

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН, ПРОХОДЯЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ПО ПРОГРАММЕ ЭКО

Андреева Е.А.¹, Хонина Н.А.¹, Тихонова М.А.¹, Баторов Е.В.¹,
Пасман Н.М.², Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Данная работа посвящена исследованию различных субпопуляций FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток (Трег) в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, проходивших лечение методом ЭКО, и взаимосвязи Трег с параметрами фолликуло-/оогенеза, качеством эмбрионов и исходом ЭКО. В исследование были включены 53 женщины, участвующие в программе стимуляции суперовуляции в возрасте от 25 до 46 лет. Содержание Трег в ФЖ определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител. Исследования ФЖ выявили наличие в ней FoxP3⁺Т-клеток как в популяции CD4⁺(CD4⁺FoxP3⁺), так и CD4⁻(CD4⁻FoxP3⁺) лимфоцитов. При этом FoxP3-клетки определяли в популяциях CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ лимфоцитов. Женщины с наименьшим числом фолликулов и ооцитов характеризовались наибольшим содержанием в ФЖ CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ и CD4⁻FoxP3⁺ клеток соответственно. Ретроспективный анализ также выявил сопряженность между относительным содержанием Трег и качеством ооцитов и эмбрионов. Высокий индекс оплодотворения (ИО 0,75-1,0) ассоциировался с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁻FoxP3⁺ клеток, а высокое качество blastocyst на 5 сутки в сравнении с оппозитной группой характеризовалось более высоким содержанием в ФЖ не только CD4⁻FoxP3⁺, но и CD4⁺FoxP3⁺ клеток. При этом наступление и прогрессирование беременности также регистрировалось у женщин с наибольшим числом CD4⁻FoxP3⁺ клеток. Полученные данные свидетельствуют о наличии различных субпопуляций FoxP3⁺Т-клеток в ФЖ и их возможном участии в регуляции ранних этапов репродуктивного процесса. Особую роль среди различных субпопуляций Трег, по-видимому, играют CD4⁻FoxP3⁺Т-клетки, количество которых прямо сопряжено с эффективностью оогенеза, blastulation и наступлением клинической беременности.

Ключевые слова: бесплодие, регуляторные Т-клетки, ЭКО, фолликулярная жидкость, ооциты, беременность

Адрес для переписки:

Андреева Евгения Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; evga_91@mail.ru

Address for correspondence:

Andreeva Evgeniya A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; evga_91@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, М.А. Тихонова,
Е.В. Баторов, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных
«Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости
у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5.
С. 657-666. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666
© Андреева Е.А. и соавт., 2018

For citation:

E.A. Andreeva, N.A. Khonina, M.A. Tikhonova, E.V. Batorov,
N.M. Pasman, E.R. Chernykh "Regulatory T cells in follicular
fluid of women undergoing IVF treatment", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5,
pp. 657-666. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666

REGULATORY T CELLS IN FOLLICULAR FLUID OF WOMEN UNDERGOING IVF TREATMENT

Andreeva E.A.^a, Khonina N.A.^a, Tikhonova M.A.^a, Batorov E.V.^a,
Pasman N.M.^b, Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to evaluate FoxP3⁺ regulatory T cell (Treg) subsets in the follicular fluid (FF) of the women undergoing *in vitro* fertilization (IVF), and their relationships with features of folliculogenesis and oogenesis, as well as quality of embryos and retrospective assessment of IVF outcomes. The study included 53 women at the age of 25 to 46 years stimulated by superovulation. The count of Tregs in the FF samples was determined by flow cytometry using appropriate monoclonal antibodies. The FF examination revealed of FoxP3⁺ T cells from both CD4⁺ (CD4⁺FoxP3⁺) and CD4⁻ (CD4⁻FoxP3⁺) T lymphocyte subsets. Moreover, the FoxP3⁺ cells were registered in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T lymphocyte subsets. Follicular fluid of women with a relatively small number of follicles contained higher numbers of CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ T cells, whereas a reduced number of oocytes was associated with the highest count of CD4⁻FoxP3⁺ T cells in FF. Retrospective analysis showed the a relationship between percentage of Tregs, and quality of oocytes and embryos. High fertilization index (0.75-1.0), reflecting maturity of the oocytes was associated with higher count of CD4⁻FoxP3⁺ T cells in the FF. Better quality of blastocysts was associated with a higher count of both CD4⁻FoxP3⁺ and CD4⁺FoxP3⁺ T cells. Onset and progression of pregnancies was also registered in women with relatively high counts of CD4⁻FoxP3⁺ T cells. The obtained data showed presence of different FoxP3⁺ T cell subtypes in follicular fluid, and its possible role in controlling early stages of reproductive process. CD4⁻FoxP3⁺ T cells seem to be the most important subpopulation; their counts are associated with efficacy of oogenesis, blastulation and pregnancy occurrence.

