

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДОМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Мотовилова Н.О.¹, Коган И.Ю.², Сысоев К.А.⁴,
Буйнова А.Н.¹, Грязнов А.Ю.¹, Тотолян Арег А.³

¹ Центр Планирования Семьи Пушкинского района, Санкт-Петербург

² Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

⁴ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Резюме. В исследовании определены клинические, гормональные и иммунологические факторы, позволяющие прогнозировать исход цикла ЭКО у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия. Показатели гонадотропной стимуляции яичников в цикле ЭКО у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия зависят от их возраста и содержания в фолликулярной жидкости цитокинов. Эффективность стимуляции яичников гонадотропинами обратно зависит от возраста больных; его увеличение сочетается с возрастанием содержания в фолликулярной жидкости провоспалительных цитокинов, а в эндометрии – повышением экспрессии рецепторов хемокинов CCR1 и снижением CCR3; эффективность стимуляции яичников гонадотропинами зависит от концентрации цитокинов в фолликулярной жидкости, о чем свидетельствует наличие достоверной прямой корреляции между количеством растущих фолликулов, ооцитов и содержанием в ней IL-10, IL-15, эотаксина, MIP-1 β , RANTES, TNF α , IFN γ и GM-CSF; уровень свободного тестостерона коррелирует положительно – с количеством ооцитов, полученных при пункции яичников; экспрессией в эндометрии CXCR2 и CCR3; отрицательно – с содержанием в фолликулярной жидкости IL-4. У больных с отрицательным результатом цикла ЭКО уровень IL-13 в фолликулярной жидкости яичников во время стимуляции в 2 раза выше такового у больных с наступившей после ЭКО беременностью. Прогноз наступления беременности в цикле лечения у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия определяется комплексом клинико-анамнестических, гормональных, эмбриологических факторов и позволяет повысить точность прогнозирования исхода ЭКО. С целью определения вероятности наступления беременности после цикла ЭКО рекомендуется рассчитывать прогностический индекс с чувствительностью теста – 93% и специфичностью теста – 89%.

Ключевые слова: бесплодие, цитокины, экстракорпоральное оплодотворение.

Motovilova N.O., Kogan I.Yu., Syssoev K.A., Buianova A.N., Griaznov A.Yu., Totolyan Areg A.

IMPACT OF SOME CYTOKINES TO EFFICIENCY OF INFERTILITY TREATMENT BY MEANS OF IN VITRO FERTILIZATION

Адрес для переписки:

Мотовилова Наталья Олеговна,
Центр Планирования Семьи Пушкинского района
196600, Санкт-Петербург, Пушкин,
ул. Магази́нная, 72.
Тел.: (812) 451-79-29.
E-mail: motovilova-natal@mail.ru

Abstract. Present study defines clinical, hormonal and immunological factors allowing to predict outcomes of IVF cycles in patients with combined forms of infertility at their reproductive age. Indices of gonadotrophic ovarian stimulation in IVF cycles in patients of reproductive age with combined forms of infertility depend on their age and cytokine contents

in follicular fluid. Effectiveness of gonadotropin-induced ovarian stimulation is inversely dependent on the patients' age, its increase is related to increased contents of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid and increased expression of CCR1, along with decreased expression of CCR3 chemokine receptors in endometrium. Effectiveness of gonadotropin-induced ovarian stimulation depends on concentration of cytokines in the follicular fluid, which is argued by presence of a significant direct correlation between the number of growing follicles, oocytes and local contents of IL-10, IL-15, eotaxin, MIP-1 β , RANTES, TNF α , IFN γ , and GM-CSF. Free testosterone levels show a positive correlation with numbers of oocytes obtained from the ovarian punctate, and CXCR2 and CCR3 expression in endometrium, as well as a negative correlation was found with IL-4 contents in follicular fluid. In patients with negative IVF cycle outcomes, levels of IL-13 in follicular fluid upon ovarian stimulation proved to be twofold higher than those in patients with successful pregnancy after IVF. Prognosis for pregnancy in a cycle of treatment in patients with combined forms of infertility of reproductive age is determined by a patients' story, and a variety of clinical, hormonal and embryological factors which can increase predictive accuracy of the IVF outcomes. To determine a probability of successful pregnancy after IVF cycle, an appropriate prognostic index is recommended, with a sensitivity levels of 93% and specificity of 89%. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 373-382)

Keywords: infertility, cytokines, in vitro fertilization.

Введение

В настоящее время охрана репродуктивного здоровья населения является приоритетной медико-социальной проблемой.

Ведущими причинами женского бесплодия являются: трубно-перитонеальный фактор (40-50%), эндокринные нарушения (15-30%), эндометриоз (20-30%). В структуре женского бесплодия иммунологические факторы занимают около 3% [1]. Более чем у половины бесплодных женщин отмечается сочетание от 2 до 5 факторов и более, нарушающих репродуктивную функцию. Считается, что иммунологические факторы могут приводить к нарушениям репродуктивного процесса на различных его стадиях – фолликулогенеза, овуляции, имплантации [2, 3, 4, 5].

