

ИММУННЫЕ ДИСФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА

Хонина Н.А.¹, Тихонова М.А.¹, Дзущева И.Б.²,
Пасман Н.М.³, Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

² МЦ планирования семьи и репродукции, г. Новосибирск

³ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Резюме. В работе исследованы параметры иммунитета здоровых фертильных женщин ($n = 48$) и женщин с бесплодием неясного генеза ($n = 386$). Сравнительный анализ женщин с первичным ($n = 179$) и вторичным ($n = 207$) бесплодием показал, что в обеих группах регистрируются сходные иммунные нарушения. Наиболее часто (в 86,5% случаев) выявляется дефицит продукции блокирующих факторов, снижение пролиферативного ответа клеток женщины на аллоантигены партнера в СКЛ регистрируется в 51,5% случаев, у 42% женщин выявляется повышенное количество активированных $CD56^+CD16^+NK$ -клеток. Снижение продукции блокирующих факторов может быть следствием низкого ответа лимфоцитов на аллоантигены партнера из-за сходства по HLA локусам, либо смещения цитокинового баланса в сторону доминирования Th1/провоспалительных факторов и дефицита циркулирующих $CD4^+CD25^+T$ -клеток. Результаты исследования свидетельствуют, что развитие первичного и вторичного бесплодия ассоциировано с однотипными иммунными дисфункциями, которые свидетельствуют о нарушении супрессорной реаранжировки иммунной системы в перiovуляторный период менструального цикла.

Ключевые слова: бесплодие, блокирующие факторы, цитокины, NK-клетки, T-клетки регуляторные.

Khonina N.A., Tikhonova M.A., Dzutzeva I.B., Pasman N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

IMMUNE DYSFUNCTIONS IN WOMEN WITH INFERTILITY OF UNKNOWN ORIGIN

Abstract. The study deals with evaluation of immune parameters in healthy fertile women ($n = 48$) versus female patients with infertility of unknown origin ($n = 386$). A comparative analysis has shown similar patterns of immune dysfunction in women with primary infertility ($n = 179$) and recurrent spontaneous abortion ($n = 207$). The most common markers of immune dysfunction include decreased production of blocking antibodies (86.5% of cases), low proliferative response to paternal alloantigens in mixed leukocyte reaction (MLR) shown in 51.5% of cases, and increased number of activated $CD56^+CD16^+NK$ -cells (42.0%). Decreased production of MLR-blocking antibodies may be caused by low lymphocyte response, due to the partner's HLA-similarity, or by predominance of Th1/proinflammatory cytokines and low contents of circulating regulatory $CD4^+CD25^+T$ -cells. The study results demonstrate that development of primary infertility and recurrent spontaneous abortions is associated with a uniform set of immune disorders, thus probably reflecting a failure of suppressor rearrangement within immune system during periovulatory period of menstrual cycle. (*Med. Immunol.*, Vol. 12, N 6, pp 511-520)

Keywords: infertility, blocking antibodies, cytokines, NK-cells, T-cells regulatory.

Адрес для переписки:

Хонина Наталья Алексеевна,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 228-21-01.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Введение

Как известно, ведущими причинами бесплодия у женщин считаются трубно-перитонеальный фактор, эндокринные расстройства и анатомические дефекты репродуктивных органов. Активно обсуждается также роль «иммунного» фактора,

связанного с развитием у женщины иммунных реакций, направленных против сперматозоидов и развивающегося плода. Тем не менее у 10–15% бесплодных пар выявить объективные причины нарушений репродуктивной функции не удается, и в таких случаях выставляется диагноз бесплодия «неясного генеза» [25]. Поскольку диагностика иммунных дисфункций до сих пор не вошла в широкую клиническую практику, многие специалисты предполагают, что нераспознанные иммунные нарушения зачастую и являются причиной идиопатического бесплодия. Кроме того, учитывая современные данные о том, что бесплодие возникает под влиянием нескольких причин, иммунный фактор, на наш взгляд, может быть причастным к патогенезу и других форм бесплодия, например, связанных с воспалительными процессами и эндокринной патологией.

Иммунная система играет исключительно важную роль в репродуктивных процессах. Поскольку клетки плода экспрессируют отцовские антигены, непременным условием его сохранения во время беременности является индукция толерантности к аллоантигенам плода, которая обеспечивается за счет нескольких механизмов, включая смещение баланса в сторону доминирования Th2/Th3 цитокинов, а также генерации регуляторных Т-клеток (Treg), в том числе с фенотипом CD4⁺CD25^{+/high} Treg [3, 10, 14]. Возрастание уровня иммуносупрессорных цитокинов и Treg сопровождается рядом характерных изменений, которые связывают с проявлением «гестационной» иммуносупрессии. К таковым относят снижение митогенной реактивности Т-лимфоцитов, появление в сыворотке крови супрессорной активности и ограничение численности активированных CD56⁺CD16⁺NK-клеток [1, 4, 5, 7, 20]. Еще одним маркером иммуносупрессорной перестройки является появление в сыворотке крови блокирующих факторов (БФ), способных подавлять пролиферативную активность лимфоцитов матери при стимуляции лимфоцитами партнера в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) [15, 17]. БФ представляют собой распознающие аллоантигены IgG антитела, которые генерируются под действием Th2 цитокинов и защищают плод от повреждающего действия иммунной системы матери [16]. Нарушение супрессорной реаранжировки рассматривается в качестве одной из ведущих причин невынашивания беременности. Так, у пациенток с угрозой прерывания беременности отмечается увеличение уровня Th1-цитокинов, уменьшение относительного содержания Treg, дефицит блокирующих факторов, повышенная митогенная реактивность Т-лимфоцитов и уве-

личение количества активированных NK-клеток [9, 18, 23, 24].

