стеклах, выводили среднее количество неповрежденных клеток-мишеней для пробы. Среднее число служило основой для введения цитотоксического индекса (ЦИ) и дальнейшей статистической обработки. Вычисление ЦИ производили по формуле:

$$ЦИ = \frac{a - b}{a} \cdot 100 (\%),$$
 где "а" и "в" - среднее количество неповрежденных клеток соответственно в контрольных и опытных препаратах.

В серии экспериментов проводили изучение влияния аутологичной плазмы беременных женщин 1 триместра на взаимодействие лимфоцитов этих беременных с разного рода клетками-мишенями. Для этой цели лимфоциты беременных помещали на культуру клеток без предварительного отмывания от аутологичной плазмы.

Все результаты обрабатывали статистически. Различия принимались за достоверные при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови беременных женщин и родильниц.

Обследовано 138 женщин, из них: 36-небеременные женщины, 41-беременные 1 триместра, 16-беременные III триместра, 22 женщины на 1-е сутки после родов и 23 - на 6-8-е сутки послеродового периода.

Статистический анализ показателей процентного содержания Т-, В- и О-лимфоцитов представлен в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, сравнение по средним показателям процентного содержания Т-лимфоцитов у небеременных и беременных женщин выявляет существенное и достоверное уменьшение относительного количества Т-лимфоцитов у беременных I триместра ($P < 0.001$) и нормализацию данного показателя у беременных III триместра по сравнению с небеременными женщинами ($P > 0.05$).

У женщин в 1-е сутки послеродового периода наблюдается значительное и достоверное уменьшение процентного содержания Т-лимфоцитов, а на 6-8-е сутки после родов - возрастание данного показателя до нормального уровня по сравнению с небеременными женщинами.

Следовательно, у беременных I триместра и родильниц 1-х суток послеродового периода наблюдается относительная Т-лимфоцитопения.

Относительное количество В-лимфоцитов у беременных женщин I и III триместра не имеет достоверных различий по сравнению с небеременными женщинами; относительное количество В-лимфоцитов у родильниц 1-х и 6-8-х суток послеродового периода достоверно ниже по сравнению с небеременными женщинами (т.е. наблюдается относительная В-лимфоцитопения).

Процентное содержание О-лимфоцитов значительно увеличено у беременных женщин I триместра, в то время как в III триместре оно не имеет столь существенных различий по сравнению с небеременными. У женщин в 1-е сутки после родов вновь наблюдается существенное возрастание относительного количества О-лимфоцитов. К 6-8 суткам послеродового периода наблюдается некоторое снижение данного показателя.

У всех обследованных женщин определяли общее количество лимфоцитов в 1 мм^3 венозной крови, необходимое для вычисления абсолютного количества Т-, В- и О-лимфоцитов. У небеременных женщин общее количество лимфоцитов в 1 мм^3 крови в среднем составляет $1,9 \pm 0,2$ тыс., у беременных I триместра - $2,1 \pm 0,1$ тыс.

лимфоцитов, у беременных III триместра - $1,8 \pm 0,4$ тыс. (достоверно ниже по сравнению с I триместром, $P < 0.05$). В 1-е сутки после родов у женщин в среднем в 1 мм^3 крови содержится $2,4 \pm 0,2$ тыс. лимфоцитов, к 6-8 суткам - $2,7 \pm 0,3$ тыс.

Таблица 1

Статистические показатели относительного количества
Т-, В- и О-лимфоцитов у беременных женщин и родильниц

Г р у п п ы	Т-ли м ф о ц и т ы (%)					В-ли м ф о ц и т ы (%)					О-ли м- фо ц и т ы (%)
	п	X - X min max	M ± m	σ	Доверит. интервал ± 95%	п	X - X min max	M ± m	σ	Доверит. интервал ± 95%	
Неберемен- ные	36	35-84	64, 2 ± 1, 9 P < 0.001	11, 4	41, 2-37, 2	36	6-38	19, 9 ± 1, 2 P > 0.05	7, 2	5, 4-34, 4	15, 9
Беременные I триместр	41	21-76	48, 2 ± 1, 9 P < 0.01	12, 1	13, 8-82, 6	38	1-36	16, 9 ± 1, 3 P > 0.05	8, 0	0, 8-31, 0	34, 9
Беременные III триместр	16	40-79	60, 2 ± 2, 8 P < 0.01	11, 0	36, 9-83, 5	16	5-44	17, 6 ± 2, 8 P < 0.05	11, 0	0-40, 9	22, 2
Родильницы 1-е сутки	22	7-72	46, 7 ± 3, 7 P < 0.05	16, 9	11, 6-81, 6	22	1-28	10, 5 ± 1, 5 P > 0.05	6, 8	0-34, 5	42, 7
Родильницы 6-8-е сутки	23	23-82	57, 2 ± 3, 2	15, 1	26, 3-88, 7	23	2-37	13, 6 ± 1, 9	8, 9	0-32, 0	29, 2
			P _{1,3} > 0.05 P _{1,3} > 0.05					P _{1,5} < 0.05 P _{2,4} < 0.01			