Иммунные нарушения могут быть вовлечены в этиологию и патогенез различных форм бесплодия, в том числе неясного генеза. Результаты современных фундаментальных исследований позволили установить тесную взаимосвязь между функционированием гипоталамо-гипофизарно-яичниковой и иммунной системами в гормональной, овуляторной функции яичников, морфофункциональных изменениях эндометрия, оплодотворении, эмбриогенезе. В частности, было показано, что действие гипофизарных и яичниковых гормонов на клеточном уровне реализуется через вовлечение множества пептидных ростовых факторов, среди которых особая роль отводится лимфогемопоэтическим цитокинам, хемокинам и факторам роста, продуцируемым иммунокомпетентными клетками. Однако, несмотря на интенсивные исследования в области иммунологии репродукции, до настоящего времени сведения о значении различных цитокинов в репродуктивной функции женщины неоднозначны [6].

Возможность изучения у человека продуцируемых в яичнике цитокинов стала особенно реальной вместе с внедрением в практику методов ЭКО. Исследование фолликулярной жидкости, взятие которой стало возможным при заборе созревших ооцитов, позволило идентифицировать в ней широкий набор цитокинов. Согласно результатам некоторых публикаций, уровень продукции отдельных цитокинов в фолликулярной жидкости выше, чем в периферической крови, что свидетельствует о значимости цитокинов в регуляции начальных этапов репродуктивного процесса [7].

К настоящему времени получены данные об особенностях системной и локальной цитокиновой регуляции плацентации, родовой деятельности, осложнений беременности (гестоза, плацентарной недостаточности, невынашивания). Однако функциональные исследования, посвященные значению цитокинов, ростовых факторов и хемокинов в фолликулогенезе при стимуляции яичников гонадотропинами в циклах ЭКО, взаимосвязи между иммунологическими факторами и уровнем гипофизарных и овариальных стероидных гормонов единичны, а их результаты часто противоречат друг другу.

Цель исследования состояла в изучении роли цитокинов в эффективности гонадотропной стимуляции яичников в цикле ЭКО и его исходах у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия.

Материалы и методы

Обследовано 79 женщин, которые составили следующие группы: основную (n = 36), сравнения (n = 36) и контрольную (n = 7). Контрольную группу составили пациентки, принимающие участие в программе «Донорство ооцитов».

В основной группе средний возраст женщин составил $32 \pm 4,3$ года; длительность бесплодия — $6,2 \pm 3,7$ года. 47,2% больных данной группы имели в прошлом беременности (13,9% — роды; 30,5% — искусственные аборт; 2,8% — самопроизвольные аборт; 2,8% — неразвивающиеся беременности). В структуре сопутствующей гинекологической заболеваемости у пациенток основной группы выявлены: хронический сальпингофорит (36,1%); миома матки (11,1%), наружный генитальный эндометриоз I-II степени тяжести (22,2%); аденомиоз (5,5%). 36,1% пациенток основной группы перенесли в анамнезе диагностическую и/или операционную лапароскопию, 27,8% — диагностическую и/или операционную гистероскопию.

В группе сравнения средний возраст женщин составил $33,7 \pm 4,2$ лет; длительность бесплодия — $5,7 \pm 3,2$ года. 61,1% больных данной группы в прошлом имели беременности (27,8% — срочные роды; 16,7% — эктопическую беременность; 44,4% — искусственный аборт; 8,3% — самопроизвольный аборт; 16,7 — неразвивающуюся беременность). В структуре сопутствующей гинекологической заболеваемости у пациенток группы сравнения выявлены: хронический сальпингофорит (58,3%), миома матки (16,4%), наружный генитальный эндометриоз I-II степени тяжести (25,0%); аденомиоз (13,9%). 47,2% пациенток группы сравнения перенесли в анамнезе диагностическую и/или операционную лапароскопию, 55,5% — диагностическую и/или операционную гистероскопию.

Контрольную группу составили здоровые женщины, принявшие участие в программе «Донорство ооцитов». Все они состояли в браке, в анамнезе имели роды, закончившиеся рождением здорового ребенка. Средний возраст пациенток составил $29,7 \pm 3,9$ лет.

Таким образом, пациенты основной группы и группы сравнения были сопоставимы по возрасту, данным акушерско-гинекологического анамнеза, частоте сопутствующей гинекологической и экстрагенитальной патологии и лабораторным показателям обследования. Основными причинами бесплодия у больных основной группы и группы сравнения явился трубно-перитонеальный фактор, недостаточность функции яичников и некритические нарушения сперматогенеза, таким образом, бесплодие носило сочетанный генез.

Клиническое обследование пациенток включало в себя сбор анамнеза, первичный осмотр, специальное гинекологическое обследование. При гормональном исследовании радиоиммунным и иммуноферментным методами с использованием стандартных наборов производилось

определение содержания в крови на 2-3 день менструального цикла гонадотропных гормонов (ФСГ, ЛГ), эстрадиола, пролактина, свободного тестостерона, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГА-С), 17 оксипрогестерона, на 19-23 день цикла — прогестерона, независимо от дня цикла — содержание антимюллера гормона. Ультразвуковое исследование производилось перед началом стимуляции яичников, в ходе ультразвукового мониторинга в цикле ЭКО, а также с целью диагностики предполагаемой беременности и контроля за ее развитием.