Важно отметить, что иммуносупрессорная реаранжировка необходима не только для вынашивания, но и имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Так, согласно полученным нами ранее данным, в овуляторный период физиологического менструального цикла и особенно на пике стимулированной овуляции по программе ЭКО в сыворотке крови женщин происходит сдвиг баланса в сторону доминирования медиаторов с супрессорной, противовоспалительной и проапоптогенной активностью, что в сочетании с увеличением количества CD4⁺CD25⁺T-клеток свидетельствует о иммуносупрессорной перестройке к моменту овуляции [2, 13]. Однако данные, характеризующие параметры иммунитета у женщин с бесплодием неясного генеза в менструальном цикле (небеременные женщины), практически отсутствуют. Аналогичным образом, много неясностей остается в отношении механизмов, лежащих в основе нарушений супрессорной реорганизации иммунной системы.

Нарушение иммуносупрессорной перестройки связывают в первую очередь с наличием у супругов сходных аллелей антигенов II класса гистосовместимости (HLA-DRB1, DQA1, DQB1). В такой ситуации отсутствуют необходимые условия для индукции толерантности к чужеродным аллоантигенам и, как следствие, иммунная система матери подавляет имплантацию и развитие эмбриона [12]. Лабораторным подтверждением дефекта распознавания аллоантигенов в этом случае является низкий пролиферативный ответ мононуклеарных клеток матери при стимуляции лимфоцитами партнера и дефицит сывороточных блокирующих факторов, ингибирующих ответ в СКЛ [15, 16]. Однако вопрос о том, всегда ли дефицит блокирующих факторов связан с недостаточной активацией аллореактивных лимфоцитов, остается открытым. Кроме того, не ясно, имеются ли какие-либо различия в иммунных нарушениях при первичном и вторичном бесплодии. Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования явилось исследование параметров иммунитета у небеременных женщин с бесплодием неясного генеза, в том числе в группах с первичным и вторичным бесплодием.

Материалы и методы

В исследование были включены 386 женщин в возрасте от 19 до 42 лет (в среднем 33,5±2,5 года), у которых на момент иммунологического обследования не была выявлена причина infertility (регулярный овуляторный менструальный

цикл, проходимость маточных труб, фертильная сперма партнера, отсутствие анатомических дефектов репродуктивных органов). Женщины с аутоиммунной патологией и антифосфолипидным синдромом в исследование не включались. Длительность бесплодия варьировала от 2 до 16 лет и в среднем составила $5,6 \pm 2,6$ лет. У 179 женщин (46,4%) было диагностировано первичное и у 207 женщин (53,6%) вторичное бесплодие. У женщин со вторичным бесплодием в анамнезе было не менее 2 спонтанных выкидышей или замерших беременностей, не связанных с хромосомной аномалией плода. Контрольную группу составили 48 женщин (средний возраст $31,4 \pm 2,5$ лет) с сохраненной репродуктивной функцией, у которых в анамнезе беременность завершилась рождением здорового ребенка.

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Содержание естественных киллерных клеток и регуляторных Т-клеток проводили методами одно- и двухцветной проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson), используя соответствующие анти-CD3⁺, -CD4⁺, -CD25⁺, -CD16⁺, -CD56⁺ моноклональные антитела («Сорбент», Москва; BD PharMingen, США).

Пролиферативный ответ МНК женщин оценивали в одонаправленной смешанной культуре лимфоцитов. Для этого МНК женщины ($0,1 \times 10^6$ /лунку) культивировали с МНК партнера ($0,1 \times 10^6$ /лунку), предварительно обработанных в течение 1 ч митомицином С (40 мкг/мл). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров IY (AB) группы крови либо 10% аутологичной сыворотки женщины при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Пролиферативный ответ в СКЛ исследовали на 5 сутки, пролиферацию МНК в ответ на стимуляцию митогином — конканавалином А (КонаА, Sigma-Aldrich, 15 мкг/мл), используемым в качестве позитивного контроля — на 3 сутки. Интенсивность пролиферации оценивали по включению ³H-тимидина (1 мКи/лунку), вводимого за 18 ч до окончания культивирования. О наличии в сыворотке крови женщин блокирующих факторов (БФ) судили по индексу влияния ИВ_{БФ}, рассчитанному по формуле $ИВ_{БФ} = O/K$, где O — интенсивность пролиферации МНК, культивируемых в присутствии 10% аутологичной сыворотки (опыт); K — интенсивность пролиферации МНК, культивируемых в присутствии 10% сыворотки АВ(IY) группы (контроль).