Статистический анализ показателей абсолютного количества Т-, В- и О-лимфоцитов представлен в таблице 2. Как видно из данных, абсолютное количество Т-лимфоцитов у беременных женщин и родильниц не изменяется в указанные сроки по сравнению с небеременными женщинами.

Абсолютное количество В-лимфоцитов у беременных 1 и III триместра не отличается достоверно от аналогичного показателя у небеременных женщин.

У родильниц 1-х суток послеродового периода имеется достоверное снижение абсолютного количества В-лимфоцитов по сравнению с небеременными женщинами ($P < 0.01$) и беременными 1 триместра ($P < 0.01$). У женщин 6-8-х суток послеродового периода этот показатель достоверно увеличивается и не отличается от такового у небеременных.

Абсолютное содержание "нулевых" лимфоцитов значительно увеличено у беременных 1 триместра, в то время как у беременных III триместра оно не имеет столь существенных различий по сравнению с небеременными женщинами. У родильниц в 1-е сутки вновь наблюдается возрастание абсолютного количества О-лимфоцитов. К 6-8 суткам послеродового периода имеется некоторое снижение данного показателя.

Таким образом, определяются изменения в распределении субпопуляций лимфоцитов, характеризующиеся появлением относительной Т-лимфоцитопении и повышением количества О-лимфоцитов у беременных 1 триместра и родильниц 1-х суток послеродового периода. У последних, кроме того, определяется относительная и абсолютная В-лимфоцитопения. Указанные изменения отсутствуют у беременных III триместра и незначительны у женщин 6-8-х суток послеродового периода.

2. Влияние плазмы беременных и доноров на ФГА-бласттрансформацию лимфоцитов беременных женщин

Обследовано 90 женщин, из них: 20 небеременных, 39 беременных 1 триместра, 31 беременная III триместра.

Статистические показатели бласттрансформационной активности лимфоцитов небеременных и беременных женщин в присутствии аутологичной плазмы представлены в таблице 3.

Таблица 2

Статистические показатели абсолютного количества
Т-, В- и О-лимфоцитов у беременных женщин и родильниц

Г р у п п ы	Т-л и м ф о ц и т ы (тыс/мм ³)					В-л и м ф о ц и т ы (тыс/мм ³)					О-лим- фоциты (тыс/мм ³)
	п	X - X min max	M ± m	σ	Доверит. интервал ± 95%	п	X - X min max	M ± m	σ	Доверит. интервал ± 95%	
Неберемен- ные	32	0,5-2,9	1,2±0,1	0,5	0,2-2,2	32	0,1-0,8	0,35±0,02	0,11	0,13-0,57	0,35
Беременные I триместр	31	0,2-2,7	1,2±0,1	0,6	0-2,4	31	0,1-1,2	0,39±0,04	0,22	0-0,79	0,71
Беременные III триместр	15	0,4-1,8	1,1±0,1	0,4	0,3-1,9	15	0,1-0,7	0,30±0,04	0,1	0,1 -0,5	0,4
Родильницы 1-е сутки	22	0,1-1,9	1,1±0,1	0,4	0,3-1,9	22	0,01-0,7	0,24±0,03	0,14	0-0,5	1,06
			P > 0.05					P < 0.05			
Родильницы 6-8-е сутки	23	0,3-3,5	1,5±0,2	0,9	0-3,4	23	0,04-1,2	0,39±0,06	0,3	0-0,99	0,81

$$P_{1,5} > 0.05$$

$$P_{2,5} > 0.05$$

$$P_{2,4} < 0.01$$

$$P_{1,4} < 0.01$$

$$P_{1,5} > 0.05$$

Таблица 3

Статистический анализ показателей бласттрансформации лимфоцитов в аутоплазме у небеременных и беременных женщин

