

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)

На правах рукописи

Покаленьева Мария Шамилевна

Патофизиологическая роль свободно-
радикальных процессов при невынашивании
беременности

14.03.03. «Патологическая физиология»

14.01.01 «Акушерство и гинекология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители
д.м.н., профессор Болевич С.Б.
д.м.н., профессор Соснова Е.А.

Москва, 2018

Оглавление

Оглавление	2
Введение.....	4
Глава I. Обзор литературы	10
1.1 Этиология привычного невынашивания беременности	10
1.2 Свободнорадикальные процессы в организме человека	21
1.2.1 Активные формы кислорода.....	22
1.2.2 Перекисное окисление липидов	24
1.2.3 Антиоксидантная система организма человека.....	26
1.3 Состояние оксидантной и антиоксидантной систем во время беременности	28
Глава 2. Материалы и методы	33
2.1 Характеристика и критерии отбора пациентов	33
2.2.2 Математическое моделирование хемилюминограмм кривых нейтрофилов методом деконволюции	38
2.2.3 Определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции	39
2.2.3 Оценка окислительной модификации альбумина по триптофановой флуоресценции.....	40
2.3 Статистическая обработка материала.....	41
Глава 3. Клиническая характеристика пациентов	42
Глава 4. Результаты собственных исследований и их обсуждение.....	48
4.1 Оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией.....	48
4.2 Анализ кривых методом деконволюции	63

4.3 Оценка антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции.....	69
4.4 Оценка триптофановой флуоресценции альбумина	73
Глава 5. Заключение	76
Выводы.....	79
Практические рекомендации	81
Список сокращений	82
Список использованной литературы	84

Введение

Актуальность. Медицинская и социальная значимость проблемы невынашивания беременности, обусловлена ее влиянием на демографические показатели в РФ. В структуре акушерско-гинекологической заболеваемости невынашивание занимает одно из первых мест, оказывая влияние на уровень перинатальной заболеваемости, смертности и репродуктивное здоровье женщин [1]. Частота невынашивания беременности составляет 15-27% от общего числа всех выявленных беременностей, при этом на долю привычного выкидыша (ПНБ) приходится от 5 до 20%. Установлено, что риск потери плода напрямую зависит от исхода предыдущей беременности и составляет 13-17% после первого выкидыша и около 55% у женщин, уже имевших 3 последовательных выкидыша [2]. По данным различных авторов в первом триместре беременности частота спонтанных выкидышей составляет около 80% [3, 4].

К наиболее частым причинам ПНБ относят: генетические, эндокринные, иммунологические, гемастазиологические нарушения репродуктивной системы, бактериальные и вирусные инфекции [2, 5, 6]. Зачастую, ПНБ вызывается сразу несколькими этиологическими факторами, одни из которых могут быть предрасполагающими, другие разрешающими. В свою очередь к прерыванию беременности приводят те факторы, которые вызывают изменения и гибель плодного яйца, а также нарушают связь плодного яйца с материнским организмом [7].

Однако, генез невынашивания зачастую остается неясным (идиопатическое ПНБ), составляющего около 50%. Несмотря на успехи в диагностике и лечении самопроизвольных прерываний беременности, частота ПНБ остается достаточно высокой и не имеет тенденции к снижению [8]. Это обусловлено отсутствием точного понимания причинных факторов и патогенетических звеньев, приводящих к прерыванию беременности.

Эмпирический подход к выбору терапии в результате не позволяет спрогнозировать и снизить частоту ПНБ [9].

Вопрос об этиологической роли свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности широко дискутируется в литературе [10, 11]. Изменения в тканях плаценты процессов свободнорадикального окисления (СРО), вызывающие повреждения структуры и нарушение проницаемости клеточных мембран играет немаловажную роль в патогенезе невынашивания беременности [12]. Данные деструктивные процессы возникают вследствие проявляющегося дисбаланса между интенсивностью СРО и эффективностью системы антирадикальной защиты [13]. Однако вопросы, связанные с изучением механизмов генерации активных форм кислорода (АФК) и активностью антиоксидантной защиты у женщин с ПНБ остаются практически не изученными.

В связи с этим представляет научный и практический интерес изучение механизмов генерации активных форм кислорода, состояние антиоксидантной системы у женщин с ПНБ, а также оценка доли окисленного альбумина, как маркера системного оксидативного стресса. Эти исследования позволят внести ясность в патофизиологические механизмы, приводящие к прерыванию беременности, а также возможно помогут разработать диагностические и прогностические параметры.

Цель исследования – Выяснение патофизиологической роли свободно-радикальных процессов при привычном невынашивании беременности и на этой основе предложить диагностические и прогностические параметры

Задачи исследования

1. Исследовать радикал-продуцирующую функцию нейтрофилов крови у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).
2. Определить антиоксидантный профиль плазмы крови у женщин с ПНБ.

3. Оценить степень системного оксидативного стресса у женщин с ПНБ по степени окисленно-модифицированного альбумина

4. Сопоставить полученные показатели окислительного стресса с клиническими данными и предложить диагностические и прогностические параметры.

Научная новизна

1. Проведенное исследование впервые выявило, что во время беременности, как физиологической, так и протекающей на фоне угрозы прерывания, нейтрофилы находятся в состоянии прайминга, о чем свидетельствует повышенный уровень базальной продукции свободных радикалов и повышенный ответ на стимулы.

2. Впервые установлено, что у женщин с неразвивающейся беременностью ответ нейтрофилов на стимулы был снижен, что указывает на иммуносупрессивное состояние, препятствующее самопроизвольному прерыванию беременности.

3. Впервые установлено, что антиоксидантная активность плазмы крови снижена после самопроизвольного аборта, что свидетельствует о расходовании антиоксидантов крови из-за развивающегося окислительного стресса в момент прерывания беременности.

4. Впервые установлено, что при неразвивающейся беременности антиоксидантная активность плазмы повышена, что указывает на присутствие в крови специфических молекул, обладающих антиоксидантными свойствами.

5. Впервые установлено, что у здоровых беременных, беременных с угрозой прерывания нет системного оксидативного стресса, затрагивающего белковое звено.

Теоретическая и практическая значимость

1. Продемонстрирована потенциальная возможность использования лабораторных критериев окислительного стресса в качестве прогностических

маркеров преждевременного прерывания беременности и неразвивающейся беременности.

2. Доказана эффективность кинетической хемилюминесценции для оценки функционального состояния нейтрофилов и антиоксидантной активности плазмы крови у женщин с угрозой прерывания.

3. Доказана эффективность определения доли окисленного альбумина в качестве параметра, характеризующего транспортную функцию альбумина и маркера системного окислительного стресса у беременных женщин.

4. Полученные данные подтвердили необходимость персонифицированного подхода к выбору антиоксидантной терапии во время угрозы прерывания и дозирования гормональных препаратов.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. Автор подготовил обзор данных отечественных и зарубежных источников литературы по теме исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы. Автором составлена компьютерная база данных 125 беременных, проведена аналитическая и статистическая обработки, даны научное обоснование и обобщение полученных результатов, сформулированы выводы и даны практические рекомендации. Автор самостоятельно проводила лабораторные исследования функциональной активности нейтрофилов; антиоксидантной емкости плазмы, определение доли окисленного альбумина. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их практической и клинико-лабораторной реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах и их внедрения в практику.

Внедрение результатов диссертации в практику

Полученные результаты используются в педагогическом процессе, в лекциях и практических занятиях по подготовке ординаторов и слушателей на кафедрах акушерства и гинекологии №1 и патологии человека лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ.

Положения, выносимые на защиту:

1. У здоровых беременных стимулированная радикал-продуцирующая функция нейтрофилов повышена по сравнению с небеременными женщинами.
2. При неразвивающейся беременности нейтрофильное звено иммунитета характеризуется сниженной базальной и стимулированной радикал-продуцирующей активностью.
3. Непосредственно сразу после выкидыша базальная и стимулированная активность нейтрофилов повышена по сравнению со здоровыми беременными. У беременных с угрозой прерывания отмечалась повышенная стимулированная активность по отношению к здоровым беременным.
4. При нормальной беременности и беременности с угрозой прерывания не развивается системного окислительного стресса, затрагивающего белковое звено.
5. В группах здоровых женщин, здоровых беременных женщин и с угрозой прерывания антиоксидантная емкость плазмы различается незначимо; при выкидыше этот показатель снижается, а при неразвивающейся беременности повышается.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась на совместной научно-практической конференции коллектива сотрудников кафедры патологии человека лечебного факультета и кафедры акушерства и гинекологии №1 лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ

25 сентября 2017г. Результаты диссертационного исследования доложены в устных докладах и материалах следующих международных конференций и конгрессов: Российская научно-практическая конференция с международным участием: «Снегиревские чтения-2016». День молодых исследователей. Москва. XXVII Ежегодная международная конференция РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» Санкт-Петербург 2017г. XXX Юбилейный международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» Москва 2017.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований – 3

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы, включающего источников, из них 54 отечественных и 112 зарубежных. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 8 таблицами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют: паспорту специальности 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1,2 и 9, паспорту специальности.14.01.01 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1 и 4 паспорта специальности.

Глава I. Обзор литературы

1.1 Этиология привычного невынашивания беременности

На сегодняшний день невынашивание беременности является серьезной социальной проблемой, оказывающей влияние на демографическую ситуацию в стране. Вследствие этого одним из приоритетных направлений в современном акушерстве является разработка оптимальной тактики ведения и лечение данной категории пациенток, а также ясное понимание основных патогенетических процессов при неразвивающейся беременности [14].

Привычное невынашивание — полиэтиологичное осложнение беременности, в основе которого лежат нарушения функции репродуктивной системы. Согласно ВОЗ диагноз привычного невынашивания устанавливается после трех или более случаев самопроизвольного выкидыша и наблюдается у 1% всех супружеских пар [15]. Однако в настоящее время в мировой литературе под привычным выкидышем подразумевают две и более потери беременности [8]. Частота привычного невынашивания в популяции составляет 2-5% от числа всех беременностей. В структуре невынашивания частота привычного выкидыша составляет от 5 до 20% [16].

К наиболее частым причинам ПНБ относят эндокринные, генетические, иммунологические, гемастазиологические нарушения репродуктивной системы, бактериальные и вирусные инфекции [15]. Зачастую, ПНБ вызывается сразу несколькими этиологическими факторами, одни из которых могут быть предрасполагающими, другие разрешающими. В свою очередь к прерыванию беременности приводят те факторы, которые вызывают изменения и гибель плодного яйца, а также нарушают связь плодного яйца с материнским организмом [7].

Большую роль в развитии самопроизвольных выкидышей у женщин играют социально-биологические факторы, особое место при которых

занимает хронический стресс, вредные привычки, низкий уровень жизни, а также изменившееся репродуктивное поведение в современном обществе [17-19]. Рядом авторов установлено, риск потери плода у женщин резко увеличивается после 35 лет, возрастая с 9% в 20-24 года до 75% после 45 лет, а также у мужчин после 40 [20, 21]. Slama R. и соавт. (2005) предполагают, что повышенный риск спонтанных аборт, связанный с мужским возрастом, является следствием увеличения частоты хромосомных аномалий в сперматозоидах, что способствует увеличению хромосомных нарушений у плода [22].

По данным В.Н. Серова частота невыясненных причин невынашивания составляет 41,2% [23]. На сегодняшний день большинство авторов придерживаются мнения о значительной роли генетических, тромбофилических и иммунных факторов в большинстве необъяснимых случаев ПНБ [24-29].

Хромосомные аномалии

Многочисленными исследованиями установлена высокая частота хромосомных нарушений у плода при самопроизвольных абортах [30]. По данным Boie J. и соавт. (1975) при генетическом исследовании в 50—65% абортусов выявлены хромосомные аномалии [31]. У женщин с привычным невынашиванием значительные структурные аномалии кариотипа встречаются в 10 раз чаще, чем в популяции и составляют 2,4% [32-34].

Тромбофилии

Известно, что у 30-50% женщин с ПНБ имеются различные нарушения системы гемостаза. К основным тромбофилическим нарушениям, осложняющим беременность и приводящим к потере беременности на любом ее этапе, относятся наследственные и приобретенные тромбофилии. К наследственным тромбофилиям относят: дефицит антитромбина, протеина С и S, гепарин-кофактора II, дефицит фактора XII, дис- и гипоплазминогенемия, дисфибриногенемия, дефицит тканевого активатора плазминогена, лейденская мутация гена V фактора свертывания крови. К

наиболее распространённой приобретённой форме тромбофилии относится антифосфолипидный синдром (АФС), частота встречаемости которого среди пациенток с ПНБ составляет 27-42% [35]. Согласно данным литературы, без лечения гибель эмбриона/плода наблюдается у 90-95% женщин, имеющих антифосфолипидные антитела. Патогенез АФС состоит в выработке материнским организмом антител у фосфолипидам клеточных мембран. В результате возникает дисбаланс в противосвёртывающей системе крови с развитием тромбозов, нарушением процессов имплантации и инфарктом плаценты [36-38].

Антифосфолипидные антитела (АФА) нарушают процессы ранней инвазии трофобласта. Они непосредственно влияют на инвазивные свойства трофобласта, нарушают его клеточную дифференцировку и созревание, снижают секрецию ХГЧ [39]. Под влиянием антител нарушается выделение клетками трофобласта интегринов и катехинов, необходимых для межклеточных взаимодействий и инвазии. Тромбоз, является основной причиной потерь беременности и задержки роста плода. АФА нарушают баланс системы гемостаза, влияя на различные его ступени: активируя коагуляцию и тромбоцитарное звено, блокируя фибринолиз и антикоагулянтную систему и вызывая эндотелиальную дисфункцию. По данным различных авторов, применение низких доз ацетилсалициловой кислоты, и низкомолекулярных гепаринов позволят уменьшить число репродуктивных потерь [40-42]

Эндокринные факторы

Среди эндокринных факторов, приводящих к потере беременности, к наиболее значимым относятся гиподисфункция яичников, проявляющаяся недостаточностью лютеиновой фазы (НЛФ), гиперандрогения (ГА) различного генеза, гиперпролактинемия, а также гиподисфункция щитовидной железы [43, 44].

Известно, что для сохранения и успешного развития беременности необходим достаточный уровень прогестерона. Дефицит прогестерона ведет

к неполноценной секреторной трансформации эндометрия, в результате чего будет неполноценная имплантация и в итоге — прерывание беременности. Прогестерон играет важную роль в развитии беременности, в частности, опосредованно через Т-лимфоциты, он ингибирует реакцию отторжения плода [45-47]. При обследовании пациенток с привычным невынашиванием, у 85% из них находят недостаточность лютеиновой фазы [5]. Развитие недостаточности лютеиновой фазы (НЛФ), предполагает несколько путей или факторов, вовлекаемых в патологический процесс — снижение гонадотропин-релизинг гормона, снижение фолликул-стимулирующего гормона, неадекватный уровень лютеинизирующего гормона, неадекватный стероидогенез или нарушения рецепторного аппарата эндометрия [48].

Однако в настоящее время большинство исследователей придерживаются мнения, о том, что недостаточность желтого тела не играет большой роли в прерывании беременности. По всей видимости, механизм прерывания беременности связан не с пониженным уровнем прогестерона, а с нарушениями в рецепторном звене эндометрия, вследствие частых аборт, хронического эндометрита, пороков развития матки, инфантилизма и внутриматочных синехий [49, 50]. Имеются сведения о том, что нарушения в рецепторном звене могут быть результатом нарушенной экспрессии гена рецепторов прогестерона [51]. Согласно представлениям Bick R.L. и соавт., (1998) снижение уровня гормонов при беременности обусловлено тем, что неадекватное плодное яйцо не стимулирует мать к должной продукции гормонов [52]. Формирование неполноценного плодного яйца может быть обусловлено гиперсекрецией ЛГ и гипосекрецией ФСГ в I фазу цикла. Гипоэстрогения на этапе селекции доминантного фолликула приводит к снижению овуляторного пика ЛГ и снижению уровня эстрадиола, замедлению темпов развития преовуляторного фолликула, преждевременной индукции мейоза, внутрифолликулярному перезреванию и дегенерации ооцита. Снижение продукции эстрадиола ведет к неполноценной продукции прогестерона и отсутствию должной секреторной трансформации

эндометрия. В этих условиях стимуляция фолликулогенеза даст лучший эффект, чем постовуляторное назначение прогестерона [23].

Гиперандрогения — патологическое состояние, обусловленное изменением секреции и метаболизма андрогенов, частота данной патологии составляет около 20-30%. Выделяют гиперандрогению надпочечникового, яичникового генеза (синдром поликистозных яичников), а также смешанные формы, частота которых составляет 57-58 %. Характерными гормональными критериями являются выраженное повышение уровня ДЭА (дегидроэпиандростерон) в крови и умеренная транзиторная гиперпролактинемия [53].

Анатомические аномалии

Частота анатомических аномалий у пациенток с привычным выкидышем колеблется в пределах 1-3%. К анатомическим причинам невынашивания относят: врожденные аномалии развития матки (двойная, двурогая, седловидная, однорогая матка, частичная или полная внутриматочная перегородка) и приобретенные анатомические дефекты — внутриматочные синехии (синдром Ашермана), субмукозную миому матки. Механизм прерывание беременности при анатомических аномалиях матки зачастую связан с неудачной имплантацией плодного яйца, нарушением васкуляризации и рецепции эндометрия [54, 55].

Инфекционные факторы

Важную роль в прерывании беременности по данным различных авторов играет персистирующая бактериально-вирусная инфекция. Среди пар с репродуктивными потерями инфекции, как причина невынашивания, определяются в 0,5-5% случаев [50]. Однако, некоторыми авторами ставится под сомнение значимая роль инфекции в патогенезе привычного невынашивания [56].

Прямое влияние инфекционных агентов заключается в инфицировании матки и плода, развитии хорионамнионита, фетоплацентарной недостаточности. Опосредованно инфекционный процесс влияет на потерю

плода путем активизации иммунных реакций, непосредственно направленных на элиминацию патогенов. Происходит активация эффекторных NK клеток, принимающих непосредственное участие в лизисе трофобласта и запуске цитокинового каскада [57].

Основными инфекциями, выявляемыми при обследовании семейный пар с привычным невынашиванием являются микробные ассоциации, среди которых преобладают условно-патогенные микроорганизмы в сочетании с вирусами. Наиболее частыми возбудителями являются хламидии, уреаплазмы, микоплазмы, трихомонады, цитомегаловирусная инфекция и их ассоциации, которые наблюдаются в 30-50% случаев [58].

Иммунологические нарушения

В настоящий момент новым направлением, изучающим проблему привычного невынашивания беременности является иммунология репродукции. Это динамически развивающаяся область медицины, посвященная изучению иммунологических взаимоотношений в системе мать-плацента-плод. Известно, что выживаемость семиаллогенного плода напрямую связана с угнетением иммунного ответа материнского организма [5]. Необходимым условием успешного пролонгирования беременности, является баланс между активным иммунитетом и иммунотолерантностью в децидуальной строме [59]. В период беременности происходит перестройка иммунной системы матери как на системном уровне, так и на локальном, что проявляется увеличением количества моноцитов и гранулоцитов, поглотительной способности макрофагов под влиянием гормонов плаценты [60, 61]. В момент имплантации оплодотворенной яйцеклетки происходит усиленное накопление NK клеток, Т лимфоцитов, а также макрофагов [62].

NK-клетки — натуральные, или естественные, киллеры (*natural killer cells*) представляют гетерогенную популяцию лимфоцитов системы врожденного иммунитета. Выделяют 2 субпопуляции натуральных киллеров, различающихся по плотности экспрессии CD56 и CD16: высокоцитотоксичные клетки CD56 dim, которые составляют > 90% NK-

клеток в периферической крови, и менее цитотоксические, но эффективно продуцирующие цитокины CD56 bright [63]. Они обладают естественной цитолитической активностью, способны продуцировать цитокины и хемокины и участвуют в противовирусном и противоопухолевом контроле организма, а также в поддержании иммунного гомеостаза [64, 65]. Формирование определенного цитотоксического ответа NK-клетками зависит от комбинации на их поверхности различных активирующих и ингибирующих рецепторов, которые регулируют их функциональную активность. Снижение или отсутствие ингибирующих сигналов приводит к преобладанию сигналов активации, что, в конечном итоге, ведет к лизису клетки-мишени и выбросу цитокинов [66, 67]. При физиологическом течении беременности популяция лейкоцитов децидуальной оболочки представлена в таком соотношении CD 56+ NK клетки (80%), CD3+T лимфоциты (10%), CD14+ макрофаги (10%) [68, 69]. Одной из основных функций NK клеток децидуальной оболочки, является регуляция инвазии трофобласта и роста плаценты. Наряду с этим также известна роль NK клеток, активизированных цитокинами в лизисе трофобласта. NK клетки вносят свой вклад в развитие иммунного ответа между организмом матери и плода [63, 70-73].

Иммунный ответ в организме матери может проходить по двум типам: Th1 тип-опосредованный Т-хелперами 1 порядка, Th 2 тип-опосредованный Т-хелперами 2 порядка, отличающихся друг от друга по характеру секреции цитокинов [74]. Th1 клетки вырабатывают интерферон, ИЛ 1, ИЛ 2, TNF α , принимающие участие в росте и дифференцировке Т и В лимфоцитов, естественных киллеров, противовирусной и антибактериальной защите. Th2 клетки вырабатывают ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ 9, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ14, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов, вызывающие преимущественно гуморальные реакции, гемопоэз, ангиогенез [75]. При нормальном течении беременности доминирует Th 2 тип иммунного ответа, переход от преимущественно гуморального ответа к клеточному (Th1) приводит к преждевременному прерыванию беременности [76, 77] [74].

