© Коллектив авторов, 2021

Артемяева К.А.¹, Богданова И.М.¹, Степанова И.И.¹, Степанов А.А.¹,
Тихонова Н.Б.¹, Болтовская М.Н.¹, Калюжин О.В.², Земляков А.Е.³

Продукция трансформирующего фактора роста β и интерлейкина-10 в селезенке мышей на раннем сроке беременности при спонтанных и мурамилпептид-зависимых абортах

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 117418, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 295007, г. Симферополь, Российская Федерация

Резюме

Введение. Материнский иммунный ответ является ключевой детерминантой успешного развития беременности. Среди множественных молекул-регуляторов локальных и системных механизмов формирования иммунной толерантности к фетоплацентарному «трансплантату» ведущую роль играют цитокины интерлейкин(ИЛ)-10 и трансформирующий фактор роста β (ТФР β). Взаимосвязь между уровнем продукции ИЛ-10 и ТФР β в периферических органах иммунной системы *in vivo* и частотой эмбриональных потерь при экспериментальном невынашивании беременности изучена недостаточно.

Цель исследования – на моделях спонтанных и мурамилпептид-зависимых аборт оценивать уровень продукции ИЛ-10 и ТФР β в селезенке беременных мышей на раннем сроке гестации.

Материал и методы. Аллогенную физиологическую беременность воспроизводили спариванием самок СВА/лас (Н-2^k) с самцами Balb/c (Н-2^d), модель спонтанных аборт – спариванием самок СВА/лас с самцами DBA/2J (Н-2^d). Для моделирования индуцированных и потенцированных аборт самкам СВА/лас, оплодотворенным, соответственно, самцами Balb/c или DBA/2J, на 5-й и 7-й дни гестации (ДГ) внутрибрюшинно вводили β -гептилгликозид мурамилдипептида (С7МДП) в дозе 20 мкг на 1 животное. Животных выводили из эксперимента на 8-й ДГ. Цитокин-продуцирующие клетки в срезах селезенки выявляли методом иммуногистохимического анализа с использованием кроличьих поликлональных антител к ТФР β и козьих поликлональных антител к ИЛ-10. Плотность распределения ТФР β ⁺- и ИЛ-10⁺-клеток определяли методом морфометрии с помощью программы Image Score M. Цифровые данные анализировали в программе Sigma Stat 3.5; различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Плотность ИЛ-10⁺- и ТФР β ⁺-клеток в селезенке при спонтанных абортах была вдвое меньше, чем при физиологической беременности. В условиях исходно высокофертильного спаривания введение С7МДП беременным мышам (индуцирование аборт) приводило к повышению плотности распределения ИЛ-10⁺-клеток. Плотность ТФР β ⁺-клеток при этом не изменялась. У беременных мышей с исходно высоким уровнем спонтанных репродуктивных потерь воздействие С7МДП (потенцирование аборт) вызывало увеличение плотности ИЛ-10⁺- и ТФР β ⁺-клеток. Локализация ТФР β в функциональных структурах селезенки не различалась при физиологической беременности и при спонтанных абортах. Мурамилпептид-зависимые аборт характеризовались увеличением ТФР β -положительных структурно-функциональных зон.

Заключение. Увеличение частоты эмбриональных потерь по сравнению с физиологической беременностью происходило на фоне снижения плотности ИЛ-10- и ТФР β -продуцирующих клеток в селезенке при спонтанных абортах и увеличения плотности ИЛ-10⁺-клеток при индуцированных абортах. Продукция ТФР β усиливалась при потен-

Для корреспонденции
Артемяева Ксения Александровна –
кандидат медицинских наук,
научный сотрудник
лаборатории патологии репродукции
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Минобрнауки России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

цированных абортах по сравнению со спонтанными. Увеличение плотности распределения ИЛ-10⁺-клеток при индуцированных абортах и расширение локализации ТФРβ⁺-зон в селезенке при индуцированных и потенцированных мурамилпептид-зависимых абортах не отменяло абортотропного действия С7МДП.

Ключевые слова: иммунная толерантность; цитокины; мурамилпептид; β-гептилгликозид мурамилдипептида; селезенка; модели невынашивания беременности на мышах

Статья получена 16.02.2021. Принята в печать 18.03.2021.