Keywords: infertility, regulatory T cells, IVF, follicular fluid, oocytes, pregnancy

Введение

За последние два десятилетия стало очевидным, что иммунная система принимает активное участие в регуляции функций яичников, контролируя стероидогенез, фолликулогенез, овуляцию, формирование и атрезию желтого тела. Ткани яичника и фолликулярная жидкость (ФЖ) содержат различные субпопуляции лейкоцитов [7], которые экспрессируют рецепторы к половым гормонам, подвержены гормональной регуляции и количественно меняются в процессе менструального цикла [1]. Среди различных популяций лимфоцитов особый интерес представляют регуляторные Т-клетки (Treg), играющие важную роль в формировании толерантности к аллоантигенам плода. При неосложненной беременности количество Treg повышено, а их снижение сопряжено с угрозой самопроизвольного прерывания беременности [2, 24] и развитием преэклампсии [27]. Наряду с важной функцией индукции и поддержания толерантности, Treg участвуют в регуляции инвазии трофобласта и ремоделировании сосудов плаценты [11]. Однако их причастность к контролю над фолликулогенезом до настоящего времени остается неизученной.

Одним из доступных источников для изучения Treg и их роли в регуляции самых ранних этапов репродуктивной функции является ФЖ, образцы которой получают при трансвагинальной пункции яичников у женщин, проходящих лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). ФЖ содержит различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток и растворимые факторы (цитокины, факторы роста, микровезикулы и ДНК), непосредственно влияющие на созревание ооцитов [3, 16, 28]. Несмотря на то, что ЭКО признается одним из наиболее успешных методов лечения бесплодия, даже в этом случае его эффективность не превышает 30-40%. Исходы ЭКО во многом зависят от степени зрелости ооцитов, эффективности оплодотворения и качества эмбрионов. С этой точки зрения анализ содержания Treg в ФЖ женщин, различающихся по данным параметрам и исходам ЭКО, может представлять интерес как в плане осмысления роли этих клеток в регуляции ранних этапов репродуктивного процесса, так и в аспекте поиска новых прогностических маркеров эффективности ЭКО.

Исследование Treg представляет определенные сложности в связи с отсутствием спец-

ифических маркеров и гетерогенностью данной популяции клеток. Treg идентифицируют как CD4⁺T-клетки с высокой экспрессией α -цепи рецептора IL-2 (CD25) [23] и внутриклеточным содержанием транскрипционного фактора FoxP3 [8, 18, 21, 25]. Однако у человека указанные маркеры не являются строго специфичными для Treg и могут экспрессироваться активированными T-клетками [22]. Рядом авторов показано, что CD4⁺FoxP3⁺ клетки, не экспрессирующие CD25-молекулы, также могут обладать супрессорной активностью [25]. Кроме того, транскрипционный фактор FoxP3 может экспрессироваться не только CD4⁺, но и CD8⁺T-клетками, которые во многом схожи с CD4⁺FoxP3⁺Treg, и их супрессорная активность нивелируется при «выключении» FoxP3⁺ [9, 15].

Учитывая вышесказанное, целью настоящей работы явилось исследование содержания различных субпопуляций FoxP3⁺T-клеток в ФЖ женщин, проходящих лечение бесплодия методом ЭКО, и анализ их взаимосвязи с параметрами фолликулогенеза, качеством эмбрионов и исходом ЭКО.

Материалы и методы

Исследуемая группа включала 53 женщины с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО в 2015-2017 гг. Все женщины подписывали информированное согласие на участие в иммунологических исследованиях. Возраст женщин варьировал от 25 до 42 лет, длительность бесплодия – от 0,5 года до 18 лет (табл. 1). Первичное бесплодие было диагностировано у 52%, вторичное – у 48% женщин. Причиной бесплодия в 36% случаев являлся трубно-перитонеальный фактор, в 13% – эндокринный фактор, в 15% – мужской фактор. В 36% случаев бесплодие было обусловлено сочетанием факторов. Процедура ЭКО была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 53%.

Сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов проводили во время трансвагинальной пункции яичников. В случае видимой контаминации образцов ФЖ кровью исследование не проводили. Образцы ФЖ центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут. Содержащиеся в осадке клетки криоконсервировали и хранили при температуре -80 °С. Относительное содержание субпопуляций T-клеток (CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁻, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺) оценивали методом проточной цитометрии, используя анти-CD25 (FITC, BD Biosciences, США), анти-CD4 (PerCP, BD Biosciences, США), анти-FoxP3 (PE, BD Biosciences) моноклональные антитела. Фиксацию и пермеабиллизацию

клеток для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов (CD25 и CD4); использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACSCalibur, CellQuest Software, США) (рис. 1). В тексте относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺T-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ – в виде процента от CD4⁺T-клеток.

Индекс оплодотворения (ИО) рассчитывали по формуле: ИО = количество оплодотворенных ооцитов/количество полученных ооцитов. Оценка качества эмбриона проводилась морфологически по принятой классификации Gardner D.K. [12].

Биохимическая беременность регистрировалась при значениях хорионического гонадотропина более 5 Ед/мл на 14 день после эмбриотрансфера; клиническая – при визуализации плодного яйца в полости матки методом УЗИ на пятой неделе гестации. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Результаты

При исследовании ФЖ у женщин со стимулированной суперовуляцией выявлено наличие в ней FoxP3⁺ клеток как в популяции CD4⁺(CD4⁺FoxP3⁺), так и CD4⁻(CD4⁻FoxP3⁺) T-клеток. При этом FoxP3⁺ клетки выявляли среди CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ T-лимфоцитов (рис. 1). Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺T-клеток составило 2,0% (1,0-3,7%), CD4⁻FoxP3⁺T-клеток – 3,0% (1,3-5,0%). Относительное количество CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺T-клеток составило 4,0% (2,0-6,7%) и 6,0% (3,5-8,0%) соответственно.