Г р у п п ы	п	$X_{\min} - X_{\max}$	$M \pm m$	б	Доверительный интервал $t_{95\%}$
Небеременные	20	32 - 96	$74,1 \pm 3,9$	16,9	38,3 - 100
Беременные I триместр	39	2 - 85	$47,6 \pm 3,1$ $P > 0.05$	19,3	8,7 - 86,5
Беременные III триместр	31	22 - 73,3	$47,1 \pm 4,4$	24,5	0 - 97,0
			$P_{1,2} < 0.001$		
			$P_{1,3} < 0.001$		

Анализируя данные таблицы 3, необходимо отметить наличие больших колебаний показателей бласттрансформации лимфоцитов у отдельных беременных I триместра (2 - 85%) по сравнению с беременными III триместра (22 - 73,3%) и небеременными женщинами (32 - 96%). Средний показатель бласттрансформационной активности лимфоцитов у небеременных женщин, равный $74,1 \pm 3,9\%$, достоверно выше аналогичных показателей у беременных I и III триместра ($P < 0.001$). У беременных I и III триместра отсутствуют различия по средним показателям бласттрансформации лимфоцитов.

Таким образом, ФГА-стимуляция лимфоцитов в присутствии аутологичной плазмы у беременных I и III триместра сопровождается достоверным снижением бласттрансформации по сравнению с небеременными женщинами.

Нами проведена серия опытов по ФГА-стимуляции лимфоцитов беременных женщин с заменой аутоплазмы на пулированную аллогенную сыворотку от здоровых лиц. Данные этой серии экспериментов представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, колебания показателей бласттрансформации лимфоцитов у отдельных беременных I триместра составляют от 36 до 95%, у беременных III триместра - от 56 до 99%.

Таблица 4

Статистический анализ показателей бласттрансформации лимфоцитов в сыворотке доноров у беременных I и III триместра

Г р у п п ы	п	X _{min} - X _{max}	M ± m	б	Доверительный интервал ± 95%
Беременные I триместр	19	36 - 95	69,1 ± 3,8 P < 0.01	16,6	34,4 - 100
Беременные III триместр	21	56 - 99	81,7 ± 2,5	11,2	58,5 - 100

Средний показатель бласттрансформации лимфоцитов у беременных I триместра равен 69,1 ± 3,8% (доверительный интервал ± 95% 34,4-100%), у беременных III триместра - 81,7 ± 2,5% (доверительный интервал ± 95% 58,5 - 100%).

Таким образом, замена аутологичной плазмы на сыворотку доноров сопровождается достоверным увеличением бласттрансформации лимфоцитов у беременных I и III триместра (P < 0.001). (Табл. 5).

Таблица 5

Средние показатели бласттрансформации лимфоцитов беременных I и III триместра в присутствии аутологичной плазмы и сыворотки доноров

Г р у п п ы	Аутоплазма		Сыворотка доноров	
	M ± m		M ± m	
Беременные I триместр	47,6 ± 3,2 (39)	P < 0.001	69,1 ± 3,3 (19)	
	P > 0.05		P < 0.01	
Беременные III триместр	47,1 ± 4,4 (31)	P < 0.001	81,7 ± 2,5 (21)	

Примечание: в скобках указано число наблюдений.

Средние показатели бласттрансформации лимфоцитов в сыворот-

ке доноров у беременных 1 и III триместра не имеют достоверных различий по сравнению с аналогичным показателем у небеременных женщин. Однако, бласттрансформационная активность лимфоцитов (в сыворотке доноров) у беременных 1 триместра достоверно ниже аналогичного показателя у беременных III триместра ($P < 0.01$).

Следовательно, ФГА-стимуляция лимфоцитов беременных женщин 1 и III триместра в аллогенной сыворотке доноров достигает нормальных показателей по сравнению с аутоплазмой.

3. Изучение цитотоксического действия лимфоцитов периферической крови беременных и родильниц на фибробластах эмбрионов человека *in vitro*.

Всего обследовано 223 человека, из них: 57-лица контрольной группы, 102 беременных женщины, 44 родильницы, 20 женщин на 1-е сутки после медицинского аборта.

Для сравнения и оценки цитотоксического эффекта лимфоцитов крови беременных и родильниц нами были обследованы здоровые лица, а также больные ревматизмом в активной фазе, лимфоциты которых проявляют выраженный цитотоксический эффект в отношении эмбриональных фибробластов человека. Лимфоциты периферической крови у обследованных лиц испытывали на аллогенных фибробластах нескольких генотипов. Статистический анализ показателей цитотоксического индекса (ЦИ) представлен в таблице 6.