По литературным данным к наиболее вероятным экзогенным факторам, обуславливающим доминирование Th 1 типа иммунного ответа относятся инфекционные агенты, поскольку гестационная иммуносупрессия является функциональным состоянием иммунной системы, при котором снижается ответ на слабые раздражители, но сохраняется высокий уровень реактивности на сильные [78].

По данным Бахаревой И.В. у беременных с урогенитальной инфекцией вирусной и смешанной этиологии наблюдается дисбаланс в системе выработки цитокинов, характеризующийся возрастанием концентрации ИЛ-1 α и снижением уровня рецепторного антагониста ИЛ-1 в сыворотке крови, что коррелирует с угрозой прерывания беременности и развитием преждевременной родовой деятельности [79].

Среди иммунологических причин невынашивания беременности в последние годы выделяют активацию CD19+5+ клеток, основное назначение которых связано с продукцией аутоантител к гормонам, имеющим важнейшее значение для нормального развития беременности: эстрадиола, прогестерона, хорионического гонадотропина [23, 80]. Нормальный уровень клеток CD19+5+ составляет от 2 до 10%. Уровень свыше 10% считается патологическим. При патологической активации CD19+5* вследствие увеличенного содержания аутоантител к гормонам у пациенток отмечается недостаточность лютеиновой фазы, неадекватная реакция на стимуляцию овуляции, синдром «резистентных яичников», преждевременное «старение» яичников и преждевременная менопауза [81-83]. Помимо непосредственного влияния на перечисленные гормоны при патологической активности этих клеток наблюдается недостаточность подготовительных к имплантации реакций в эндометрии и децидуальной ткани. Это выражается в децидуальном воспалении и некрозе, в нарушении образования фибриноида и избыточном отложении фибрина.

Известно, что важнейшим аспектом формирования нормальных взаимоотношений между материнским организмом и эмбрионом является

генетически детерминированная антигенная несовместимость матери и плода. Многими исследователями установлена важная роль лейкоцитарных антигенов (HLA, human leucocyte antigens) главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex), в процессе иммунологической адаптации плода к материнскому организму на ранних этапах развития и поддержания иммунологического гомеостаза.[84, 85]. Кодлируемые этими генами молекулы относятся к трем классам (I, II, III). В настоящее время описаны классические антигены МНС I класса (A, B, C), обнаруживаемые на всех клетках, содержащих ядро, тромбоцитах, и являющиеся единственными антигенами HLA, экспрессируемыми на неактивированных Т-лимфоцитах; неклассические антигены (E, F, G), а также антигены II класса (DR, DP, DQ), индуцирующие клеточный иммунитет. «Иммунологический парадокс беременности» обусловлен наличием на уникальной ткани трофобласта (пограничного слоя между слизистой оболочкой матки и собственно тканями эмбриона) дополнительных антигенов HLA-комплекса, идентифицированный как HLA-G-локус I класса [86]. Благодаря наличию этого антигена, клетки трофобласта могут индуцировать защитные иммунные реакции, такие как образование клеток-супрессоров классического иммунного ответа и блокирующих антител (MLR-Б-АТ), защищающих эмбрион от иммунной атаки материнского организма. Наличие достаточной выработки организмом матери MLR-Б-АТ является необходимым атрибутом нормальной беременности. Последний экспрессируется на ткани внеэмбрионального трофобласта, который внедряется в децидуальную ткань во время имплантации, а также на поверхности эндотелиоцитов сосудов плаценты и хориона в I триместре беременности. Предположительно, роль HLA-G состоит в блокировке естественных киллеров матери, тем самым защищая плод от атаки ее иммунной системы [87].

В литературе описано протективное влияние прогестерона на развитие беременности как мощного иммуносупрессора путем опосредованного

воздействия через систему цитокинов [88, 89]. В момент взаимодействия прогестерона с рецепторами Т-клетки CD8⁺ продуцируют прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (PIBF), который воздействуя на иммунокомпетентные клетки, направляет иммунный ответ матери в сторону менее активных NK клеток, несущих маркеры CD56⁺, CD16⁻ [45]. При наличии этих клеток иммунный ответ матери будет через Th-2 типа [54, 63, 90]. При низком содержании прогестерона или поражении рецепторного аппарата – иммунный ответ матери на трофобласт сдвигается в сторону лимфокинактивных киллеров (LAK) с продукцией провоспалительных цитокинов [5]. Провоспалительные цитокины ограничивают инвазию трофобласта, нарушая его нормальное формирование, вызывают активацию протромбиназы, что обуславливает тромбозы, инфаркты и его отслойку, что в конечном счете приводит к выкидышу [67]. Среди клеток, составляющих ворсины хориона к синтезу и продукции цитокинов способны различные клеточные популяции, включая клетки трофобласта, мезенхимальные клетки и резидентные макрофаги [91]. Также плацента, как орган с развитой цитокиновой сетью способна продуцировать цитокины. Макрофаги составляют до 40% нетрофобластных клеток ворсин хориона. Они представлены как в децидуальной оболочке матки, так и в плодовой части плаценты. Макрофаги фетоплацентарного комплекса продуцируют цитокины ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, стимулируют синтез простагландинов, и тем самым инициируют сократительную активность матки. Более того показано, что макрофаги могут самостоятельно продуцировать ПГЕ2 и ПГФ2 α , которые непосредственно воздействуют на эндометрий [61].

Несомненна роль плацентарных макрофагов, как «ключевых клеток плаценты», принимающих участие в межклеточных взаимодействиях, обеспечении иммунологической адаптации фетоплацентарного комплекса, участии в регуляции молекулярных процессов формирования плаценты [92]. К таким метаболическим процессам, в частности, относятся процессы деградации ДНК и нуклеотидов, аргиназный и декарбоксилазный пути

обмена аргинина, метаболизм активных форм кислорода и глутатиона. Шестопаловым А.В. установлено, что процессы синцитиализации и первой волны инвазии трофобласта сопровождаются увеличением генерации перекиси водорода плацентарными макрофагами, активацией в клетках трофобласта Са/Mg-зависимой эндонуклеазы, увеличением содержания аллантаина, высоким уровнем полиаминов. Данные об активности антиоксидантных ферментов плацентарных макрофагов и особенностях формирования антиоксидантной ферментативной системы плаценты человека в процессе физиологической беременности определяют их значимость в формировании защитно-приспособительных реакций, обеспечивающих состоятельность беременности [93].

Вопрос об этиологической роли свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности широко дискутируется в литературе. Локальная гипоксия оказывает существенное влияние на продукцию цитокинов и других секретируемых факторов в периферических мононуклеарных клетках, ткани плаценты и макрофагах фетоплацентарного комплекса [94, 95].

Изменения в тканях плаценты процессов свободнорадикального окисления (СРО), вызывающие повреждения структуры и нарушение проницаемости клеточных мембран играет немаловажную роль в патогенезе невынашивания беременности [96, 97]. Данные деструктивные процессы возникают вследствие проявляющегося дисбаланса между интенсивностью СРО и эффективностью системы антирадикальной защиты и могут быть обусловлены целым комплексом условий, включающих эндокринную недостаточность и вызванную нарушением транспорта кислорода гипоксию плода [98]. Вопросы, связанные с изучением механизмов генерации активных форм кислорода в свободнорадикальных процессах и активностью системы антиоксидантной защиты сыворотки крови у женщин с привычной потерей плода остаются практически неизученными и в связи с этим представляют значительный интерес для исследования.

1.2 Свободнорадикальные процессы в организме человека

В настоящее время установлено, что действия экстремальных факторов среды на молекулярном уровне приводят к усилению процессов окисления целого ряда биосубстратов: тиоловых соединений белковой и небелковой природы, аскорбиновой кислоты, нуклеиновых кислот, липидов и ряда др. веществ [99].

В последнее время в литературе активно обсуждается роль процессов свободнорадикального окисления в молекулярных механизмах адаптационных реакций при разнообразных заболеваниях, в том числе и при акушерской патологии. Причем характерной чертой исследований гомеостатических нарушений во время беременности является внимание исследователей к проблеме окислительного стресса, его роли и значению в патогенезе осложнений [13, 100].

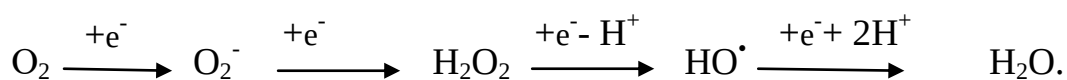
Свободные радикалы – это атом, группа атомов или молекулы с неспаренным электроном, занимающим наружную орбиту. Присутствие такого электрона наделяет радикал двумя характерными свойствами: очень высокой окислительной способностью, связанной с сильной электрофильностью и наличием магнитного момента, обусловленного нескомпенсированным спином неспаренного электрона [101, 102].

Реакции и процессы (комплексы реакций), идущие с участием свободных радикалов, называются свободнорадикальными реакциями и процессами [103]. Среди всех свободнорадикальных процессов в организме человека особое место отводят образованию двух типов свободных радикалов: АФК, а также появлению при окислении липидов радикалов органического происхождения [104, 105]. В тканях живых организмов осуществляется три типа процессов образования свободных радикалов: первичное инициирование, обусловленное факторами окружающей среды и внешними воздействиями, вторичное инициирование, связанное с цепным

свободнорадикальным окислением жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран, и ферментное инициирование [106].

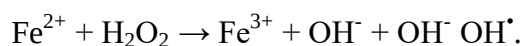
1.2.1 Активные формы кислорода

Среди всех разновидностей ферментативного инициирования важное место принадлежит процессу образования свободных радикалов кислорода [107]. Кислород, необходимый организму для функционирования цепи переноса электронов и многих других реакций, является одновременно и токсическим веществом, если из него образуются так называемые активные формы. К АФК относят: гидроксильный радикал $\text{OH}^\bullet$, супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\bullet -}$, пероксид водорода H_2O_2 , синглетный кислород O_2 [108]. Образование АФК зависит от числа электронов, одновременно восстановленных в молекулярном кислороде [109]. Четырехэлектронное восстановление кислорода происходит в митохондриях при помощи ферментов дыхательной цепи (митохондриальной цитохромоксидазы) с образованием двух молекул воды. В организме здорового человека таким путем восстанавливается до 95% потребляемого кислорода. Однако 2-5% всего поступающего в клетку кислорода метаболизируется по свободнорадикальному пути за счет одноэлектронного восстановления O_2 с образованием АФК:



При одноэлектронном восстановлении, которое катализируется многими оксидазами: ксантиноксидазой, альдегидоксидазой, НАДФН-оксидазой, цитохром С-оксидазой митохондрий, микросомально – монооксигеназной системой цитохрома Р450, липоксидазой; образуется супероксид анион-радикал (САР). САР может реагировать с пероксидом водорода путем трехэлектронного восстановления и образовывать гидроксильный анион OH^- и высокореакционный гидроксильный радикал $\text{OH}^\bullet$.

Пероксид водорода химически не очень активен, что связано с отсутствием в молекуле неспаренных электронов, но H_2O_2 может реагировать с ионами железа (реакция Фентона) с образованием гидроксильного радикала ($\text{OH}^\bullet$), обладающего свойствами мощного окислителя, по следующей схеме:



Наличие в клетках Fe^{2+} или ионов других переходных металлов увеличивает скорость образования гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода. Например, в эритроцитах окисление иона железа гемоглобина способствует образованию супероксидного аниона. Гидроксильный радикал образует вторичные свободные радикалы, в том числе перекисные соединения липидов [110].

Обычный кислород O_2 , которым мы дышим, представляет собой молекулу, имеющую два неспаренных электрона с параллельными спинами; его называют триплетным. Под действием различных факторов триплетный кислород переходит в возбужденное, синглетное состояние, в котором кислород весьма химически активен [104].

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ возникает как сопутствующий метаболит во многих ферментативных реакциях с участием СОД, каталазы, пероксидаз, а также в различных фотоиндуцирующих процессах [111].

АФК образуются практически во всех клетках организма. К клеткам, способным к генерации АФК относят: лейкоциты, из них наиболее активно генерируют нейтрофилы, а также тромбоциты [112]. АФК образуются внутриклеточно в митохондриях, микросомах, пероксисомах [113, 114] и внеклеточно при респираторном взрыве в процессе фагоцитоза. Под респираторным взрывом понимают резкое усиление потребления кислорода клетками-фагоцитами при их стимуляции [115]. Способность фагоцитирующих клеток выделять АФК в точке контакта цитоплазматической мембраны с чужеродными частицами имеет большое биологическое значение, так как обезвреживает микроорганизмы и тем

самым делает возможным их поглощение. Эта секреторная функция фагоцитов необходима для уничтожения бактерий, но также может привести к повреждению ткани [116].

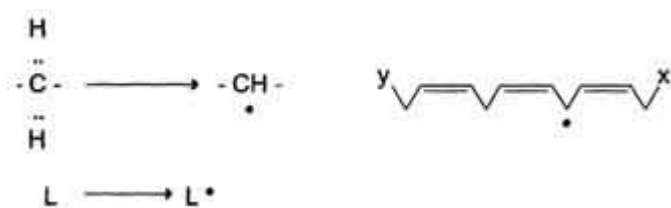
Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению [108].

1.2.2 Перекисное окисление липидов

Одним из проявлений свободнорадикального процесса является перекисное окисление липидов (ПОЛ), которое протекает в фосфолипидных структурах клеточных мембран. ПОЛ – цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов, частиц, имеющих неспаренный электрон, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления [117].

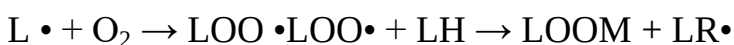
Стадии перекисного окисления липидов: [103]

1) Инициация: образование свободного радикала (L•):



Иницирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от CH₂-групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала.

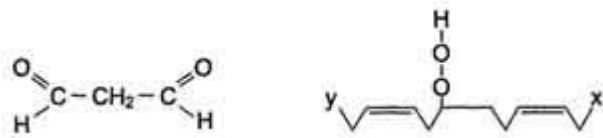
2) Развитие цепи:



Развитие цепи происходит при присоединении O₂, в результате чего образуется липопероксирадикал LOO• или пероксид липида LOOH.

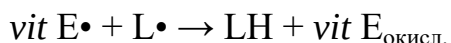
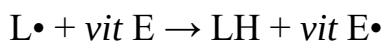
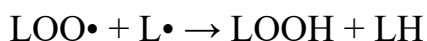
ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, т.е. каждый образовавшийся радикал инициирует образование нескольких других.

3) Разрушение структуры липидов



Конечные продукты перекисного окисления полиеновых кислот – малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты.

4) Обрыв цепи – взаимодействие радикалов между собой:



Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму.

Существует мнение, что ПОЛ инициируется ферментативно и неферментативно [118]. Неферментативное ПОЛ, локализованное в митохондриях, микросомах и лизосомах, инициируется аскорбиновой кислотой и некоторыми восстановителями, которое имеет место при некоторых патологических процессах, связанных с нарушением функции мембран, в частности воспалительные процессы, злокачественный рост, лучевое поражение [111]. Ферментативное ПОЛ, локализованное в микросомах печени, инициируется НАДФ-Н₂, цитохромом Р-450, пиррофосфатом и протекает в мембранах эндоплазматического ретикулума. При его помощи идет ферментативный синтез перекисей липидов, являющихся предшественниками таких биологически активных веществ как простагландины, тромбоксаны, простациклины и лейкотриены [119].

Продукты ПОЛ в малых концентрациях оказывают физиологическое действие и необходимы для регуляции проницаемости клеточных мембран, стабильности липопротеиновых комплексов. Установлено, что перекиси, образующиеся в результате неферментативного окисления, выступают в роли неспецифических регуляторов фаго- и пиноцитоза, регулируют проницаемость мембран лизосом [120]. Однако при чрезмерной активации свободнорадикальных процессов происходит усиление процессов перекисидации, включающего повреждения мембран липидов, нарушение ресинтеза АТФ, накопление перекисных продуктов денатурации белков [101]

Активация ПОЛ возникает как следствие резких изменений кислородного режима клетки. При этом гипероксия является причиной временного усиления процессов ПОЛ, а стойкая гипоксия ведет к значительному накоплению токсичных продуктов перекисного окисления липидов [121].

В настоящее время имеется большое количество работ, посвященных исследованию роли свободнорадикальных процессов в патогенезе различных заболеваний. По результатам исследования, проведенного С.Б. Болевичем в 2006 году получены данные, свидетельствующие об активации свободнорадикальных кислородных и липидных процессов и угнетении антиперекисной активности при бронхиальной астме [122]. Также имеются сведения об участии продуктов ПОЛ при сердечно-сосудистых [123], почечно-печеночных заболеваниях [124], экзогенных отравлениях [125], заболеваниях нервной системы.

1.2.3 Антиоксидантная система организма человека

В настоящее время известно, что для поддержания СРО на уровне, необходимом для нормального течения окислительных процессов в организме человека присутствует антиоксидантная система (АОС), препятствующая избыточному образованию и накоплению свободных радикалов [126]. [127] [128]. В ее состав входят: гидрофильные и

гидрофобные вещества с редуцирующими свойствами, различные ферменты [129].

Согласно современным представлениям антиоксиданты делятся на неферментные и ферментные соединения. К неферментным АО относят небелковые вещества, которые в свою очередь делятся на водорастворимые и жирорастворимые. К водорастворимым относятся аскорбиновая кислота, соединения, содержащие SH-группы (цистеин, глутатион, метионин), мочевая кислота. К жирорастворимым относятся вещества из группы витамина Е (токоферол), витамины А и К, флавоноиды (витамин Р), стероидные гормоны, полифенолы (убихинон). Основным механизмом действия АО неферментной группы является обрыв свободнорадикальной реакции. Эти вещества являются либо ловушками свободных радикалов, либо разрушают перекисные соединения [130].

Ферментативные антиоксиданты представлены антирадикальными и антиперекисными (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), а также оксидоредуктазными (глутатионредуктаза) ферментами, которые ингибируют реакции СРО как на стадии образования свободных радикалов, так и на стадии образования перекисей [111].

СОД – универсальный внутриклеточный фермент, обеспечивает превращение супероксид анион-радикала в менее активный окислитель – пероксид водорода. Образующийся пероксид водорода элиминируется ферментом каталазой. Каталаза находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество H_2O_2 , а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва».

Глутатионпероксидаза – важнейший селензависимый фермент, обеспечивающий инактивацию активных форм кислорода, так как он разрушает и H_2O_2 и гидропероксиды липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона. Сульфгидрильная группа глутатиона служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную группу глутатиона. Окисленный

глутатион восстанавливается глутатионредуктазой с использованием НАДФ Н₂, образующегося в пентозомонофосфатном цикле [131]. Таким образом, антиоксидантная система организма человека имеет многоуровневую и многокомпонентную организационную структуру, направленную на регуляцию свободнорадикальных реакций по принципу отрицательной обратной связи, заключающуюся в устранении вызываемого АФК ПОЛ на разных этапах. Нарушение динамического равновесия между про- и антиоксидантными системами может стать патогенетической основой оксидативного стресса и свободнорадикальной патологии [99, 132].

1.3 Состояние оксидантной и антиоксидантной систем во время беременности

Беременность – это состояние, при котором происходит метаболическая перестройка в организме матери, необходимая для правильного развития и роста плода. Плацентарные нарушения на ранних сроках гестации лежат в основе развития таких осложнений как самопроизвольное прерывание беременности, гестоз, неразвивающаяся беременность и синдром задержки роста плода [133]. Установлено, что нарушение баланса про- и антиоксидантной систем приводят к развитию окислительного стресса в тканях фето-плацентарного комплекса. При физиологической беременности развитие эмбриона на ранних сроках должно проходить в среде с низким содержанием кислорода. Локальная гипоксия защищает развивающийся плод от негативных и тератогенных воздействий свободных радикалов, кислородно-опосредованного повреждения синцитиотрофобласта и повышения апоптоза, а также способствует поддержанию стволовых клеток в плюрипотентном состоянии [134, 135]. При выкидыше первичные нарушения связаны с плацентарной дегенерацией, заключающейся в фрагментированном и тонком трофобласте, неполноценной инвазии синцитиотрофобласта в эндометрий, неполной закупоркой спиральных артерий и преждевременным проникновением

материнской крови в межворсинчатое пространство. В норме состояние окислительного стресса возникает к концу первого триметра, к 10 неделе гестации, в период формирования артериальной циркуляции связанной с притоком материнской крови через регрессирующие ворсины хориона и увеличения напряжения кислорода в плаценте. В течение долгого времени считалось, что присоединение материнского кровотока происходит непосредственно в момент имплантации [136]. Однако ряд исследователей на основе анатомических и ультразвуковых исследований, утверждали, что значительного притока материнской крови не происходит до 12 недель беременности [137]. Eric Jauniaux et al., исследовали изменения в напряжении кислорода в плаценте в конце 1 триместра. С помощью многопараметрического зонда было установлено, что напряжение кислорода резко возрастает от < 20 мм рт.ст. на 8-й недели беременности до > 50 мм рт.ст. в течение 12 недель. Этот рост совпадает с морфологическими изменениями в маточных артериях, которые способствуют свободному потоку материнской крови в плаценту. Этот процесс связан с увеличением концентрации мРНК и активности антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы, а также марганца и меди, цинка, супероксиддисмутазы в пределах плацентарной ткани. Вызванный в результате этого окислительный стресс выполняет в этой ситуации важные физиологические функции, участвуя в запуске механизмов дифференцировки клеток с одной стороны, а с другой может приводить к повреждению ворсинчатого дерева и прерыванию беременности [138]. Во втором триместре после формирования полноценной плаценты и притока материнской крови в межворсинчатое пространство напряжение кислорода возрастает в 3 раза и тем самым увеличивает плацентарный окислительный стресс. Этот процесс физиологичен и необходим для адекватного роста плода, однако данное состояние при дефиците антиоксидантной системы, изменяет плацентарное ремоделирование, приводит к эндотелиальной дисфункции, ослаблению метаболической и детоксицирующей функций

плаценты и, в конечном счете, приводит к нарушению роста и развития плода [139].