Для цитирования: Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Степанов А.А., Тихонова Н.Б., Болтовская М.Н., Калюжин О.В., Земляков А.Е. Продукция трансформирующего фактора роста β и интерлейкина-10 в селезенке мышей на раннем сроке беременности при спонтанных и мурамилпептид-зависимых абортах. Иммунология. 2021, 42 (2): 131–139. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-131-139>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» Минобрнауки России (№ АААА-А17-117013050049-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Artemieva K.A.¹, Bogdanova I.M.¹, Stepanova I.I.¹, Stepanov A.A.¹,
Tikhonova N.B.¹, Boltovskaya M.N.¹, Kalyuzhin O.V.², Zemlyakov A.E.³

Production of transforming growth factor β and interleukin-10 in the mouse spleen at early stage of gestation in models of spontaneous and muramylpeptide-dependent abortions

¹ Research Institute of Human Morphology, Ministry of Science and High Education of the Russian Federation, 117418, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

³ V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and High Education of the Russian Federation, 295007, Simferopol, Russian Federation

Abstract

Introduction. The maternal immune response is a key determinant of successful pregnancy development. Among the multiple local and systemic mechanisms of immune tolerance formation to the fetoplacental «graft», the regulatory cytokines interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β (TGFβ) play the leading role. However, the relationship between the production levels of IL-10 and TGFβ in peripheral organs of the immune system *in vivo* and the frequency of fetal losses in experimental pregnancy failure has not been sufficiently studied.

The aim of the study was to evaluate the production levels of IL-10 and TGFβ in the spleen of pregnant mice in models of spontaneous and muramylpeptide-dependent abortions at early gestational age.

Material and methods. Allogeneic physiological pregnancy was reproduced by crossing CBA/lac females (H-2^k) with Balb/c males (H-2^d) and the model of spontaneous abortion by mating females with DBA/2J males (H-2^d). To model induced and potentiated abortions, CBA/lac females fertilized by Balb/c or DBA/2J males, respectively, were intraperitoneally injected with muramyl dipeptide β-heptylglycoside (C7MDP) at the dose of 20 μg per 1 animal on days 5 and 7 of gestation (DG). Animals were removed from the experiment at the 8th DG. Cytokine-producing cells in spleen sections were detected by immunohistochemical analysis using rabbit polyclonal antibodies to TGFβ and goat polyclonal antibodies to IL-10. The density of TGFβ⁺- and IL-10⁺-cells was determined by morphometry using Image Scope M software. The digital data were analyzed using Sigma Stat 3.5 software, the differences were considered significant at *p* < 0.05.

Results. The density of IL-10⁺- and TGFβ⁺-cells in the spleen in spontaneous abortions was half that in physiological pregnancy. Under the conditions of baseline high-fertility crosses, injection of C7MDP into pregnant mice (induction of abortion) resulted in an increase in the density of IL-10⁺-cells, while the density of TGFβ⁺-cells did not change. In pregnant mice with

For correspondence

Ksenia A. Artemieva – PhD, Researcher,
Laboratory of Reproduction pathology,
Research Institute of Human Morphology,
Ministry of Science and High Education
of the Russian Federation,
Moscow, Russian Federation
E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

initially high levels of spontaneous reproductive losses, exposure to C7MDP (abortion potentiation) caused an increase in the density of IL-10⁺- and TGF β ⁺-cells. Localization of TGF β in spleen functional structures did not differ between physiological pregnancy and spontaneous abortions; muramylpeptide-dependent abortions were characterized by an increase in TGF β -positive structural and functional areas.

Conclusion. The increased incidence of fetal losses compared with physiological pregnancy occurred against the background of decreased IL-10- and TGF β -producing cell density in the spleen in spontaneous abortions and increased IL-10⁺-cell density in induced abortions. TGF β -production was increased in potentiated abortions compared to spontaneous abortions. The increased density of IL-10⁺-cell distribution in induced abortions and the increased localization of TGF β ⁺-zones in the spleen in induced and potentiated muramylpeptide-dependent abortions did not abolish the abortogenic effect of C7MDP.

Keywords: immune tolerance; cytokines; muramylpeptide; muramyl dipeptide β -heptylglycoside; spleen; mouse models of pregnancy failure

Received: 16.02.2021. **Accepted:** 18.03.2021.

For citation: Artemieva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Stepanov A.A., Tikhonova N.B., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E. Production of transforming growth factor β and interleukin-10 in the mouse spleen at early stage of gestation in models of spontaneous and muramylpeptide-dependent abortions. *Immunologiya*. 2021; 42 (2): 131–9. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-131-139> (in Russian)

Funding. The work was performed in the framework of the state task of Research Institute of Human Morphology of MSHE of Russia (No. AAAA-A17-117013050049-3).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Иммунная система матери играет важную роль в репродуктивном процессе. Беременность – физиологическая ситуация, при которой ключевым фактором, позволяющим избежать иммунного отторжения полуаллогенного плода при контакте с иммунной системой матери, является индукция иммунной толерантности к фетальным антигенам. В настоящее время очевидно, что иммунная система матери способна распознавать отцовские антигены в тканях эмбриона и формирующейся плаценты и индуцировать состояние транзитной физиологической толерантности к полуаллогенному плоду. Уже в ранние сроки беременности в периферической крови у человека и грызунов обнаруживают Т-клетки и антитела, реагирующие с отцовскими антигенами. Наряду с защитой репродуктивного тракта от инфекционных агентов иммунная система должна быть адаптирована к ряду физиологических событий репродуктивного цикла. В создании благоприятного микроокружения в сайте взаимодействия «мать–плод» принимают участие различные типы клеток, включая Т-регуляторные клетки (T regulatory cells, Treg), естественные киллерные клетки, децидуальные стромальные клетки, дендритные клетки, альтернативно активированные супрессорные M2-макрофаги (МФ) и иммуномодулирующие мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки [1–3]. Кроме того, существуют многочисленные локальные и системные механизмы, которые действуют в течение всего срока беременности, предупреждая материнскую иммунную атаку на плод.