Спонтанную или стимулированную липополисахаридом (ЛПС, *E. coli* 0111:B4, Sigma) продукцию цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17) определяли в культурах клеток цельной крови. Для этого гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в круглодонных, стерильных пробирках при 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -20 °C до тестирования. Концентрацию цитокинов оценивали методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Достоверность различия частоты встречаемости признака определяли, используя метод хи-квадрата (χ^2). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Данные приведены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (S.E.), а также в виде медианных значений (Median) и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). Для оценки прогностической значимости параметров вычисляли информативность каждого признака по соотношению двух вероятностей $P(X_i/A_1)$ и $P(X_i/A_2)$, где A_1 и A_2 — классы прогноза, где A_1 составили фертильные женщины ($n = 48$) и A_2 — женщины с бесплодием ($n = 386$); X_i — номер признака, а $P(X_i/A_k)$ — вероятность (частота) события. Диагностический коэффициент (ДК) вычисляли по формуле: $ДК = 10 \lg \times P(X_i/A_1)/P(X_i/A_2)$.

Информативность по К. Шеннону J(Sh) рассчитывали по формуле:

$$J_{xi} = P(X_i/A_1)/10 \lg P(X_i/A_2) [P(X_i/A_1) - P(X_i/A_2)]$$

Результаты

Оценка иммунологических параметров у женщин с бесплодием неясного генеза включала исследование пролиферативной активности МНК женщины при стимуляции лимфоцитами партнера и митогином КонаА; определение активности в сыворотке факторов, блокирующих СКЛ, и оценку относительного содержания активированных CD56⁺CD16⁺NK-клеток. Контролем

служили фертильные женщины. Значения показателей женщин с бесплодием, выходящие за нижнюю или верхнюю границы квартильного диапазона контрольной группы, расценивали как значимое изменение соответствующих иммунологических параметров.

Анализ пролиферативной активности лимфоцитов в СКЛ показал, что в целом по группе женщины с бесплодием неясного генеза статистически достоверно отличались более низким уровнем ответа по сравнению с контрольной группой. Сниженный пролиферативный ответ на аллоантигены партнера отмечался в 51,5% случаев и регистрировался примерно с равной частотой у женщин с первичным и вторичным бесплодием (соответственно в 54,2 и 49,3% случаев). При этом следует отметить, что пролиферативная активность МНК женщин с бесплодием в КонА-стимулированных культурах в целом по группе была сопоставима с показателями фертильных женщин. Тем не менее анализ митогенной реактивности в подгруппах женщин с сохранным ($n = 187$) и сниженным ($n = 199$) ответом в СКЛ (медианные значения ответа в СКЛ составляли соответственно 13600 и 5090 имп/мин) показал, что уровень КонА-индуцированной пролиферации у женщин второй подгруппы был снижен и достоверно отличался от показателей женщин с сохранным ответом в СКЛ (24300 ± 950 vs 33360 ± 1250 имп/мин, $p_U < 0,01$), а также от нормативных значений фертильных женщин (30100 ± 1520 имп/мин, $p_U < 0,05$). Кроме того, проведенный корреляционный анализ показал наличие умеренной прямой взаимосвязи между уровнями КонА-стимулированной пролиферации и ответом в СКЛ в целом по группе обследованных женщин с бесплодием ($r_s = 0,34$; $p = 0,00001$). Таким образом, угнетение ответа лимфоцитов на аллоантигены по крайней мере отчасти могло быть обусловлено компонентом неспецифической иммуносупрессии.

Исследование активности БФ показало, что у фертильных женщин уровень пролиферативного ответа в СКЛ в присутствии аутологичной сыворотки крови был ниже (5900 ± 790 , медиана 3830 имп/мин), чем в присутствии сыворотки крови доноров IY (AB) группы (14100 ± 1000 , медиана 12900 имп/мин). Соответственно, значения ИВБФ были существенно ниже 1,0 (медиана 0,36 расч. ед.). Это означало, что в сыворотке крови фертильных женщин содержались растворимые факторы, способные блокировать ответ на аллоантигены партнера в среднем на 64%.

В отличие от фертильных женщин, значения ИВБФ у женщин с бесплодием были достоверно выше и составляли в среднем 1,0, свидетельствуя

об отсутствии у них блокирующих факторов в сыворотке крови. Дефицит БФ, диагностируемый при значениях ИВБФ, выходящих за верхнюю границу квартильного диапазона контрольных значений ($> 0,60$ расч. ед.), регистрировался у 86,5% женщин исследуемой группы и выявлялся примерно с одинаковой частотой у женщин с первичным и вторичным бесплодием (в 89,9 и 83,6% случаев соответственно). Более того, практически у каждой второй женщины (в 45,8% случаев), у которой ИВБФ выходил за установленную границу нормы, пролиферативный ответ в СКЛ в присутствии аутологичной сыворотки был выше, чем в присутствии сыворотки доноров (ИВБФ $> 1,0$, медиана 1,2 расч. ед.). Эти данные свидетельствуют о наличии в сыворотке крови инфертильных женщин факторов, которые не блокируют, а наоборот усиливают ответ на аллоантигены партнера в среднем на 20%.