Иммунологическое обследование пациенток включало определение уровня цитокинов в фолликулярной жидкости методом мультиплексного анализа белков (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, эотаксина, IP-10, IL-8, фракталкина, TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, IL-10, IL-1ra) и определение в биоптатах эндометрия методом PCR экспрессии мРНК хемокинов (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, эотаксина, IP-10, IL-8, фракталкина) и их рецепторов (CXCR1, 2, 3, 4; CX3CR1; CCR 1, 3, 4, 5, 7).

Образцы фолликулярной жидкости получали во время процедуры трансвагинальной пункции фолликулов после проведения курса контролируемой стимуляции суперовуляции. В случае попадания проводной крови в содержимое фолликулов исследование данного материала не проводилось. Биологический материал хранили в таких же пробирках, как и сыворотку крови, в замороженном состоянии (при температуре -20 °C). Содержание в фолликулярной жидкости цитокинов оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем 17-Plex (определяемый динамический диапазон 2-32000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Оценка содержания мРНК хемокинов и их рецепторов в ткани эндометрия проводилась с помощью метода RT-PCR, описанного ранее [24].

Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с использованием программной системы STATISTICA 10.0, которая является интегрированной системой статистического анализа и обработки данных. Исследованы методы анализа средних тенденций и линейного корреляционного анализа. В процессе анализа были рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена как мера линейной зависимости признаков, проведены факторный анализ, сравнения групп с использованием критерия Манна-Уитни, метод Краскела-Уоллиса (непараметрический критерий сравнения трех и более групп), а также

дискриминантный анализ для выделения группы переменных, оказывающих максимальное влияние на результат лечения. Для исследования зависимости между качественными переменными были использованы таблицы сопряженности и точный критерий Фишера (в случае таблиц 2×2) или критерий Хи-квадрат. Во всех случаях статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

При обследовании больных основной группы и группы сравнения было показано, что по содержанию эстрадиола и прогестерона эти группы были сопоставимы между собой. Выявлены достоверные различия только в содержании свободного тестостерона. Так, его уровень у больных основной группы был в 1,4 раза выше такового у больных группы сравнения. С возрастанием уровня свободного тестостерона в крови наблюдалось повышение экспрессии мРНК CXCR2 в эндометрии и снижение уровня IL-4 в фолликулярной жидкости у пациенток обеих групп.

У больных с отрицательным результатом цикла ЭКО уровень IL-13 в фолликулярной жидкости яичников во время стимуляции в 2 раза выше такового у больных с наступившей после ЭКО беременностью (рис. 1). Достоверных различий в содержании других цитокинов в фолликулярной жидкости у больных основной группы и группы сравнения не было получено.

Проведен корреляционный анализ между показателями стимуляции яичников (суммарной дозой гонадотропинов, длительностью стимуляции яичников, количеством фолликулов в яичниках, количеством ооцитов, полученных при пункции яичников) в цикле ЭКО и содержанием цитокинов в фолликулярной жидкости. Общая доза гонадотропинов имела достоверную отрицательную взаимосвязь с MIP-1 α . Возрастание концентрации IL-10 сопровождается увеличением количества фолликулов в яичниках. Аналогичная зависимость выявлена с увеличением IFN γ , MIP-1 β , RANTES, TNF α и возрастанием количества фолликулов в яичниках. Обнаружено также, что между концентрацией в фолликулярной жидкости цитокинов IL-10, IFN γ , GM-CSF, MIP-1 β , RANTES, TNF α и количеством ооцитов, полученных при пункции яичников, также имеется достоверная позитивная взаимосвязь (табл. 1)

В нашем исследовании с помощью корреляционного анализа определено, что имеется достоверная взаимосвязь между концентрацией отдельных цитокинов в фолликулярной жидкости. Содержание IL-10 имело позитивную взаимосвязь с концентрациями IL-6, эотаксина, MCP-1 и G-CSF, а содержание IL-2 – с GM-CSF и IL-15 (табл. 2).

При корреляционном анализе между содержанием в фолликулярной жидкости больных цитокинов и данными их акушерско-гинекологического анамнеза было выявлено, что имеется