Регуляторные цитокины интерлейкин(ИЛ)-10 и трансформирующий фактор роста β (ТФР β) являются ключевыми участниками врожденного и адаптивного им-

мунного ответа [4, 5]. Первым идентифицированным источником ИЛ-10 стали Th2-клетки. Позже была продемонстрирована продукция этого цитокина клетками миелоидной и лимфоидной линий системы врожденного и адаптивного иммунитета (дендритные клетки, МФ, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, эозинофилы, нейтрофилы, В-клетки, Treg, CD8⁺- и CD4⁺-Т-клетки, Th1- и Th17-клетки), а также тучными клетками [6, 7]. В последнее десятилетие активно изучается роль ИЛ-10-продуцирующих В-регуляторных клеток (Breg) в становлении и развитии беременности [8].

ТФР β играет существенную роль в поддержании иммунного гомеостаза, формировании толерантности и регуляции иммунного ответа, определяя развитие и дифференцировку Т-клеток. ТФР β направляет дифференцировку Т-клеток тимуса в естественные Т-клетки-киллеры (НКТ), естественные регуляторные Т-клетки (nTreg) и CD8⁺-Т-клетки. Цитокин модулирует иммунную толерантность, подавляя пролиферацию высокоаффинных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток и дифференцировку в Th1-, Th2- и цитотоксические Т-лимфоциты. ТФР β ингибирует пролиферацию nTreg, но обеспечивает их поддержание в периферических лимфоидных органах. В сочетании с другими цитокинами (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-23) он способствует дифференцировке периферических индуцированных клеток Treg (iTreg), определяет функциональный статус Th17-клеток. Помимо воздействия на Т-клетки, ТФР β снижает уровень пролиферации В-клеток, уменьшает активность макрофагов, дендритных клеток и естественных киллеров [9, 10].

ИЛ-10 и ТФР β являются основными эффекторными молекулами Treg, обеспечивающими формирование гестационной иммунотолерантности. ТФР β играет крити-

ческую роль в развитии Treg, поскольку CD4⁺-T-клетки, дефицитные по передаче сигналов TФРβ, не могут дифференцироваться в Treg *in vitro* или *in vivo* [11, 12].

В ряде экспериментальных исследований на различных моделях невынашивания аллогенной и сингенной беременности (спонтанные аборт, инфицирование самок *Toxoplasma gondii*, ИЛ-10-дефицитные мыши) продемонстрирована роль ИЛ-10 и TФРβ1 в поддержании беременности. Так, уменьшение частоты резорбции эмбрионов достигалось адоптивным переносом Treg, индуцированных TФРβ *ex vivo*, что приводило к увеличению сывороточных концентраций ИЛ-10 и TФРβ1 [13], введением рекомбинантного ИЛ-10 мыши, снижающим уровень апоптоза децидуальных Treg [14], воздействием рекомбинантного TФРβ человека, увеличивающим абсолютное количество Treg в плаценте, матке и селезенке самок, уменьшающим выраженность воспалительной реакции на границе «мать–плод», корригирующим плацентарный дисбаланс ИЛ-10/ФНОα [15, 16].

Нарушения в системе иммунорегуляции, ассоциированной с физиологической адаптацией к беременности, могут приводить к таким осложнениям, как самопроизвольные аборты. Иммунные механизмы невынашивания активно исследуют в моделях на мышах с разной частотой резорбции эмбрионов [17]. Так, хорошо изучена модель спонтанных абортов ♀CBA/J×♂DBA/2. Исследования на этой модели показали, что у самок со спонтанными абортами на 7-й день гестации (ДГ) в некоторых сайтах имплантации отсутствуют контакты между децидуальными клетками и клетками эктоплацентарного конуса, а также отмечается инфильтрация НК-, Т- и В-клетками [18], тучными клетками и МФ, обнаружен дефицит Th2-цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в фетоплацентарной единице и выраженный Th1-тип иммунного ответа материнских Т-лимфоцитов. Th1-цитокины усиливают прокоагулянтную активность эндотелия сосудов, стимулируя продукцию протромбиназы fg12, что, в свою очередь, приводит к массивному отложению фибрина, тромбозам и ишемии плаценты [19]. В отличие от физиологической беременности, при спонтанных абортах не происходит увеличения популяции Treg в периферической крови, лимфоузлах, селезенке, а в тимусе и в децидуальной оболочке количество Treg падает [20].