В настоящее время внимание клиницистов сосредоточено на изучении оксидантного статуса беременных женщин и роли АФК в патогенезе различных осложнений беременности [140, 141]. Так, имеются сведения об участии АФК в преждевременном разрыве околоплодных оболочек [142], в развитии гестоза [143].

В связи с тем, что все обменные процессы между матерью и плодом осуществляются через плаценту, трофобластический и эндотелиальный компоненты которых включают в себя фосфолипидные мембраны, исследование свободнорадикального окисления в повреждении мембран при беременности и ее патологии является актуальным.

В современной литературе рядом ученых активно обсуждается участие свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности [100]. Известно, что во время беременности происходит изменения в метаболизме белков, жиров и углеводов, направленные на обеспечение жизнедеятельности материнского организма и развитие плода [144, 145]. При этом отмечается увеличение процессов ПОЛ, обусловленное повышением концентрации полиненасыщенных жирных кислот, а также усилением тканевого дыхания и увеличением количества поглощаемого кислорода [146]. В норме избыточное количество ПОЛ инактивируется антиоксидантами. По данным Vural et al. (2000) у женщин с ПНБ было значительное снижение уровня аскорбиновой кислоты и α -токоферола в плазме крови, что свидетельствует о пониженном антиоксидантном статусе [147].

По данным Маматиевой М.А, у женщин с привычным невынашиванием беременности отмечалось значительное повышение продукции супероксидного анион-радикала и снижение супероксиддисмутазы в сыворотке крови, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в организме матери [148]. Nazem k. Ghneim был установлен сниженный уровень образования СОД и экспрессии гена hsSOD1

и повышение супероксидного анион-радикала у женщин с привычной потерей плода, а также сниженный уровень цинка, меди и селена [149].

Имеются сведения об участии оксидативного стресса в развитии гестозов. При гестозах повреждающим фактором липидного слоя клеточных мембран является активация ПОЛ, TNF- α , ИЛ-6, фосфолипазы A₂, тканевой гипоксии, на фоне угнетения антиоксидантной активности [150, 151]. Из данных Лебедеко В.С. известно, что при патологическом течении беременности, осложненной гестозом, происходит существенное и некомпенсированное увеличение уровня продуктов, ПОЛ и свободных жирных кислот, а также снижение активности глутатионредуктазы в плазме крови и эритроцитов [152]. Рядом авторов выявлено значимое повышение общей оксидантной и снижение антиоксидантной активности в плазме беременных с преэклампсией по сравнению с физиологической беременностью [150, 153].

Оксидативный стресс может оказывать деструктивное воздействие на клеточные структуры плаценты. По результатам исследования проведенного Кузьминых Т.У, Абрамченко В.В. при изучении тканей последа было установлено, что при осложненном течении беременности (угроза прерывания, гестоз, урогенитальная инфекция) имеются выраженные морфологические изменения в тканях последа, заключающиеся в повреждении биомембран и изменении иммунного гомеостаза. При преждевременном прерывании беременности отмечено усиление интенсивности процессов свободнорадикальных процессов, связанное с отложением патогенных иммунных комплексов в тканях последа. По данным Прокопенко В.М. спонтанное преждевременное прерывание беременности происходит в условиях развития окислительного стресса в митохондриях и постмитохондриальной фракции периферийного участка плаценты, где на фоне повышения уровня интенсивности процессов пероксидации наблюдается недостаточное увеличение общей емкости антиоксидантной

защиты и ослабление вне зависимости от локализации ее глутатионзависимого звена [154].

В литературе имеются многочисленные данные относительно антиоксидантного статуса и эффективности применения различных антиоксидантов при осложненной беременности. Так, по данным Zachara BA, Wasowicz W у женщин с привычным невынашиванием беременности имелось значительное снижение концентрации селена и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах и плазме крови по сравнению с небеременными женщинами [155]. Рядом исследователей [156, 157] установлено, что у женщин с ПНБ имелось снижение в сыворотке крови таких антиоксидантов как витамин А и Е, β -каротин, билирубин. Кроме того, у женщин был отмечен повышенный уровень ПОЛ и глутатиона.

Акушерская патология сопровождается изменением баланса между процессами свободнорадикального окисления и антиоксидантной активностью, проявляющимся увеличением интенсивности пероксидации на фоне снижения уровня антиоксидантов в системе мать-плацента-плод [99].

В связи с вышеизложенным, рассмотрение вопросов, связанных с ролью свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности, а также определение места антиоксидантной терапии в лечении данной патологии представляет научный и практический интерес.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Характеристика и критерии отбора пациентов

Для решения поставленных задач было выполнено комплексное клинико-лабораторное обследование 125 пациентов. Из них 28 беременных с угрозой прерывания (УПБ), из которых у 19 был установлен диагноз привычное невынашивание, 9 женщин с неразвивающейся беременностью (НБ). Группу контроля 1 (К1) составили 61 женщина с физиологическим течением беременности. Группа контроля 2 (К2) — 22 небеременные женщины, 5 женщин после самопроизвольного выкидыша до 22 нед. (К3).

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Возраст от 18 лет.
2. Пол-женский
3. Давность выкидыша для группы К3 не более 48 часов
4. Желание и способность пациента принять участие в исследовании и выполнять требования исследования.
5. Наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Маточная патология (пороки развития матки, миома матки и т.д.)
2. Острые инфекционные и воспалительные заболевания.
3. Отказ подписывать добровольное информированное согласие.

Все участники исследования за время наблюдения прошли клинико-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее:

- Сбор жалоб.
- Анамнестические данные: наследственность, аллергоанамнез, гемотрансфузии, трудовой, эпидемиологический анамнез, перенесенные заболевания, оперативные вмешательства,

менструальная, репродуктивная функции, гинекологические заболевания, количество и исход предыдущих беременностей.

- -Объективный осмотр: антропометрические показатели, телосложение, состояние кожных покровов и слизистых оболочек, состояние дыхательной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и мочеполовой систем.
- Гинекологический осмотр: оценка состояния наружных половых органов, состояние слизистой влагалища, шейки матки, определение положения, размеров, консистенции, болезненности матки и придатков, оценка характера выделений из половых путей и др
- Общеклинические методы исследования: клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, исследование системы гемостаза, электрокардиография, обследование на ВИЧ, гепатиты В и С, антитела к бактериоскопическое исследование мазков из влагалища.
- Ультразвуковое исследование. При ультразвуковом исследовании определяли: наличие плодного яйца в полости матки, жизнеспособность эмбриона, соответствие размеров матки гестационному сроку, характер имплантации, наличие патологических образований в шейке матки, матке и придатках. Ультразвуковое сканирование проводили при помощи аппарата «Toshiba Xario 200» (Япония) с использованием трансабдоминальных и эндовагинальных конвексных датчиков частоты 3,5 и 10 МГц.
- Методики определения оксидативного стресса: оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией; определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции в модификации, основанной на регистрации и обработке полной кривой развития ХЛ

во времени; математический анализ кинетической кривой хемилюминесценции с помощью программного модуля на базе платформы LabView (разработчик А.Ю. Рябов); определение окислительной модификации альбумина по триптофановой флуоресценции.

Клиническая часть исследования была выполнена в гинекологическом и акушерском отделении ГБУЗ «Дмитровская городская больница» в период с 2013 по 2016 год. Экспериментальная часть проводилась на базе кафедры медицинской биофизики ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. кафедрой академик РАН Владимиров Ю.А.).

Оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией

Метод хемилюминесцентной оценки активности нейтрофилов основан на регистрации развития во времени свечения клеток, стимулированных последовательно двумя соединениями с разным механизмом действия. На первом этапе нейтрофилы стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) с внутриклеточным механизмом действия, на втором этапе проводили основную стимуляцию *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) – стимул с внеклеточным механизмом действия. Анализ проводили на 12-ти кюветном хемилюминометре Lum1200 (ДИСофт, Россия). Использовали люминол (в качестве хемилюминесцентного зонда) (Sigma, США); раствор Хенкса с глюкозой без красителя (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Россия), стабилизированный 2 мМ HEPES; *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, фМЛФ; форбол-12-миристат-13-ацетат, ФМА (все Sigma, США).

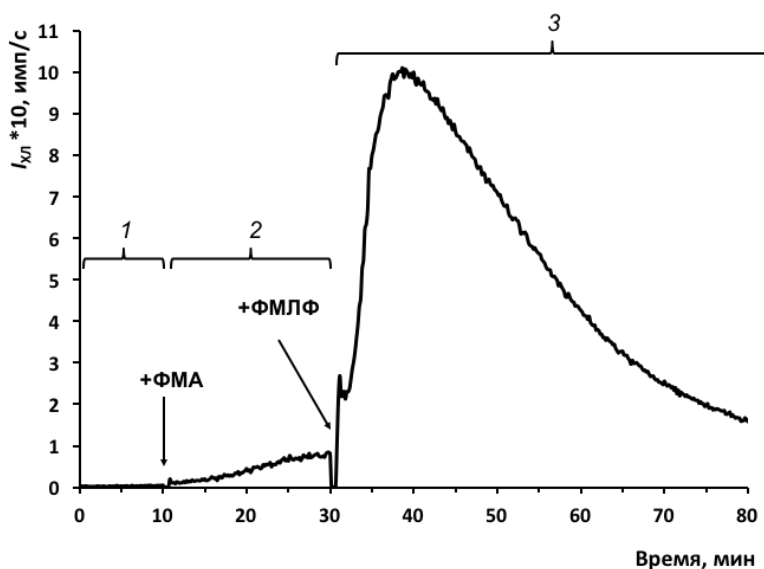


Рис. 1. Типичная кривая развития ХЛ при двойной стимуляции нейтрофилов: (1) — спонтанная ХЛ, (2) — предстимуляция ФМА, (3) — основная стимуляция фМЛФ. Стрелками обозначены моменты добавления стимулов.

Исследование проводили согласно методике [158]. В кювету, содержащую раствор Хенкса и люминол в конечной концентрации 45 мкМ, помещали цельную кровь, отобранную в вакутейнеры с гепарином, в конечной концентрации 4,5% (45 мкл на 1,000 мл раствора в кювете) и регистрировали спонтанную хемилюминесценцию (ХЛ) в течение 12 минут, затем вносили ФМА (конечная концентрация в кювете 50 нг/мл). После 20 минут инкубации проводили стимуляцию фМЛФ (конечная концентрация 10 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 мин (рис.1).

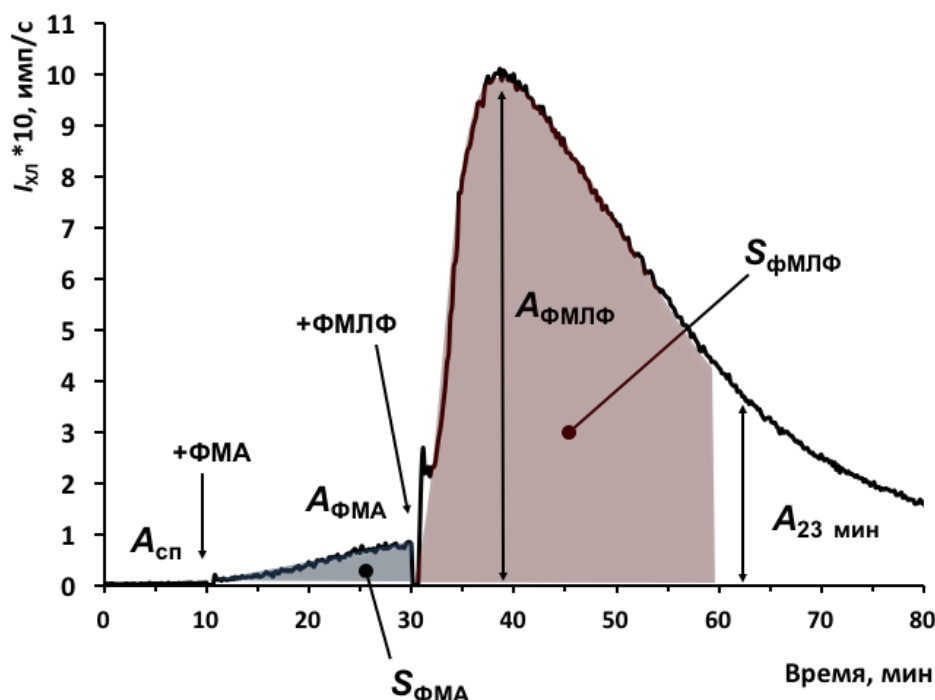


Рис. 1. Аналитические показатели исследования кривой развития ХЛ (пояснение в тексте). Стрелками обозначены моменты добавления стимулов.

В исследуемой группе изучали аналитические показатели — 1) удельную спонтанную активность нейтрофила $A_{\text{сп}}^*$ (амплитуда базальной, деленная на количество нейтрофилов в пробе), 2) удельную пиковую активность праймированного нейтрофила $A_{\text{ФМА}}^*$ (амплитуда ФМА-индуцированной ХЛ, деленная на число нейтрофилов), 3) удельную пиковую активность стимулированного нейтрофила $A_{\text{фМЛФ}}^*$ (амплитуда фМЛФ-индуцированной ХЛ, деленная на число нейтрофилов), 4) суммарная удельная пиковая активность $S_{\text{фМЛФ}}^*$ (светосумма вспышки фМЛФ-индуцированной ХЛ за 30 минут после добавления фМЛФ, деленная на число нейтрофилов) 5) интегральный уровень спонтанной ХЛ $A_{\text{сп}}$, (интенсивность ХЛ на 10-минуте развития свечения) 6) амплитуду ФМА-стимулированной ХЛ $A_{\text{ФМА}}$ (интенсивность ХЛ спустя 20 минут после добавления ФМА), 7) амплитуду вспышки фМЛФ-индуцированной ХЛ $A_{\text{фМЛФ}}$ (интенсивность в максимуме пика). 8) суммарную радикал-продуцирующую активность клеток крови $S_{\text{фМЛФ}}$ (светосумма вспышки фМЛФ-

индуцированной ХЛ за 30 минут после добавления фМЛФ), 9) коэффициент праймирования $K_{\text{прайм}} = A_{\text{ФМА}}/A_{\text{сц}}$ (отражает способность нейтрофилов реагировать на праймирующий фактор). 10) коэффициент активации $K_{\text{акт}} = A_{\text{фМЛФ}}/A_{\text{ФМА}}$ (отражает способность нейтрофилов реагировать на стимул после праймирования). 11) коэффициент затухания респираторного взрыва K_d (амплитуда фМЛФ-индуцированной ХЛ, деленная на интенсивность фМЛФ-индуцированной ХЛ на 23-й минуте после добавления фМЛФ) (рис 2), Полученные данные сравнивали с группами контроля.

2.2.2 Математическое моделирование хемилюминограмм кривых нейтрофилов методом деконволюции

Кинетическая кривая ХЛ при двухстадийной стимуляции имеет сложный характер и может быть математически обработана с целью разложения на составляющие контуры. Эта процедура называется деконволюцией, для ее выполнения был разработан специальный модуль на базе платформы LabView (разработчик А.Ю. Рябов). В результате, итоговая кривая представляется как математическая сумма квадратично-экспоненциальных функций. Оказалось, что любая кривая может быть разложена на три составляющие: 1) ФМА-индуцированная продукция АФК, 2) «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внеклеточной продукцией АФК через рецепторный путь, 3) «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внутриклеточной продукцией АФК (рис.3).

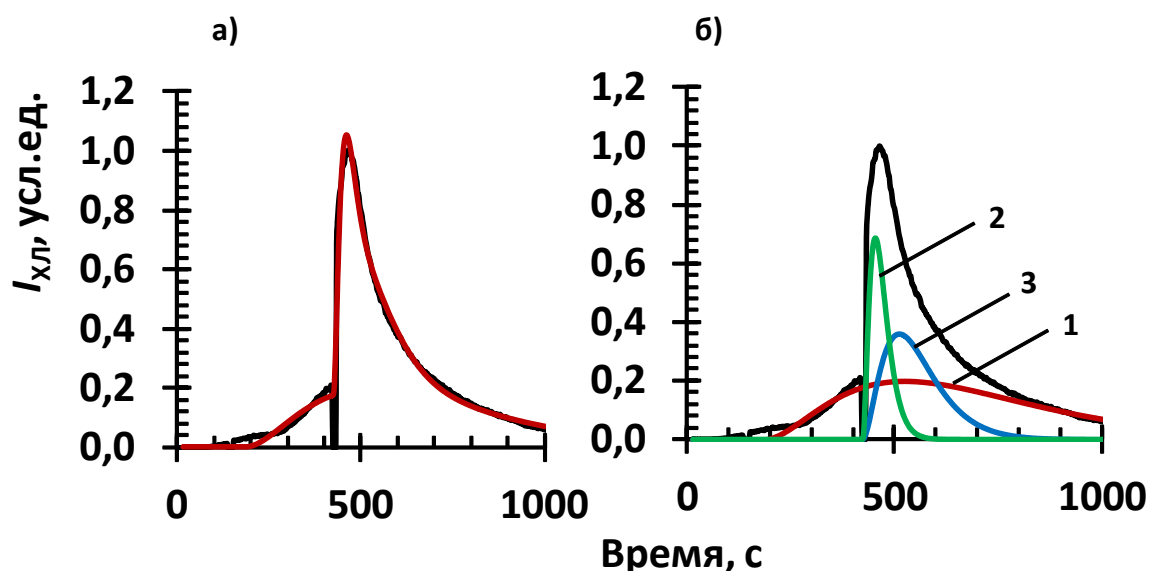


Рис. 3. Кривая кинетической ХЛ нейтрофилов крови при ответе на два стимула (ФМА и фМЛФ): а) результат математического моделирования и экспериментальная кривая, б) результат деконволюции на три квадратично-экспоненциальные функции (пояснение в тексте).

2.2.3 Определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции

Оценку антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови проводили с помощью методики, основанной на подавлении хемилюминесценции (ХЛ) [15]. Источником свободных радикалов в системе являлось диазосоединение — 2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП; Fluka, США). В качестве хемилюминесцентного зонда использовали люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталевой кислоты, Sigma, США). Хемилюминесцентный анализ плазмы проводили на однокюветном хемилюминометре SmartLum 100 (ДИСофт, Россия) [159].

В микропробирку объемом 1,5 мл помещали 50,0 мкл 50 мМ раствора АБАП и 20,0 мкл 0,1 мМ люминола. Смесь перемешивали в течение двух минут на встряхивателе «Vortex yellow line tts2» при частоте 1400 об/мин и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. Образование свободных радикалов в системе инициировали добавлением в кювету 930

мкл нагретого (37°C) фосфатного буферного раствора (100 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4; Sigma, США) к 70,0 мкл смеси АБАП и люминола. Помещали пробирку в кюветное отделение хемилюминометра. Регистрировали свечение до достижения стационарного уровня (I_0) при 37°C, затем добавляли 10 мкл плазмы крови, предварительно разбавленной в 10 раз фосфатным буферным раствором. После добавления плазмы крови свечение прекращалось благодаря нейтрализации радикалов антиоксидантами плазмы крови, прежде всего, мочевой кислотой. После расходования антиоксидантов происходило нарастание свечения и достижение нового стационарного уровня I (рис. 4). Общий объем пробы в кювете составлял 1,000 мл.

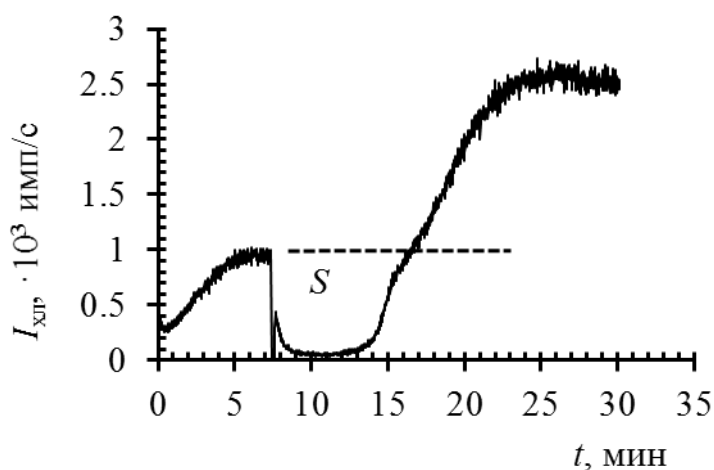


Рис. 4. Типичная кривая развития хемилюминесценции при исследовании антиоксидантных свойств плазмы крови. Аналитический сигнал $S(\text{AOA})$ — площадь над кривой, «вырезаемая» антиоксидантами.