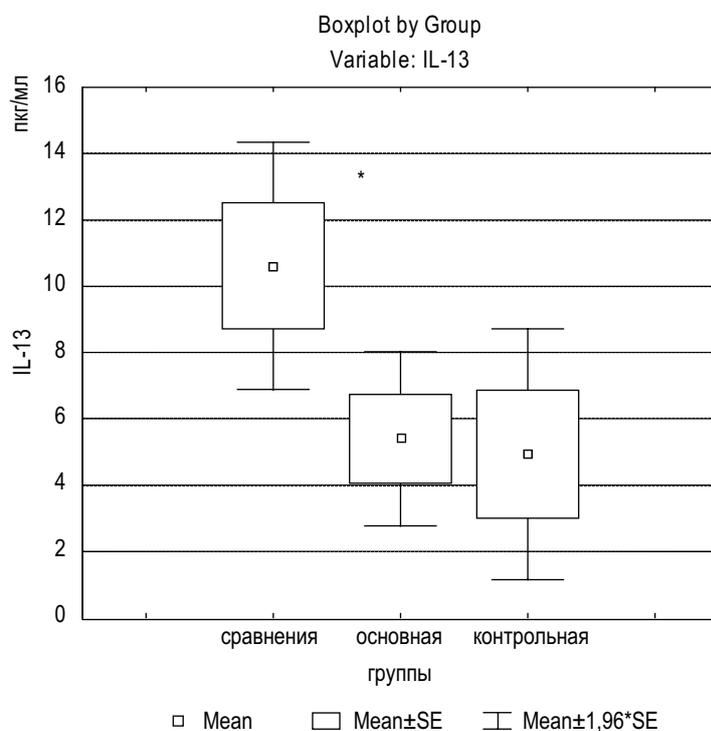


Рисунок 1. Содержание IL-13 в фолликулярной жидкости больных бесплодием и лиц контрольной группы

Примечание. * – достоверность различий группы сравнения от основной группы и группы сравнения при $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 1. ЗАВИСИМОСТЬ КОЛИЧЕСТВА Фолликулов и количества ооцитов от уровня некоторых цитокинов в фолликулярной жидкости больных бесплодием (n = 60)

Показатели стимуляции	Цитокины в фолликулярной жидкости	Коэффициент корреляции Спирмена, R _c	p
Количество фолликулов	IL-10	0,31	< 0,05
	IFN γ	0,31	< 0,01
	MIP-1 β	0,32	< 0,01
	RANTES	0,38	< 0,01
	TNF α	0,27	< 0,05
Количество ооцитов	IL-10	0,26	< 0,05
	IFN γ	0,28	< 0,05
	GM-CSF	0,28	< 0,05
	MIP-1 β	0,28	< 0,05
	RANTES	0,35	< 0,01
	TNF α	0,28	< 0,05

достоверная позитивная взаимосвязь между возрастом больных обеих групп и уровнем G-CSF, IL-7, IL-9, IL-1ra, PDGF BB. Также с возрастом в ткани эндометрия уровень мРНК CCR1 нарастал, а уровень мРНК CCR3 снижался (табл. 3).

Выявлена корреляционная взаимосвязь между содержанием в фолликулярной жидкости цитокинов GM-CSF, MIP-1 β , RANTES, IFN γ , IL-15 и качеством ооцитов, а также частотой дробления и частотой криоконсервации эмбрионов. Возрастание концентрации GM-CSF, MIP-1 β , RANTES сопровождалось увеличением числа ооцитов на стадии МII мейоза, а возрастание концентрации GM-CSF в фолликулярной жидкости сопровождалось уменьшением частоты оплодотворения (табл. 4).

С помощью дискриминантного анализа проведено выявление факторов, определяющих прогноз лечения бесплодия с помощью ЭКО (табл. 5). Как видно из таблицы, одним из наиболее информативных прогностических факторов является наличие трубно-перитонеального бесплодия. Согласно статистическому методу в дальнейшем было использовано расслоение вы-

борки по данному признаку. Были определены основные клиничко-анамнестические, гормональные и иммунологические факторы, определяющие исход цикла ЭКО, у больных (n = 42), не имеющих трубно-перитонеального фактора бесплодия.

На основании полученных данных была определена сводная характеристика эффективности лечения бесплодия с помощью ЭКО у больных, не имеющих трубно-перитонеального фактора бесплодия: $D_0 = -0,81494 * \text{Возраст} + 0,146218 * (\% \text{ дробления эмбрионов}) - 0,24226 * \text{G-CSF} + 0,188225 * \text{прогестерон} + 0,40203 * \text{IL-9} + 20,47004 * \text{IL-4} - 0,17025 * \text{IL-13} + 1,775071 * \text{IL-2} - 1,70697 * \text{TNF}\alpha - 4,13941 * \text{GM-CSF} + 0,920219 * \text{свободный тестостерон} + 7,771985$. При $D > 0$ прогнозируется наступление беременности после цикла ЭКО; при $D < 0$ прогнозируется отрицательный результат лечения. Оперативные характеристики теста: чувствительность – 93%; специфичность – 89%.