Ранее нами было исследовано распределение клеток, продуцирующих ИЛ-10 и TФРβ, в маточно-плацентарных единицах (МПЕ) самок мышей CBA с физиологической беременностью, спонтанными и мурамилпептид-индуцированными и потенцированными абортами, различающимися уровнем эмбриональных потерь на 8-й ДГ (12,5; 34,8; 46,7 и 50,0 % соответственно) [21]. Однако связь между продукцией ИЛ-10 и TФРβ в периферических органах иммунной системы и повышением частоты резорбции эмбрионов при мурамилпептид-зависимых абортах не исследована.

Цель работы – оценить уровень продукции ИЛ-10 и TФРβ в селезенке беременных мышей на моделях спонтанных, индуцированных и потенцированных абортов.

Материал и методы

Моделирование физиологической беременности, спонтанных и иммунозависимых абортов. В исследовании использовали самок линии CBA/lac (H-2^k) и самцов линий DBA/2J (H-2^d), Balb/c (H-2^d) с массой тела 20–25 г, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 6А от 19 октября 2009 г.).

Модель аллогенной физиологической беременности воспроизводили спариванием самок CBA/lac с самцами Balb/c, модель спонтанных абортов – спариванием самок CBA/lac с самцами DBA/2J. День появления копулятивной пробки обозначали как 1-й ДГ. Моделирование индуцированных и потенцированных абортов осуществляли путем двукратного внутрибрюшинного введения иммуномодулятора β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) в дозе 20 мкг на 1 животное (≈ 1 мг/кг) самкам CBA/lac, оплодотворенным, соответственно, самцами Balb/c или DBA/2, в период между завершением имплантации (5-й ДГ) и началом формирования плаценты (7-й ДГ) [21]. Для проведения исследования были сформированы экспериментальные группы самок с физиологической беременностью и вариантами невынашивания (спонтанные, индуцированные и потенцированные аборты) по 6 особей в каждой. Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 8-й ДГ.

Иммуногистохимическое исследование. Селезенку фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, подвергали стандартной гистологической проводке через спирты восходящей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°) и хлороформ в аппарате «Tissue-Tek» (Sakura, США), заливали в гистомикс и получали срезы толщиной 5–8 мкм на микротоме «Microm HM340E» (Thermo Scientific, США), которые монтировали на стекла с адгезивным покрытием «Superfrost Plus» (Menzel/Thermo Fisher Scientific, США). При проведении иммуногистохимической (ИГХ) реакции в качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные анти-TФРβ-антитела (ab 66043, 1 : 100, Abcam, Великобритания) и козы поликлональные анти-ИЛ-10-антитела (sc-1783, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology, США). Вторичными антителами служили кроличьи поликлональные антитела к IgG козы, меченные пероксидазой хрена (ab 6741, Abcam, Великобритания). Использовали систему детекции «LabVision™ UltraVision™ LP Detection System: HRPPolymer/DABPlus Chromogen» (TL-015-HD) (Thermo Scientific, Великобритания). Негативным контролем служили срезы селезенки, инкубированные без первичных антител. По окончании ИГХ-реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Морфометрические методы. Морфометрическое исследование проводили на микроскопе «Leica DM 2500» с цифровой фотокамерой при помощи графического планшета и программы Image Scope M (Leica Microsystems GmbH, Германия). В 10 полях зрения при 200-кратном увеличении оценивали плотность распределения ТФР β^+ - и ИЛ-10 $^+$ -клеток на 100 клеток селезенки (индекс плотности, ИП), а также локализацию и интенсивность ИГХ-реакции с антителами к ТФР β . Интенсивность окрашивания определяли полуколичественно, по формуле $HScore = \sum P(i) \times i$, где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах (0 – отсутствие окрашивания, 1 – слабое, 2 – умеренное, 3 – сильное), $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью (от 0 до 100 %) [22].

Статистическая обработка. Данные анализировали с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали по критерию Колмо-

горова–Смирнова, для сравнения двух выборок использовали непараметрический U -критерий Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

После проведения ИГХ-реакции с использованием антител к ИЛ-10 во всех структурно-функциональных зонах селезенки выявляли изолированные ИЛ-10 $^+$ -клетки. При физиологической беременности индекс плотности ИЛ-10 $^+$ -клеток в селезенке составил 18, что почти в 2 раза превысило показатель плотности распределения этих клеток в селезенке самок со спонтанными абортами (9,5). После введения С7МДП в ранние сроки беременности ИП ИЛ-10 $^+$ -клеток в селезенке значимо увеличился в группах индуцированных и потенцированных абортотворов по сравнению с группами физиологической беременности и спонтанных абортотворов – 31 против 18 и 20 против 9,5 соответственно (табл. 1).

А

Б

В

Г

Распределение TGF- β^+ -клеток в селезенке

Ув. $\times 100$. А – физиологическая беременность; Б – спонтанные абортотворы; В – индуцированные абортотворы; Г – потенцированные абортотворы.