Сравнение относительного количества CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁻FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺T-клеток в группах женщин, различающихся по возрасту (< 35 и \geq 35 лет), продолжительности бесплодия (< 3 лет, 3-6 и > 6 лет) и овариальному резерву (антимюллеров гормон < 1,0; 1-6 и > 6 нг/мл), не выявило значимых

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМОЙ ГРУППЫ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUP (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Исследуемая группа Study group (n = 53)	Параметры Parameters	Исследуемая группа Study group (n = 53)
Возраст (лет) Age (years)	34,0 (32,0-36,5)	ФСГ (МЕ/л) на 2-4 д.ц. FSH (IU/l) by 2-4 d.c.	6,9 (5,4-9,2)
Менархе (лет) Menarche (years)	13,5 (13,0-14,0)	ЛГ (МЕ/л) в 2-4 д.ц. LH (IU/l) by 2-4 d.c.	5,0 (3,6-7,6)
Продолжительность цикла (дни) Duration of the cycle (days)	28,0 (28,0-30,0)	Е ₂ (пмоль/л) на 2-4 д.ц. E ₂ (pmol/l) by 2-4 d.c.	115,0 (70,5-207,0)
Длительность бесплодия (лет) Duration of infertility (years)	6,0 (3,0-10,0)	АМГ (нг/мл) AMG (ng/ml)	1,9 (1,2-3,5)
Аборты Abortions	0 (0-1,0)	ТТГ (мМЕ/л) TTG (mIU/l)	1,3 (0,9-1,7)
Количество попыток ЭКО Number of IVF attempts	1,0 (1,0-1,0)	Св. Т4 (нмоль/л) Free T4 (nmol/l)	12,4 (11,6-13,4)
Количество рожденных детей (n = 9)	1,0 (1,0-1,0)	17-ОН прогестерон (нмоль/л) 17-OH progesterone (nmol/l)	2,7 (1,9-3,2)
М-эхо в день переноса (мм) M-echo on the day of transfer (mm)	10,7 (10,0-12,0)	Тестостерон (нмоль/л) Testosterone (nmol/l)	1,2 (0,9-2,5)
Количество фолликулов Number of follicles	9,0 (6,0-13,0)	Пролактин (мМЕ/мл) Prolactin (mIU/ml)	278 (190,0-390,0)
Количество ооцитов Number of oocytes	7,0 (4,5-10,5)		

различий в содержании исследуемых субпопуляций. Содержание CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁻, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺T-клеток у женщин с трубно-перитонеальным, эндокринным, мужским и сочетанным факторами бесплодия было также сопоставимо и значимо не различалось (табл. 2). Поэтому в дальнейшем изучение взаимосвязи между количеством Treg и параметрами, характеризующими созревание ооцитов, качество эмбрионов и исходы ЭКО, проводилось в общей группе пациенток.

Учитывая выраженные вариации в количестве созревших фолликулов при стимуляции суперовуляции, все женщины были разделены на 3 группы: с количеством фолликулов менее 6 (груп-

па 1), от 6 до 12 (группа 2) и более 12 (группа 3). Анализ различных субпопуляций Treg в выделенных группах показал, что образцы ФЖ женщин с наименьшим количеством фолликулов отличались более высоким содержанием CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺T-клеток, доля которых в группе 1 составляла 6,0% (6,0-19,0%) и была значимо выше, чем в группах 2 и 3: 5,0% (3,3-9,0%), p_u = 0,04, и 4,6% (3,3-6,0%), p_u = 0,03 соответственно (рис. 2А).

Для анализа возможной взаимосвязи Treg с количеством ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников, все женщины также были разделены на 3 группы – с числом ооцитов менее 4 (группа 1), от 4 до 8 (группа 2) и более 8 (группа 3). Образцы ФЖ женщин из груп-