Также были определены основные значимые прогностические факторы в отношении эффек-

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В Фолликулярной жидкости

Цитокин	Цитокин	R _c	P
IL-10	IL-6	0,759042	< 0,0001
	Eotaxin	0,627613	0,00000008
	MCP-1	0,625601	0,000000081
	G-CSF	0,560548	0,0000006
IL-2	GM-CSF	0,591489	0,0000002
	IL-15	0,788342	< 0,0001

ТАБЛИЦА 3. ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В Фолликулярной жидкости и мРНК НЕКОТОРЫХ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ ОТ ВОЗРАСТА БОЛЬНЫХ

	Цитокины	N	Коэффициент корреляции Спирмена R	p
Возраст	IL-1ra	68	0,31	0,010009
	IL-7	68	0,33	0,005968
	IL-9	60	0,28	0,033376
	G-CSF	60	0,33	0,010425
	PDGF-BB	60	0,41	0,001142
	мРНК CCR1	27	0,40	0,035400
	мРНК CCR3	27	-0,42	0,028783

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ В Фолликулярной жидкости ЦИТОКИНОВ И КАЧЕСТВОМ ООЦИТОВ, ЧАСТОТой ДРОБЛЕНИЯ, ЧАСТОТой КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ

Показатели качества ооцитов и раннего развития эмбрионов	Цитокины в фолликулярной жидкости	N	Коэффициент корреляции Спирмена R	p
Количество ооцитов на стадии MII	GM-CSF	59	0,27	0,037485
	MIP-1 β	59	0,31	0,015079
	RANTES	59	0,32	0,011913
% оплодотворения	GM-CSF	59	-0,29	0,026133
% дробления	IFN γ	59	-0,28	0,031401
	RANTES	59	-0,263	0,043509
Перенос эмбрионов	IL-15	62	0,26	0,043468
Криоконсервация эмбрионов	MIP-1 β	61	0,30	0,017846

ТАБЛИЦА 5. ОСНОВНЫЕ КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ, ГОРМОНАЛЬНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИСХОД ЦИКЛА ЭКО У ВСЕХ ПРЕДСТАВЛЕННЫХ ПАЦИЕНТОВ (n = 72) В ЦЕЛОМ

Фактор	Дискриминантный коэффициент	P
Возраст	-0,876	< 0,001
Содержание IL-13 в фолликулярной жидкости	-0,274	< 0,01
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия	-7,045	< 0,001
% дробления	0,051	0,1
Тестостерон	0,427	0,3
Содержание IL-1ra в фолликулярной жидкости	0,007	< 0,05
Содержание TNF α в фолликулярной жидкости	0,548	< 0,05
Возраст менархе	-1,994	< 0,01
ИМТ	-0,471	< 0,05
Содержание RANTES в фолликулярной жидкости	-0,015	< 0,05
Длительность бесплодия	0,583	< 0,05
Содержание IL-12 (p70) в фолликулярной жидкости	0,773	0,1
Содержание VEGF в фолликулярной жидкости	-0,002	0,2

тивности цикла ЭКО у больных, имеющих трубно-перитонеальный фактор бесплодия.

На основании полученных данных была определена сводная характеристика эффективности лечения бесплодия с помощью ЭКО у больных, имеющих признаки трубно-перитонеального бесплодия: $D_1 = -0,5476 * \text{Возраст} - 0,31456 * \text{IL-13} + 0,011018 * \text{IL-1ra} + 1,384012 * \text{свободный тестостерон} - 0,00392 * \text{VEGF} + 1,064499 * \text{IL-12} - 0,48706 * \text{ИМТ} + 0,056158 * \text{прогестерон} + 25,82745$. При $D > 0$ – прогнозируется наступление беременности после цикла ЭКО; при $D < 0$ – прогнозируется отрицательный результат лечения. Оперативные характеристики теста: чувствительность – 81%; специфичность – 79 %.

Обсуждение

Одним из направлений преодоления бесплодия является применение вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе экстракорпорального оплодотворения, средняя эффективность которого в плане частоты наступления беременности и родов составляет, соответственно, 29,1% и 21,5% [8].

Одним из путей повышения эффективности ЭКО является изучение регуляторных механизмов репродуктивных процессов, прогнозирование их нарушений и определение подходов к коррекции. В этом плане одно из центральных мест занимает проблема иммунологической регуляции репродуктивной функции женщины. Иммунокомпетентные клетки (макрофаги, лимфоциты) и продукты их деятельности (цитокины, ростовые факторы, хемокины) являются неотъемлемыми участниками основных репродуктивных процессов: овуляции, формирования и функционирования желтого тела, морфофункциональных изменений эндометрия в течение менструального цикла и при наступлении беременности, оплодотворения и имплантации.

Короткодистантный (ауто- и паракринный) характер действия цитокинов определяет особую актуальность изучения не только системных, но, прежде всего, локальных механизмов их действия.

В исследовании изучалась взаимосвязь между показателями гонадотропной стимуляции яичников в цикле ЭКО и содержанием в фолликулярной жидкости, полученной при пункции фолликулов, иммунологических факторов. В работе выявлено, что эффективность стимуляции яичников гонадотропинами зависит от концентрации цитокинов в фолликулярной жидкости. Так, определена достоверная прямая корреляция между количеством растущих фолликулов, ооцитов, в том числе зрелых, и содержанием в фолликулярной жидкости IL-10, IL-15, эотаксина,