Таблица 1. Плотность распределения ИЛ-10-продуцирующих клеток

Группа	Индекс плотности (ИЛ-10 ⁺ -клетки/100 клеток селезенки), <i>Me</i> (Q1; Q3)
Физиологическая беременность (1)	18,0 (14,25; 24,75)
Спонтанные аборт (2)	9,5 (5,5; 10,0)
Индукцированные аборт (3)	31,0 (24,75; 40,25)
Потенцированные аборт (4)	20,0 (11,25; 24,0)
Достоверность различий	$p_{1-2} = 0,006$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$

При ИГХ-исследовании экспрессии ТФРβ в селезенке отмечали положительную реакцию с анти-ТФРβ-антителами как в клетках, так и в окружающем внеклеточном матриксе. Анализ плотности распределения ТФРβ⁺-клеток в селезенке показал, что при физиологической беременности ИП составил 30, этот же показатель в группе спонтанных абортов был вдвое меньше (15). При введении С7МДП плотность распределения ТФРβ⁺-клеток в селезенке значимо увеличилась в группе потенцированных абортов по сравнению с группой спонтанных абортов – 21 против 15 соответственно (см. рисунок, табл. 2).

Оценка интенсивности ИГХ-реакции с анти-ТФРβ-антителами по шкале HScore показала, что при физиологической беременности и индуцированных абортах интенсивность ТФРβ-окрашивания клеток селезенки достоверно не различалась, при спонтанных абортах была выше, чем при физиологической беременности, а при потенцированных абортах – меньше, чем при

спонтанных. Интенсивность окрашивания ТФРβ⁺-клеток при абортах, индуцированных и потенцированных мурамилдипептидом, значимо не различалась.

При определении локализации ТФРβ в функциональных структурах селезенки не наблюдали различий между физиологической беременностью и спонтанными абортами – цитокин был визуализирован в красной пульпе и зоне периаартериоллярных лимфоидных муфт (ПАЛМ-зона). Группы иммунозависимых абортов характеризовало увеличение числа структур с локализацией ТФРβ. Так, при индуцированных абортах ТФРβ-позитивными оказались клетки и внеклеточный матрикс красной пульпы, ПАЛМ-зоны и маргинальной зоны лимфоидных фолликулов, а при потенцированных абортах ТФРβ⁺-реакция была обнаружена в красной пульпе, ПАЛМ-зоне, маргинальной зоне и в светлых центрах лимфоидных фолликулов (см. рисунок, табл. 2).

Таким образом, увеличение частоты эмбриональных потерь по сравнению с физиологической беременностью происходило на фоне снижения плотности ИЛ-10⁺-клеток в селезенке при спонтанных абортах и увеличения – при мурамилдипептид-зависимых индуцированных и потенцированных абортах. Иммунозависимые аборт характеризовались увеличением ТФРβ-положительных структурно-функциональных зон селезенки.

Обсуждение

Ранее при изучении иммунного микроокружения в МПЕ мышей с различными вариантами течения беременности мы обнаружили, что при физиологической гестации плотность клеток, продуцирующих ТФРβ и ИЛ-10, в МПЕ была значимо больше, чем у животных с высокой частотой спонтанных абортов [21]. В настоящей работе установлены сходные различия в плотности распределения ИЛ-10⁺- и ТФРβ⁺-клеток в селезенках мышей: при физиологической беременности плотность этих клеток была вдвое выше, чем в группе спонтанных

Таблица 2. Плотность распределения и интенсивность окрашивания ТФРβ-продуцирующих клеток, локализация ТФРβ⁺-клеток и внеклеточного матрикса в функциональных зонах селезенки

Группа	Индекс плотности (ТФРβ ⁺ -клетки / 100 клеток селезенки), <i>Me</i> (Q1; Q3)	Интенсивность окрашивания, HScore, <i>Me</i> (Q1; Q3)	Локализация
Физиологическая беременность (1)	30 (18; 42)	195,83 (157,29; 231,88)	Красная пульпа, ПАЛМ-зона
Спонтанные аборт (2)	15 (14; 17)	234,03 (229,17; 236,46)	Красная пульпа, ПАЛМ-зона
Индукцированные аборт (3)	36,5 (33; 44)	203,86 (186,25; 221,15)	Красная пульпа, ПАЛМ-зона, маргинальная зона лимфоидных узелков
Потенцированные аборт (4)	21 (21; 26)	207,08 (198,96; 213,75)	Красная пульпа, ПАЛМ-зона, маргинальная зона и светлый центр лимфоидных узелков
Достоверность различий	$p_{1-2} = 0,002$ $p_{1-3} = 0,494$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,371$ $p_{2-4} = 0,032$ $p_{3-4} = 0,277$	

абортов. Это позволяет предположить общность или по крайней мере взаимосвязь локальных и системных регуляторных механизмов, направленных на сохранение беременности, и участие в них ИЛ-10- и ТФР β -продуцирующих клеток.

