

# АЛЛОИММУНИЗАЦИЯ ЛИМФОЦИТАМИ ПАРТНЕРА В ЛЕЧЕНИИ БЕСПЛОДИЯ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТАРУЮ ПРОБЛЕМУ

Хонина Н.А.<sup>1</sup>, Ладыгина Е.А.<sup>3</sup>, Вятчина А.Н.<sup>4</sup>,  
Пасман Н.М.<sup>2</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБГУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> АНО «Медицинский центр Авиценна», г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> МБГУЗ «Центр планирования семьи и репродукции», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Снижение продукции блокирующих факторов (БФ) является частым проявлением иммунных дисфункций у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и может быть скорректировано методом аллоиммунизации лимфоцитами партнера (АИЛ). Ранее нами было показано, что дефицит БФ в ряде случаев ПНБ не связан со сниженным ответом в СКЛ и выявляется не только при ПНБ, но и при первичном бесплодии неясного генеза. В данной работе исследовано влияние АИЛ на активность БФ и проведен анализ клинической эффективности иммунотерапии при вторичном и первичном бесплодии неясного генеза с учетом эффективности генерации БФ. Проведение АИЛ сопровождалось появлением БФ у 75% женщин с ПНБ и 74% женщин с первичным бесплодием неясного генеза. При этом наличие БФ регистрировалось с одинаковой частотой в группах женщин со сниженным и сохранным ответом в СКЛ. Число родов составило в группе с ПНБ 65,5% и группе с первичным бесплодием – 40%. При этом частота родов у женщин с наличием БФ существенно превышала таковую в группах женщин с дефицитом БФ, причем как у женщин с ПНБ (70,4% против 28%), так и с первичным бесплодием (50 против 9%). Таким образом, проведение АИЛ у женщин с дефицитом БФ сопровождается появлением активности БФ, что ассоциировано с наступлением и вынашиванием беременности у женщин как с ПНБ, так и с первичным бесплодием неясного генеза.

*Ключевые слова:* блокирующие факторы, привычное невынашивание, первичное бесплодие, аллоиммунизация

## **Адрес для переписки:**

Хонина Наталья Алексеевна  
д.м.н., ведущий научный сотрудник ФБГУ «НИИ  
клинической иммунологии» СО РАМН  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская,  
14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
E-mail: cell\_lab@mail.ru

## **Авторы:**

Хонина Н.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник  
ФБГУ «НИИ клинической иммунологии»  
СО РАМН, г. Новосибирск, Россия  
Ладыгина Е.А. – врач, АНО «Медицинский центр  
Авиценна», г. Новосибирск, Россия  
Вятчина А.Н. – к.м.н., врач, МБГУЗ  
«Центр планирования семьи и репродукции»,  
г. Новосибирск, Россия  
Пасман Н.М. – д.м.н., профессор, Новосибирский  
государственный университет, г. Новосибирск,  
Россия  
Черных Е.Р. – д.м.н., профессор, член-  
корреспондент РАМН, ФБГУ «НИИ клинической  
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Поступила 07.05.2013

Отправлена на доработку 13.05.2013

Принята к печати 14.05.2013

# PATERNAL LYMPHOCYTE ALLOIMMUNIZATION IN THE TREATMENT OF INFERTILITY: A NEW LOOK AT AN OLD PROBLEM

Khonina N.A.<sup>a</sup>, Ladigina E.A.<sup>c</sup>, Vyatchinina A.N.<sup>d</sup>,  
Pasman N.M.<sup>b</sup>, Chernykh E.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Avicenna Medical Center (MC) Inc., Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Center for Family Planning and Reproduction, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** Decreased production of blocking factors (BF) is a common manifestation of immune dysfunction in women with recurrent spontaneous abortions (RSA), and this disorder may be corrected by lymphocyte immunotherapy performed with paternal lymphocytes (LIT). Our previously data show, in a half of RSA cases, BF deficiency is not associated with a reduced MLC response, being detected not only in RSA, but also in primary infertility of unknown origin. In this work we have investigated the effect of LIT upon BF activity and evaluated clinical efficacy of immunotherapy in women with RSA and primary unexplained infertility, taking into account the efficiency of BF production. The lymphocytes immunotherapy was accompanied by the appearance of BF in women with RSA (75%) and in women with primary unexplained infertility (74%). BF were detected at similar frequency in the groups of women with intact and reduced response in MLC. Clinical efficacy (number of births) was – 65.5% in RSA group, and 40% in primary infertility. The rate of successful pregnancy in both groups was shown to be significantly higher in women positive for BF as compared with the BF-negative women, including women with RSA (70% vs 28%) and primary infertility (50 vs 9%). Hence, LIT in BF-negative women is accompanied by enhanced production of blocking factors, thus being associated with improved pregnancy outcomes, both in females with history of RSA, and in women with unexplained infertility. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 1, pp 61-70)