Анализируя статистические данные необходимо отметить, что средний показатель ЦИ лимфоцитов крови здоровых лиц, равный $8,8 \pm 1,3\%$, и верхняя граница доверительного интервала, равная $20,7\%$, соответствуют данным В.П. Лозового и соавт. (1968), Л.А. Труновой (1970), установившим наличие цитотоксического потенциала лимфоцитов крови здоровых лиц и определившим критерий нормы для данного показателя. Выведение критерия нормального цитотоксического индекса лимфоцитов здоровых дает возможность сравнения и оценки индекса цитотоксического эффекта лимфоцитов беременных женщин. Верхняя граница доверительного интервала использована нами, как критерий нормы, и при обработке данных контрольных групп (больные ревматизмом) и групп беременных женщин и родильниц положительным результатом считали те, которые превышали ЦИ, равный 21% .

Средний показатель ЦИ лимфоцитов больных ревматизмом равен $46,0 \pm 2,3\%$, что достоверно выше по сравнению со здоровыми лицами

Таблица 6

Статистический анализ показателей цитотоксического индекса лимфоцитов крови лиц контрольной группы, беременных и родильниц на аллогенных клетках-мишенях нескольких генотипов

РР пп	Г р у п п и	п	X - X min max	M ± m	б	Доверитель- ный интервал ± 95%
1.	Здоровые лица	20	0-22	8,8±1,3 P < 0.001	5,7	0 - 20,7
2.	Больные ревма- тизмом	37	11-81,0	46,0±2,3 P < 0.01	10,2	25,4 - 66,6
3.	Беременные I триместр	43	0-96,2	35,1±3,3 P > 0.05	20,4	0 - 76,3
4.	Беременные III триместр	20	0-68,1	30,2±4,5 P < 0.05	19,5	0 - 62,9
5.	Родильницы 1-е сутки	22	0-88,9	48,1±5,1 P < 0.05	23,3	0 - 96,3
6.	Родильницы 6-8-е сутки	22	0-84,7	29,5±4,8	21,9	0 - 74,8
7.	Женщины на 1-е сутки пос- ле аборта	20	15,6-57,8	37,2±2,5	10,8	14,7 - 59,7
				P _{1,3} < 0.001		
				P _{1,6} < 0.05		

(P < 0.001). Увеличение индекса цитотоксического эффекта лимфоцитов больных ревматизмом свидетельствует о наличии сенсibilизации лимфоцитов к фибробластическим соединительнотканным антигенам (Л. А. Трунова, 1970). Средний показатель ЦИ лимфоцитов беременных I триместра равен 35,1±3,3%, процент положительных результатов составляет 65±7 (доверительный интервал процента для вероятности 95% 49-79). У беременных III триместра средняя величина ЦИ равна 30,2±4,5%, процент положительных результатов составляет 60±11 (доверительный интервал процента для вероятности 95% 36-81). Таким образом, цитотоксическая активность лимфоцитов бере-

менных I и III триместра в отношении аллогенных фибробластов нескольких генотипов достоверно выше таковой у здоровых лиц ($P < 0.001$), но достоверно ниже по сравнению с больными ревматизмом ($P < 0.01$). Сравнение по средним величинам ЦИ и частоте определения цитотоксического эффекта лимфоцитов на аллогенных фибробластах у беременных I и III триместра не выявляет достоверного различия. Следовательно, у здоровых беременных женщин на ранних и поздних сроках беременности наблюдается выраженная цитотоксическая активность лимфоцитов крови в отношении аллогенных эмбриональных клеток-мишеней.

Нас интересовал вопрос о значении прерывания беременности на ранних сроках на проявление цитотоксической активности лимфоцитов к эмбриональным фибробластам. При сравнении по средним величинам ЦИ лимфоцитов на аллогенных клетках-мишенях у беременных I триместра и женщин на 1-е сутки после прерывания беременности не обнаруживаются достоверных различий. Таким образом, в 1-е сутки после прерывания беременности на ранних сроках у женщин сохраняется наличие сенсibilизации лимфоцитов крови к эмбриональным клеткам-мишеням.

Для решения вопроса и возможности снижения цитотоксической активности лимфоцитов крови беременных после родов нами обследованы родильницы на 1-е и 6-8-е сутки после родов. У женщин на 1-е сутки после родов наблюдается возрастание цитотоксического действия лимфоцитов по сравнению с беременными I триместра (не достоверно) и III триместра (достоверно, $P < 0.05$). На 6-8-е сутки послеродового периода цитотоксическая активность лимфоцитов снижается, однако, не достигает нормальных показателей.