Введение С7МДП беременным мышам, приводящее к росту репродуктивных потерь, изменяло (усложняло) характер связи частоты резорбции эмбрионов с плотностью ИЛ-10 $^{+}$ - и ТФР β^{+} -клеток в селезенке. У беременных мышей с исходно высоким уровнем спонтанных репродуктивных потерь воздействие С7МДП (потенцирование абортотропности) вызывало увеличение плотности ИЛ-10 $^{+}$ - и ТФР β^{+} -клеток в селезенке, что ранее было продемонстрировано и в МПЕ [21]. Указанные изменения можно трактовать как проявление не только и не столько действия С7МДП, но и компенсаторных реакций, выраженность которых недостаточна для блокировки абортотропного эффекта этого иммуностимулятора.

В условиях исходно высокофертильного спаривания введение С7МДП беременным мышам (индуцирование абортотропности) приводило к повышению плотности распределения ИЛ-10 $^{+}$ -клеток в селезенке, тогда как в МПЕ этот показатель имел тенденцию к снижению на фоне статистически значимого падения тканевого содержания этого цитокина [21]. Плотность ТФР β^{+} -клеток при этом не изменялась ни в селезенке, ни в МПЕ.

Очевидно, С7МДП усиливает иммунный ответ матери на аллоантигены плода, нарушая цитокиновый баланс на системном и локальном уровнях в неблагоприятном для прогрессирования беременности направлении [23]. В группе самок с потенцированными абортотропными С7МДП оказывает аддитивный эффект, усиливая нарушения иммунорегуляции, изначально существующие при спонтанных абортах.

При ИГХ-исследовании в селезенке отмечали положительную реакцию с анти-ТФР β -антителами как в клетках, так и во внеклеточном матриксе. Подобную картину наблюдали при выявлении ТФР β в селезенке мутантных Gata1 low -мышей на модели миелофиброза [24]. В ряде работ было показано, что в клетках ТФР β продуцируется и секретируется в неактивной форме в виде комплекса с LAP (ассоциированным с латентно-

стью пептидом) и гликопротеином LTBP (латентным ТФР β -связывающим белком). Последний опосредует отложение комплекса во внеклеточном матриксе. Матрикс служит резервуаром и источником цитокина, который после воздействия активирующих факторов (ретиноевая кислота, фактор роста фибробластов, тромбоспондин-1, эндотоксин, активные формы кислорода, плазмин, матриксные металлопротеазы MMP-2 и MMP-9) высвобождается из комплекса, связывается с рецепторами и активирует сигнальные пути [9, 25]. Расширение ТФР β^{+} -зон, очевидно, связано с тем, что при индуцированных и потенцированных абортах происходит увеличение объемных долей белой пульпы и Т-зависимой зоны периаартериоларных лимфоидных муфт под воздействием С7МДП [26].

Заключение

Таким образом, в моделях спонтанных и С7МДП-зависимых абортотропности на мышах охарактеризованы особенности продукции ТФР β и ИЛ-10 в селезенке *in vivo*. Результаты, полученные на модели спонтанных абортотропности, дают основания полагать, что формирование иммунного микроокружения в зоне МПЕ и иммунные реакции в периферических лимфоидных органах взаимосвязаны. Не вызывает сомнения участие ТФР β и ИЛ-10 в регуляции не только системного, но и локального иммунного ответа на аллогенный эмбрион на раннем сроке беременности. В то же время выявленное увеличение плотности распределения ИЛ-10 $^{+}$ -клеток и расширение локализации ТФР β^{+} -зон в селезенке при иммунозависимых абортотропностях, очевидно, имеющее компенсаторный характер, не способно обеспечить отмену абортотропного действия С7МДП.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Артемьева К.А., Богданова И.М., Земляков А.Е.; сбор и обработка материала – Артемьева К.А., Степанова И.И., Степанов А.А., Тихонова Н.Б.; статистическая обработка – Артемьева К.А.; написание текста – Артемьева К.А., Богданова И.М., редактирование – Болтовская М.Н., Калюжин О.В.