Сравнительная оценка относительного содержания активированных НК-клеток в периферической крови женщин исследуемой и контрольной групп не выявила статистически значимых различий. Тем не менее при индивидуальном анализе у 42% женщин с бесплодием относительное количество $CD16^+CD56^+$ НК-клеток превышало верхнюю границу квартильного диапазона нормативных значений ($> 7,0\%$), составляя в среднем 9,0% (vs 6,0% у фертильных женщин). Частота встречаемости женщин с повышенным содержанием $CD16^+CD56^+$ клеток в подгруппе с вторичным бесплодием была выше, чем у женщин с первичным бесплодием (44,4 и 39,6% соответственно), однако эти различия не были статистически достоверны.

Исходя из полученных данных, у женщин с бесплодием неясного генеза наиболее часто (в 86,5% случаев) встречается низкая (вплоть до полного отсутствия) активность блокирующих факторов в сыворотке крови. Снижение пролиферативного ответа в СКЛ и увеличение относительного количества циркулирующих активированных НК-клеток регистрируется реже, но тем не менее отмечается в 51,5 и 42% случаев соответственно. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют также, что дефицит БФ у женщин с бесплодием неясного генеза может наблюдаться как на фоне сниженного, так и сохранного ответа в СКЛ, и, следовательно, эти два параметра могут быть не связаны между собой. Действительно, корреляционный анализ не выявил какой-либо значимой взаимосвязи между уровнем пролиферации в СКЛ и ИВБФ ($r_s = -0,06$; $p = 0,25$; $n = 386$). Не было выявлено также корреляционной взаимосвязи между количеством активированных НК клеток и уровнем

пролиферации в СКЛ ($r_s = 0,07$; $p = 0,18$; $n = 386$) или ИВ_{БФ} ($r_s = -0,08$; $p = 0,10$; $n = 386$).

Анализ частоты встречаемости различных вариантов комбинированных изменений параметров иммунитета показал, что данные иммунологические тесты обладают высокой диагностической значимостью. Из данных таблицы 2 видно, что различные комбинации иммунных нарушений обладают высокой специфичностью (SP варьирует от 89,6 до 97,9%) в сочетании с относительно низкой чувствительностью (SN варьирует от 17,3 до 43%). Снижение активности блокирующих факторов в сочетании с низким ответом в СКЛ или с увеличением количества активированных NK-клеток характеризовалось высокими значениями диагностических коэффициентов (ДК = 8,4 и 6,4), информативность которых составляла 2,78 и 2,11. Обнаружение у женщин репродуктивного возраста таких иммунных нарушений ассоциируется с 11- и 6-кратным увеличением относительно риска бесплодия

неясного генеза (RR 11,3 и 6,2). Следует отметить тем не менее, что чувствительность выделенных признаков составляет всего 36–43%, т.е. такие комбинации иммунных нарушений обнаруживаются только примерно у трети женщин с бесплодием, правда, в этом случае позволяют проводить диагностику с очень высокой точностью (SP на уровне 91,7 – 93,8%).

Вариант сниженного ответа в СКЛ в сочетании с увеличением количества активированных NK-клеток имел наименьший диагностический коэффициент (ДК = 3,1), информативность которого составляла 1,03. Использование комбинации, включающей все три исследуемых параметра (ИВ_{БФ} + СКЛ + NK-клетки), повышало точность диагностической процедуры практически до 100% (SP 97,9%), но одновременно сопровождалось существенным снижением чувствительности до 17,3%.

Тем не менее полученные нами результаты четко показывают, что анализируемые иммуно-

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА У ФЕРТИЛЬНЫХ ЖЕНЩИН И У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ

Параметры		Фертильные женщины (n = 48)	Женщины с бесплодием (n = 386)	Первичное бесплодие (n = 179)	Вторичное бесплодие (n = 207)
Ответ в СКЛ, имп/мин	M±S.E.	14100±1000	9900±320 **	9940±480 **	9860±430 **
	Median	12900	8700	8350	9200
	LQ-UQ	8900-17900	Частота встречаемости значений < LQ (< 8900 имп/мин)		
			51,5% (199/386) $\chi^2 = 0,0005$	54,2% (97/179) $\chi^2 = 0,0003$	49,3% (102/207) $\chi^2 = 0,002$
Индекс влияния БФ, расч.ед.	M±S.E.	0,40±0,04	1,0±0,03 **	0,98±0,02 **	1,02±0,05 **
	Median	0,36	1,0	0,99	1,0
	LQ-UQ	0,12-0,60	Частота встречаемости значений > UQ (> 0,60 расч. ед.)		
			86,5% (334/386) $\chi^2 = 0,000001$	89,9% (161/179) $\chi^2 = 0,000001$	83,6% (173/207) $\chi^2 = 0,000001$
Содержание CD56 ⁺ CD16 ⁺ NK-клеток, %	M±S.E.	5,9±0,5	6,25±0,2	6,1±0,3	6,4±0,2
	Median	6,0	6,0	6,0	6,0
	LQ-UQ	3,0-7,0	Частота встречаемости значений > UQ (> 7,0 %)		
			42% (163/386) $\chi^2 = 0,021$	39,6% (71/179) $\chi^2 = 0,061$	44,4% (92/207) $\chi^2 = 0,013$
Ответ на КонА, имп/мин	M±S.E.	30100±1520	28700±810	29300±1360	28200±960
	Median	29800	24900	24000	25450

