

повышению концентрации рецепторов к витамину D.

4) Выявленные изменения метаболизма витамина D с активацией потребления клетками иммунной системы гормонально активного метаболита с одновременным повышением экспрессии VDR могут иметь место в патогенезе ХСК.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А., Яблочкова С.В. Современный взгляд на метаболизм и физиологические эффекты витамина D в организме человека // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей. – 2013. – №2. – С. 27-30
2. Prietl B., Treiber G., Pieber T.R. et al. Vitamin D and Immune Function // *Nutrients*. – 2013. – V.5(7). – P. 2502–2521
3. Shalita-Chesner M., Koren R., Mekori YA. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances degranulation of mast cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1993. – V.142. – P. 49-55

4. Baroni E., Biffi M., Benigni F. et al. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 // *Leukoc. Biol.* – 2007. – V.81. – P.250-262

5. Oguz T., Kocaturk E., Gungor S. et al. Does replacement of vitamin D reduce the symptom scores and improve quality of life in patients with chronic urticaria? // *Dermatolog Treat.* – 2016. – V.27. – P.163-166

6. Rorie A., Goldner W., Lyden E. Beneficial role for supplemental vitamin D3 treatment in chronic urticaria: a randomized study // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2014. – V.112(4). – P. 376-382

7. Zuberbier T., Aberer W., Asero R. et al. The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update // *Allergy*. – 2014. – V.69. – P. 868-887.

8. Miraglia D., Allegorico A. The Role of Vitamin D in Allergic Diseases in Children // *J Clin Gastroenterol.* – 2016. – V.50(2). – P. 133-135.

9. Kolkhir P., André F., Church M.K. et al. Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticarial // *Clin Exp Allergy*. – 2017. – V.47(1). – P.19-36.

## МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЛИМФОЦИТИММУНОТЕРАПИИ В ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКЕ ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

**Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Голубева Е.А., Агаджанова А.А., Тетруашвили Н.К.**

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

### THE PROCEDURE OF LYMPHOCYTOIMMUNOTHERAPY UNDER PRE-PREGNANCY MANAGEMENT OF WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

**Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Golubeva E.L., Agadzhanova A.A., Tetrushvili N.K.**

Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**П**ривычный выкидыш – диагноз, который, согласно определению ВОЗ, устанавливается в случае произошедших подряд трёх и более самопроизвольных прерываний беременности на сроке гестации до 22 недель. У женщин с привычным выкидышем повышена вероятность развития плацентарной недостаточности, наступления преждевременных родов, преждевременного излития околоплодных вод, преждевременной отслойки плаценты [1,2]. Причины невынашивания беременности многочисленны:

- аутоиммунные факторы – наличие в кро-

ви аутоантител;

- тромбофилические – генетически обусловленные тромбофилии;
- гормональные – недостаточность лютеиновой фазы и гиперандрогения различного генеза;
- анатомические – врожденные пороки развития половых органов и приобретенные изменения (внутриматочные синехии, миома матки и др.);
- инфекционные – бактериально-вирусная колонизация эндометрия;

• хромосомные – аномалии кариотипа су-  
пругов.

Ключевую роль в развитии привычного вы-  
кидыша неясного генеза (5-20% в структуре при-  
вычного невынашивания беременности) играют  
аллоиммунные нарушения [3]. По данным зару-  
бежных авторов, шансы доносить беременность  
без терапии после трёх выкидышей, обусловлен-  
ных аллоиммунными механизмами, составляют  
30%, после четырех – 25%, после пяти – 5% [4,5].  
Поэтому наличие даже двух последовательных  
выкидышей рассматривается как основание для  
постановки диагноза «привычный выкидыш»,  
последующего обследования и подготовки к бе-  
ременности [6].

Показано, что лимфоцитоиммунотерапия  
(ЛИТ) – введение аллогенных партнерских лим-  
фоцитов женщинам с привычным выкидышем  
при подготовке к беременности (особенно в су-  
пругеских парах с совместимостью по HLA-ан-  
тигенам), способствует формированию состо-  
яния иммунной системы, необходимого для  
успешной пролонгации беременности [7,8].

В связи с разнообразием методов выделения  
лимфоцитов из периферической крови, различия-  
ми в количестве вводимых клеток, в кратности  
и способах введения клеток, а также с разнообра-  
зием показателей эффективности иммунизации,  
однозначных выводов об эффективности данно-  
го способа лечения не сделано. ЛИТ широко ис-  
пользуется для коррекции привычного невына-  
шивания беременности как в России [9,10], так  
и за рубежом [11,12], однако механизмы влияния  
аллоиммунизации на имплантацию и гестацию  
остаются неизученными.