MIP-1 β , RANTES, TNF α , IFN γ и GM-CSF. Кроме этого, при сравнении содержания цитокинов, факторов роста и хемокинов в фолликулярной жидкости яичников, полученной во время их пункции, выявлено, что уровень IL-13 у больных основной группы (беременность наступила) в 2 раза ниже такового у больных группы сравнения (беременность не наступила) (5,4 пг/мл и 10 пг/мл соответственно). Полученная в нашем исследовании корреляция между количеством растущих фолликулов и содержанием в фолликулярной жидкости яичников цитокинов, вероятно, обеспечивается высоким количеством иммунокомпетентных клеток, в том числе макрофагов, лейкоцитов, в тканях яичников при гонадотропной стимуляции. Кроме этого, секреция цитокинов может обеспечиваться гранулезными клетками фолликулов. Секретируемые ИКК цитокины, ростовые факторы вовлечены в развитие, рост фолликула, стимулируя пролиферацию и ингибируя апоптоз клеток гранулезы, участвуют в синтезе стероидных гормонов яичника. Полученные нами результаты согласуются с данными некоторых исследований, в которых анализировалось содержание цитокинов в крови, а также в фолликулярной жидкости больных с бесплодием во время стимуляции яичников в циклах ЭКО. Так, в работе Т.С.С. Bonetti [8] при анализе содержания в сыворотке крови во время пункции фолликулов IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF α , LIF было определено, что только содержание IL-1 β позитивно коррелировало с частотой наступления беременности. Частота наступления беременности после цикла ЭКО у больных, у которых во время пункции фолликулов в крови определен данный цитокин, составила 62,5%, а частота наступления беременности у больных, у которых IL-1 β в крови не определялся – 37,5%. Полифункциональные цитокины IL-10, IL-4, IL-13 относят к цитокинам, характерным для так называемого Th2-иммунного ответа, доминирующего при нормальном течении беременности. IL-10, IL-4 обладают выраженным противовоспалительным эффектом, регуляторными свойствами в отношении цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-лимфоцитов, дендритных клеток. Экспрессия данных цитокинов в плаценте рассматривается как один из факторов, способствующих сохранению беременности путем негативной регуляции синтеза простагландинов и сократительной активности миометрия [9]. Считается, например, что основным их источником в плаценте являются макрофаги. IL-10 и IL-4 могут рассматриваться в качестве антагонистов действия TNF α , IFN γ , обладающих провоспалительным действием. Так, IL-10 ингибирует апоптоз клеток, инду-

цированный TNF α или IFN γ . Цитокины, секретируемые в яичниках во время их гонадотропной стимуляции, могут оказывать прямое или опосредованное воздействие на процесс ангиогенеза в яичнике. Прямым ангиогенным эффектом могут обладать TNF α , G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4. Эти цитокины принимают участие в миграции, пролиферации эндотелиальных клеток, формировании капиллярных трубок и новой базальной мембраны. Опосредованное ангиогенное действие TNF α и IFN γ может быть реализовано через индукцию экспрессии VEGF, играющего ключевую роль в ангиогенезе. При этом TNF α , IL-10 могут оказывать также и противоположный, ангиостатический эффект. Такие данные были получены, например, при исследовании ангиогенеза плаценты TNF α и IFN γ , секреция которых возрастает во время гонадотропной стимуляции яичников. Они могут индуцировать апоптоз клеток (в высоких концентрациях) через активацию проапоптотических Вах-белков, протеинкиназы С или каспаз. В некоторых исследованиях показано, что TNF α , IFN γ , GM-CSF необходимы для осуществления сигнального взаимодействия между ооцитом и окружающими его соматическими (гранулезными) клетками, обеспечивая рост фолликула, а при формировании желтого тела они участвуют в синтезе прогестерона [10, 11]. Синтезируемые макрофагами хемокины обладают хемоаттрактивным эффектом и обеспечивают привлечение и активацию в ткани яичника лейкоцитов [12]. Таким эффектом обладают RANTES, эотаксин, MIP-1 β , секреция которых возрастает, согласно нашим данным, в ходе гонадотропной стимуляции яичников. Привлеченные в ткань яичника лейкоциты также секретируют цитокины, хемокины и факторы роста, вероятно, обеспечивая избыточность цитокиновой регуляции фолликулогенеза в яичниках [13]. Считается, что основная роль GM-CSF в яичниках заключается в рекрутировании и активации макрофагов, гранулоцитов и дендритных клеток. Кроме этого, GM-CSF осуществляет сигнальное взаимодействие между ооцитом и окружающими его соматическими (гранулезными) клетками, обеспечивая рост фолликула, а при формировании желтого тела – синтеза прогестерона [14]. Существуют данные о влиянии GM-CSF на развитие эмбриона до имплантации. Дефицит фактора приводил к уменьшению количества клеток бластоцисты. При этом культивирование эмбриона в присутствии GM-CSF восстанавливало клеточный состав эмбриона [15]. Данный цитокин играет также важную роль в обеспечении толерантности материнского организма к антигенным структурами плода, обеспечивая нормальный ход раннего развития эмбриона. Это

может свидетельствовать о сходных клеточных источниках синтеза указанных факторов [16].