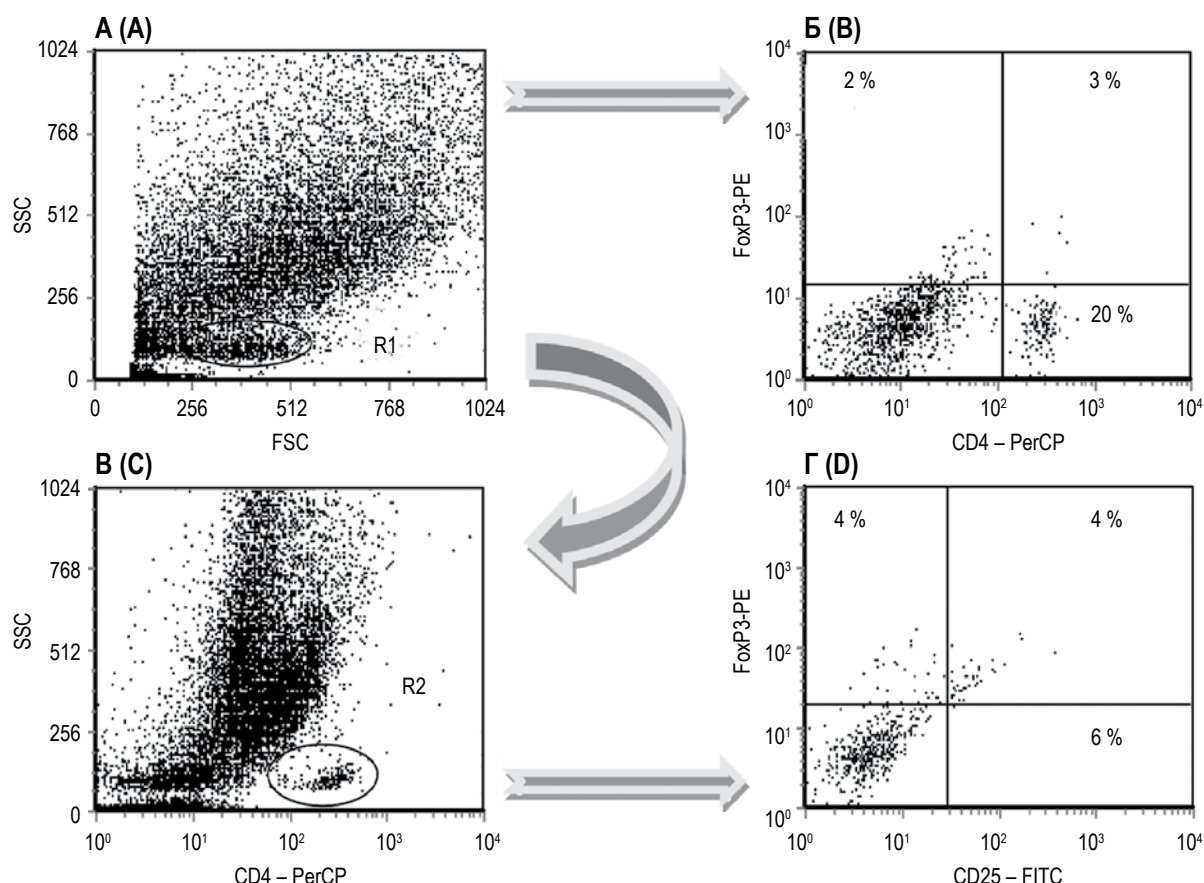


Рисунок 1. Цитометрическая характеристика популяций FoxP3⁺Т-клеток в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО

Примечание. На рисунке А представлено общее лимфоцитарное облако, из которого выделены: (Б) CD4⁺FoxP3⁺Т-клетки, (В) популяция CD4⁺Т-клеток и (Г) популяции CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Т-клеток. Представлены данные репрезентативной пациентки.

Figure 1. Cytometric characteristics of FoxP3⁺ T cell subtypes in the follicular fluid of women undergoing IVF treatment

Note. Figure A shows the total lymphocyte gate from which: (B) CD4⁺FoxP3⁺ T cells, (C) CD4⁺ T cell population, and (D) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cell subsets are selected. The data of a representative patient are presented.

ТАБЛИЦА 2. РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В Фолликулярной жидкости женщин с различным генезом бесплодия (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. REGULATORY T CELLS IN THE FOLLICULAR FLUID OF WOMEN WITH INFERTILITY BY DIFFERENT ORIGIN (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Фактор бесплодия Infertility factor			
	Группа 1 МФ Group 1 MF (n = 8)	Группа 2 ТП Group 2 TP (n = 19)	Группа 3 Эндокринный Group 3 Endocrine (n = 7)	Группа 4 Сочетанный Group 4 Combined (n = 19)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	3,0 (1,1-3,2)	2,0 (1,0-4,0)	1,5 (1,0-4,0)	2,0 (1,0-1,4)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,0 (3,0-6,0)	3,0 (1,2-7,0)	1,0 (1,0-4,0)	2,1 (1,1-4,5)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	3,0 (1,5-5,5)	5,9 (3,0-7,0)	5,0 (3,0-6,0)	4,0 (2,0-8,0)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	6,0 (3,3-9,0)	5,0 (3,5-7,0)	6,0 (4,0-7,0)	6,0 (3,4-10,0)

Примечание. Используемые сокращения: МФ – мужской фактор бесплодия; ТП – трубно-перитонеальный. Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Note. Abbreviations used: MF, male factor of infertility; TP, tubular/peritoneal factors. Statistically significant differences between groups were not revealed.