В качестве аналитического сигнала использовали $S(\text{AOA})$ — площадь над кривой, «вырезаемую» антиоксидантами.

2.2.3 Оценка окислительной модификации альбумина по триптофановой флуоресценции

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,00 см.

Предварительно из плазмы крови отделяли глобулины — к 100 мкл плазмы добавляли равное количество насыщенного раствора сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄, Sigma-Aldrich, США), при этом глобулины осаждались, а альбумин оставался в растворе. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 450 *g* (микроцентрифуга MiniSpin — Eppendorf, Нидерланды). Использование сульфата аммония в качестве высаливателя не оказывало мешающего влияния проведению спектрофлуориметрических исследований.

Полученную безглобулиновую плазму предварительно разбавляли в 500 раз в 100 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7,4) и одновременно регистрировали спектр флуоресценции и спектр поглощения. Для расчета доли окисленного альбумина использовали формулу:

$$\text{ДОА} = \frac{(I_0 - I)}{I_0}$$

где I — флуоресценция альбумина в исследуемой плазме ($\lambda_{\text{ex}} = 260$ нм, $\lambda_{\text{max}} = 335$ нм), I_0 — флуоресценция чистого альбумина в концентрации, равной концентрации альбумина в плазме, определенной биохимическим методом.

2.3 Статистическая обработка материала

Статистическую обработку данных проводили, используя программный пакет GraphPad Prisma 6.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Для проверки гипотезы о нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка ($p > 0,05$). Для изучения связи между данными использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент корреляции признавался достоверным при $p < 0,05$. Достоверность различия между группами определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Глава 3. Клиническая характеристика пациентов

В исследовании принимали участие 125 пациентов, из которых 28 беременных женщин с угрозой прерывания беременности. Из них у 19 пациентов установлен диагноз ПНБ. Средний срок беременности составил $19,3 \pm 7,6$ нед. Угроза прерывания проявлялась тянущими болями внизу живота, скудными кровянистыми выделения из половых путей. У 2 женщин произошла гибель эмбриона на сроке беременности 8-9 недель. У остальных пациенток беременность завершилась самопроизвольным выкидышем или преждевременными родами.

Группа пациенток с неразвивающейся беременностью ($n = 9$). Диагноз устанавливался по результатам объективного осмотра и данных ультразвукового исследования. Средний срок беременности составил $6,1 \pm 1,5$ нед. Группу К1 составили 61 пациентка, беременность которых закончилась срочными родами. Средний срок беременности составил $15,6 \pm 8,3$ нед.

Небеременные здоровые женщины (К2). Средний возраст составил 29,6 лет. Группа женщин после самопроизвольного выкидыша ($n = 5$). Давность выкидыша от 4,5 до 48 часов.

Терапия пациентов с угрозой прерывания включала в себя препараты прогестеронового ряда («Дюфастон», «Утрожестан») в терапевтических дозировках, гемостатическую, витаминотерапию, спазмолитическую, а также по показаниям антибактериальную терапию препаратами широкого спектра действия.

При установке диагноза неразвивающаяся беременность, пациентам проводили плановое выскабливание полости матки на фоне антибактериальной, противовоспалительной терапии.

Возраст обследуемых варьировал от 18 до 43 лет (средний возраст $29,7 \pm 5,7$ года). Распределение пациентов по возрастным категориям в группах сравнения представлено в табл. 1.

Распределение пациентов по возрастным категориям

Возраст (лет)	Группы обследованных (n=125)				
	УПБ (n=28)	НБ (n=9)	K1 (n=61)	K2 (n=22)	K3 (n=5)
18-24	1 (3,6%)	1 (11%)	16 (26,2%)	1 (5%)	-
25-29	9 (32%)	1 (11%)	18 (29,5%)	9 (41%)	1 (20%)
30-34	8 (28,8%)	2 (22%)	15 (24,5%)	2 (9%)	1 (20%)
35-39	9 (32%)	3 (34%)	10 (16,4%)	10 (45%)	2 (40%)
Старше 40	1 (3,6%)	2 (22%)	2 (3,4%)	-	1 (20%)

При объективном осмотре пациентов отмечался женский тип телосложения с правильным развитием вторичных половых признаков. При общем объективном обследовании беременных острой патологии со стороны сердечно-сосудистой, легочной, пищеварительной и мочевыделительной систем не выявлено.

По данным литературы, избыточная масса тела значительно осложняет течение беременности и является фактором риска перинатальной патологии [160]. Избыточная масса тела наблюдалась в 56,8% беременных с угрозой прерывания, а индекс массы тела в среднем был равен $25,43 \pm 5,4$ кг/рост², медиана 26. В группе с неразвивающейся беременностью также отмечался высокий процент пациентов с нарушением жирового обмена (56%), ИМТ составил $23,11 \pm 5,22$ кг/рост², медиана 25. Нормальные показатели ИМТ имели 39,3 % пациентов с угрозой прерывания и 33% с неразвивающейся беременностью. Напротив, в группах контроля K1 и K2 нормальный ИМТ составил 65,6% и 68,3%. Медиана для группы K1 составила 22, ИМТ в

среднем $23,49 \pm 4,49$ кг/рост². Для группы К2 медиана -20,5, ИМТ составил в среднем $21,05 \pm 3,29$ кг/рост². Результаты представлены в табл. 2

Таблица 2

Распределение пациентов, в зависимости от ИМТ

ИМТ	Беременные с угрозой прерывания	Неразвивающаяся беременность	Здоровые беременные	Небеременные	Пациенты после самопроизвольного выкидыша
<18	1 (3.6%)	1 (11%)	2 (3.3%)	3 (13.7 %)	0
18-25	11 (39.3%)	3 (33%)	40 (65.6%)	15 (68.3%)	1 (20%)
25-30	8 (28.6%)	4 (45%)	12 (19.7%)	4 (18%)	1 (20%)
30-35	6 (21.4%)	1 (11%)	4 (6.6)	0	2 (40%)
>35	2 (7.1%)	0	3 (4.8%)	0	1 (20%)

При изучении анамнеза у всех обследованных пациенток были выявлены различные нарушения менструального цикла (табл.3), причем более выраженные в группе беременных с угрозой прерывания: менструальный цикл более 31-35 дней отмечен в 64,7% пациентов с угрозой прерывания и в 22,9 % - группы К2; меноррагии (длительность менструации свыше 7 дней - в 64,3% случаев, обильные менструации - в 22% случаев в группе УПБ и в 60% в К3; альгодисменорея (77% случаев в группе с неразвивающейся беременностью и в 15% - в группе К2); нерегулярные менструации (56% случаев в группе УПБ и в 60 % - в группе К3).

Характер менструального цикла у обследуемых пациентов

Длительность менструального цикла	Группы обследованных (n=125)				
	УПБ (n=28)	НБ (n=9)	К1 (n=61)	К2 (n=22)	К3 (n=5)
21-24	4 (14,2%)	1 (11%)	12 (19,8)	3 (14%)	1 (20%)
25-30	6 (21,5%)	2 (22%)	35 (57,3)	15 (68%)	2 (40%)
31-35	18 (64,3)	6 (67%)	14 (22,9)	4 (18%)	2 (40%)
Продолжительность менструации (дни)					
До 3-х	6 (22%)	2 (22%)	8 (13%)	2 (9%)	0
4-7	10 (34%)	3 (34%)	48 (79%)	16 (73)	3 (60%)
>7	12 (44%)	4 (44%)	5 (8%)	4 (18)	2 (40%)
Характер менструации					
скудные	12 (44%)	7 (78%)	6 (10%)	1 (5%)	1 (20%)
умеренные	10 (34%)	1 (11%)	49 (80%)	17 (77%)	1 (20%)
обильные	6 (22%)	1 (11%)	6 (10%)	4 (18%)	3 (60%)
регулярные	12 (44%)	6 (66%)	53 (87%)	19 (86%)	2 (40%)
нерегулярные	16 (56%)	3 (34%)	8 (13%)	3 (14%)	3 (60%)
болезненные	11 (39%)	7 (77%)	9 (15%)	6 (27 %)	2 (40%)
безболезненные	17 (61%)	2 (23%)	52 (85%)	16 (73%)	3 (60%)

При изучении гинекологического анамнеза отмечено преобладание воспалительных заболеваний органов малого таза: хронический сальпингоофорит составил 28,5 % в группе с угрозой прерывания и в 4,5% и 5% в группах небеременных и здоровых беременных; хронический

эндометрит в 57% случаев был в группе УПБ, по сравнению с 3% в группе К1. Структура гинекологической заболеваемости представлена на рис.5

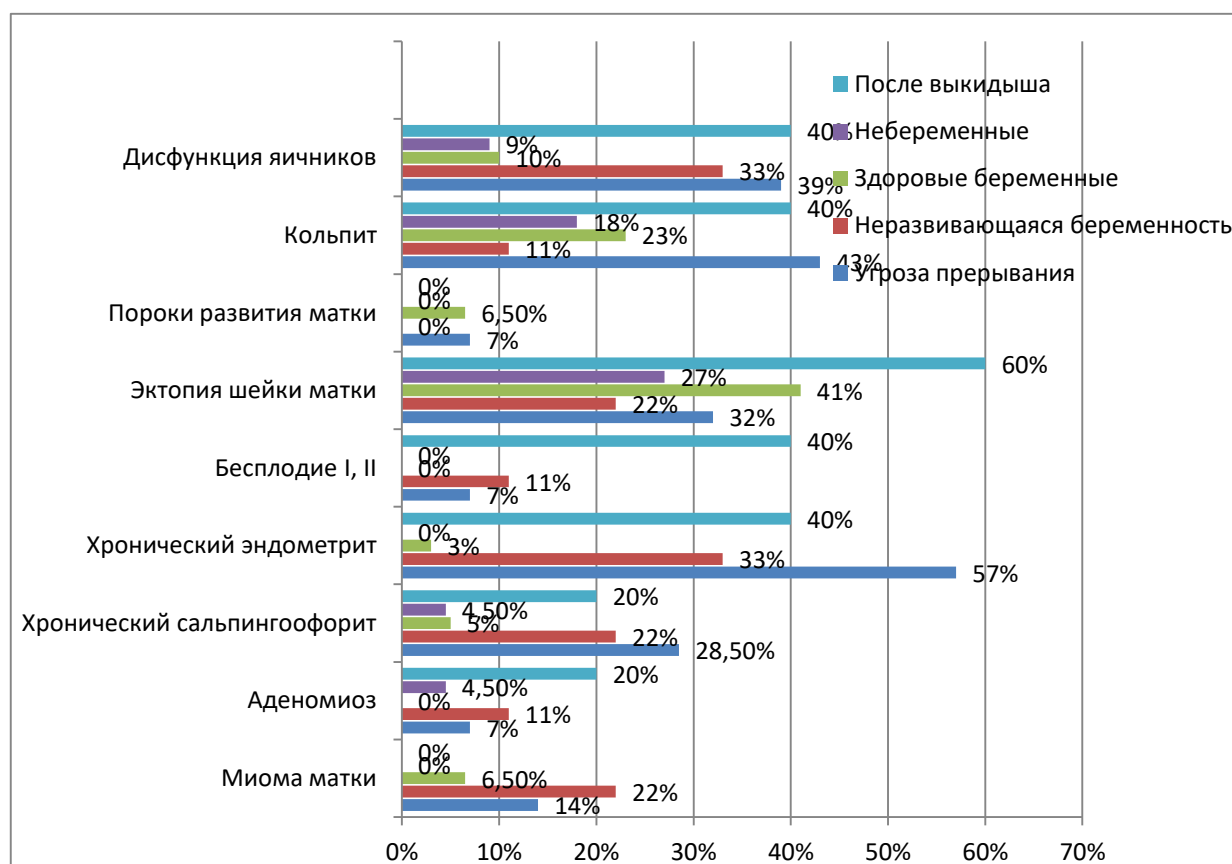


Рис 5. Структура гинекологической заболеваемости в виде гистограммы.

Эти данные в целом указывают на совокупность различных заболеваний в группах пациентов с угрозой прерывания, а также с неразвивающейся беременностью, что указывает на влияние данных патологий на течение и прогноз беременности.

При изучении репродуктивной функции обращалось внимание на число беременностей и их исходы. Исходы беременностей у обследованных женщин представлены в рис. 6.

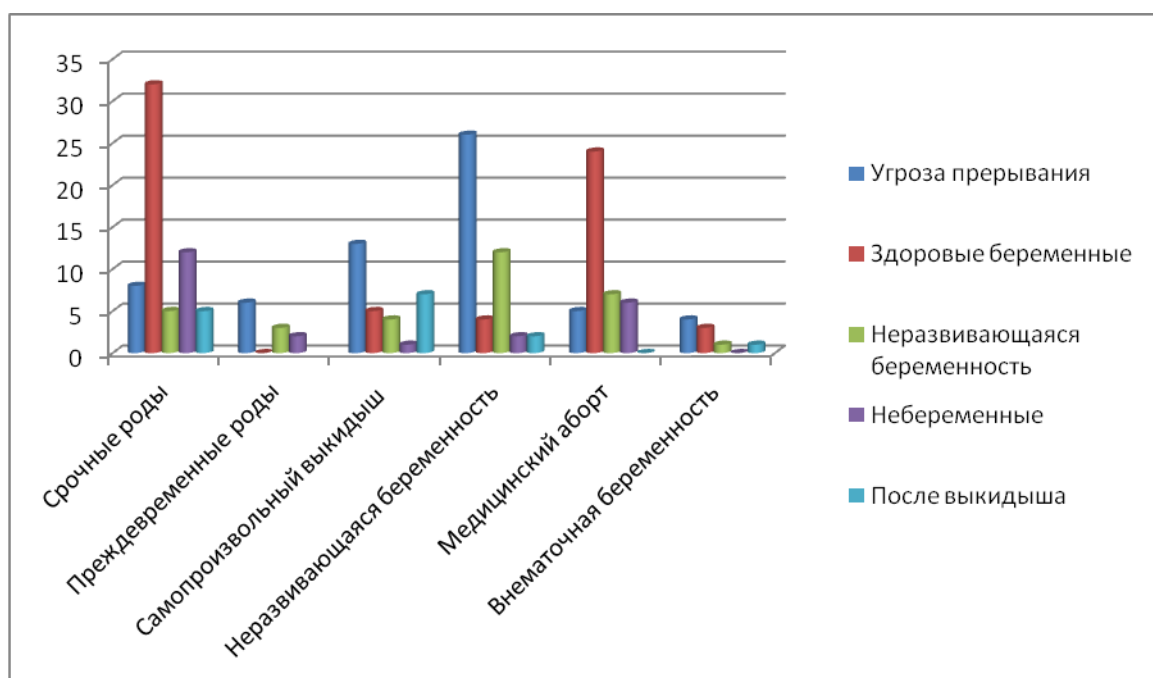


Рис 6. Исходы предыдущих беременностей.

Как видно из представленных данных, лишь в 12,9% у женщин с угрозой прерывания в анамнезе были отмечены своевременные роды, в 8% был произведен медицинский аборт по желанию женщины. В остальных случаях имели место неблагоприятные исходы беременностей. Отмечен высокий процент недонашивания беременности. В группе УПБ в 9,7% имели место преждевременные роды, в 21 % случаев отмечался самопроизвольный аборт, и в 42% происходило замирание плода на раннем сроке гестации. В группе с неразвивающейся беременностью также отмечен высокий процент замерших беременностей (37,5%), тогда как в группе с физиологическим течением беременности самопроизвольный аборт был в 7,6 % случаев, диагноз неразвивающейся беременности был установлен в 5,8% случаев, а срочные роды составили 47% от числа всех беременностей.

Глава 4. Результаты собственных исследований и их обсуждение.

4.1 Оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией

Хемилюминесценцию успешно применяется при изучении иммунных нарушений, нарушений метаболизма, дисфункции эндотелия, ишемии/реперфузии миокарда и мозга, онкологических и воспалительных заболеваний, а также многих других болезней, патогенез которых связан с оксидативным стрессом [161].

Новый метод ХЛ оценки функциональной активности нейтрофилов, основанный на последовательной стимуляции в образце цельной крови двумя стимулами, позволяет оценить максимальный радикал-продуцирующий потенциал нейтрофилов. Стимулы ФМА и ФМЛФ имеют разный механизм действия. ФМА (внутриклеточный механизм) проникает в клетку путем пассивной диффузии и активирует протеинкиназу С. ФМЛФ характеризуется внеклеточным рецепторным механизмом, причем стимуляция фМЛФ обусловлена последовательной сменой внеклеточного и внутриклеточного синтеза АФК. Взаимодействие фМЛФ со специфическими рецепторами приводит к немедленной выработке АФК во внеклеточную среду НАДФН-оксидазными комплексами, находящимися на плазматической мембране. Активация рецепторов фМЛФ стимулирует растянутый во времени процесс фагоцитоза и образование фагосом, в которых также происходит синтез АФК [158].

Основным источником АФК в крови являются фагоциты. Генерация осуществляется с помощью ферментного комплекса НАДФН-оксидазы. Изоформа NOX2, первая изученная НАДФН-оксидаза, представляет собой многокомпонентный ферментативный комплекс, направленный на перенос

электрона на молекулу кислорода. Этот комплекс встроен в липидный бислой мембраны и может находиться как на плазмалемме, так и на мембранах секреторных вакуолей, гранул, содержащих желатиназу, или специфических гранул нейтрофилов. Весь ферментативный комплекс состоит из нескольких субъединиц. В покоящейся клетке эти субъединицы разобщены и распределены между плазматической мембраной и цитозолем. Во время активации клетки каким-либо стимулом запускается каскад внутриклеточных посредников, сопровождающийся стремительным входом ионов кальция в клетку, активацией протеинкиназы C, фосфолипазы A_2 , что приводит к фосфорилированию белков *p47-phox* и *p67-phox* и сборке мембранного комплекса НАДФН оксидазы и активный синтез супероксидного радикала [162].

В эксперименте активацию клетки вызывают воздействием различных стимулов, которые подразделяют на корпускулярные (частицы латекса, опсонизированный и неопсонизированный зимозан, бактерии и их компоненты, активированный уголь) и растворимые агенты (фМЛФ, аллергены, пирогенал). Указанные индукторы воздействуют через рецепторный аппарат фагоцита. Безрецепторная активация клеток достигается после воздействия кальциевого ионофора A_{23187} или активатором ПкС ФМА, который проникает в клетку за счёт пассивной диффузии [163].

Данные были проверены на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка. Распределение данных не является нормальным, поэтому дальнейшие оценки проводили по непараметрическим критериям ($p < 0.005$).

Оценка удельной активности нейтрофила

При определении удельной спонтанной активности нейтрофила $A_{\text{сп}}^*$ в группе КЗ значения были выше в 4,5 раза по отношению к НБ ($p = 0,007$), по отношению к УПБ в 2,1 раз, по отношению к группе К1 в 2,4 раза, однако различия не достоверны. Удельная пиковая активность нейтрофила в ответ на стимул ФМА была также достоверно выше у КЗ по сравнению с НБ в 8

раз ($p = 0,001$), в 4,7 раз к К1 ($p = 0,0027$) и в 3,7 раз по отношению к УПБ ($p = 0,001$). Удельная активность в ответ на стимул ФМЛФ статистически значимо выше в группе УПБ по отношению к НБ в 2,4 раза ($p = 0,003$), в 2,5 раз по отношению к К3 ($p = 0,05$), в 1,7 раз относительно К1 ($p = 0,003$). Суммарная удельная радикал-продуцирующая активность нейтрофила была достоверно выше в группе УПБ по отношению к НБ в 2 раза ($p = 0,002$), в 2,6 раз относительно К3 ($p = 0,01$) и в 1,8 раз относительно К1 ($p = 0,004$). Оценка удельной активности нейтрофила представлена в табл. 4

Таблица 4

Оценка удельной активности нейтрофилов по группам

Группа		УПБ	НБ	К1	К3
Удельная спонтанная активность нейтрофила	25%	0,58	0,4	0,48	1,18
	Медиана	1,28	0,59	1,15	2,72
	75%	2,7	1,45	2,25	6,56
Удельная пиковая активность нейтрофила на стимул ФМА	25%	3,15	2,9	2,75	16,65
	Медиана	7,3	3,4	5,7	27
	75%	13,38	8,8	10,75	127,7
Удельная пиковая активность нейтрофила на стимул ФМЛФ	25%	70,53	48,35	52,8	40,15
	Медиана	131,6	55,7	77,5	53,9
	75%	202,9	86	243,8	123,3
Суммарная удельная	25%	82,55	41,35	52,13	16,6
	Медиана	137,5	63,1	73,55	52,8

активность нейтрофила	75%	249,7	87,1	143	107,5
--------------------------	-----	-------	------	-----	-------

Таким образом, удельная спонтанная активность нейтрофилов, а также удельная пиковая активность в ответ на стимул ФМА достоверно выше в группе пациенток после самопроизвольного выкидыша, что указывает на высокую генерацию АФК нейтрофилами в момент выкидыша. Удельная пиковая активность в ответ на стимул ФМЛФ и суммарная активность нейтрофила была выше в группе беременных с угрозой прерывания, что говорит о высокой радикалпродуцирующей способности нейтрофилов к генерации АФК на фоне угрозы прерывания (преимущественно за счет внутриклеточной продукции).