Примечание. ** – $p_0 < 0,001$ - достоверность различий средних значений по сравнению с фертильными женщинами. Достоверность различий частоты встречаемости индивидуальных значений, выходящих за границы нормативного квартильного диапазона, посчитана с помощью хи-квадрата (χ^2).

ТАБЛИЦА 2. ИНФОРМАТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КОМБИНИРОВАННЫХ ИММУННЫХ ДИСФУНКЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ БЕСПЛОДИЯ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА

Комбинация признаков	Частота, % P (Xi/Ak)		ДК	SN %	SP %	J(Sh)	RR
	A ₁	A ₂					
1. ИВ _{БФ} > 0,60 расч. ед. + СКЛ < 8900 имп/мин	6,2	43 **	8,4	43	93,8	2,78	11,3
2. ИВ _{БФ} > 0,60 расч.ед. + CD56 ⁺ CD16 ⁺ НК-клетки > 7%	8,3	36 **	6,4	36	91,7	2,11	6,2
3. СКЛ < 8900 имп/мин + CD56 ⁺ CD16 ⁺ НК-клетки > 7%	10,4	21,2 *	3,1	21,2	89,6	1,03	2,3
4. ИВ _{БФ} > 0,60 расч.ед. + СКЛ < 8900 имп/мин + CD56 ⁺ CD16 ⁺ НК-клетки > 7%	2,1	17,3 **	9,2	17,3	97,9	3,06	9,9

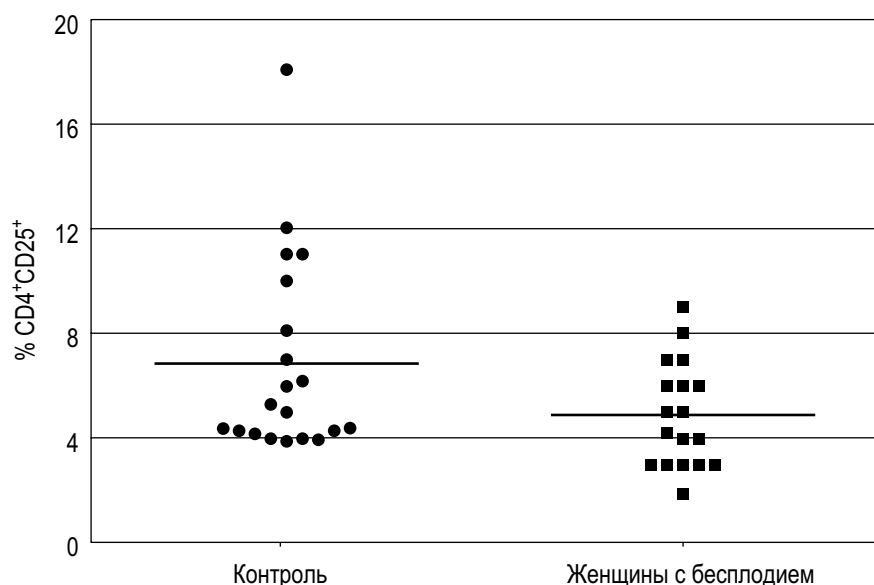
Примечание: А₁ и А₂ – классы прогноза, где А₁ составили фертильные женщины (n = 48) и А₂ – женщины с бесплодием (n = 386). ДК – диагностический коэффициент; SN – чувствительность и SP – специфичность признака; J(Sh) – информативность по К.Шеннону; RR – относительный риск. Достоверность различий частот рассчитана методом хи-квадрата (* и ** при уровне $\chi^2 < 0,05$ и $< 0,01$ соответственно).

логические параметры могут быть в дальнейшем использованы в качестве высоко информативных и специфичных диагностических признаков для диагностики и уточнения иммунных механизмов бесплодия.

Согласно современным представлениям появление БФ в сыворотке крови беременных рассматривается как одно из проявлений гестационной иммуносупрессии. Однако важно отметить, что признаки супрессорной реаранжировки иммунной системы наблюдаются не только при беременности, но и у фертильных небеременных

женщин в процессе менструального цикла. Учитывая эти факты, а также отсутствие взаимосвязи между дефицитом блокирующих факторов и уровнем ответа в СКЛ, можно полагать, что отсутствие БФ у женщин исследуемой группы может быть обусловлено не только и не столько сходством партнеров по аллоантигенам, сколько несостоятельностью супрессорной реаранжировки иммунной системы в процессе овуляторного цикла.