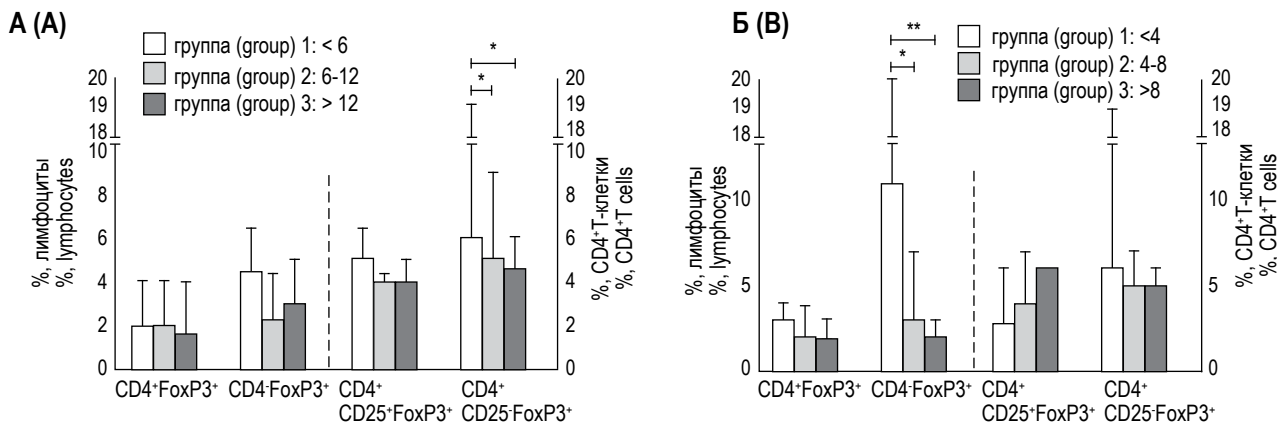


Рисунок 2. Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в группах с различным количеством фолликулов и ооцитов

Примечание. Дана характеристика относительного содержания субпопуляций Treg в фолликулярной жидкости в зависимости от количества созревших фолликулов при стимуляции суперовуляции (А): группа 1 – менее 6; группа 2 – от 6 до 12; группа 3 – более 12, и от количества ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников (Б): группа 1 – менее 4; группа 2 – от 4 до 8; группа 3 – более 8 ооцитов.

Данные представлены в виде медиан и интерквартильного диапазона. Статистическая значимость различий: * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,01$ по U-критерию Манна–Уитни.

Figure 2. Regulatory T cells in the follicular fluid of women who underwent IVF treatment in groups with various amounts of follicles and oocytes

Note. (A) The relative counts of Treg subsets in the follicular fluid are presented depending on the number of mature follicles during stimulation of superovulation: Group 1, less than 6; Group 2, from 6 to 12; Group 3, > 12. (B) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are presented in dependence on the number of oocytes obtained by transvaginal ovarian puncture: Group 1, less than 4; Group 2, 4 to 8; Group 3, > 8 oocytes.

The data are presented as a median and interquartile range. Statistical significance of the differences: *, $p_u < 0.05$; **, $p_u < 0.01$, according to Mann–Whitney U-test.

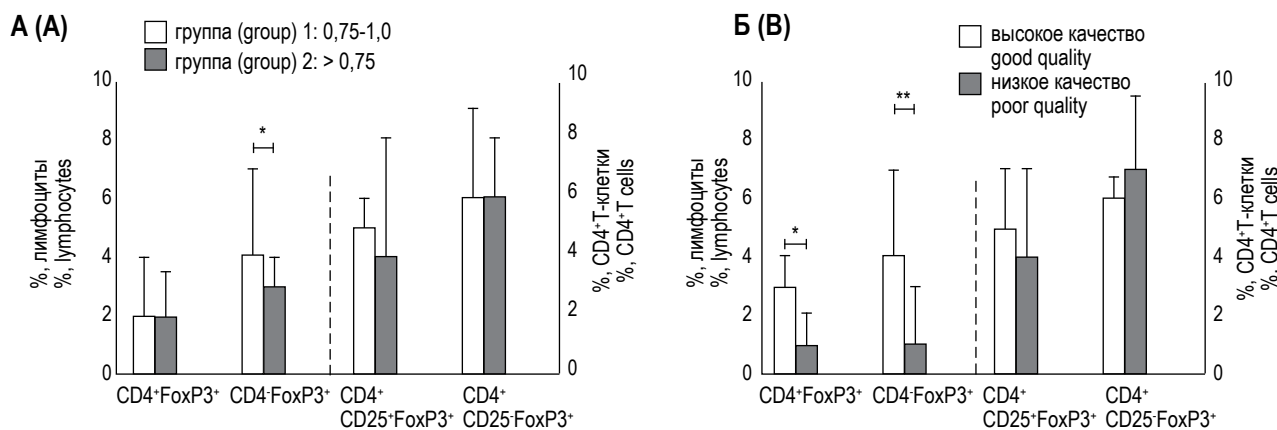


Рисунок 3. Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в зависимости от индекса оплодотворения и качества бластоцист

Примечание. Дана характеристика относительного содержания субпопуляций Treg в фолликулярной жидкости в зависимости от значения индекса оплодотворения (А): группа 1 – от 1,0 до 0,75; 2 – менее 0,75, и от качества бластоцист (Б): группа 1 – с высоким качеством; группа 2 – с низким качеством. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Статистическая значимость различий: * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,01$ по U-критерию Манна–Уитни.

Figure 3. Regulatory T cells in follicular fluid of the women subjected to IVF treatment, depending on fertilization index and blastocyst quality

Note. (A) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are compared against the values of fertilization index: Group 1, from 1.0 to 0.75; Group 2, < 0.75. (B) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are presented depending and on the blastocyst quality: Group 1, with high blastocyst quality; Group 2, with low quality.