Оценка интегральной активности нейтрофила

Описание массива данных для интегральной спонтанной ХЛ для группы УПБ: Медиана для группы УПБ (0,21 V), межквартильный размах (0,09-0,6 V). Медиана для группы НБ (0,08 V), межквартильный размах (0,05-0,125 V). Медиана для К1 (0,16 V) (межквартильный размах (0,06-0,3V). Медиана для К2 (0,22 V) (межквартильный размах (0,15- 0,27V). Медиана для К3 (0,41 V) межквартильный размах (0,35-1,9V) (рис.7).

Интегральная спонтанная активность нейтрофила в группе УПБ выше в 2,6 раз по отношению к НБ. В группе К3 выше в 5,1 раз относительно группы НБ, в 1,86 раз выше чем К2, в 2,5 раз относительно К1 и в 1,9 раз выше УПБ. В группе К2 A_{cn} в 2,7 раз выше чем в НБ.

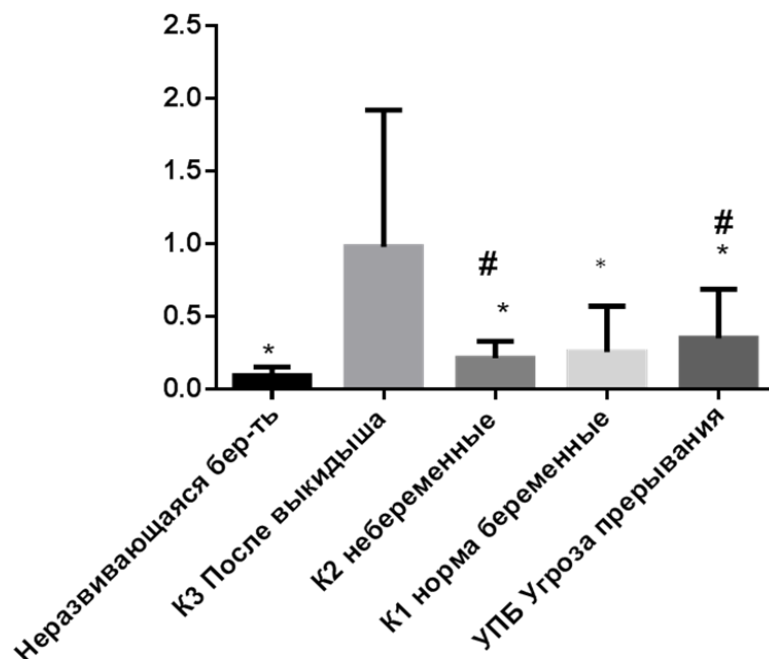


Рис. 7. Оценка интегральной спонтанной активности нейтрофила $A_{сн}$ по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно К3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,005$; # относительно НБ $p < 0,01$.

Таким образом, пациенты, беременность которых протекает на фоне угрозы прерывания, а также пациенты после самопроизвольного аборта характеризуются высокой спонтанной активностью нейтрофилов, при этом у пациентов с неразвивающейся беременностью, напротив, отмечалась сниженная активность, указывающая на иммунносупрессию.

При сравнительном анализе параметра $A_{ФМА}$ статистически значимые различия были выше в группах К3 по отношению к НБ в 10 раз, по отношению к К2 в 9,6 раз, к К1 в 7,7 раз, к УПБ в 4,8 раз ($p < 0,03$), значения в УПБ выше НБ в 2 раза, К2 в 1,9 раз ($p < 0,02$). Медиана для группы УПБ (1,2 V), межквартильный размах (0,57-6,7 V). Медиана для группы НБ (0,6 V), межквартильный размах (0,2-1,4 V). Медиана для К1 (0,7 V)

(межквартильный размах (0,4-29 V). Медиана для K2 (0,62 V) (межквартильный размах (0,28- 4,1V). Медиана для K3 (6 V) (межквартильный размах (4-43,1V) (рис 8).

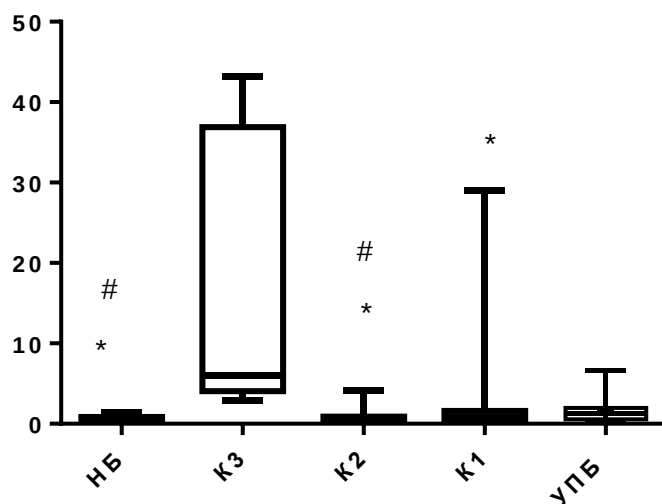


Рис. 8. Оценка интегральной спонтанной активности нейтрофила по группам в ответ на стимул ФМА. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно K3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,03$; # относительно УПБ $p < 0,02$.

Таким образом, интегральная спонтанная активность в ответ на стимул ФМА был достоверно выше у пациентов после самопроизвольного выкидыша и угрозы прерывания, что указывает на праймирование нейтрофилов и напряженность лейкоцитарного звена иммунитета в результате родовой деятельности. Напротив, при неразвивающейся беременности был самый низкий ответ. Отсутствие реакции на стимул указывает на слабую способность нейтрофилов к генерации АФК. Сравнительная характеристика интегральной активности в ответ на стимул фМЛФ представлена в табл.5.

Интегральная активность в ответ на стимул фМЛФ по группам

Группы, между которыми проводили сравнение	Медиана	Межквартильный размах	<i>p</i> критерий Манна-Уитни
К3 (<i>n</i> = 5) и НБ (<i>n</i> = 9)	14 8,8	11,4-28,4 5,3-10,2	0,01
К1 (<i>n</i> = 61) и НБ (<i>n</i> = 9)	10,8 8,8	7,1-17,9 5,3-10,2	0,03
УПБ (<i>n</i> = 28) и НБ (<i>n</i> = 9)	21,8 8,8	10,6-40,9 5,3-10,15	0,008
К2 (<i>n</i> = 22) и К3 (<i>n</i> = 5)	4,9 14,0	2,8-13 11,4-28,4	0,007
УПБ (<i>n</i> = 18) и К2 (<i>n</i> = 22)	21,8 4,9	10,6-40,9 2,8-13	0,001
УПБ (<i>n</i> = 28) и К1 (<i>n</i> = 5)	21,8 10,8	10,6-40,9 7,1-17,9	0,001

Суммарная интегральная активность в ответ на стимул фМЛФ достоверно выше в группе УПБ по отношению к К1, К2, НБ более чем в 2 раза ($p < 0,001$). В группе К3 достоверно выше, чем в К2 и НБ более чем в 1,6 раз ($p < 0,01$) (рис.9).

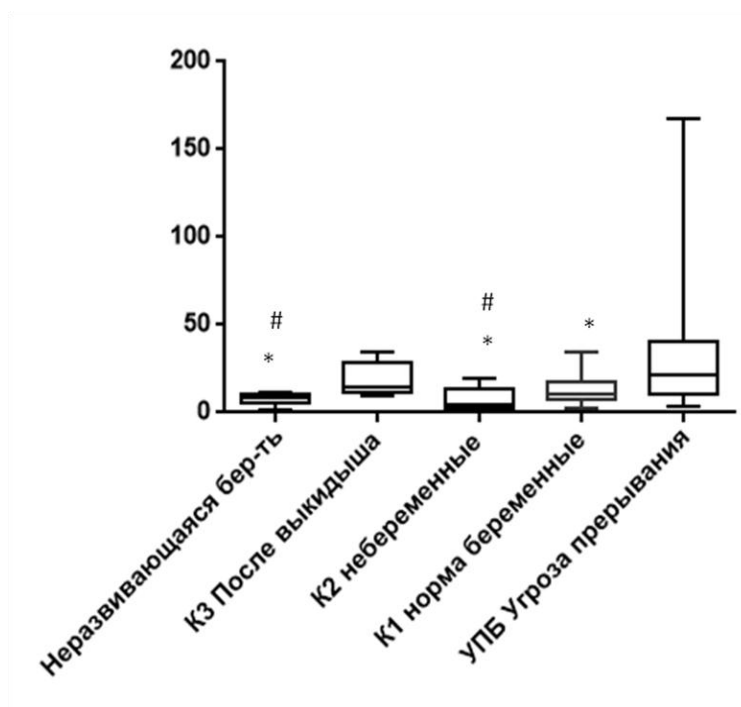


Рис. 9. Оценка интегральной активности нейтрофила по группам в ответ на стимул ФМЛФ. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно УПБ критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$; # относительно K3 $p < 0,01$, K1 относительно НБ $p = 0,03$.

Таким образом, интегральная спонтанная активность в ответ на стимул ФМЛФ достоверно выше у беременных с угрозой прерывания, что указывает на высокую способность нейтрофилов к генерации АФК и возможное преждевременное прерывания беременности. После самопроизвольного выкидыша способность к дальнейшей генерации АФК снижается, что свидетельствует о расходовании потенциала нейтрофилов после родовой деятельности. У пациентов с неразвивающейся беременностью, также как и при стимулировании ФМА был отмечен самый низкий ответ.

Таблица 6

Описательная статистика для коэффициентов праймирования, активации и затухания респираторного взрыва

Коэффициенты	Медиана	Межквартильный размах
K_d УПБ	0,53	0,38-0,75
K_d К1	0,42	0,33-0,53
K_d К2	0,35	0,27-0,43
K_d К3	0,12	0,08-0,39
K_d НБ	0,37	0,32-0,52
$K_{акт}$ УПБ	21	12,45-37,05
$K_{акт}$ К1	14,9	9-23,5
$K_{акт}$ К2	10,9	7-12,2
$K_{акт}$ К3	1,5	0,65-4,5
$K_{акт}$ НБ	10,3	7,4-28,5
$K_{прайм}$ УПБ	5,3	2,5-9,6
$K_{прайм}$ К1	4,9	2,6-11,3
$K_{прайм}$ К2	2,8	2-4,4
$K_{прайм}$ К3	15	11,3-20,4
$K_{прайм}$ НБ	5,3	3,6-11,7

Коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов оказался статистически значимо выше у больных с УПБ по сравнению с группами контроля К1, К2, К3 (рис.10) ($p < 0,01$), у К1 по отношению к К3 ($p < 0.02$)

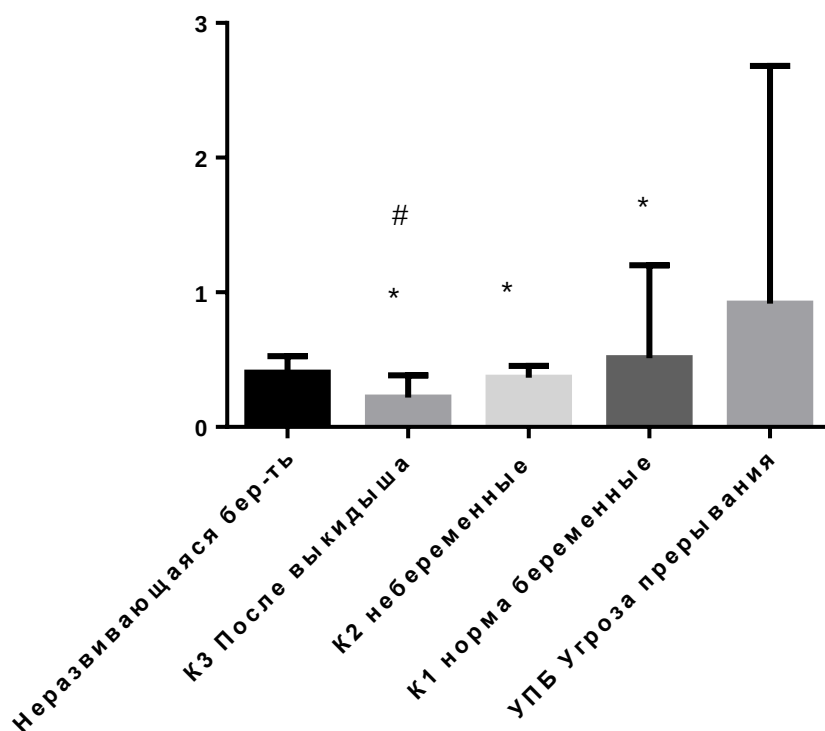


Рис. 10. Сравнительная характеристика коэффициента затухания респираторного взрыва по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно УПБ критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; # K1 vs K3 ($p < 0,01$);

Таким образом, достоверные различия были у беременных с угрозой прерывания и физиологическим течением беременности, что указывает на повышенную радикал-продуцирующую способность нейтрофилов во время беременности.

Коэффициент активации был достоверно выше в группе УПБ по сравнению с К3 и К2 ($p < 0,0001$). У группы контроля К2, К1 и НБ достоверно значимые различия были выше по отношению к К3 ($p < 0,002$) (рис .11).

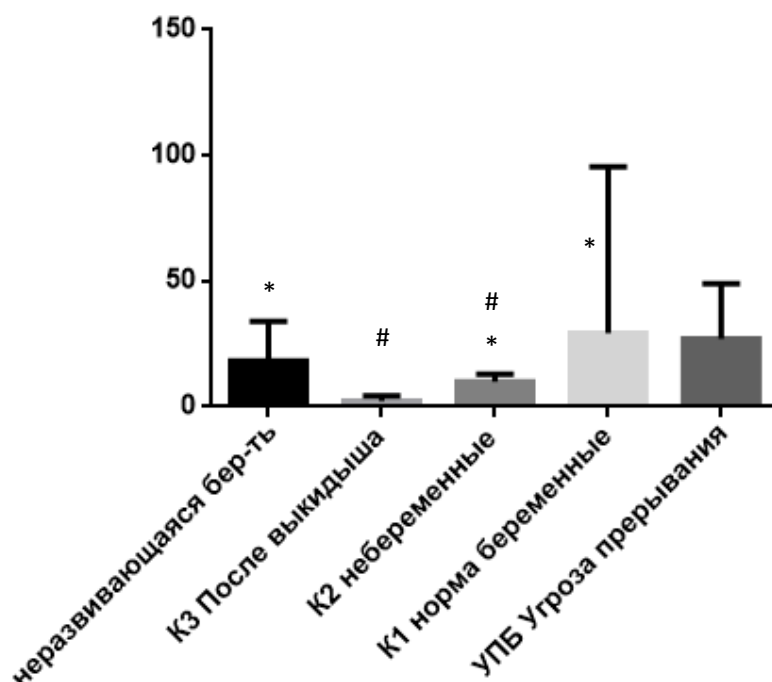


Рис. 11. Сравнительная характеристика коэффициента активации нейтрофилов по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно K3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; K1 vs K2 ($p < 0,01$); НБ относительно K2 ($p < 0,003$).

Таким образом, коэффициент активации респираторного взрыва был достоверно ниже у пациентов после выкидыша, что говорит об истощении радикал - продуцирующей способности нейтрофилов.

Коэффициент праймирования был достоверно выше во всех группах беременных женщин относительно K2. Самые высокие показатели $K_{\text{прайм}}$ были у пациентов после выкидыша (рис.12).

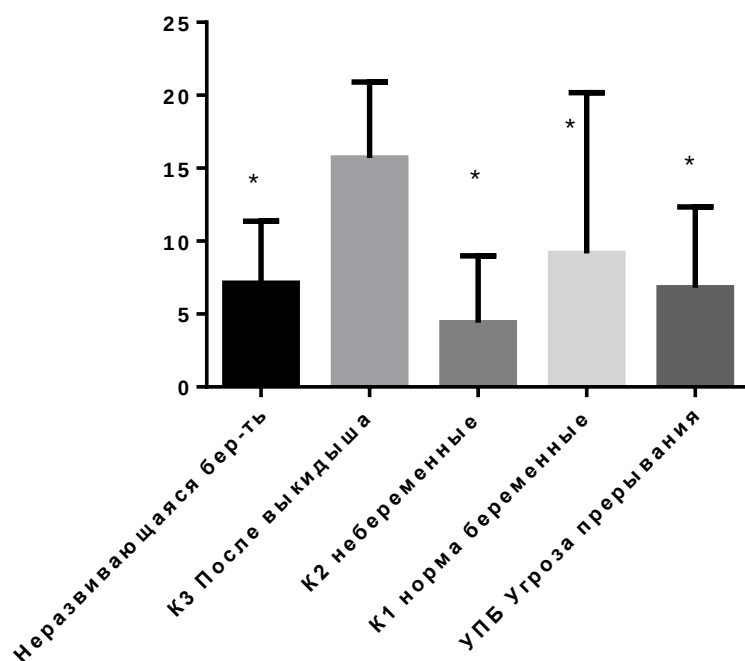


Рис. 12. Сравнительная характеристика коэффициента праймирования нейтрофилов по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно K3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; K1 vs K2 ($p < 0,01$); НБ относительно K2 ($p < 0,003$).

На основании анализа ХЛ кривых можно предположить, что во время беременности, как физиологической, так и протекающей на фоне угрозы прерывания, нейтрофилы находятся в состоянии прайминга. Во всех группах $K_{\text{прайм}}$ был достоверно выше, по сравнению с небеременными женщинами.

В группе пациенток после самопроизвольного выкидыша интенсивность спонтанной ХЛ выше, а $K_{\text{акт}}$ ниже по сравнению с группами K1 и K2 (критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$), что говорит о высокой активности нейтрофильного звена иммунной системы у женщин перед и сразу после выкидышем. В результате стимуляции фМЛФ у данной группы заметно снижение ответа, что указывает на истощение радикал-продуцирующей способности нейтрофила после выкидыша. Коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов, а также ответ на стимулы,

оказался статистически значимо выше у беременных с угрозой прерывания. У пациентов после самопроизвольного аборта K_d достоверно ниже, чем в группе с физиологической беременностью. Эти данные свидетельствуют о напряженности иммунитета у женщин, беременность которых протекает на фоне выраженной угрозы, и являются возможными предикторами преждевременной родовой деятельности. Снижение коэффициента затухания у пациентов после выкидыша, вероятно, указывают на функциональную недостаточность и истощение нейтрофилов.

В группе женщин с неразвивающейся беременности показатели удельной, интегральной спонтанной и стимулированной активности нейтрофилов были достоверно ниже, чем в остальных группах, что указывает на иммуносупрессивное состояние, препятствующее сократительной активности матки. Также у 2 пациенток из группы УПБ с низким ответом на стимулы в последующем происходило замирание плода. Таким образом, является неоспоримым вклад активированных нейтрофилов в патофизиологические процессы, приводящие к прерыванию беременности.

Клинический пример (рис.13)

Пациентка 38 лет, поступила в гинекологическое отделение с диагнозом: беременность 5-6 нед. Двойня. ОАГА. Привычное невынашивание. Наследственная тромбофилия. Миома матки. При поступлении предъявляла жалобы на тянущие боли внизу живота, скудные сукровичные выделения из половых путей. Проводилась сохраняющая, гормональная, гемостатическая терапия. По данным ультразвукового исследования в сроке 9-10 недель беременности диагностирована неразвивающаяся беременность 9-10 нед, анэмбриония во втором плодном яйце. Произведено выскабливание полости матки на фоне антибактериальной, противовоспалительной терапии.

Описательная статистика в динамике

	Данные при первичном анализе	Динамика через 1 месяц
Удельная спонтанная активность нейтрофила	2,99	1,83
Удельная пиковая активность нейтрофила на стимул ФМА	12,3	6,8
Удельная пиковая активность нейтрофила на стимул ФМЛФ	203,5	43,9
Суммарная удельная активность нейтрофила	219,1	33,9
Интегральная спонтанная активность нейтрофила	0,47	0,17
Интегральная активность ответ на стимул ФМА	1,92	0,63
Интегральная активность ответ на стимул ФМЛФ	31,7	3,9
Суммарная интегральная активность нейтрофила	34167	3153
Коэффициент активации	16,6	6,2
Коэффициент праймирования	4,1	3,7
Коэффициент затухания	0,418	0,210

респираторного взрыва		
Антиоксидантная активность	353	596
Доля окисленного альбумина	34	25

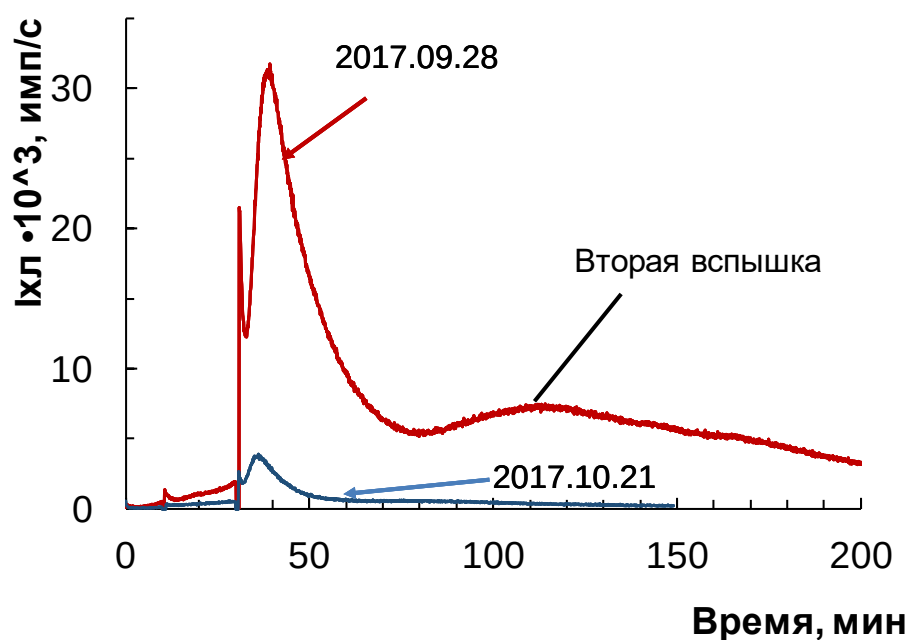


Рис 13 Кривая хемилюминесценции нейтрофилов при ответе на два стимула ФМА и ФМЛФ.