Средний показатель ЦИ лимфоцитов родильниц 1-х суток равен $48,1 \pm 5,1\%$, процент положительных результатов составляет 91 ± 6 (доверительный интервал процента для вероятности 95% 77-99). У родильниц 6-8-х суток послеродового периода средний показатель ЦИ равен $29,5 \pm 4,8\%$, процент положительных результатов составляет 59 ± 11 (доверительный интервал процента для вероятности 95% 36-79). Сравнение средних величин ЦИ и частоты определения цитотоксического эффекта в группе родильниц выявляет достоверное уменьшение данных показателей у женщин на 6-8-е сутки послеродового периода по сравнению с родильницами 1-х суток ($P < 0.05$). Следовательно, в послеродовом периоде наблюдается снижение цитотоксической активности лимфоцитов и нормализация

показателей.

В серии исследований изучали влияние аутологичной плазмы беременных женщин 1 триместра на цитотоксическую активность лимфоцитов при взаимодействии с полуаллогенными фибробластами (собственного эмбриона), аллогенными фибробластами одного генотипа (чужеродного эмбриона) и аллогенными фибробластами нескольких генотипов. На клетках-мишенях испытывали отмытые и неотмытые от аутологичной плазмы лимфоциты. Результаты статистического анализа представлены в таблице 7.

Как видно из данных таблицы 7, при сравнении средних величин ЦИ отмытых и неотмытых от аутоплазмы лимфоцитов беременных 1 триместра при взаимодействии с полуаллогенными фибробластами собственного эмбриона выявлено достоверное снижение показателя при испытании неотмытых лимфоцитов ($P < 0.05$). Для того, чтобы в каждом конкретном случае можно было судить о действительном снижении интенсивности цитотоксического эффекта необходимо оценить разность ЦИ с учетом вероятной ошибки разности (В. Ю. Урбах, 1963). Величина вероятной ошибки разности в цитотоксических индексах отмытых и неотмытых от аутоплазмы лимфоцитов при взаимодействии с полуаллогенными клетками-мишенями составила 21% (для $\pm 95\%$). Следовательно, ингибирующие свойства аутоплазмы достоверно проявляются в $57 \pm 14\%$ (из 14 положительных результатов достоверное снижение в 8 случаях). При сравнении по средним показателям ЦИ и частоте проявления цитотоксического эффекта не обнаружено достоверных различий при взаимодействии отмытых и неотмытых от аутоплазмы лимфоцитов с аллогенными клетками-мишенями чужеродного эмбриона ($P > 0.05$). Величина вероятной ошибки разности в ЦИ равна 29,4% (для $\pm 95\%$). Ингибирующие свойства аутоплазмы проявляются достоверно в $17 \pm 11\%$ (из 12 положительных результатов достоверное снижение выявлено в 2 случаях). При сравнении по средним показателям ЦИ отмытых и неотмытых от аутоплазмы лимфоцитов в культуре с аллогенными фибробластами нескольких генотипов не выявляется достоверных различий. Величина вероятной ошибки разности равна 20,5% (для $\pm 95\%$). Блокирующие свойства аутоплазмы проявляются достоверно в $44 \pm 18\%$ (из 9 положительных результатов достоверное снижение обнаружено в 4 случаях). Таким образом, ингибирующие свойства плазмы беременных женщин 1 триместра проявляются только при взаимодействии с клетками-мишенями собственного эмбриона.

Таблица 7

Статистические показатели цитотоксического эффекта отмытых и неотмытых от аутоплазмы лимфоцитов беременных женщин 1 триместра в культуре с клетками-мишенями различных генотипов

Обозначения	Полуаллогенные фибробласты собственного эмбриона		Аллогенные фибробласты одного генотипа		Аллогенные фибробласты нескольких генотипов	
	отмытые лимфоциты	неотмытые лимфоциты	отмытые лимфоциты	неотмытые лимфоциты	отмытые лимфоциты	неотмытые лимфоциты
Число наблюдений	20	20	19	19	19	15
Средний показатель цитотоксического индекса	53,0 \pm 3,1 P < 0.05	27,8 \pm 6,0	52,3 \pm 9,9 P > 0.05	49,7 \pm 10,0	25,3 \pm 6,4 P > 0.05	39,1 \pm 7,2
Процентный показатель наличия ЦЭ	70 \pm 10 P > 0.05	50 \pm 12	63 \pm 11 P > 0.05	58 \pm 12	47 \pm 12 P > 0.05	71 \pm 12
Процентный показатель отсутствия ЦЭ ¹	57 \pm 14 P < 0.05		17 \pm 11 P > 0.05		44 \pm 18	

Примечание: ¹ достоверное ингибирующее действие аутоплазмы при сравнении цитотоксических индексов отмытых и неотмытых от плазмы лимфоцитов с учетом вероятной ошибки разности (В. Ю. Урбах, 1963).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При обсуждении результатов и их оценке основные положения можно сгруппировать в виде следующих разделов.