В результате нашего исследования были выявлены взаимосвязи между возрастом больных, содержанием в их крови гонадотропных, овариальных стероидных гормонов и секрецией в яичниках провоспалительных цитокинов. Так, увеличение возраста больных с бесплодием сочеталось с повышением содержания в фолликулярной жидкости яичников G-CSF, PDGF BB, IL-1 α , IL-7, IL-9, а в эндометрии повышением содержания мРНК CCR1 и снижением содержания мРНК CCR3. Возможно, у человека имеются возрастные особенности цитокиновой регуляции репродуктивных процессов. При этом может иметь место возрастная специфичность продукции цитокинов во время фолликулогенеза, в том числе стимулированного. Возрастание уровня G-CSF в крови больных наблюдается также во время стимуляции яичников [17]. Возрастание содержания цитокинов в фолликулярной жидкости у больных, ассоциированное с увеличением их возраста, возможно, является проявлением возрастных изменений функциональных свойств ИКК яичника, а также комплекса ооцит-кумюлюс, в том числе их адаптации к гонадотропной стимуляции. Увеличение содержания в фолликулярной жидкости IL-1 α , IL-7, IL-9, вероятно, отражает нарастание провоспалительного потенциала с увеличением возраста больных. При этом с увеличением возраста выявлено повышение содержания в фолликулярной жидкости PDGF BB [18]. Известно, что PDGF является проангиогенным фактором, стимулирующим пролиферацию эндотелиальных клеток, перидитов и гладкомышечных клеток, обеспечивает стабилизацию сосудистого русла. Кроме этого, данный фактор влияет на миграцию и /или выживание этих клеток во время роста эндотелия. Усиление экспрессии тромбоцитарного фактора роста может быть обусловлено активацией синтеза провоспалительных цитокинов ИКК [19]. Выявленные нами закономерности напоминают особенности гестационных эффектов цитокинов, которые во многом обусловлены возрастом фетоплацентарной морфофункциональной единицы, что проявляется стадийной специфичностью продукции цитокинов во время беременности – последовательно сменяющие друг друга так называемые «окна гестации», каждое из которых характеризуется сложной сетью цитокиновой сигнализации с тонкой и точной пространственной и временной регуляцией [20]. Нами было определено, что при этом уровень свободного тестостерона коррелирует положительно с количеством ооцитов, экспрессией в эндометрии СХС-рецепторов; отрицательно – с содержанием в фолликулярной

жидкости IL-4. Кроме этого, было установлено, что имеется достоверная обратная взаимосвязь между базальным уровнем ФСГ и секрецией в яичниках IL-10 и эотаксина; уровнем эстрадиола в крови и содержанием в яичниках цитокина MCP-1. Была также определена достоверная прямая корреляция между базальным уровнем ЛГ и содержанием IFN γ в фолликулярной жидкости; уровнем пролактина и уровнем фактора роста фибробластов в фолликулярной жидкости. Полученные данные могут быть обусловлены влиянием стероидных гормонов на функцию ИКК, в частности макрофагов. Так, в исследованиях [21] выявлено, что эстрогены и прогестерон являются негативными регуляторами экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6. Считается, что гормональный контроль может осуществляться как при непосредственном связывании гормона с соответствующим рецептором, так и быть опосредованным аутокринной и паракринной продукцией цитокинов и ростовых факторов [22]. На поверхности макрофагов децидуальной оболочки экспрессируется общий рецептор к лютеинизирующему гормону и хорионическому гонадотропину. Это предполагает гормональную регуляцию синтеза аутокринных и паракринных регуляторных молекул в этих клетках [23].

В настоящей работе впервые выявлена отрицательная взаимосвязь между уровнем продукции в яичниках во время стимуляции гонадотропинами GM-CSF, IFN γ , RANTES и качеством оплодотворения эмбриона. В последние годы получены сведения о том, что стимуляция яичников, ее режимы влияет на «качество» ооцита, потенции его к оплодотворению и темпы раннего развития эмбриона. Известно, что морфофункциональная зрелость ооцита является основой успешного оплодотворения и ранних стадий эмбриогенеза. Предполагается, что негативную роль на зрелость ооцита, процесс оплодотворения и дробления могут играть высокие концентрации в крови больных эстрадиола во время стимуляции яичников. Предметом дискуссий является также влияние на яйцеклетку, в том числе на частоту хромосомных аномалий, фармакологических препаратов, используемых во время стимуляции яичников (гонадотропинов, агонистов и антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона). Полученные данные свидетельствуют о том, что усиление секреции в яичнике провоспалительных цитокинов, в том числе GM-CSF, IFN γ , RANTES, может являться одним из возможных механизмов неблагоприятного влияния стимуляции яичников гонадотропинами на ооцит. Полученные нами результаты подтвердили имеющиеся фундаментальные представления

о том, что взаимодействие между ооцитом и соматическими клетками фолликула являются критическим для нормального течения фолликуло- и оогенеза.

Заключительным этапом нашего исследования явилась разработка прогностических признаков эффективности цикла ЭКО у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия. С помощью дискриминантного анализа было доказано, что наиболее значимыми для определения прогноза эффективности цикла ЭКО, наряду с такими критериями как возраст больной, индекс массы тела, наличие трубно-перитонеального фактора бесплодия и возраст менархе, являются показатели содержания свободного тестостерона и прогестерона в крови на 20-22 день менструального цикла, предшествующего ЭКО, и содержание в фолликулярной жидкости следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-9, IL-13, IL-1ra, TNF α , RANTES и G-CSF.