При анализе кривых ХЛ отмечено присутствие 2 волны генерации свободных радикалов в ответ на стимулы. Это указывает на повышенную активность нейтрофилов и напряженность иммунитета и может свидетельствовать о наличии в организме беременной хронического очага инфекции. Также обращает на себя внимание повышенная интенсивность ХЛ ответа во время беременности на фоне угрозы прерывания. После замирания плода, интенсивность ХЛ снизилась, а антиоксидантная активность наоборот повысилась. Это данные свидетельствуют о существенной роли иммунной системы в патогенезе сократительной активности матки. Возможно высокие

дозы гормональных препаратов, опосредованно влияют на тонус матки и препятствуют выкидышу при неразвивающейся беременности.

4.2 Анализ кривых методом деконволюции

Кинетическая кривая ХЛ при двухстадийной стимуляции имеет сложный характер и может быть математически обработана с целью разложения на составляющие контуры методом деконволюции. Любая кривая может быть разложена на три составляющие: 1) ФМА-индуцированная продукция АФК, 2) «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внеклеточной продукцией АФК через рецепторный путь, 3) «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внутриклеточной продукцией АФК. Результаты деконволюции для ХЛ-ответа нейтрофилов представлены на клинических примерах:

Клинический пример (рис.14)

Пациентка 26 лет с диагнозом: беременность 18 недель. Угроза самопроизвольного выкидыша. Поступила в гинекологическое отделение с жалобами на скудные кровянистые выделения из половых путей, тянущие боли внизу живота. Клинико-лабораторные данные: в общем анализе крови: лейкоцитоз $19 \cdot 10^{12}/л$, СОЭ = 56. С-реактивный белок 48,2 мг/л. Была назначена токолитическая, гемостатическая, антибактериальная терапия. Через 48 часов после проведения ХЛ анализа, у пациентки произошел самопроизвольный аборт. Произведено выскабливание полости матки в экстренном порядке. Кинетическая кривая ХЛ представлена на рис. 5 (скриншот программного модуля). Из рисунка видно, что интенсивность процесса внутриклеточной генерации АФК (кривая 3) высока, что свидетельствует о развивающемся иммунном ответе.

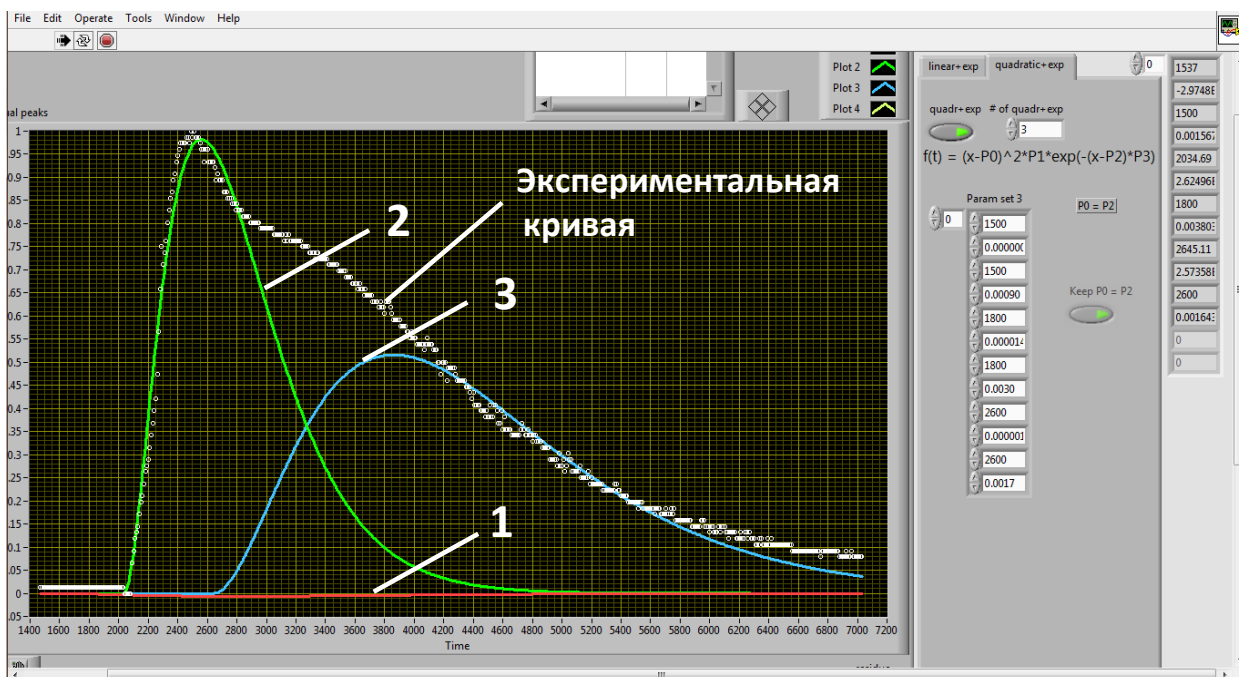


Рис. 14. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА- индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Клинический пример (рис.15)

Пациентка поступила в гинекологическое отделение по направлению врача женской консультации с диагнозом: неразвивающаяся беременность в сроке 6 недель. При поступлении жалоб не предъявляла. Клинико-лабораторные данные: в общем анализе крови: лейкоциты $9 \cdot 10^{12}/л$, СОЭ = 11. Произведено выскабливание полости матки в плановом порядке.

Полученная кинетическая кривая (рис. 6) аналогична кривым практически здоровых доноров — в ней присутствуют три составляющие, причем эти составляющие характерны для отсутствия ответа со стороны нейтрофильного звена иммунной системы. В частности, кривая 3 — внутриклеточная продукция АФК — выражена даже слабее, чем у здорового донора.

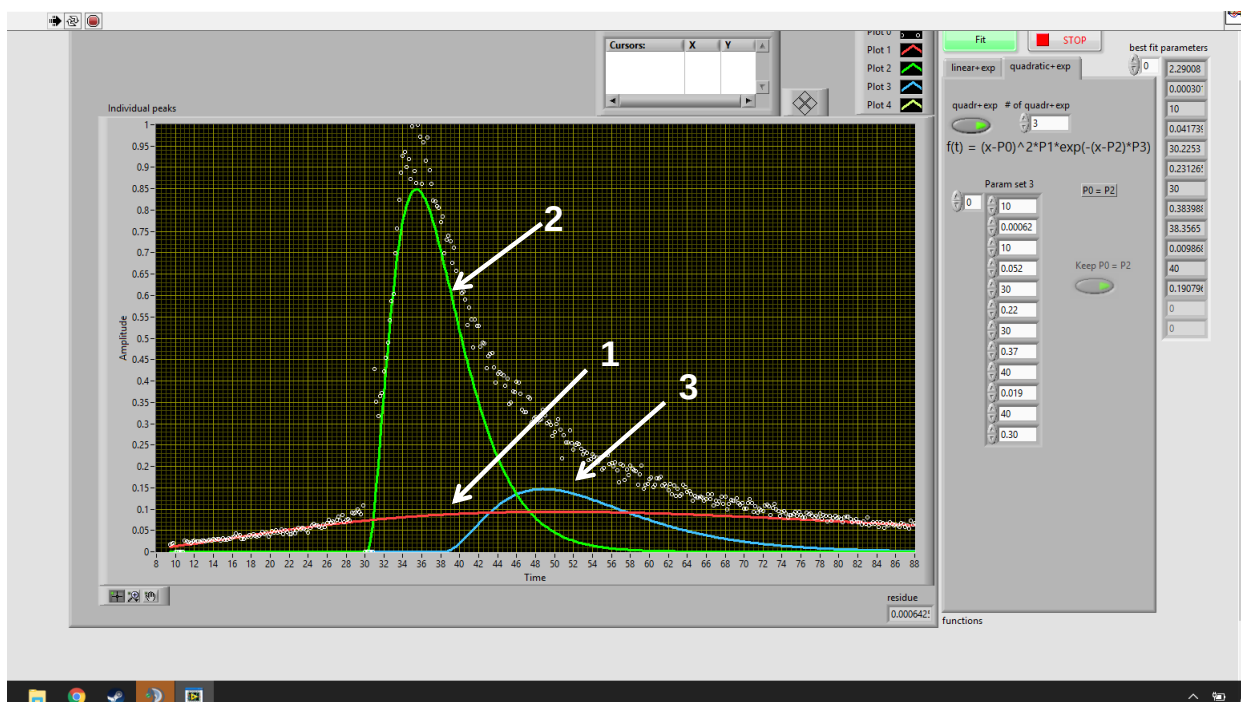


Рис. 15. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА-индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Клинический пример (рис.16)

Пациентка 25 лет поступила в гинекологическое отделение с диагнозом: беременность 20 нед. Угроза прерывания. Краевое предлежание плаценты. Кольпит. При поступлении предъявляла жалобы на выраженные боли внизу живота, обильные слизисто-кровянистые выделения из половых путей. В ОАК при поступлении: лейкоциты $17 \cdot 10^{12}/л$, СОЭ = 47. Назначена антибактериальная терапия без эффекта, развился хориоамнионит. Через 4 дня после ХЛ анализа у пациентки произошла преждевременная отслойка низко расположенной плаценты, произведено малое кесарево сечение в экстренном порядке. Их кривой, представленной на рисунке 7 видно, что повышенная продукция радикалов происходит и за счет быстрой и за счет медленной вспышки. Эти данные указывают о постепенной готовности организма к родовой деятельности за счет повышенного потенциала нейтрофилов к генерации АФК.

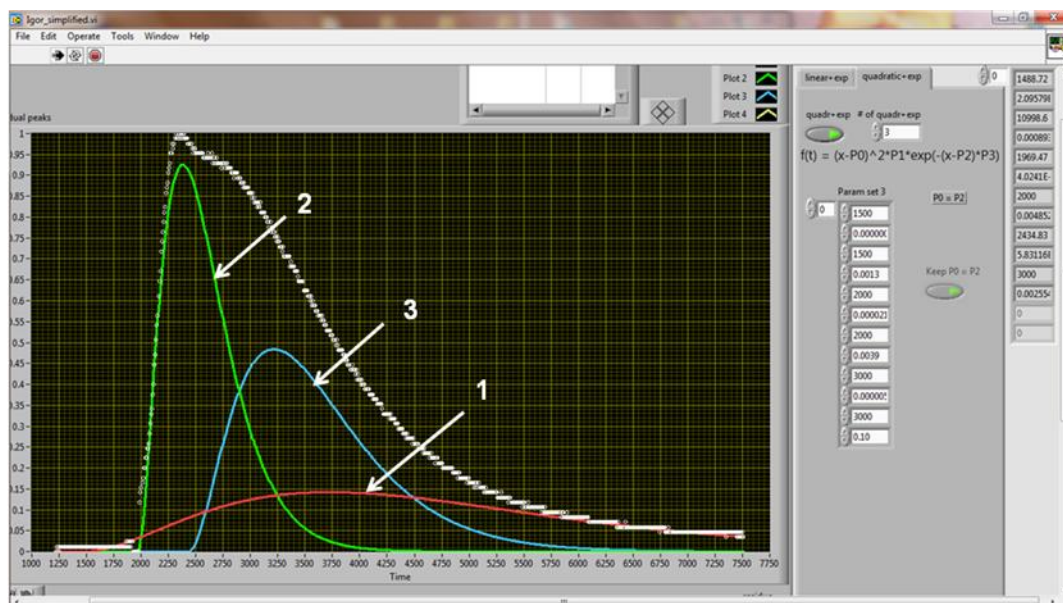


Рис. 16. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА-индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Клинический пример (рис.17)

Пациентка 31 год поступила в акушерское отделение с жалобами на боли внизу живота, подтекание околоплодных вод. Диагноз: беременность 28-29 нед. Угроза прерывания беременности. Подтекание околоплодных вод. При влагалищном осмотре: шейка матки укорочена до 1,5 см, частично размягчена, цервикальный канал пропускает 1 исследующий палец. Предлежит головка плода, прижата к входу в малый таз. Проводилась антибактериальная, токолитическая, спазмолитическая терапия. В 30 недель произошли преждевременные самопроизвольные роды. Масса плода 1700гр, оценка по Апгар 7-8 баллов.

При анализе ХЛ отмечена выраженная интенсивность медленной и быстрой вспышки, свидетельствующей о развивающемся системном

окислительном стрессе и напряженности иммунной системы перед родовым актом.

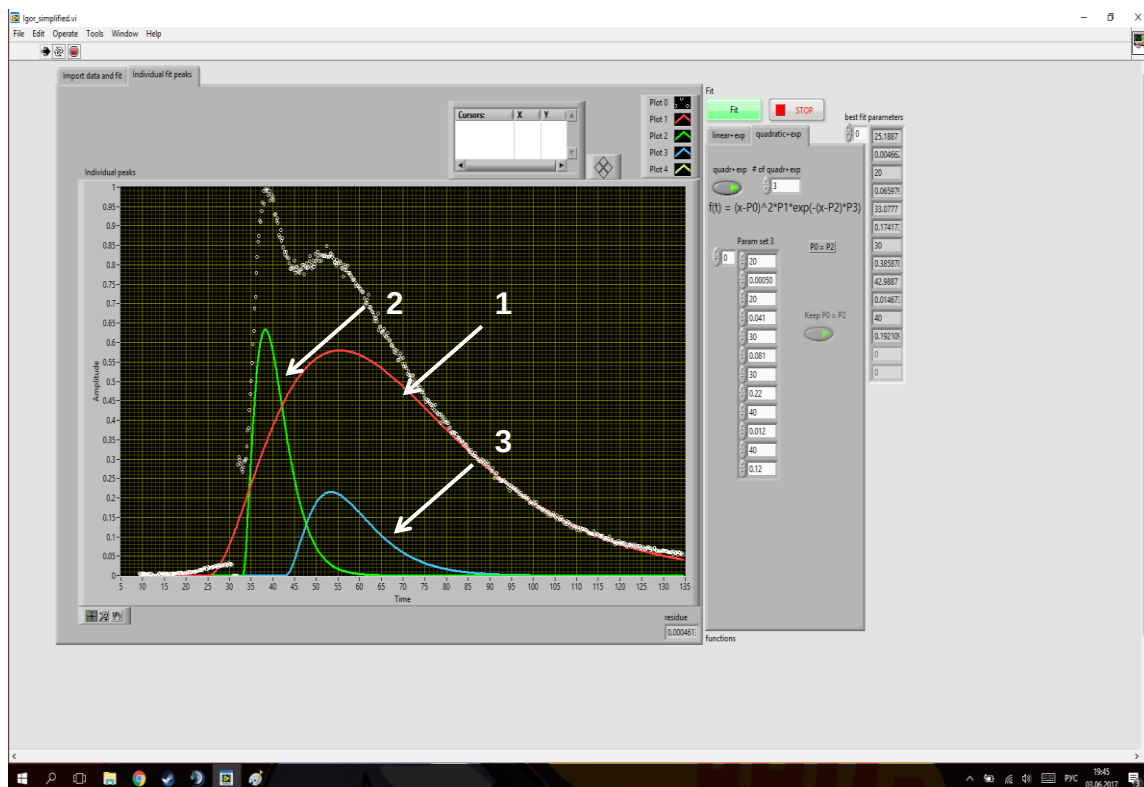


Рис. 17. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА-индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Таблица 8

Окислительный статус пациентов

Показатель	Клинический пример №1	Клинический пример №2	Клинический пример №3	Клинический пример №4
Удельная спонтанная активность нейтрофила $A_{\text{сп}}^*$	1,73	1,21	2,7	0,31

Удельная пиковая активность нейтрофила $A^*_{\text{ФМА}}$	4,3	4,8	10,7	1,8
Удельная пиковая активность нейтрофила $A^*_{\text{ФМЛФ}}$	204,9	43,9	429,5	58,9
Интегральный уровень спонтанной ХЛ $A_{\text{сп}}$	0,64	0,15	0,54	0,09
Амплитуду ФМА- стимулированной ХЛ $A_{\text{ФМА}}$	1,6	0,6	2,14	0,52
Амплитуду вспышки фМЛФ- индуцированной ХЛ $A_{\text{фмлф}}$	76,1	5,5	85,8	16,6
Коэффициент активации $K_{\text{акт}}$	47,6	9,2	40,1	32,2
Коэффициент праймирования $K_{\text{прайм}}$	2,5	3,9	4	5,9
АОА	330	380	305	195
ДОО	43	30	23	31

4.3 Оценка антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции

В настоящий момент проблеме иммунологических взаимоотношений в системе мать-плод уделяется особое внимание. Известно, что выживаемость семиаллогенного плода напрямую связана с угнетением иммунного ответа и перераспределением субпопуляции лимфоцитов в организме матери [1]. При физиологическом течении беременности отмечено доминирование Th 2 тип иммунного ответа, отвечающего за преимущественно гуморальные реакции, гемопоэз, ангиогенез. Сдвиг ответа в сторону Th1 приводит к активации антиген-специфических цитотоксических Т лимфоцитов, активизации макрофагов, натуральных киллеров и провоспалительных цитокинов (интерферон, ИЛ 1, ИЛ 2, TNF α) [89].[63] Источником цитокинов в организме беременной женщины являются активизированные NK клетки, присутствующие в 80% в децидуальной оболочке матки, а также клетки фето-плацентарного комплекса. [16] В литературе описано протективное влияние прогестерона на развитие беременности как мощного иммуносупрессора путем опосредованного воздействия через систему цитокинов [89]. В момент взаимодействия прогестерона с рецепторами Т-клетки CD8⁺ продуцируют прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (ПИБФ), который воздействуя на иммунокомпетентные клетки, направляет иммунный ответ матери в сторону менее активных NK клеток, несущих маркеры CD56⁺, CD16⁻. При наличии этих клеток иммунный ответ матери будет через Th-2 типа. При низком содержании прогестерона или поражении рецепторного аппарата – иммунный ответ матери на трофобласт сдвигается в сторону лимфокинактивных киллеров (LAK) с продукцией провоспалительных цитокинов. Провоспалительные цитокины ограничивают инвазию трофобласта, нарушая его нормальное формирование, вызывают активацию протромбиназы, что обуславливает тромбозы, инфаркты и его отслойку, что в конечном счете приводит к выкидышу [69, 164]

В настоящее время уделяется большое внимание различным субпопуляциям натуральных киллеров, различающихся по плотности экспрессии CD56 и CD16. [64]] Существуют два подмножества CD56 NK-клеток: высокоцитотоксичные клетки CD56dim, которые составляют > 90% NK-клеток в периферической крови, и менее цитотоксические, но эффективно продуцирующие цитокины CD56bright. Было проведено исследование восприимчивости данных групп клеток к воздействию активных форм кислорода в присутствии окислителей. Установлено, что подмножество CD56bright клеток NK, в отличие от клеток CD56dim, остается жизнеспособным и функционально неповрежденным после воздействия радикалов. CD56bright клетки отличались высокой способностью к нейтрализации окислителей и повышенной экспрессией антиокислительных тиолов на поверхности клеток. Это указывает на то, что клетки CD56bright NK снабжены эффективной антиоксидантной защитной системой

Проверку данных на нормальность распределения групп проводили по критерию Шапиро-Уилка. Распределение в группах для параметра S(AOA) не было нормальным, и последующий анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни.

У пациентов после самопроизвольного аборта отмечалось достоверное снижение АОА по сравнению с группой К2 ($p = 0,004$) и УПБ ($p = 0,04$). Это может свидетельствовать об истощении антиоксидантной емкости плазмы крови перед выкидышем, либо вследствие него (рис. 18). Напротив, более высокий уровень АОА отмечался у группы пациентов с неразвивающейся беременностью, а также у двух пациентов из группы УПБ с последующим замиранием плода.