The data are presented as a median and interquartile range. Statistical significance of the differences: *, $p_u < 0.05$; **, $p_u < 0.01$, according to Mann–Whitney U-test.

ТАБЛИЦА 3. РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЖЕНЩИН С РАЗНЫМИ ИСХОДАМИ ЦИКЛА ЭКО (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. REGULATORY T CELLS IN FOLLICULAR FLUID OF THE WOMEN WITH VARIOUS OUTCOMES OF IVF PROCEDURE (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Клиническая беременность Clinical pregnancy (n = 15)	Биохимическая беременность + эктопическая Biochemical pregnancy + ectopic (n = 18)	Отрицательный исход Negative outcome (n = 16)	Значимость (p _u) Statistical significance
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	2,0 (1,0-3,7)	3,0 (1,0-4,0)	1,6 (1,0-3,0)	p ₁₋₂ = 0,46 p ₁₋₃ = 0,98 p ₂₋₃ = 0,52
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,2 (1,6-7,0)	3,0 (2,0-4,0)	1,0 (1,0-3,0)	p ₁₋₂ = 0,83 p ₁₋₃ = 0,04 p ₂₋₃ = 0,92
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,0 (2,0-6,0)	4,5 (2,0-7,0)	4,5 (2,5-6,0)	p ₁₋₂ = 0,66 p ₁₋₃ = 0,74 p ₂₋₃ = 0,23
CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺ , %	3,2 (2,4-4,0)	6,5 (4,0-9,0)	6,0 (4,5-9,5)	p ₁₋₂ = 0,09 p ₁₋₃ = 0,10 p ₂₋₃ = 0,72

пы 1 и 2 содержали значимо большее количество CD4⁺FoxP3⁺ клеток по сравнению с группой 3, что составило: 11,0% (2,0-20,0) vs 2,0% (1,0-3,0), p_u = 0,006 и 3,0% (1,0-7,0) vs 2,0% (1,0-3,0), p_u = 0,03 соответственно (рис. 2Б).

Поскольку полученные при пункции ооциты различались по степени зрелости и способности к оплодотворению, мы также сравнили содержание Treg в группах женщин с высоким и средним индексом оплодотворения (ИО): 0,75-1,0 и < 0,75 соответственно. Как следует из рисунка 3А, у женщин с высоким ИО по сравнению с оппозитной группой регистрировали значимо большее число CD4⁺FoxP3⁺ клеток, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 3,0% (1,0-4,0), p_u = 0,04. Количество клеток в других исследуемых субпопуляциях было сопоставимо.

На следующем этапе был проведен ретроспективный анализ содержания Treg в ФЖ в зависимости от эмбриологических показателей, то есть от качества 3-суточного и 5-суточного эмбриона. Значимых различий в содержании Treg при разном качестве эмбрионов на 3 сутки обнаружено не было. Известно, что до стадии морулы эмбрионы развиваются за счет функционирования органелл яйцеклетки, затем на 3-4 сутки происходит активация собственного генома эмбриона [17]. Данный процесс является критической точкой, так как на этой стадии от 10 до 50% эмбрионов останавливаются в дроблении. Поэтому

получение бластоцисты на пятые сутки развития дает право говорить об успешном запуске генома эмбриона. На основании показателей качества бластоцист женщины были разделены на 2 группы – с высоким качеством (классы А и В) и низким (класс С). Женщины с высоким качеством бластоцист характеризовались более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺FoxP3⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ клеток по сравнению с оппозитной группой, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 1,0% (1,0-3,0), p_u = 0,04 и 3,0% (1,0-4,1) vs 1,0% (1,0-2,0), p_u = 0,04 соответственно (рис. 3Б).

Качество бластоцисты является одним из основных факторов, влияющих на имплантацию эмбриона и наступление беременности. На заключительном этапе мы провели ретроспективный анализ взаимосвязи между содержанием Treg в ФЖ и исходами ЭКО в группах женщин с клинической беременностью, биохимической беременностью и отрицательными исходами (табл. 3). Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺ клеток в ФЖ женщин с наступившей и прогрессирующей беременностью было значимо выше, чем в ФЖ женщин с отрицательными исходами ЭКО. В то же время отсутствие биохимической и клинической беременности было ассоциировано с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺-клеток, хотя различия в содержании этих клеток в ФЖ женщин с клинической беременностью проявлялись в виде тренда.

Обсуждение

Известно, что регуляторные Т-клетки присутствуют во всех органах репродуктивной системы, включая яичники и эндометриальную ткань, и их количество в циркуляции меняется в динамике менструального цикла [1], свидетельствуя о возможной вовлеченности Treg в регуляцию функций яичников. Одним из доступных для исследований источников иммунных клеток в яичниках является ФЖ, содержащая различные субпопуляции лимфоцитов и моноцитов [7]. Вместе с тем данные о содержании Treg в ФЖ практически отсутствуют. В настоящей работе мы исследовали различные фенотипы FoxP3-позитивных Т-клеток и продемонстрировали присутствие в ФЖ не только CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, но и CD4⁺FoxP3⁺Treg, не экспрессирующих молекулу CD25, а также CD4-FoxP3⁺ клеток.