Таким образом, в ходе настоящего исследования выявлена роль цитокинов в эффективности цикла ЭКО у больных репродуктивного возраста с сочетанными формами бесплодия и определены клинические, гормональные и иммунологические факторы, позволяющие прогнозировать его исход.

Список литературы

1. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л.Н. Кузьмичева. — М: МИА, 2005. — 592.
2. Gleicher N., Barad D. Unexplained infertility: does really exist // Hum. Reprod. 2006; 21: 8: 1951-1955.
3. Назаренко Т.А., Дуринян Э.Р., Чечурова Т.Н. Эндокринное бесплодие у женщин // Диагностика и лечение. — М., 2004.
4. Руководство ВОЗ по стандартизованному обследованию и диагностике бесплодных супружеских пар. — М.: МЕДпресс, 1997.
5. Кулаков В.И., Корнеева И.Е. Диагностика и лечение женского бесплодия / В кн.: Практическая гинекология. Под ред. В.И. Кулакова. — М., 2002.
6. Putowski L., Darmochwal-Kolarz D., Oleszczuk J. The immunological profile of infertility women with after repeated IVF failures (preliminary study) // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2004; 10: 112: 2: 192-196.
7. Fasouliotis S.J., Spandorfer S.D., Witkin S.S., Schattman G., Liu H.C., Roberts J.E., Rosenwaks Z. Maternal serum levels of interferon-gamma and interleukin-2 soluble receptor-alpha predict the outcome of early IVF pregnancies // Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 19, N 6. — P. 1357-1363.

8. de Mouzon J., Goossens V. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE The European IVF-Monitoring (EIM), and Consortium for the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE) // Hum. Reprod. 2012 27: 954-966 Open Access
9. Bonetti T.C.S., Salomao R. Cytokine and hormonal profile in serum samples of patients undergoing controlled ovarian stimulation: interleukin-1 β predicts ongoing pregnancy // Hum. Reprod. (2010) 25(8): 2101-2106 first published online June 24, 2010 doi: 10.1093/humrep/deq171
10. Hannan N.J., Jones R.L., Critchley H.O., Kovacs G.J., Rogers P.A., Affandi B., Salamonsen L.A. Co-expression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. // J. Clin. Endocrin. Metab. 2004; 89: 6119-6129.
11. Wu R., Van der Hoek K.H., Ryan N.K., Norman R.J., Robker R.L. Macrophage contributions to ovarian function // Hum. Reprod. Update 2004; 10: 2: 119-133.
12. Bornstein S.R., Rutkowski H., Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis // Mol. Cell Endocrinol. 2004; 215: 1-2: 135-141.
13. Norman R.J., Brannstrom M. Cytokines in the ovary: pathophysiology and potential for pharmacological intervention // Pharmacol. Ther. 1996; 69: 219-227.
14. Machelon V., Emilie D. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary // Eur. Cyt Network 1997; 8: 137-143.
15. Duncan W.C., Rodger F.E., Illingworth P.J. The human corpus luteum: reduction in macrophages during stimulated maternal recognition of pregnancy // Hum. Reprod. 1998; 13: 2435-2442.
16. Nakayama T., Fujiwara H., Maeda M., Inoue T., Yoshioka S., Mori T., Fujii S. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC // Hum. Reprod. 2002; 17: 1: 207-212.
17. Kämmerer U., Marzusch K., Kröber S., Ruck P., Handgretinger R., Dietl J. A subset of CD56+ large granular lymphocytes in first-trimester human decidua are proliferating cells // Fertil Steril. 1999; 71: 74-79.
18. Buculmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function // Hum. Reprod. 2000; 6: 1-15.
19. Klentzeris L.D. The role of endometrium in implantation // Hum. Reprod. 1997; 12: 170-175.
20. Gendie E. Lash, Barbara A. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in recurrent miscarriage // Hum. Reprod. (2012) 27(1): 183-195 first published online November 10, 2011 doi: 10.1093/humrep/der376.
21. Сельков С.А., Павлов О.В. Плацентарные макрофаги. – СПб., 2007. – 186 с.
22. Das V., Shukla B.R.K. Immunology: Outcome of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion following immunotherapy with allogeneic lymphocytes // Hum. Reprod. 1995; 10(9): 22.
23. Hunt J. Immunology of Reproduction. // Encyclopedia of reproduction. – 1999. – Vol. 2. – P. 798-814.
24. Zhang J.H., He H., Borzychowski A.M., Takeda K., Akira S., Croy B.A. Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells // Biol. Reprod. 2003; 69: 404-411.
25. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысоев К.А., Якубовская Л.А., Шахманов Д.М., Тотолян Арег А. Экспрессия хемокинов и их рецепторов в крови и ткани печени при хроническом вирусном гепатите С // Мед. иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 379-388.

поступила в редакцию 25.12.2011

отправлена на доработку 18.01.2012

принята к печати 11.02.2012