1. В наших исследованиях у небеременных женщин в периферической крови в среднем определяется $64,2 \pm 1,9\%$ Т-лимфоцитов, $19,9 \pm 1,2\%$ В-лимфоцитов, 15% О-лимфоцитов, что согласуется с данными Strelkauskas et al. (1975). Полученные в настоящих исследованиях данные, свидетельствующие о достоверном снижении относительного количества Т-лимфоцитов у беременных I триместра и о нормальном содержании Т-лимфоцитов у беременных III триместра соответствуют литературным сведениям (Nakakita et al. 1974; Strelkauskas et al. 1975; Ueda et al. 1975; Clements, 1976). Мы полагаем, что относительная Т-лимфоцитопения и увеличение количества О-лимфоцитов у женщин в ранние сроки беременности обусловлены перераспределением клеток внутри гетерогенной популяции лимфоцитов (на фоне стабильного уровня общего количества лимфоцитов в 1 мм^3 крови). Данные клинко-экспериментальных исследований являются косвенным подтверждением этого предположения. Nelson (1964) сообщает о явлениях гипоплазии тимуса у женщин, особенно на ранних сроках беременности. Следовательно, снижение функциональных свойств тимуса (уровня тимического фактора) может привести к появлению в периферической крови незрелых Т-лимфоцитов в I триместре. По-видимому, наблюдаемая относительная Т-лимфоцитопения и увеличение количества О-клеток в ранние сроки беременности отражают адаптивную иммунологическую реакцию со стороны беременной женщины в ответ на стрессорное воздействие (формирование трансплантационных антигенов у плода). Видимо, такого рода адаптивная иммунологическая реакция связана, в первую очередь, с действием сложного комплекса гипофизарно-надпочечниковых гормонов и гормонов фето-плацентарного комплекса, приводящих к изменению миграции и перераспределению клеток внутри лимфоидной популяции лимфоцитов (Slaman, 1972; Spry, 1972; Cohen, 1972).

У беременных III триместра в периферической крови наблюдается распределение субпопуляций лимфоцитов близкое к нормальному (как у небеременных). Можно думать, что регенерация тимуса по мере прогрессирования беременности сопровождается восстановлением функциональных свойств тимуса и полноценным созреванием Т-лимфоцитов.

Наблюдается некоторое сходство в распределении субпопуляций лимфоцитов (Т-, В- и нулевых) у беременных 1 триместра и родильниц 1-х суток послеродового периода по сравнению с небеременными женщинами: относительная Т-лимфоцитопения и увеличение количества О-лимфоцитов. У родильниц 1-х суток, кроме того, имеется относительная и абсолютная В-лимфоцитопения, что, по-видимому, отражает более глубокие перестройки в системе иммунофизиологической регуляции. Можно полагать, что такого рода адаптивная иммунологическая реакция у родильниц 1-х суток "препятствует" развитию сенсibilизации к плодовым антигенам, поступающим в наибольших количествах в организм матери в родах (Л. С. Волкова, 1970).

Полученные нами данные, свидетельствующие о существенном перераспределении субпопуляций лимфоцитов в ранние сроки беременности позволяют думать о возможном изменении функциональных свойств лимфоцитов у беременных в данный период.