В ФГБУ «Научный центр акушерства, гине-  
кологии и перинатологии имени академика В.И.  
Кулакова» МЗ РФ процедура ЛИТ используется  
для терапии привычного выкидыша с 1983 года и  
утверждена на Учёном совете 25.12.2012 г. для ис-  
пользования в научных исследованиях (Говалло  
В.И., Сидельникова В.М. Иммунизация беремен-  
ных женщин аллогенными лимфоцитами мужа  
как метод профилактики самопроизвольных  
выкидышей //Акуш. и гин.–1983.–№12.–С.25-27;  
Сидельникова В.М., Сухих Г.Т., Кирющенков П.А.,  
Верясов В.Н. Способ лечения невынашивания  
беременности.//Патент №2283653 от 20.09.06 г.;  
Сидельникова В.М. Привычная потеря беремен-  
ности.-М: Триада-Х, 2005.-303 с.; Петросян Л.А.  
Оптимизация лимфоцитоиммунотерапии в ле-  
чении привычной потери беременности первого  
триместра. Автореф. дис.канд.мед.наук. Москва,  
2009.-24 с.; Сидельникова В.М. Подготовка и ве-

дение беременности у женщин с привычным не-  
вынашиванием: метод. пособия и клин. рекомен-  
дации.-М: МЕДпресс-информ, 2011.-224с.).

В качестве прегравидарной подготовки паци-  
ентов с привычным выкидышем процедура ЛИТ  
проводится двукратно на 5-10 день менструаль-  
ного цикла в течение 2-х менструальных циклов.

Для проведения ЛИТ используются лимфо-  
циты, соответствующие критериям донорства.  
Супруги (доноры) обследуются согласно ин-  
струкции о медицинском освидетельствовании  
доноров (Приказ №364 от 14.09.2001г. об утверж-  
дении порядка медицинского обследования до-  
норов и компонентов крови с изменениями от 16  
апреля, 6 июня 2008 г.). Забор крови из локтевой  
вены осуществляется в стерильную пробирку  
объёмом 50 мл, в качестве антикоагулянта ис-  
пользуется 200 мкл раствора гепарина (5000МЕ/  
мл). Выделение лимфоцитарной взвеси осущест-  
вляется в помещении, оснащённом ламинарным  
боксом. Кровь инкубируется при 37°C в течение  
1-1,5 часов. После разделения крови на 2 слоя  
(верхний – плазма с лимфоцитами и тромбоци-  
тами, нижний – эритроциты), верхний слой пе-  
реносится в центрифужную стерильную пробир-  
ку объёмом 14мл и центрифугируется в течение  
7 минут при 1500 об/мин. Затем надосадок уда-  
ляется и в пробирку вносится 10мл стерильной  
дистиллированной воды, осадок тщательно ресу-  
спендируется в течение 10-15 секунд, добавляется  
избыток физиологического раствора. Пробирка  
центрифугируется в течение 7 минут при 1500 об/  
мин, надосадок удаляется, к осадку добавляет-  
ся 2мл стерильного физиологического раствора.

В случаях, когда женщина имеет положитель-  
ный резус-фактор, а её супруг – резус отрицатель-  
ную кровь, при выделении клеток плазма крови с  
форменными элементами разводится в 6 мл фи-  
зиологического раствора и наслаивается на 3 мл  
фикола 1,077 г/см<sup>3</sup> в 2 пробирки. Пробирки цен-  
трифугируются в течение 30 минут при 1500 об/  
мин. Затем собираются кольца клеток в чистую  
стерильную пробирку, 2 раза отмываются в 15  
мл физиологического раствора в течение 7 минут  
при 1500 об/мин. Затем надосадок удаляется, к  
осадку добавляется 2 мл стерильного физиологи-  
ческого раствора.

В полученной взвеси определяется количество  
клеток путем визуального подсчета в камере Го-  
ряева. Окончательная концентрация лимфоци-  
тов в физиологическом растворе доводится до 50  
млн в 1 мл.

Лимфоцитарная взвесь вводится в ладонную  
поверхность предплечья внутрикочно в 10-12

точек. Все манипуляции осуществляются с учётом правил асептики и антисептики.

В качестве иммунологического маркера эффективности проведения ЛИТ используется определение антиотцовских антител (АОАТ) – количества лимфоцитов с фенотипом CD3+, несущих на своей поверхности антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулина G, специфичных к антигенам лимфоцитов супруга. Появление в сыворотке крови женщин АОАТ после проведения ЛИТ является одним из показателей формирования иммунного ответа на введение аллогенных клеток. До назначения ЛИТ у женщин с привычным выкидышем определяется низкий уровень АОАТ. Проведение ЛИТ приводит к постепенному повышению уровня АОАТ. Уровень АОАТ, достигнутый после второй процедуры ЛИТ, сохраняется стабильным у забеременевших в дальнейшем женщин на протяжении всего первого триместра [13].