Литература

1. Renaud S.J., Graham C.H. The role of macrophages in utero/placental interaction during normal and pathological pregnancy. *Immunol. Invest.* 2008; 37 (5): 535–64. DOI: <https://doi.org/10.1080/08820110802191375>
2. Minoz-Suano A., Hamilton A.B., Betz A.G. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* 2011; 241 (1): 2038. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
3. Ning F., Liu H., Lash G.E. The role of decidual macrophages during normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016; 75 (3): 298–309. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.12477>
4. Maloy K. J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N. J., Powrie F. CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 111–9. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20021345>
5. Connor R.A., Anderton S.M. Inflammation-associated genes: risks and benefits to Foxp3 $^{+}$ regulatory T-cell function. *Immunology.* 2015; 146: 194–205. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12507>
6. Ng T.H., Britton G.J., Hill E.V., Verhagen J., Burton B.R., Wraith D.C. Regulation of adaptive immunity: role of interleukin-10. *Front. Immunol.* 2013; 4: 129. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
7. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* 2020; 217 (1): e20190418. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
8. Guzman-Genuino R.M., Diener K.R. Regulatory B cells in pregnancy: lessons from autoimmunity, graft tolerance, and cancer. *Front. Immunol.* 2017; 8: 172. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00172>
9. Li M.O., Flavell R.A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008; 134: 392–404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.025>
10. Yoshimura A., Wakabayashi Y., Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J. Biochem.* 2010; 147 (6): 781–92. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvq043>

11. Liu Y.Z., Zhang P., Li J., Kulkarni A.B., Perruche S., Chen W.J. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9. P. 632–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1607>
12. Pyzik M., Piccirillo C.A. TGF-β modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4 T cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82: 335–46. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1006644>
13. Qiu T., Teng Y., Wang Y., Xu L. Adoptive transfer of transforming growth factor-β1-induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells prevents immune response-mediated spontaneous abortion. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015 May 14. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD14503>
14. Lao K., Zhao M., Li Zh., Liu X., Zhang H., Jiang Y., Wang Y., Hu X. IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis contributing to the abnormal pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection. *Microb. Pathog.* 2015; 89: 210–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.002>
15. Zhao M., Zhang R., Xu X., Liu Y., Zhang H., Zhai X., Hu X. IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56455. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056455>
16. Zhao M., Zhang H., Liu X., Jiang Y., Ren L., Hu X. The effect of TGF-β on Treg cells in adverse pregnancy outcome upon *Toxoplasma gondii* infection. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 901. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00901>
17. Clark D.A. On use of animal models. *Emerg. Top. Life Sci.* 2020; 4 (2): 207–27. DOI: <https://doi.org/10.1042/ETLS20200042>
18. Gendron R.L., Baines M.G. Morphometric analysis of the histology of spontaneous fetal resorption in a murine pregnancy. *Placenta.* 1989; 10 (3): 309–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(89\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0143-4004(89)90031-3)
19. Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 611–23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00847.x>
20. Thuere C., Zenclussen M.L., Schumacher A., Langwisch S., Schulte-Wrede U., Teles A., Paeschke S., Volk H.D., Zenclussen A.C. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58 (6): 514–23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00538.x>
21. Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Калюжин О.В., Степанов А.А., Земляков А.Е. Особенности иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортми. *Иммунология.* 2019; 40 (6): 26–33. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-16004>
22. Aeffner F., Wilson K., Martin N.T., Black J.C., Luengo Hendriks C.L., Bolon B., Rudmann D.G., Gianani R., Koegler S.R., Krueger J., Young G.D. The gold standard paradox in digital image analysis: manual versus automated scoring as ground truth. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2017; 141 (9): 1267–75. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0386-RA>
23. Sykes L., MacIntyre D., Yap Xiao J., Teoh T.G., Bennett Ph.P. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 967629. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/967629>
24. Zingariello M., Ruggeri A., Martelli F., Marra M., Sancillo L., Ceglia I., Rana R.A., Migliaccio A.R. A novel interaction between megakaryocytes and activated fibrocytes increases TGF-β bioavailability in the Gata1(low) mouse model of myelofibrosis. *Am. J. Blood Res.* 2015; 5 (2): 34–61.
25. Kubiczкова L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. TGF-β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 183. DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
26. Артемьева К.А., Калюжин О.В., Степанова И.И., Назимова С.В., Болтовская М.Н. Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы и плаценты при аллогенной беременности у мышей с высокой фертильностью и мурамилидипептид-индуцированными абортми. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2013; (4): 34–40.