2. Наблюдаемое различие в бласттрансформационной активности лимфоцитов в сыворотке доноров у беременных женщин I и III триместра позволяет высказать предположение о существовании различных механизмов, обуславливающих снижение ФГА-ответа лимфоцитов в аутологичной плазме у женщин в разные сроки беременности. Снижение ФГА-бласттрансформации у беременных III триместра, по-видимому, связано, главным образом, с действием ингибирующих факторов, содержащихся в аутологичной плазме (В. И. Говалло, 1975; Л. А. Трунова и соавт., 1975; С. Д. Булиенко и соавт., 1973; Kanazawa et al, 1974; Saito et al. 1975). Наблюдается значительное увеличение бласттрансформационной активности лимфоцитов беременных III триместра в присутствии сыворотки доноров и без отмывания от аутологичной плазмы. В I триместре у женщин снижение бласттрансформации лимфоцитов обусловлено, видимо, не только действием плазменных факторов (поскольку при замене аутоплазмы на сыворотку доноров ФГА-бласттрансформация не достигает нормальных показателей у небеременных женщин и достоверно ниже аналогичного показателя у беременных III триместра). Возможно, у беременных в ранние сроки снижение бласттрансформации лимфоцитов в аутоплазме связано как с влиянием блокирующих плазменных факторов, так и с появлением в крови клеток, не способных оптимально реагировать на определенную дозу митогена (Р. А. Назарова и соавт., 1975; Carr et al. 1973).

3. При разрешении поставленных перед нами задач, мы получили данные, свидетельствующие о наличии у здоровых беременных женщин и родильниц выраженной реакции цитотоксического действия лимфоцитов на эмбриональных клетках-мишенях. Цитотоксический эффект лимфоцитов на клетках-мишенях является одним из главных признаков ГЗТ, выявляемых в условиях *in vitro* и свидетельствующих о наличии сенсibilизации эффекторных клеток к определенному роду клеточным или тканевым структурам. Наличие киллерного эффекта к фибробластам собственного эмбриона, наблюдаемое у $70 \pm 10\%$ беременных 1 триместра (средний ЦИ равен $53,0 \pm 8,1\%$), можно расценивать как проявление истинной иммунизации лимфоцитов беременной женщины к антигенам своего плода. Наличие сенсibilизации лимфоцитов к аллогенным эмбриональным фибробластам, выявляемое нами у $65 \pm 7\%$ беременных 1 триместра и у $60 \pm 11\%$ беременных III триместра согласуется с данными Л. М. Фроловой и соавт. (1977), Timonen et al. (1976). Показателем сенсibilизации лимфоцитов служит не только величина цитотоксического индекса, но и скорость проявления реакции. В наших опытах лизис клеток-мишеней происходил спустя 18-24 часа. Осуществление цитотоксического эффекта лимфоцитов беременных женщин, активированных *in vivo* за счет персистенции антигенов плода в кровотоке матери, по типу вторичной реакции может происходить за счет укорочения специфической фазы распознавания, связанной с отличиями по LD-антигенам гистосовместимости (Alter et al. 1976). Следовательно, даже использование аллогенной культуры фибробластов позволяет выявлять наличие сенсibilизации лимфоцитов беременных к эмбриональным антигенам, видимо, за счет наличия идентичных локусов гистосовместимости. Это положение согласуется с данными Youtanapisorn et al. (1972), Timonen, Saksela (1976), свидетельствующими о наличии сенсibilизации лимфоцитов беременных женщин к аллогенным плодовым и плацентарным антигенам, обусловленной по мнению авторов общими перекрестно реагирующими антигенами.

Установление специфических ингибирующих свойств аутологичной плазмы беременных женщин 1 триместра в цитотоксическом тесте позволяет думать, что регуляция функциональной активности Т-киллеров, наряду с другими факторами, осуществляется также факторами сыворотки беременных (Hellstrom et al. 1969; Taylor et al., 1976). По-видимому, защитное действие блокирующих факторов (антител, комплексов антиген-антитело, растворимых антигенов), выявляе-

мое в условиях *in vitro*, может иметь весьма сложный механизм. Результаты настоящего исследования позволяют предполагать, что в условиях нашего эксперимента механизм блокирующего действия плазмы связан с экранированием, возможно, антителами рецепторов клеток-эффекторов. В связи с этим, представляется интересным сообщение Davies (1977) о том, что феномен усиления создают антитела к LD-антигенам гистосовместимости, тогда как антитела к SD-антигенам - повреждают трансплантат.

Проведенные нами исследования позволяют высказать предположение о необходимости комплексной оценки цитотоксического феномена у беременных женщин с учетом функционального состояния других субпопуляций лимфоцитов (Т-супрессоров), уровнем блокирующих факторов.

Полученные данные, свидетельствующие о перераспределении субпопуляций лимфоцитов в ходе беременности, о наличии выраженной киллерной активности лимфоцитов к эмбриональным клеткам-мишеням, об изменении антигенраспознавательной и киллерной функций лимфоцитов, обусловленных влиянием аутологичной плазмы беременных женщин, ставят вопросы для дальнейших исследований по изучению механизмов возникновения данных феноменов, возможных путях поломки при осложненном течении беременности.