Чтобы проверить это предположение, в отдельной серии экспериментов было проведе-

Рисунок 1. Содержание CD4⁺CD25⁺Т-клеток в периферической крови фертильных женщин и женщин с бесплодием

Примечание. По оси ординат представлены индивидуальные (точками) и медианные (линией) значения процентного содержания CD4⁺CD25⁺Т-клеток в периферической крови фертильных женщин (контроль, n = 20) и женщин с бесплодием (n = 18).

но сравнительное исследование содержания $CD4^+CD25^+$ Т-клеток и продукции цитокинов в периферической крови женщин контрольной и исследуемой групп. Поскольку возрастание доли Treg и смещение баланса в сторону Th2 цитокинов у фертильных женщин регистрирует к моменту овуляции, женщины исследуемой и контрольной групп в данной серии экспериментов были обследованы на 12-18 день менструального цикла. Количество $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, в том числе с высокой экспрессией CD25 антигена, у женщин контрольной и исследуемой групп достоверно не различалось, хотя фертильные женщины характеризовались тенденцией к более высокому содержанию $CD4^+CD25^+$ клеток ($6,8 \pm 0,8\%$; $n = 20$ vs $5,1 \pm 0,6\%$; $n = 18$; $p_U = 0,08$). Вместе с тем анализ индивидуальных значений показал (рис. 1), что практически у каждой второй женщины с бесплодием (в 8 из 18 случаев) содержание $CD4^+CD25^+$ клеток было сниженным и выходило за нижнюю границу нормативного квартильного диапазона ($< 4,25\%$). Характерно, что у большинства женщин со сниженным количеством $CD4^+CD25^+$ Т-клеток (7 из 8 пациенток) дефицит БФ (ИББФ $0,92 \pm 0,03$ расч. ед) наблюдался на фоне сохранного ответа в СКЛ (10659 ± 1237 имп/мин), и только в 1 из 7 случаев был сопряжен со снижением ответа на аллоантигены.

Сравнительный анализ продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов в культурах клеток цельной крови женщин исследуемой и контрольной групп не выявил значимых различий в уровне их спонтанной секреции (табл. 3). Тем не менее у женщин с бесплодием отмечалась тенденция к усилению продукции провоспалительного цитокина IL-17

и снижению синтеза Th2 цитокина — IL-6. В то же время женщины с бесплодием отличались достоверным возрастанием ЛПС-стимулированной продукции IFN γ и IL-17 и снижением индуцированной секреции IL-6. Исследование сопряженности цитокинового дисбаланса с уровнем ответа в СКЛ показал, что изменения продукции цитокинов почти в 2 раза чаще регистрировалось у пациенток с сохранным уровнем ответа в СКЛ ($64,3\%$; 9/14), чем у женщин со сниженным пролиферативным ответом на аллоантигены ($35,7\%$; 5/14 случаев). Таким образом, бесплодие неясного генеза ассоциировалось со смещением баланса в сторону Th1/провоспалительных цитокинов, что проявлялось в виде тенденции в отношении спонтанной продукции цитокинов и достоверных различий в культурах ЛПС-стимулированных клеток крови и более часто регистрировалось у женщин с сохранным ответом в СКЛ.

Обсуждение

Согласно данным литературы, нарушение механизмов иммунологической толерантности рассматривается в качестве возможной причины самопроизвольного прерывания беременности, т.е. вторичного бесплодия [14, 19]. Однако вопрос о том, возникают ли указанные дисфункции во время беременности или формируются уже в процессе менструального цикла, остается открытым. Кроме того, до сих пор практически отсутствуют данные о состоянии иммунитета у женщин с первичным бесплодием. Поэтому настоящая работа была нацелена на исследование параметров иммунитета у женщин с первичным и вторичным бесплодием неясного генеза в естественном овуляторном цикле.

ТАБЛИЦА 3. СПОНТАННАЯ И ЛПС-СТИМУЛИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ

Цитокины, пкг/мл	Спонтанная продукция		Стимулированная продукция	
	Контроль n=6	Женщины с бесплодием, n = 22	Контроль, n = 6	Женщины с бесплодием, n = 22
IFN γ	12,1 \pm 4,6	12,7 \pm 2,2	233 \pm 61	973 \pm 205 *
TNF α	18,6 \pm 7,0	20,5 \pm 3,7	4022 \pm 694	6628 \pm 1059
IL-17	20,4 \pm 3,9	31,3 \pm 6,2	26,6 \pm 2,6	47,9 \pm 7,0 *
IL-6	61,5 \pm 49,0	39,0 \pm 14,3	5832 \pm 168	3172 \pm 236 *
IL-10	2,9 \pm 1,4	1,7 \pm 0,3	595 \pm 93	493 \pm 48,0

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий показателей стимулированной продукции цитокинов по сравнению с контрольной группой женщин. Содержание цитокинов определяли в супернатантах цельной крови после 24-часовой инкубации клеток без митогенов (спонтанная продукция) или при добавлении ЛПС (стимулированная продукция).