В связи с присутствием в лимфоцитарной взвеси тромбоцитов и возможной аллосенсибилизации к антигенам тромбоцитов было проведено качественное определение антитромбоцитарных антител у 40 женщин до и после проведения 2 процедур ЛИТ (через 2-3 недели) методом иммуноферментного анализа («GEN-PROBE», США). По результатам исследования у одной женщины антитромбоцитарные антитела определялись как до, так и после проведения ЛИТ (2,5%), а у двух (5,1%) женщин наблюдалось появление слабopоложительных результатов на антитела к тромбоцитам после 2 процедур ЛИТ. За период 2012-2015 гг. в рамках грантов Президента РФ ведущих научных школ НШ-366.2012.7 на 2012-2013 гг. «Молекулярные и клеточные механизмы иммунорегуляции процесса гестации в норме и при потерях беременности ранних сроков» и НШ-1694.2014.7 на 2014-2015 гг. «Молекулярные и клеточные механизмы нарушения и коррекции иммунорегуляции процесса гестации при невынашивании беременности» проиммунизировано 68 женщин с привычным выкидышем, из них за наблюдаемый период забеременело 57 женщин (83,8%), причем у 39 женщин (68,4%) беременность наступила в течение 6 месяцев после проведения ЛИТ, у двух женщин выполнено прерывание беременности в сроке 12 недель в связи с диагностированными врожденными пороками развития плода (3,5%), у 11 женщин произошла потеря беременности на ранних сроках – до 16 недель гестации (19,3%), преждевременные роды наблюдались у 9 женщин (15,8%), у 35 женщин (61,4%) беременность закончилась рождением

живого доношенного ребёнка.

Включение лимфоцитоиммунотерапии в алгоритм подготовки женщин с привычным выкидышем является перспективным методом прегравидарной подготовки и требует дальнейших исследований для оценки ее эффективности.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Saraswat L., Bhattacharya S., Maheshwari A., Bhattacharya S. Maternal and perinatal outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester: a systematic review. *BJOG*. 2010 Feb;117(3):245-57.
2. Oppenraaij R.H., Jauniaux E., Christiansen O.B., Horcajadas J.A., Farquharson R.G., Exalto N.; ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: a review. *Hum Reprod Update*. 2009; 15(4): 409-21.
3. Recurrent pregnancy loss: causes, controversies and treatment. Ed. by Carp Howard J.A.: Informa UK Ltd.; 2007. 290p.
4. Chong P.J., Matzner W.L., Ching W.T. Benefit of leukocyte immunizations? *Fertil Steril*. 1993; 59(1): 247-9.
5. Chong P.J., Matzner W.L., Ching W.T. Controversy about immunotherapy. *Fertil Steril*. 1993; 59(5): 1138-9.
6. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности: Руководство для практикующих врачей.-М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2011.-516с.
7. Сухих Г.Т., Л.В. Ванько. Иммунология беременности. М.: Изд-во РАМН; 2003. 400 с.
8. Посиссева Л.В., Малышкина А.И., Бойко Е.Л., Сотникова Н.Ю., Перетятко Л.П., Фетисова И.Н. Реабилитация репродуктивного здоровья супружеских пар с невынашиванием беременности. Иваново: ОАО «Изд-во Иваново»; 2008. 240с.
9. Петросян Л.А. Оптимизация лимфоцитоиммунотерапии в лечении привычной потери беременности первого триместра. Автореф.дисс.канд.мед наук, Москва. 2009. 24с.
10. Khonina N.A., Broitman E.V., Shevela E.Y., Pisman N.M., Chernykh E.R. Mixed lymphocyte reaction blocking factors (MLR-Bf) as potential biomarker for indication and efficacy of paternal lymphocyte immunization in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2013; 288(4): 933-7.
11. Taro Nonaka, Koichi Takakuwa, Izumi Ooki, Mami Akashi, Tomokazu Yokoo, Akira Kikuchi, Kenichi Tanaka. Results of Immunotherapy for Patients with Unexplained Primary Recurrent Abortions – Prospective Non-Randomized Cohort Study. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2007; 58: 530–36.
12. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1994; 32(3): 255.
13. Кречетова Л.В., Хачатрян Н.А., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Голубева Е.Л., Николаева М.А., Сухих Г.Т. Динамика выработки антиотцовских антител лимфоцитарных антител при иммунизации аллогенными клетками женщин с привычным выкидышем. *Акушерство и гинекология*, 2015; 3: 16-20.