В Н В О Д И

Основные выводы исследования могут быть сформулированы следующим образом.

1. Развитие физиологически протекающей беременности сопровождается изменениями относительного и абсолютного количества субпопуляций лимфоцитов, их функциональных свойств, что свидетельствует об определенном состоянии клеточного иммунитета в разные периоды беременности.

2. У беременных 1 триместра:

а) в периферической крови наблюдается относительная Т-лимфоцитопения и увеличение относительного и абсолютного количества О-лимфоцитов;

б) определяется снижение ФГА-бласттрансформации лимфоцитов в присутствии аутологичной плазмы; замена аутоплазмы на аллогенную сыворотку доноров сопровождается нормализацией бласттрансформации;

в) лимфоциты беременных 1 триместра оказывают цитотоксический эффект на полуаллогенных фибробластах собственного эмбриона в $70 \pm 10\%$ (средний ЦИ равен $53,0 \pm 8,1\%$), аллогенных фибробластах в $65 \pm 7\%$ (средний ЦИ - $35,1 \pm 3,3\%$);

г) аутологичная плазма беременных 1 триместра достоверно ингибирует цитотоксический эффект лимфоцитов при взаимодействии с полуаллогенными фибробластами собственного эмбриона в $57 \pm 14\%$, при взаимодействии с аллогенными фибробластами чужеродного эмбриона в $17 \pm 11\%$ ($P < 0.05$).

3. У беременных III триместра:

а) в периферической крови наблюдается распределение субпопуляций лимфоцитов, близкое к таковому у небеременных женщин;

б) аутологичная плазма беременных оказывает блокирующее действие на ФГА-стимуляцию лимфоцитов. Бласттрансформация лимфоцитов в аллогенной сыворотке доноров достигает нормальных показателей и превышает таковой у беременных 1 триместра;

в) лимфоциты беременных оказывают выраженный цитотоксический эффект на аллогенных фибробластах в $60 \pm 11\%$ (средний ЦИ равен $30,2 \pm 4,5\%$).

4. У родильниц 1-х суток наблюдается относительная Т- и В-лимфоцитопения, увеличение относительного и абсолютного количества О-лимфоцитов, абсолютная В-лимфоцитопения; процентный показатель наличия цитотоксического эффекта составляет $91 \pm 6\%$ (средний ЦИ равен $48,1 \pm 5,1\%$).

5. У родильниц 6-8-х суток наблюдается нормализация в распределении субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, выявляется достоверное снижение цитотоксического эффекта лимфоцитов на аллогенных фибробластах по сравнению с беременными женщинами.

6. Установленные критерии нормальных показателей количества субпопуляций лимфоцитов и их функциональных свойств у беременных женщин в разные периоды беременности дает основание рекомендовать их для оценки иммунного статуса при нормально протекающей беременности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. The role of autoimmune cell reactions in mother-foetus system interrelation. In abstr. International Conf. of Allergol. and Clin. Immunol. of Socialist Countries. Prague, 1974, 101. L. Trunova, N. Konstantinova.

2. Цитотоксическое действие лимфоцитов периферической крови здоровых беременных женщин на фибробласты эмбрионов человека. Акуш. и гинекол., 1975, 2, 33-34. Соавт: Л. А. Трунова.

3. Участие блокирующих факторов сыворотки в поддержании иммунологической толерантности при физиологически протекающей беременности. Тезисы докл. III межд. симпозиума по иммунологии размножения. Варна, Болгария, 1975, 203. Соавт: Л. А. Трунова, Л. А. Иванова, Р. А. Назарова.

4. Влияние плазмы беременных женщин III триместра на бласт-трансформацию аутолимфоцитов в культуре с ФГА. Сб. 1 Всесоюзного симпозиума "Современные проблемы иммунологии репродукции", Новосибирск, 1977, 121-122. Соавт: Л. А. Трунова, Л. А. Иванова.

5. Изучение состояния клеточного иммунитета в системе мать-плацента-плод при физиологической беременности. Тезисы докл. IV межд. симпозиума по иммунологии репродукции. Варна, Болгария, 1978, 161. Соавт: Л. А. Трунова, Л. А. Иванова.

Подписано в печать 27.12.1978 г.

МН 16727 Тираж 120 экз. Объем 1,5 печ. листа, Заказ №646

Отпечатано в СФ АМН СССР