Полученные нами результаты показали, что изменения иммунных параметров регистрировались у подавляющего большинства женщин с бесплодием. Доминирующим нарушением, которое выявлялось в изолированном или комбинированном виде у 86,5% женщин, было снижение (вплоть до полного отсутствия) активности сывороточных блокирующих факторов. Основным компонентом БФ является молекула IgG, которая связывается с соответствующими рецепторами на NK-клетках и подавляет их активность, а также экранирует плод от действия аллореактивных цитотоксических Т-клеток. Недостаточная продукция БФ сопровождается нарушением процесса плацентации, что в свою очередь приводит к спонтанным выкидышам или замершей беременности. Поэтому снижение содержания БФ, выявленное многими авторами в сыворотке крови женщин с вторичным бесплодием [15, 16, 17] вполне объяснимо. Однако аналогичное снижение продукции БФ было выявлено нами и у 89,9% женщин с первичным бесплодием. Из этого следует, что дефицит БФ регистрируется уже в овуляторном цикле до наступления беременности и характерен не только для вторичного, но и первичного бесплодия.

Вторым важным моментом, на наш взгляд, явилось сходство иммунных нарушений, выявленных в подгруппах с первичным и вторичным бесплодием. И в том и другом случае у большей части женщин регистрировалось отсутствие блокирующих факторов, около 50% имели низкий ответ в СКЛ, и примерно у 40% женщин отмечалось повышенное количество активированных NK-клеток. Традиционно дефицит БФ связывают с дефектом запуска механизмов толерантности вследствие сходства партнеров по HLA-DR и HLA-DQ локусам, которые отвечают за уровень иммунного ответа на аллоантигены [12]. Соответственно, лимфоциты таких женщин характеризуются низким уровнем пролиферативного ответа в СКЛ при стимуляции клетками партнера. В наших исследованиях снижение ответа в СКЛ отмечалось только у каждой второй женщины с дефицитом БФ (в 49,7%, у 166 из 334 женщин), означая, что отсутствие БФ может иметь место и при сохранной реактивности лимфоцитов женщины на аллоантигены партнера, т.е. может быть обусловлено другими механизмами. Действительно, проведенные нами дополнительные исследования показали, что дефицит БФ у женщин с сохранным ответом в СКЛ ассоциирован со снижением количества $CD4^+CD25^+$ Т-клеток.

Кроме того, женщины с бесплодием, обследованные в овуляторный период, характеризовались смещением цитокинового баланса в сторону более высокой продукции провоспалительных

цитокинов (IFN γ и IL-17) и снижением Th2 цитокинов (IL-6) в ЛПС-стимулированных культурах клеток крови. При этом изменения баланса цитокинов в 64,3% случаев выявлялись у женщин с сохранной реактивностью лимфоцитов на аллоантигены.

Уменьшение относительного содержания в периферической крови и/или функциональной активности естественных $CD4^+CD25^+$ Treg, а также смещение баланса в сторону доминирования Th1/провоспалительных цитокинов при беременности однозначно интерпретируется как нарушение «гестационной» иммуносупрессии и является характерным для женщин с привычным невынашиванием [7, 24]. Полученные нами данные впервые выявили сходные изменения в периферической крови у значительной части инфертильных женщин в овуляторной фазе менструального цикла. Согласно данным литературы, признаки супрессорной перестройки происходят не только при беременности, но и регулярно наблюдаются у фертильных женщин в процессе менструального цикла. Так, в периферической крови в период овуляции отмечается возрастание количества естественных Treg [6]. Кроме того, переход в лютеиновую фазу ассоциирован со смещением баланса в сторону Th2 цитокинов [8]. Учитывая эти данные, а также полученные нами результаты, можно полагать, что иммунные нарушения у женщин с бесплодием формируются еще до наступления беременности. В пользу такого предположения свидетельствуют также результаты исследований Jaspeg M.J. с соавторами, которые выявили снижение экспрессии Foxp3 (характерный маркер Treg) в эндометрии женщин с первичным бесплодием [11]. Можно также предположить, что изменения Treg в большей степени характерны для эндометриальной ткани, поэтому в периферической крови выявляются не у всех женщин.

Выявленное нами нарушение баланса цитокинов в овуляторный период менструального цикла у женщин с бесплодием может отчасти объяснить причину дефицита БФ у пациентов с сохранным ответом клеток в СКЛ. Так, наряду с молекулами IgG, свойствами «блокирующих факторов» могут обладать и другие молекулы, например, иммуносупрессорные цитокины [21]. Снижение продукции иммуносупрессорных цитокинов может быть обусловлено конституциональными особенностями, например, аллельным полиморфизмом генов цитокинов или скрытыми недиагностированными инфекциями, сопровождающимися изменением баланса цитокинов. В этом аспекте заслуживают внимания данные о возможной сопряженности между повышенным содержанием провоспалитель-

тельных цитокинов, в частности $TNF\alpha$, и развитием infertility [22, 23].