■ References

1. Renaud S.J., Graham C.H. The role of macrophages in utero/placental interaction during normal and pathological pregnancy. *Immunol. Invest.* 2008; 37 (5): 535–64. DOI: <https://doi.org/10.1080/0882011130802191375>
2. Minoz-Suano A., Hamilton A.B., Betz A.G. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* 2011; 241 (1): 2038. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
3. Ning F., Liu H., Lash G.E. The role of decidual macrophages during normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016; 75 (3): 298–309. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.12477>
4. Maloy K. J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N. J., Powrie F. CD4⁺CD25⁺TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 111–9. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20021345>
5. Connor R.A., Anderton S.M. Inflammation-associated genes: risks and benefits to Foxp3⁺ regulatory T-cell function. *Immunology.* 2015; 146: 194–205. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12507>
6. Ng T.H., Britton G.J., Hill E.V., Verhagen J., Burton B.R., Wraith D.C. Regulation of adaptive immunity: role of interleukin-10. *Front. Immunol.* 2013; 4: 129. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
7. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* 2020; 217 (1): e20190418. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
8. Guzman-Genuino R.M., Diener K.R. Regulatory B cells in pregnancy: lessons from autoimmunity, graft tolerance, and cancer. *Front. Immunol.* 2017; 8: 172. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00172>
9. Li M.O., Flavell R.A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008; 134: 392–404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.025>
10. Yoshimura A., Wakabayashi Y., Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J. Biochem.* 2010; 147 (6): 781–92. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvq043>
11. Liu Y.Z., Zhang P., Li J., Kulkarni A.B., Perruche S., Chen W.J. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9. P. 632–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1607>
12. Pyzik M., Piccirillo C.A. TGF-β modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4 T cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82: 335–46. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1006644>
13. Qiu T., Teng Y., Wang Y., Xu L. Adoptive transfer of transforming growth factor-β1-induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells prevents immune response-mediated spontaneous abortion. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015 May 14. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD14503>
14. Lao K., Zhao M., Li Zh., Liu X., Zhang H., Jiang Y., Wang Y., Hu X. IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis contributing to the abnormal pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection. *Microb. Pathog.* 2015; 89: 210–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.002>
15. Zhao M., Zhang R., Xu X., Liu Y., Zhang H., Zhai X., Hu X. IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56455. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056455>
16. Zhao M., Zhang H., Liu X., Jiang Y., Ren L., Hu X. The effect of TGF-β on Treg cells in adverse pregnancy outcome upon *Toxoplasma gondii* infection. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 901. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00901>
17. Clark D.A. On use of animal models. *Emerg. Top. Life Sci.* 2020; 4 (2): 207–27. DOI: <https://doi.org/10.1042/ETLS20200042>
18. Gendron R.L., Baines M.G. Morphometric analysis of the histology of spontaneous fetal resorption in a murine pregnancy. *Placenta.* 1989; 10 (3): 309–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(89\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0143-4004(89)90031-3)
19. Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 611–23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00847.x>
20. Thuere C., Zenclussen M.L., Schumacher A., Langwisch S., Schulte-Wrede U., Teles A., Paeschke S., Volk H.D., Zenclussen A.C. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58 (6): 514–23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00538.x>
21. Artem'eva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V., Stepanov A.A., Zemlyakov A.E. Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endome-

trium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 26–33. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-16004> (in Russian)

22. Aeffner F., Wilson K., Martin N.T., Black J.C., Luengo Hendriks C.L., Bolon B., Rudmann D.G., Gianani R., Koegler S.R., Krueger J., Young G.D. The gold standard paradox in digital image analysis: manual versus automated scoring as ground truth. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2017; 141 (9): 1267–75. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0386-RA>

23. Sykes L., MacIntyre D., Yap Xiao J., Teoh T.G., Bennett Ph.P. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 967629. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/967629>

Сведения об авторах

Артемьева Ксения Александровна – канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Богданова Ирина Марковна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Степанова Ирина Ильдаровна – науч. сотр. лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Степанов Александр Алексеевич – науч. сотр. лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>

Тихонова Наталья Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5437-6933>

Болтовская Марина Николаевна – д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Калюжин Олег Витальевич – д-р мед. наук, проф., проф. кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация
E-mail: kalyuzhin@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3628-2436>

Земляков Александр Евгеньевич – д-р хим. наук, проф., зав. кафедрой органической и биологической химии Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского Минобрнауки России, Симферополь, Российская Федерация
E-mail: alex_z56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3536-1618>

24. Zingariello M., Ruggeri A., Martelli F., Marra M., Sancillo L., Ceglia I., Rana R.A., Migliaccio A.R. A novel interaction between megakaryocytes and activated fibrocytes increases TGF- β bioavailability in the Gata1(low) mouse model of myelofibrosis. *Am. J. Blood Res.* 2015; 5 (2): 34–61.

25. Kubiczkova L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 183. DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>

26. Artem'eva K.A., Kalyuzhin O.V., Stepanova I.I., Nazimova S.V., Boltovskaya M.N. Morphofunctional characteristics of the immune system and placenta in allogeneic pregnancy in mice high fertility and muramyl dipeptides-induced abortion. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2013; (4): 34–40. (in Russian)

Authors' information

Ksenia A. Artemieva – PhD, Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Irina M. Bogdanova – PhD, Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Irina I. Stepanova – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Alexander A. Stepanov – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>

Natalia B. Tikhonova – PhD, Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5437-6933>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci., PhD, Prof., Head of the Laboratory of Pathology of Reproduction, RIHM of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Oleg V. Kalyuzhin – MD, PhD, Prof., Prof. of the Department of Clinical Immunology and Allergology, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: kalyuzhin@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3628-2436>

Alexander E. Zemlyakov – Dr.Sci., PhD, Prof., Head of the Department of Organic and Biological Chemistry, V.I. Vernadsky Crimean Federal University of the MSHE of Russia, Simferopol, Russian Federation
E-mail: alex_z56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3536-1618>