Поскольку в исследование были включены женщины со стимулированной овуляцией, которые существенно различались по количеству фолликулов и ооцитов, у нас была возможность проанализировать взаимосвязь между содержанием в ФЖ различных субпопуляций Treg и фолликуло-/оогенезом. Наибольшие различия были выявлены в отношении CD4-FoxP3⁺T-клеток, максимальное число которых, наряду с CD4⁺CD25-FoxP3⁺T-клетками, регистрировалось в группе женщин с наименьшим числом фолликулов и ооцитов, что, возможно, связано с участием данных субпопуляций Treg в контроле над созреванием ооцитов и выбраковкой незрелых клеток. Это предположение нашло подтверждение при анализе взаимосвязи между содержанием Treg и индексом оплодотворения ооцитов, отражающим зрелость ооцита и способность к оплодотворению. Так, наибольшее число CD4-FoxP3⁺Treg регистрировалось у женщин, ооциты которых имели высокий индекс оплодотворения. Более того, ретроспективный анализ выявил взаимосвязь между качеством 5-суточных бластоцист и содержанием в ФЖ Treg. Высокое качество бластоцист было ассоциировано с более высоким содержанием в ФЖ субпопуляций CD4⁺FoxP3⁺ и CD4-FoxP3-клеток.

Имплантация эмбриона является одним из наиболее уязвимых моментов при проведении ЭКО. Данный процесс во многом зависит от качества бластоцист и индукции толерантности к аллоантигенам плода, в формировании которой непосредственное участие принимают Treg. Учитывая при этом выявленную нами связь между качеством бластоцист и численностью Treg, мы предположили, что содержание Treg в ФЖ может в определенной степени отражать и эффективность ЭКО. Действительно, анализ между содержанием Treg в ФЖ и исходами ЭКО выявил

взаимосвязь клинической беременности с более высоким содержанием в ФЖ CD4-FoxP3⁺ клеток. В свою очередь, отсутствие беременности было сопряжено с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺CD25-FoxP3⁺T-клеток.

CD4-FoxP3⁺T-клетки, представляющие, по всей видимости, субпопуляцию CD8⁺T-клеток с супрессорной активностью, так же как и CD4⁺FoxP3⁺Treg, экспрессируют CTLA-4, ICOS, CD25 и способны супрессировать эффекторные Т-клетки [13]. Процесс овуляции рассматривается как воспалительная реакция, при которой возрастает продукция провоспалительных цитокинов, в том числе IL-2 [20]. Поскольку CD8⁺FoxP3⁺T-клетки, в отличие от CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, способны отвечать на низкие дозы IL-2 [6], они могут иметь пролиферативное преимущество и первыми накапливаться в ФЖ к моменту овуляции. Что же касается CD4⁺CD25-FoxP3⁺T-клеток, возрастание данной субпопуляции у человека выявлено при некоторых аутоиммунных заболеваниях, и мнения исследователей в отношении природы этих клеток расходятся [14, 29]. Yang и соавт. полагают, что CD4⁺CD25-FoxP3⁺ не являются Treg и представляют недавно активированные Т-лимфоциты, транзиторно экспрессирующие FoxP3 [26]. Bonelli и соавт., напротив, полагают, что CD4⁺CD25-FoxP3⁺ клетки представляют Treg с нарушенной супрессорной активностью, так как способны ингибировать только пролиферацию Т-клеток, но не продукцию IFN γ [5]. Однако, учитывая, что активированные Т-клетки и Treg обычно экспрессируют CD25, остается неясным, чем объясняется отсутствие данной молекулы. Miura и соавт. при анализе коэкспрессии CD45RA предположили, что CD4⁺FoxP3⁺T-клетки включают две субпопуляции Treg, одни из которых (CD25-негативные) являются наивными клетками, а другие (CD25-позитивные) относятся к Т-клеткам памяти [19]. Возможно, что присутствующие в ФЖ CD4⁺CD25-FoxP3⁺T-клетки представлены наивными Treg, обладающими меньшей супрессорной активностью [4, 10]. При таком рассмотрении можно полагать, что возрастание их численности в ФЖ компенсирует недостаточность супрессорной активности на этапе фолликулогенеза и оогенеза, однако является недостаточной для обеспечения полноценной толерантности при прогрессировании беременности.

Полученные в целом данные свидетельствуют о наличии различных субпопуляций FoxP3⁺T-клеток в ФЖ и их взаимосвязи с ранними этапами репродуктивного процесса. Различные субпопуляции Treg могут вовлекаться в регуляцию различных процессов. При этом важную роль в контроле ранних этапов репродук-

ции играют Treg, сосредоточенные в популяции CD4⁺T-клеток, которые, по-видимому, регулируют созревание ооцитов, наряду с CD4⁺FoxP3⁺T-клетками детерминируют эффективную бластуляцию и участвуют в поддержании беременности.

В свою очередь, возрастание в ФЖ CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺T-клеток, возможно, связанное с блоком их дифференцировки в Treg с высокой супрессорной активностью, ассоциировано с отрицательными исходами ЭКО.