В целом полученные нами результаты позволяют предположить, что у женщин с бесплодием неясного генеза нарушения супрессорной реаранжировки иммунной системы происходят уже в процессе менструального цикла и могут быть обусловлены различными механизмами. В частности, причиной дефицита БФ у пациентов со сниженным ответом в СКЛ может быть сходство партнеров по аллоантигенам, а у женщин с сохранным уровнем ответа в СКЛ — снижение количества естественных Treg и/или смещение баланса цитокинов в сторону доминирования Th1/провоспалительных факторов.

Список литературы

1. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Дударева А.В., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика естественных цитотоксических клеток и регуляторных Т-лимфоцитов у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией // Иммунология. — 2007. — Т. 28, № 3. — С. 151-155.
2. Хонина Н.А., Айзикович И.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Ладыгина Е.А., Белова А.Е., Дегтярев М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Регуляторные факторы и цитокины в сыворотке и фолликулярной жидкости у женщин при контролируемой овариальной гиперстимуляции // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 38-44.
3. Хонина Н.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Особенности продукции цитокинов при физиологической и осложненной беременности // Акушерство и гинекология. — 2006. — № 2. — С. 11-15.
4. Чистякова Г.Н., Газиева И.А., Ремизова И.И. Оценка цитокинового профиля при физиологической и патологически протекающей беременности // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 1. — С. 3-8.
5. Agerwal N., Gosh R., Jain A., Arya S.C. Elevated peripheral natural killer cell and infertility // Am. J. Reprod. Immunol. — 2006. — Vol. 56. — P. 77-78.
6. 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. — P. 2572-2578.
7. Daher S., Denardi K., Blotta M., Mamoni R. Cytokines in recurrent pregnancy loss // J. Reprod. Immunol. — 2004. — Vol. 62. — P. 151-157.
8. Faas M., Bouman A., Moesa H., Heineman M.J., de Leij L., Schuiling G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? // Fertil. Steril. — 2000. — Vol. 74. — P. 1008-1013.
9. Faridi R.M., Das V., Tripathi G., Talwar S. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages // Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 24. — P. 1558-1764.
10. Gueri L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? // Human Reprod. Update. — 2009. — Vol. 1. — P. 1-19.
11. Jasper M.J., Tremellen R.P., Robertson S.A. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor FoxP3 in endometrial tissue // Mol. Hum. Reprod. — 2006. — Vol. 12. — P. 301-308.
12. Karagozoglu H., Karlikaya G., Ismailoglu B. Clinical outcomes of 6 year-experience on HLA-typing // Fert. Steril. — 2008. — Vol. 90. — P. 308-309.
13. Kallikourdis M., Betz A.G. Periodic accumulation of regulatory T cells in the uterus: preparation for the implantation of a semi-allogeneic fetus? // PLoS ONE. — 2007. — Vol. 2. — P. 382.
14. Mjosberg J., Berg G., Ernerudh J. $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in human pregnancy // Immunology. — 2007. — Vol. 120. — P. 456-466.
15. Nonako T., Takakuwa K., Ooki I. Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions — prospective non-randomized cohort study // Am. J. Reprod. Immunol. — 2007. — Vol. 58. — P. 530-536.
16. Pandey M.K., Saxena V., Agrawal S. Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy // Pregnancy Childbirth. — 2003. — Vol. 3. — P. 1-7.
17. Pandey M.K., Thakur S., Agarwal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion // Arch. Gynecol. Obstet. — 2004. — Vol. 269, N 3. — P. 161-172.
18. Quenby S., Nik H., Innes B. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure // Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 24. — P. 45-54.
19. Ramhorst R.E., Fainboim L. New actors for immunological mechanisms involved in the materno-fetal tolerance // Current Women's Health Reviews. — 2005. — Vol. 1. — P. 15-20.
20. Vacca P., Cantoni C., Prato C. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional

profiles of decidual versus peripheral NK cells // Int. Immunol. — 2008. — Vol. 20. — P. 1395-1405.

21. Vigano P., Somigliana E., Mangioni S. Expression of Interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87. — P. 5730-5736.

22. Vinet E., Pineau C., Clarke F.E., Bernatsky S. Anti-TNF therapy pregnancy outcomes in women with inflammatory arthritis: anti-TNF therapy and infertility // Exp. Rev. Clin. Immun. — 2009. — Vol. 5. — P. 27-34.

23. Wang C., Ng S.C., Kwak-Kim J., Gilman-Sachs, Beer A.E., Beaman K.D. Increased tumor

necrosis factor-alpha level in infertility patient // Immun. Rev. — 2002. — Vol. 3. — P. 6.

24. Yang H., Qiu L., Chen G. Proportional change of CD4CD25 regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients // Fertil. Steril. — 2008. — Vol. 89. — P. 656-661.

25. The practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility // Fertil. Steril. — 2006. — Vol. 86, N 5, Suppl 1. — P. 111-114.

поступила в редакцию 13.07.2010

принята к печати 02.09.2010