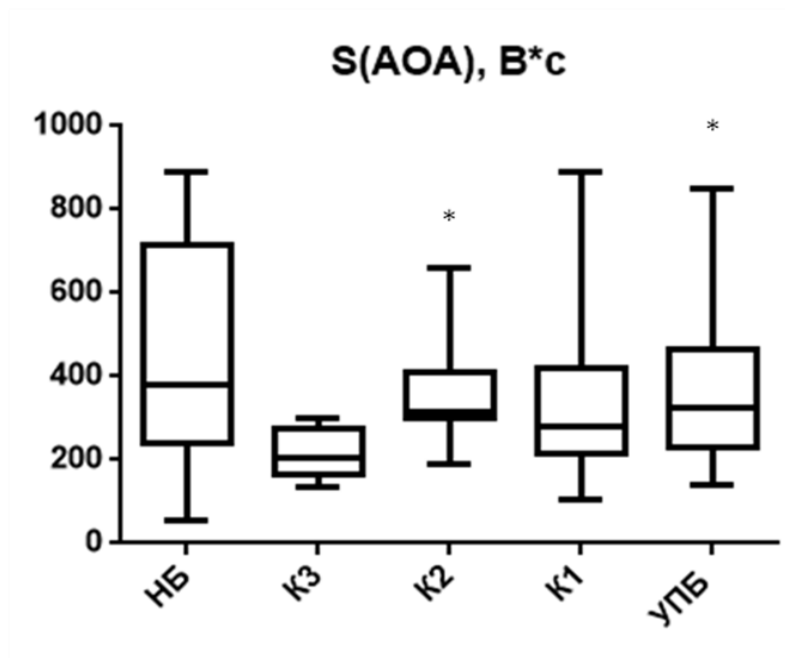


Рис 18 Диаграмма типа «ящик с усами». Сравнительная характеристика параметра S (АОА) по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно КЗ критерий Манна-Уитни, $p < 0,04$.

В обследованной группе здоровых женщин ($n = 22$) определены границы референсного интервала, куда попали 95% показателей — границы нормы, которые составили от 195 до 405 усл.ед, медиана 320. Из сопоставления данных следует, что в группе здоровых беременных есть случаи, выходящие за пределы нормальных значений, как в меньшую, так и в большую сторону.

Описательная статистика АОА для групп представлена в таблице 9

АОА исследованных групп: медиана и размах варьирования, усл. ед.

Группа	Медиана	Размах варьирования
Беременные женщины	285	110–890
Беременные с угрозой прерывания	325	140–850
Пациентки после выкидыша	205	135–300
Неразвивающаяся беременность	380	190–890

На основании анализа ХЛ кривых можно предположить, что во время самопроизвольного аборта происходит снижение антиоксидантной емкости плазмы. Эти данные косвенно свидетельствуют о развитии окислительного стресса в момент выкидыша в тканях фето-плацентарной системы и резком спаде уровня прогестерона.

Повышение АОА в группе с неразвивающейся беременностью возможно связано с накоплением различных токсических веществ с антиоксидантными свойствами, являющихся продуктом лизиса погибшего эмбриона, а также с гормональной поддерживающей терапией препаратами прогестерона, обладающими иммуносупрессивными эффектами. У двух пациентов из группы УПБ с последующим замиранием плода отмечался более высокий уровень АОА, что может являться прогностическим фактором. Эти данные указывают на необходимость определения эндогенного уровня прогестерона и индивидуального подхода к подбору дозировки и длительности терапии.

Из сопоставления данных следует, что в группе здоровых беременных есть случаи, выходящие за пределы нормальных значений, как в меньшую,

так и в большую сторону. Возможно, для женщин со сниженной АОА требуется терапия антиоксидантами. Повышенные значения могут свидетельствовать или о компенсации оксидативного стресса, или быть следствием несбалансированной гормональной терапии.

4.4 Оценка триптофановой флуоресценции альбумина

При окислительном стрессе происходит свободнорадикальное окисление различных биомолекул, в первую очередь окислительной модификации в результате действия активных форм кислорода подвергается альбумин плазмы. Этот белок участвует в поддержании внутрисосудистого коллоидно-осмотического давления, обладает конъюгирующими и инактивирующими свойствами, выполняет гомеостатическую, детоксицирующую, ферментоподобную, антиоксидантную, хемокинетическую функции [165]. Для оценки окислительного статуса при различных патологических состояниях и заболеваниях в последнее время проводят измерение доли окисленного альбумина, как маркера системного оксидативного стресса. Сывороточный альбумин может выступать в качестве, как источника, так и мишени свободных радикалов. Перехватывая свободные радикалы, альбумин подвергается окислительной модификацией и теряет свои транспортные свойства. В комплексе с ионами меди при окислении SH группы или взаимодействия с монооксидом азота (NO) сывороточный альбумин приобретает прооксидантные свойства [159].

Окисленная модификация белка вызывает образование в организме продуктов окисления тирозина и триптофана. Степень окисленности альбумина в эксперименте оценивали по изменению его флуоресценции при 353 нм (флуоресценция триптофана).

При сравнительной характеристике ДОА (рис 19) в группе женщин после самопроизвольного выкидыша достоверно ниже по отношению к К2 ($p = 0,02$), по отношению к К1 ($p = 0,06$)

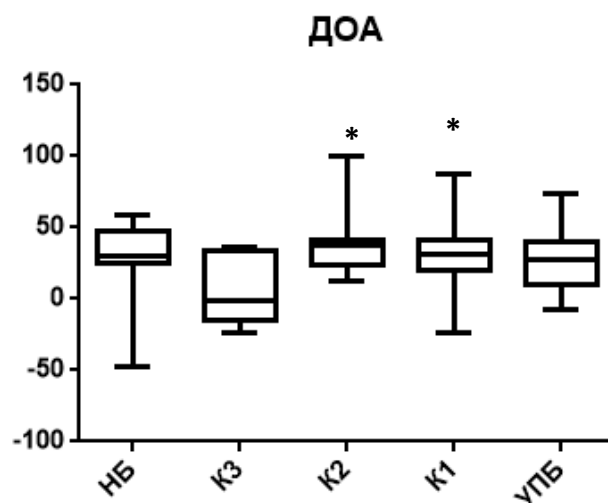


Рис 19. Сравнительная характеристика параметра ДОО по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно КЗ критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$.

В некоторых случаях показатель ДОО принимал отрицательные значения, что свидетельствовало о наличии белковых компонентов, вносящих вклад в триптофановую флуоресценцию. Было сделано предположение, что такими мешающими компонентами могут оказаться ЦИК, цитокины, или специфические антитела. При попытке осаждения ЦИК с помощью полиэтиленгликоля из безглобулиновой плазмы ни в одном случае не было обнаружено ЦИК. Таким образом, гипотеза о наличии цитокинов или специфических антител нуждается в дальнейшей проверке.

При сравнении групп К1 и К2 не было выявлено статистически значимых различий, однако в группе К2 отмечался больший разброс в значениях: размах варьирования для К1 (-24–88), медиана 31, для К2 (12–43), медиана 37. У трех пациентов были отрицательные значения, а в пяти случаях значения были выше нормы (> 60).

Наибольшие отрицательные значения ДОА были в группе после самопроизвольного выкидыша, что подтверждает роль провоспалительных цитокинов в инициации родовой деятельности.

Известен TRALI синдром, при котором развивается острый респираторный дистресс-синдром в первые 4 часа после переливания донорской крови и ее компонентов от рожавших женщин.[166] Патогенез этого синдрома до конца не изучен. Установлено, что в крови донора присутствуют специфические антилейкоцитарные антитела класса I, II системы HLA (human leucocytes antigen) с последующим их взаимодействием с соответствующими антигенами лейкоцитов реципиента. Основными клетками, вовлекаемыми в патологический процесс являются нейтрофилы. Взаимодействие между антителами и родственными антигенами вызывает активацию нейтрофилов, их секвестрацию и повреждение эндотелиального барьера легочных капилляров. Это повреждение служит основой для развития TRALI-синдрома, при котором выделяемые нейтрофилами цитокины (интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-8, фактор некроза опухолей), протеолитический фермент эластаза и активные радикалы кислорода инициируют каскад иммунологических реакций с дальнейшим повреждением сосудистого и альвеолярного эндотелия и пропотеванием плазмы в альвеолярное пространство. Эти данные указывают на возможное наличие аутоантител у беременных с отрицательными показателями ДОА, что требует дальнейших исследований в этой области.

Глава 5. Заключение

Физиологически протекающая беременность в норме сопровождается развитием локального окислительного стресса. Окислительный стресс выполняет в этой ситуации важные физиологические функции, участвуя в запуске механизмов дифференцировки клеток. Этот процесс возникает в период формирования артериальной циркуляции и увеличения напряжения кислорода в плаценте с 10 недели гестации. Повышение кровотока в плаценте с 10 по 12 неделю беременности приводит к повышению давления кислорода и параллельной активации и экспрессии антиоксидантных ферментов. В свою очередь слабый антиоксидантный ответ может привести к чрезмерной активности окислительного стресса и вызвать дегенерацию трофобласта и нарушение плацентации. При этом, установлено, что различные патологические состояния, такие как преэклампсия, угроза прерывания беременности, фетоплацентарная недостаточность, являются следствием окислительного стресса и могут рассматриваться как нарушения адаптации к изменению кислородного окружения [40, 61].

Важная роль отводится плацентарным макрофагам, как ключевым клеткам плаценты. Их функциональная активность различается на разных сроках гестации. В первом триместре их основная роль сводится к регуляции функций структурных элементов плаценты, при этом провоспалительный потенциал макрофагов снижен, что способствует гармоничному развитию плаценты и сохранению беременности на этапе плацентации. К третьему триместру усиление провоспалительных свойств способствует активации противоинфекционного иммунитета и подготовку к родовому акту. При преждевременной активации плацентарных макрофагов в первом триместре происходит генерация АФК, провоспалительных цитокинов, проводящих либо к отслойке плодного яйца от стенок матки, либо к нарушению функции

плаценты, сопровождающие такие патологические состояния как преэклампсия и плацентарная недостаточность [95, 150].

В нашем исследовании было показано, что у женщин с выраженными признаками угрозы прерывания беременности, происходит повышение активности нейтрофилов и продукции ими АФК, что может быть источником оксидативного стресса. Установлено, что беременность способствует праймированию нейтрофилов, о чем свидетельствует повышенный уровень базальной продукции АФК и повышенный ответ на стимулы. Праймирование нейтрофилов у беременных может быть объяснено повышенной активностью НК клеток и плацентарных макрофагов фето-плацентарного комплекса с последующей выработкой провоспалительных цитокинов и прерыванием беременности. Напротив, у группы женщин с неразвивающейся беременностью был зарегистрирован слабый ответ на стимулы, что указывает на сниженную иммунореактивность. Возможно, это связано с нарушенной функциональной активностью НК клеток и повышенным уровнем ингибирующих рецепторных сигналов на их поверхности.

Для оценки оксидативного статуса плазмы крови были использованы две люминесцентные методики, позволяющие определить антиоксидантную активность плазмы и долю окисленного альбумина как параметр, характеризующий глубину системного оксидативного стресса, с одной стороны, и с другой — транспортные свойства альбумина. Эти методики являются простыми, экспрессными и недорогими, и могут быть использованы в рутинной клинической практике.

При сопоставлении АОА здоровых небеременных женщин, здоровых беременных женщин, беременных с угрозой прерывания, пациенток после выкидыша и беременных с неразвивающейся беременностью достоверные различия были получены только для группы после выкидыша — АОА оказалась значимо ниже, что свидетельствует о расходовании антиоксидантов крови из-за развивающегося оксидативного стресса в момент прерывания беременности.

Аналогично, параметр, характеризующий степень окисленности альбумина (ДОА), значимо отличался для группы пациенток с выкидышем. Однако, этот параметр был не превышен, а понижен, и в некоторых случаях принимал даже отрицательные значения, что свидетельствует о наличии в крови либо антител, либо цитокинов, которые могут давать вклад в триптофановую флуоресценцию. Показано, что эти вещества не являются ЦИК, для выяснения их природы требуются дальнейшие исследования.

Для группы здоровых небеременных ДОА не превышала 50г/л, что является нормой и свидетельствует о сохранной транспортной функции альбумина. В группе здоровых беременных отмечались повышенные ДОА до 90 г/л, что свидетельствует о выраженном системном оксидативном стрессе и нарушении транспортной функции альбумина. С клинической точки зрения, можно думать о возможных отклонениях течения беременности, таких как преэклампсия, фетоплацентарная недостаточность и др. Эти исследования должны быть продолжены для большей когорты пациенток.

Резюмируя вышесказанное, для более точного понимания патофизиологических процессов, происходящих по время плацентации и уточнения морфофункциональных характеристик отдельных клеточных компонентов плаценты, необходимы комплексная оценка состояния иммунной системы матери и изучение фенотипических и функциональных характеристик клеток ворсинчатого хориона.

В целом, новый подход исследования радикал-продуцирующей функции нейтрофилов — двухстадийная стимуляция с последующей деконволюцией кинетической кривой — позволяет более четко провести анализ кривой и вычленить вклад различных механизмов продукции, с одной стороны, и с его помощью выработать новые диагностические и прогностические параметры, с другой.

Выводы

1. Состояние физиологической беременности характеризуется активацией нейтрофильного звена иммунитета по сравнению с небеременными женщинами, оцененной по люминол-активированной хемилюминесценции с двухстадийной стимуляцией: коэффициент праймирования нейтрофилов $K_{\text{прайм}}$ медиана нормы небеременных женщин 2,8, межквартильный размах 2–4,4, медиана здоровых беременных 4,9, межквартильный размах 26–11,3, по критерию Манна-Уитни $p = 0,01$
2. При неразвивающейся беременности уровень базальной и стимулированной ФМА и ФМЛФ продукции радикалов нейтрофилами крови был достоверно ниже, чем у здоровых беременных и беременных с угрозой прерывания, что указывает на сниженную активность нейтрофильного звена иммунитета. По критерию Манна-Уитни $p < 0,02$.
3. Непосредственно сразу после выкидыша базальная и ФМА-стимулированная продукция радикалов нейтрофилами достоверно выше более чем в 7 раз по сравнению со здоровыми беременными и более чем в 4 раза по сравнению с пациентами с угрозой прерывания. Отсутствие дальнейшего роста кривой в результате стимулирования ФМЛФ указывает на истощение радикал-продуцирующей способности нейтрофилов в результате сократительной активности матки и свидетельствует об участии свободнорадикальных процессов в инициации родовой деятельности.
4. У женщин с выраженными признаками угрозы прерывания и последующим выкидышем или преждевременными родами отмечалась повышенная ФМЛФ стимулированная продукция

активных форм кислорода относительно беременных с физиологическим течением беременности: медиана беременных с угрозой прерывания 21,8, межквартильный размах 10,64–40,93, медиана здоровых беременных 10,8, межквартильный размах: 7,1–17,9. Также, беременность, протекающая на фоне угрозы прерывания, характеризуется повышением коэффициента затухания респираторного взрыва в 1,8 раз относительно здоровых беременных. По критерию Манна-Уитни $p = 0,01$. Повышенная радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у беременных с привычным невынашиванием и угрозой прерывания может являться возможным предиктором преждевременной родовой деятельности.

5. При оценке триптофановой флуоресценции альбумина было установлено, что при физиологической беременности и беременности с угрозой прерывания не развивается системного оксидативного стресса, затрагивающего белковое звено.
6. В группах здоровых женщин, здоровых беременных женщин и с угрозой прерывания антиоксидантная емкость плазмы различается незначимо, однако при выкидыше этот показатель снижается, что свидетельствует о расходовании антиоксидантов крови из-за развивающегося оксидативного стресса в момент прерывания беременности, а при замершей беременности, наоборот, повышен. Повышение у беременных с привычным невынашиванием антиоксидантной активности плазмы крови выше 320 ед и отсутствие ответа на стимулы является прогностически неблагоприятным фактором, указывающим на высокую вероятность замирания беременности.

Практические рекомендации

1. В комплексное обследование женщин с привычным невынашиванием беременности помимо общепринятых методов рекомендовано включение хемилюминисцентных методик оценки функционального состояния нейтрофилов, антиоксидантной активности плазмы крови и определение доли окисленного альбумина. Эти методики являются простыми, экспрессными и недорогими, и могут быть использованы в рутинной клинической практике.
2. Величина активности радикал-продуцирующей способности нейтрофилов и антиоксидантной активности плазмы имеют важное значение для прогноза течения беременности. Снижение базальной и стимулированной радикал-продуцирующей способности нейтрофилов и повышение антиоксидантной активности плазмы крови выше 320 ед на ранних сроках беременности позволит спрогнозировать возможное замирание беременности, напротив высокая активность нейтрофилов указывает на большую вероятность прерывания беременности.
3. При высокой способности нейтрофилов к генерации АФК рекомендовано включение в комплексную консервативную терапию антиоксидантов и проведение рациональной иммуннокоррекции. Учитывая возможные антиоксидантные эффекты препаратов прогестеронового ряда, необходим персонализированный подход к назначению и дозированию гормональной терапии.

Список сокращений

АОА – антиоксидантная активность

АФК – активные формы кислорода

АФА – антифосфолипидные антитела

АФС – антифосфолипидный синдром

ДООА – доля окисленного альбумина

ИМТ – индекс массы тела

Люминол – 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион

МДА – малоновый диальдегид

НБ – неразвивающаяся беременность

НФЛ – недостаточность лютеиновой фазы

ГА – гиперандрогения

ОАГА – отягощенный акушерско-гинекологический анамнез

ОС – окислительный стресс

ПНБ – привычное невынашивание беременности

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПИБФ - прогестерон-индуцированный блокирующий фактор

САЧ – сывороточный альбумин человека

СОД – супероксиддисмутаза

СРБ – С-реактивный белок

УПБ – угроза прерывания беременности

ФМА – 4 β -форбол-12-миристенат-13-ацетат

ФМЛФ – *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин

ФНО α – фактор некроза опухоли α

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ХЛ – хемилюминесценция

ЦИК – циклические иммунные комплексы

HLA – human leucocytes antigen

TRALI – transfusion – related acute lung injuru

Список использованной литературы

1. Айламазян, Э.К., et al., *Привычное невынашивание беременности*. Акушерство национальное руководство, 2007: р. с 349
2. Regan, L. and R. Rai, *Epidemiology and the medical causes of miscarriage*. Bailliere's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 2000. **14**(5): р. 839-54.
3. Кулаков, В.И. and В.М. Сидельникова, *К вопросу о патогенезе привычного выкидыша* Акушерство и гинекология, 2002. **4**: р. 3-5.
4. Кошелева, Н.Г. and Т.А. Плужникова, *Невынашивание беременности*. Спб: Мир медицины, 1998. №**11/12**: р. 43-46.
5. Сидельникова, В.М., *Привычная потеря беременности* 2002, Москва: Триада-Х.
6. Chatterjee, P., et al., *Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy*. Frontiers in immunology, 2014. **5**: р. 253.
7. Кира, Е.Ф., et al., *Невынашивание беременности*. Санкт-Петербург, 1999.
8. Stirrat, G.M., *Recurrent miscarriage*. Lancet, 1990. **336**(8716): р. 673-5.
9. Saravelos, S.H. and L. Regan, *Unexplained recurrent pregnancy loss*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2014. **41**(1): р. 157-66.
10. Jauniaux, E. and G.J. Burton, *[The role of oxidative stress in placental-related diseases of pregnancy]*. Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction, 2016. **45**(8): р. 775-785.
11. Safronova, V.G., et al., *Changes in regulation of oxidase activity of peripheral blood granulocytes in women with habitual abortions*. Bulletin of experimental biology and medicine, 2003. **136**(3): р. 257-60.

12. Prokopenko, V.M., [*Human placental myeloperoxidase in miscarriage*]. *Fiziologiya cheloveka*, 2006. **32**(4): p. 131-3.
13. Peter Stein, T., et al., *Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome*. *Free radical research*, 2008. **42**(10): p. 841-8.
14. Сидельникова, В.М., *Невынашивание беременности - современный взгляд на проблему*. *Российский Вестник Акушера-гинеколога*, 2007(№2): p. С 62-65.
15. Сидельникова, В.М., *Актуальные проблемы невынашивания беременности*. Москва, 2001: p. 168.
16. Vince, G.S. and P.M. Johnson, *Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues*. *Biochemical Society transactions*, 2000. **28**(2): p. 191-5.
17. Copper, R.L., et al., *The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation*. *National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1996. **175**(5): p. 1286-92.
18. Jacobson, J.L., S.W. Jacobson, and R.J. Sokol, *Effects of prenatal exposure to alcohol, smoking, and illicit drugs on postpartum somatic growth*. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 1994. **18**(2): p. 317-23.
19. Kolte, A.M., et al., *Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss*. *Human reproduction*, 2015. **30**(4): p. 777-82.
20. Nybo, A.A., et al., *Is maternal age an independent risk factor for fetal loss?* *The Western journal of medicine*, 2000. **173**(5): p. 331.
21. Marquard, K., et al., *Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years*. *Fertility and sterility*, 2010. **94**(4): p. 1473-7.
22. Slama, R., et al., *Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion*. *American journal of epidemiology*, 2005. **161**(9): p. 816-23.

23. Серов, В.Н., В.М. Сидельникова, and Е.В. Жаров, *Привычное невынашивание беременности: современные представления о патогенезе, диагностике и лечении. В помощь практическому врачу*, 2008: p. с.28-41.
24. Gris, J.C., et al., *Antiphospholipid antibodies and the risk of pregnancy complications*. Thrombosis research, 2017. **151 Suppl 1**: p. S34-S37.
25. Sudhir, N., et al., *Cytogenetic analysis in couples with recurrent miscarriages: a retrospective study from Punjab, north India*. Journal of genetics, 2016. **95(4)**: p. 887-894.
26. Turki, R.F., et al., *Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia*. BMC medical genetics, 2016. **17(Suppl 1)**: p. 69.
27. Grimstad, F. and S. Krieg, *Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2016. **33(7)**: p. 833-47.
28. Allison, J.L. and D.J. Schust, *Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes*. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity, 2009. **16(6)**: p. 446-50.
29. Warren, J.E. and R.M. Silver, *Genetics of pregnancy loss*. Clinical obstetrics and gynecology, 2008. **51(1)**: p. 84-95.
30. Goncalves, R.O., et al., *Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions*. Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia, 2014. **36(3)**: p. 113-7.
31. Boue, J., A. Bou, and P. Lazar, *Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions*. Teratology, 1975. **12(1)**: p. 11-26.
32. Shi, X., et al., *Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis*. Clinical genetics, 2017. **91(2)**: p. 265-284.