Список литературы / References

1. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 4, pp. 2572-2578.
2. Bao S.H., Wang X.P., De Lin Q., Wang W.J., Yin G.J., Qiu L.H. Decidual CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2011, Vol. 55, pp. 94-98.
3. Basuino L., Silveira C.F. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist. Reprod.*, 2016, Vol. 20, no. 1, pp. 38-40.
4. Bedke T., Pretsche L., Karakhanova S., Enk A.H., Mahnke K. Endothelial cells augment the suppressive function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T cells: Involvement of programmed death-1 and IL-10. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 5562-5570.
5. Bonelli M., Savitskaya A., Steiner C.W., Rath E., Smolen J.S., Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 3, pp. 1689-1695.
6. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, pp. 180-190.
7. Bukulmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum. Reprod. Update*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 1-15.
8. Chakraborty S., Panda A.K., Bose S., Roy D., Kajal K., Guha D., Sa G. Transcriptional regulation of FOXP3 requires integrated activation of both promoter and CNS regions in tumor-induced CD8⁺ Treg cells. *Sci Rep.*, 2017, no. 7, Article number 1628. doi:10.1038/s41598-017-01788-z.
9. Chaput N., Darrasse-Jèze G., Bergot A.S., Cordier C., Ngo-Abdalla S., Klattmann D., Azogui O. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 8, pp. 4969-4978.
10. Chen W.J., Hu X.F., Yan M. Human umbilical vein endothelial cells promote the inhibitory activation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells via PD-L1. *Atherosclerosis*, 2016, Vol. 244, pp. 108-112.
11. Du M.R., Guo P.F., Piao H.L., Wang S.C., Sun C., Jin L.P., Tao Y., Li Y.H., Zhang D., Zhu R., Fu Q. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 192 (4), pp. 1502-1511.
12. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 1999, Vol. 11, no. 3, pp. 307-311.
13. Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F., Lorenzon R., Bellier B., Rosenzweig M., Klattmann D. Human and mouse CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 171.
14. Horwitz D.A. Identity of mysterious CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ cells in SLE. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, no. 1, p. 101.
15. Kuniwa Y., Miyahara Y., Wang H.Y., Peng W., Peng G., Wheeler T.M., Thompson T.C., Old L.J., Wang R.F. CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 23, pp. 6947-6958.
16. Kollmann Z., Schneider S., Fux M., Bersinger N.A., Wolff M. Gonadotrophin stimulation in IVF alters the immune cell profile in follicular fluid and the cytokine concentrations in follicular fluid and serum. *Hum. Reprod.*, 2017, Vol. 32, no. 4, pp. 820-831.
17. Martins W.P., Natri C.O., Rienzi L., Poel S.Z., Gracia C., Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 2017, Vol. 49, no. 5, pp. 583-591.
18. Mei S., Tan J., Chen H., Chen Y., Zhang J. Changes of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil. Steril.*, 2010, Vol. 94, no. 6, pp. 2244-2247.
19. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoy G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 6, pp. 899-911.
20. Oakley O.R., Kim H.Y., El-Amouri I., Lin P.P., Cho J., Bani-Ahmad M., Ko C. Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*, 2010, Vol. 151, no. 9, pp. 4551-4559.
21. Ohkura N., Kitagawa Y., Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 3, pp. 414-423.
22. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 241, no. 1, pp. 260-268.

23. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 531-562.
24. Woidacki K., Meyer N., Schumacher A., Goldschmidt A., Maurer M., Zenclussen A.C. Transfer of regulatory T cells into abortion-prone mice promotes the expansion of uterine mast cells and normalizes early pregnancy angiogenesis. *Sci Rep.*, 2015, Report 5, 13938. doi:10.1038/srep13938.
25. Yagi H., Nomura T., Nakamura K. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 11, pp. 1643-1656.
26. Yang H.X., Zhang W., Zhao L.D., Li Y., Zhang F.C., Tang F.L., He W., Zhang X.: Are CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells? *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 5, p. R153.
27. Yu J., Qian L., Wu F., Li M., Chen W., Wang H. Decreased frequency of peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells correlates with IL-33 levels in pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2017, Vol. 36, no. 2, pp. 217-225.
28. Zamah A.M., Hassis M.E., Albertolle M.E., Williams K.E. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin. Proteomics*, 2015, Vol. 12, no. 1, p. 5.
29. Zóka A., Barna G., Somogyi A., Múzes G., Oláh Á., Al-Aissa Z., Hadarits O., Kiss K., Firneisz G. Extension of the CD4⁺Foxp3⁺CD25(-/low) regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 2015, Vol. 48, no. 5, pp. 289-297.

Авторы:

Андреева Е.А. — эмбриолог, аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Хонина Н.А. — д.м.н., врач клинический иммунолог, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Баторов Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пасман Н.М. — д.м.н., профессор, врач акушер-гинеколог, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Поступила 04.10.2017
Отправлена на доработку 10.10.2017
Принята к печати 12.10.2017

Authors:

Andreeva E.A., Embryologist, Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Khonina N.A., PhD, MD (Medicine), Immunologist, Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Clinical Obstetrician/Gynecologist, Head, Obstetrics and Gynecology Department, Faculty of Medicine, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Received 04.10.2017
Revision received 10.10.2017
Accepted 12.10.2017