33. Tunc, E., et al., *Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions*. Reproductive biomedicine online, 2016. **32**(4): p. 414-9.
34. Suzumori, N. and M. Sugiura-Ogasawara, *Genetic factors as a cause of miscarriage*. Current medicinal chemistry, 2010. **17**(29): p. 3431-7.
35. Макацария, А.Д., *Антифосфолипидный синдром-иммунная тромбофилия в акушерстве и гинекологии*. М.: Триада-X, 2007: p. с.55-112.
36. Motha, M.B., T.S. Palihawadana, and D.J. Perry, *Recurrent pregnancy loss and thrombophilia*. The Ceylon medical journal, 2014. **59**(1): p. 1-3.
37. Макацария, А.Д. and В.О. Бицадзе, *Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике*. М.: Триада-X, 2003: p. 904.
38. Farquharson, R.G., S. Quenby, and M. Greaves, *Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized, controlled trial of treatment*. Obstetrics and gynecology, 2002. **100**(3): p. 408-13.
39. Kutteh, W.H. and C.D. Hinote, *Antiphospholipid antibody syndrome*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2014. **41**(1): p. 113-32.
40. Maged, A.M., et al., *The role of prophylactic use of low dose aspirin and calheparin in patients with unexplained recurrent abortion*. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology, 2016. **32**(12): p. 970-972.
41. Wang, Y., et al., *Thrombophilia Markers in Patients with Recurrent Early Miscarriage*. Clinical laboratory, 2015. **61**(11): p. 1787-94.
42. Kutteh, W.H., *Antiphospholipid antibody syndrome and reproduction*. Current opinion in obstetrics & gynecology, 2014. **26**(4): p. 260-5.
43. Pluchino, N., et al., *Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL)*. Hormones, 2014. **13**(3): p. 314-22.
44. Smith, M.L. and D.J. Schust, *Endocrinology and recurrent early pregnancy loss*. Seminars in reproductive medicine, 2011. **29**(6): p. 482-90.

45. Laskarin, G., et al., *Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity*. American journal of reproductive immunology, 2002. **48**(4): p. 201-9.
46. Szekeres-Bartho, J., *Progesterone receptors on lymphocytes*. Human reproduction, 1995. **10**(3): p. 695-6.
47. Szekeres-Bartho, J., et al., *The role of gamma/delta T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: a review*. American journal of reproductive immunology, 1999. **42**(1): p. 44-8.
48. Ke, R.W., *Endocrine basis for recurrent pregnancy loss*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2014. **41**(1): p. 103-12.
49. Mayor, S., *Progesterone supplements do not reduce risk of recurrent miscarriage, study shows*. BMJ, 2015. **351**: p. h6359.
50. Макаров, О.В., et al., *Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет*. ГЭОТАР-Медиа, 2007: p. с 45.
51. Kryvopustov, O.S. and V.E. Dosenko, *[Single Nucleotide Polymorphisms in Human Progesterone Receptor Gene and Its Value in Miscarriage or Preterm Delivery]*. Fiziologichnyi zhurnal, 2015. **61**(2): p. 111-9.
52. Bick, R.L., et al., *Recurrent miscarriage: causes, evaluation, and treatment*. Medscape women's health, 1998. **3**(3): p. 2.
53. Rosenfield, R.L. and D.A. Ehrmann, *The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited*. Endocrine reviews, 2016. **37**(5): p. 467-520.
54. Galamb, A., et al., *[Uterine anomalies in women with recurrent pregnancy loss]*. Orvosi hetilap, 2015. **156**(27): p. 1081-4.
55. Jaslow, C.R., *Uterine factors*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2014. **41**(1): p. 57-86.
56. Ford, H.B. and D.J. Schust, *Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy*. Reviews in obstetrics & gynecology, 2009. **2**(2): p. 76-83.
57. Nigro, G., et al., *Role of the infections in recurrent spontaneous abortion*. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of

- the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 2011. **24**(8): p. 983-9.
58. Cheshik, S.G. and L.B. Kisteneva, [*Human Cytomegalovirus Infection and Spontaneous Abortion in Pregnant Women of I and II Trimester*]. *Voprosy virusologii*, 2016. **61**(2): p. 74-8.
 59. Krieg, S. and L. Westphal, *Immune Function and Recurrent Pregnancy Loss*. *Seminars in reproductive medicine*, 2015. **33**(4): p. 305-12.
 60. Tang, M.X., et al., *What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy?* *Journal of reproductive immunology*, 2015. **112**: p. 73-80.
 61. Ширшев, С.В., *Иммунология материнско-фетальных взаимодействий*. УрО РАН. Екатеринбург, 2009: p. с. 582.
 62. Ratsep, M.T., et al., *Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis*. *Reproduction*, 2015. **149**(2): p. R91-102.
 63. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. *Nature reviews. Immunology*, 2002. **2**(9): p. 656-63.
 64. Thoren, F.B., et al., *The CD16-/CD56bright subset of NK cells is resistant to oxidant-induced cell death*. *Journal of immunology*, 2007. **179**(2): p. 781-5.
 65. Saito, S., et al., *The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy*. *Journal of reproductive immunology*, 2008. **77**(1): p. 14-22.
 66. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends in immunology*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
 67. Saini, V., et al., *Cytokines in recurrent pregnancy loss*. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2011. **412**(9-10): p. 702-8.
 68. Park, D.W., et al., *Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages*. *American journal of reproductive immunology*, 2010. **63**(2): p. 173-80.

69. Lachapelle, M.H., et al., *Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome.* Journal of immunology, 1996. **156**(10): p. 4027-34.
70. Kwak-Kim, J., et al., *Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress.* American journal of reproductive immunology, 2014. **72**(2): p. 129-40.
71. Gao, Y. and P.L. Wang, *Increased CD56(+) NK cells and enhanced Th1 responses in human unexplained recurrent spontaneous abortion.* Genetics and molecular research : GMR, 2015. **14**(4): p. 18103-9.
72. Sotnikova, N., et al., *Interaction of decidual CD56+ NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation.* Scandinavian journal of immunology, 2014. **80**(3): p. 198-208.
73. Тетуашвили, Н.К., *Роль системы цитокинов в патогенезе привычного выкидыша и преждевременных родов.* Автореф. Дис.кан.мед.наук, 2000. **М**: p. 13-40.
74. Kwak-Kim, J.Y., A. Gilman-Sachs, and C.E. Kim, *T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures.* Chemical immunology and allergy, 2005. **88**: p. 64-79.
75. Chaouat, G., *Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy.* Clinical and experimental immunology, 2003. **131**(3): p. 393-5.
76. Lee, S.K., et al., *Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss.* American journal of reproductive immunology, 2013. **70**(5): p. 398-411.
77. Comba, C., et al., *Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss.* Fertility and sterility, 2015. **104**(6): p. 1467-74 e1.
78. Shirshev, S.V., *[Mechanisms of immune tolerance in physiological pregnancy].* Uspekhi fiziologicheskikh nauk, 2010. **41**(1): p. 75-93.

79. Бахарева, И.В., *Роль механизмов врожденного иммунитета в реализации внутриутробной инфекции при беременности высокого инфекционного риска*
Дисс. док. мед. наук, 2009: p. с 25-125.
80. Beer, A.E., J.Y. Kwak, and J.E. Ruiz, *Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles*. American journal of reproductive immunology, 1996. **35**(4): p. 376-82.
81. Raghupathy, R., et al., *Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions*. Cellular immunology, 1999. **196**(2): p. 122-30.
82. Kwak, J.Y., et al., *Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses*. American journal of reproductive immunology, 1995. **34**(2): p. 93-9.
83. Scott, J.R. and D.W. Branch, *Potential alloimmune factors and immunotherapy in recurrent miscarriage*. Clinical obstetrics and gynecology, 1994. **37**(3): p. 761-7.
84. Alecsandru, D. and J.A. Garcia-Velasco, *Immunology and human reproduction*. Current opinion in obstetrics & gynecology, 2015. **27**(3): p. 231-4.
85. D'Ippolito, S., et al., *Human leukocyte antigen (HLA) DQ2/DQ8 prevalence in recurrent pregnancy loss women*. Autoimmunity reviews, 2016. **15**(7): p. 638-43.
86. Juch, H., et al., *HLA class I expression in the human placenta*. Wiener medizinische Wochenschrift, 2012. **162**(9-10): p. 196-200.
87. Meuleman, T., et al., *HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis*. Human immunology, 2015. **76**(5): p. 362-73.

88. Patel, B., et al., *Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology*. Human reproduction update, 2015. **21**(2): p. 155-73.
89. Тетуашвили, Н.К., В.М. Сидельникова, and В.М. Верясов, *Роль системы цитокинов в патогенезе привычного выкидыша и преждевременных родов*. Вестн.Рос.ассоц.акуш-гинеко., 1999. **3**: p. 37-45.
90. Clifford, K., A.M. Flanagan, and L. Regan, *Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study*. Human reproduction, 1999. **14**(11): p. 2727-30.
91. Сельков, С.А., *Иммунологические аспекты невынашивания беременности*. Автореф. дис. . докт. мед. наук, 1996. М.: p. с.36.
92. Сельков, С.А. and О.В. Павлов, *Роль маточно-плацентарных макрофагов в репродуктивной патологии*. Ж. акушерства и женских болезней, 2010. **Т. 59**(№1): p. с. 122-130.
93. Шестопапов, А.В., *Метаболическая активность плацентарных макрофагов и молекулярные механизмы формирования плаценты при различных вариантах течения беременности*
Дисс. док. биол. наук, 2007: p. 180-190.
94. Benyo, D.F., T.M. Miles, and K.P. Conrad, *Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1997. **82**(5): p. 1582-8.
95. Шестопапов, А.В., et al., *Окислительный стресс в патологии плацентации*. Журнал акушерства и женских болезней, 2009: p. 3-5.
96. Прокопенко, В.М., А.В. Арутюнян, and Е.В. Флорова, *Свободнорадикальное окисление и антиокислительная активность в тканях плаценты при преждевременных родах* Бюлл. Эксперим.биологии и медицины, 1997. **2**: p. 632-634.
97. Кузьминых, Т.У., *Свободнорадикальное окисление и иммуноморфологические изменения в плаценте и внеплацентарных*

- оболочках при преждевременных родах. Автореферат дис. на соиск. учен. степ. к. м. н, 1994: р. 21.
98. Прокопенко, В.М., А.В. Арутюнян, and Т.У. Кузьминых, *Свободно-радикальное окисление в тканях последа при недоношенной беременности* Вопросы медицинской химии, 1995. **Т. 41**(№3): р. С. 53-56.
99. Абрамченко, В.В., *Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве (оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами)*. СПб, 2001: р. 400.
100. Ruder, E.H., T.J. Hartman, and M.B. Goldman, *Impact of oxidative stress on female fertility*. Current opinion in obstetrics & gynecology, 2009. **21**(3): р. 219-22.
101. Halliwell, B., *The biological effects of the superoxide radical and its products*. Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire, 1981. **17 Suppl**: р. 21-9.
102. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases*. Molecular aspects of medicine, 1985. **8**(2): р. 89-193.
103. Владимиров, Ю.А., О.А. Азизова, and А.И. Деев, *Свободные радикалы в живых системах*. Итоги науки и техники. Серия «Биофизика» М., 1991: р. 249 с.
104. Fridovich, I., *Oxygen toxicity: a radical explanation*. The Journal of experimental biology, 1998. **201**(Pt 8): р. 1203-9.
105. Лукьянова, Л.Д., Б.С. Балмуханов, and А.Т. Уголев, *Кислородзависимые процессы в клетке и ее функция*. . М., 1982: р. с. 301.
106. Журавлев, А.И., *Спонтанная биохемилюминисценция животных тканей*. Биохемилюминисценция.-М., 1983: р. С.3-30.

107. Kuo, C.F. and I. Fridovich, *Free-radical chain oxidation of 2-nitropropane initiated and propagated by superoxide*. The Biochemical journal, 1986. **237**(2): p. 505-10.
108. Северин, Е.С., *Биохимия*. М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003: p. 779 с
109. Сторожук, П.Г. and А.П. Сторожук, *Образование и устранение реактивных оксигенных радикалов в эритроцитах и их биологическая роль (с учетом интенсивной терапии)*. Вестн. интенсивн. терапии, 1998. №4: p. с1721.
110. Пескин, А.В., *Взаимодействие активного кислорода с ДНК*. Биохимия, 1997. Т.62(вып. 12): p. С. 1571-1578.
111. Зенков, Н.К., В.З. Ланкин, and Е.Б. Меньщикова, *Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты*. М.: Наука, 2001: p. с.343.
112. Babior, B.M., *The enzymatic basis for O₂ production by human neutrophils*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 1982. **60**(11): p. 1353-8.
113. Holmberg, P., *The physics and chemistry of free radicals*. Medical biology, 1984. **62**(2): p. 68-70.
114. Барсуков, А.А., В.М. Земсков, and С.А. Безносенко, *Анализ функциональной активности макрофагов при адгезии*. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1986. № 1: p. С. 3-8.
115. Allen, R.C., *Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis*. Methods in enzymology, 1986. **133**: p. 449-93.
116. Маянский, А.Н., А.Л. Невмятуллин, and И.В. Чеботарь, *Реактивная хемилюминесценция в системе фагоцитоза*. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии., 21987. №7: p. с. 109-115.

117. Барабой, В.А., И.И. Брехман, and В.Г. Голожин, *Перекисное окисление и стресс*. М.: Наука, 2004: p. с. 148.
118. Cohen, G. and P. Hochstein, *Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes*. Biochemistry, 1963. 2: p. 1420-8.
119. Коган, В.Е., А.В. Смирнов, and В.М. Савов, *ПОЛ в митохондриаль-ных мембранах, индуцируемое ферментативным дезаминированием биогенных аминов* Вopr. мед. химии., 1984. №1: p. с. 112-119.
120. Bulkley, G.B., *The role of oxygen free radicals in human disease processes*. Surgery, 1983. 94(3): p. 407-11.
121. Parks, D.A. and D.N. Granger, *Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals*. The American journal of physiology, 1983. 245(2): p. G285-9.
122. Болевич, С.Б., *Бронхиальная астма и свободнорадикальные процессы (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты)*. М.: Медицина. , 2006: p. 256 с.
123. Калмыкова, В.И., *О роли перекисей липидов в снижении антиоксидантной активности липидов в патогенезе атеросклероза*. ВИНИТИ № 5248-80 ДЕЛ., 1980.
124. Дунаева, А.Н., *Клинико-патогенетическое значение структурно-функциональных нарушений мембран эритроцитов при хроническом гепатите у детей*. Автореф. дисс. .канд. мед. наук, 1985: p. 19с.
125. Мышкин, В.А., А.И. Савлуков, and И.Л. Гуляева, *Коррекция прооксидантно-антиоксидантного равновесия после тяжелых острых отравлений*. Общая реаниматология., 2007. Т.3(№ 5-6): p. С. 69-74.
126. Владимиров, Ю.А., О.А. Азизова, and А.И. Деев, *Свободные радикалы в живых системах*. . Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1991. Т.29: p. 50-252.
127. Зенков, Н.К., *Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты*. Наука/Интерпериодика, 2001: p. 343.

128. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*. Annual review of nutrition, 1996. **16**: p. 33-50.
129. Соколовский, В.В., *Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальные воздействия* Вопросы медицинской химии, 1988. **Т34** p. 2-11.
130. Соколовский, В.В., *Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции на организм на экстремальное воздействие (обзор)*. Вопр. мед. химии., 1988. **№ 1**: p. С. 2-11.
131. Дубинина, Е.Е., *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток*. Санкт-Петербург, 2006: p. с.397.
132. Владимиров, Ю.А. and А.И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. . М.: Наука, 1972: p. 2-18.
133. Harma, M., *Defective placentation and resultant oxidative stress play a similar role in complete hydatidiform mole to that in preeclampsia and early pregnancy loss*. Medical hypotheses, 2006. **66**(1): p. 100-2.
134. Poston, L. and M.T. Raijmakers, *Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review*. Placenta, 2004. **25 Suppl A**: p. S72-8.
135. Ezashi, T., P. Das, and R.M. Roberts, *Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(13): p. 4783-8.
136. Larsen, W., *Human Embryology*. New York, Churchill Livingstone, 1997: p. 3-12.
137. Hustin, J. and J.P. Schaaps, *Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy*. American journal of obstetrics and gynecology, 1987. **157**(1): p. 162-8.
138. Jauniaux, E., L. Poston, and G.J. Burton, *Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution*. Human reproduction update, 2006. **12**(6): p. 747-55.

139. Cindrova-Davies, T., *Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S55-65.
140. Ghneim, H.K. and M.M. Alshebly, *Biochemical Markers of Oxidative Stress in Saudi Women with Recurrent Miscarriage*. Journal of Korean medical science, 2016. **31**(1): p. 98-105.
141. Baban, R.S., *Oxidative stress in recurrent pregnancy loss women*. Saudi medical journal, 2010. **31**(7): p. 759-63.
142. Plessinger, M.A., J.R. Woods, Jr., and R.K. Miller, *Pretreatment of human amnion-chorion with vitamins C and E prevents hypochlorous acid-induced damage*. American journal of obstetrics and gynecology, 2000. **183**(4): p. 979-85.
143. Chappell, L.C., et al., *Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function*. American journal of obstetrics and gynecology, 2002. **187**(3): p. 777-84.
144. Кумерова, А.О., *Антиоксидантный статус крови в ранних критических периодах беременности*. Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1999. **№1**: p. С. 27.
145. Myatt, L. and X. Cui, *Oxidative stress in the placenta*. Histochemistry and cell biology, 2004. **122**(4): p. 369-82.
146. Ruder, E.H., et al., *Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility*. Human reproduction update, 2008. **14**(4): p. 345-57.
147. Vural, P., et al., *Antioxidant defence in recurrent abortion*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2000. **295**(1-2): p. 169-77.
148. Маматиева, М.А., *Оценка метаболического резерва фагоцитов и антиоксидантной активности крови при привычном невынашивании беременности в I триместре* Дисс. канд. мед. наук, 2009: p. с. 82-95.

149. Ghneim, H.K., et al., *Superoxide dismutase activity and gene expression levels in Saudi women with recurrent miscarriage*. Molecular medicine reports, 2016. **13**(3): p. 2606-12.
150. Bernardi, F., et al., *Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia*. The journal of obstetrics and gynaecology research, 2008. **34**(6): p. 948-51.
151. Bilodeau, J.F. and C.A. Hubel, *Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia*. Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC, 2003. **25**(9): p. 742-50.
152. В.С., Л., *Перекисное окисление липидов при плацентарной недостаточности и гипотрофии плода*. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1988: p. 34-96.
153. Ozturk, E., et al., *Measurement of the placental total antioxidant status in preeclamptic women using a novel automated method*. The journal of obstetrics and gynaecology research, 2011. **37**(4): p. 337-42.
154. Прокопенко, В.М., *Процессы свободнорадикального окисления в плаценте при преждевременных родах*. Журн. акушерства и жен. болезней, 2000. **Т.49**(Вып.2): p. с. 37-40.
155. Zachara, B.A., et al., *Blood selenium and glutathione peroxidases in miscarriage*. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, 2001. **108**(3): p. 244-7.
156. Simsek, M., et al., *Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion*. Cell biochemistry and function, 1998. **16**(4): p. 227-31.
157. Nicotra, M., et al., *Blood levels of lipids, lipoperoxides, vitamin E and glutathione peroxidase in women with habitual abortion*. Gynecologic and obstetric investigation, 1994. **38**(4): p. 223-6.
158. Образцов, И.В., et al., *Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции:*

- новый подход к хемилюминесцентному анализу. Российский иммунологический журнал, 2015. **9(18)**(4): p. 418-425.
159. Созарукова, М.М., et al., *Изменения в кинетике хемилюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека*. Биофизика, 2016: p. 337-344.
160. Sugiura-Ogasawara, M., *Recurrent pregnancy loss and obesity*. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 2015. **29**(4): p. 489-97.
161. Vladimirov, Y.A. and E.V. Proskurnina, *Free radicals and cell chemiluminescence*. Biochemistry. Biokhimiia, 2009. **74**(13): p. 1545-66.
162. Cathcart, M.K., *Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(1): p. 23-8.
163. Cree, I.A., *Phagocyte chemiluminescence*. Methods in molecular biology, 1998. **102**: p. 179-87.
164. Giannubilo, S.R., et al., *The involvement of inflammatory cytokines in the pathogenesis of recurrent miscarriage*. Cytokine, 2012. **58**(1): p. 50-6.
165. Муравлева, Л.Е., et al., *ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ* Фундаментальные исследования, 2010. **1**: p. 74-78.
166. Fung, Y.L. and C.C. Silliman, *The role of neutrophils in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury*. Transfusion medicine reviews, 2009. **23**(4): p. 266-83.