*Keywords: blocking factor, recurrent spontaneous abortion, infertility of unknown origin, lymphocyte immunotherapy*

---

## Address for correspondence:

Khonina Natalya A.  
PhD, MD, Leading Research Associate,  
Research Institute of Clinical Immunology,  
Russian Academy of Medical Sciences, Siberian  
Branch  
630112, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadritsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
E-mail: cell\_lab@mail.ru

---

## Authors:

Khonina N.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation  
Ladigina E.A., MD, Avicenna Medical Center (MC) Inc., Novosibirsk, Russian Federation  
Vyatchinina A.N., PhD (Medicine), Professor, City Center for Family Planning and Reproduction, Novosibirsk, Russian Federation  
Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation  
Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Medical Sciences, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Received 07.05.2013

Revision received 13.05.2013

Accepted 14.05.2013

## Введение

В последние годы в экономически развитых странах наблюдается рост бесплодных браков, в том числе форм, обозначенных как «бесплодие неясного генеза», причины которого связывают с иммунными дисфункциями. Иммунные нарушения проявляются наличием антител против различных антигенных детерминант собственных тканей (антифосфолипидных и антинуклеарных антител, антител к половым гормонам) или сперматозоидам, что может оказывать неблагоприятное влияние на имплантацию эмбриона и вынашивание беременности [33]. Кроме того, причина бесплодия может быть обусловлена нарушением иммунных механизмов, участвующих в формировании толерантности к фетальным аллоантигенам. На это указывают многочисленные данные о нарушении Th1-/Th2-баланса [11, 22], снижении количества регуляторных Т-клеток [41] и ослаблении толерогенной активности ДК [6, 20] у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ). Поиск биомаркеров, ассоциированных с бесплодием иммунного генеза, активно ведется во всем мире, однако найти универсальный параметр, позволяющий диагностировать данную патологию, до сих пор не удается, что, видимо, обусловлено патогенетической разнородностью иммунных нарушений.

Еще в 1958 г. Payne и Rolfs обнаружили, что в крови многорожавших женщин содержатся аллореактивные антитела, вызывающие агглютинацию отцовских лейкоцитов [24]. Впоследствии наличие антител против отцовских аллоантигенов стали выявлять по цитотоксической активности сывороток крови фертильных женщин против отцовских лимфоцитов (anti-paternal cytotoxic antibodies, APCА) или способности блокировать пролиферацию лимфоцитов женщины в ответ на стимуляцию отцовскими лимфоцитами в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) [25, 38]. В последнем случае антитела против отцовских лимфоцитов получили название СКЛ-блокирующих факторов (БФ) [26]. Выработка аллореактивных антител у нерожавших женщин может индуцироваться экспрессируемыми на сперматозоидах TLX (трофобласт-лимфоцит-кроссреагирующими) антигенами, имеющими перекрестные детерминанты с HLA-молекулами

II класса и эпитопами антигенов трофобласта [10], а при беременности индуцироваться антигенными детерминантами клеток трофобласта и плода [35].

Ранние исследования показали, что дефицит указанных антител у женщин с наличием в анамнезе ПНБ или беременных с угрозой выкидыша [2, 4] ассоциируется с высоким сходством партнеров по HLA-антигенам гистосовместимости [7, 17, 34]. Соответственно, для профилактики и лечения ПНБ был предложен метод иммунизации лимфоцитами отца, позволяющий индуцировать появление БФ [2, 4]. На протяжении 20 лет метод аллоиммунизации (АИЛ) активно применяется для профилактики спонтанных выкидышей во многих странах\* – Японии<sup>1</sup>, США<sup>2</sup>, Канаде<sup>3</sup>, Англии<sup>4</sup>, Германии<sup>5</sup>, Индии<sup>6</sup>, Польше<sup>7</sup>, Греции<sup>8</sup>, Бразилии<sup>9</sup>, Китае<sup>10</sup>, Иране<sup>11</sup>, Филиппинах<sup>12</sup> и др., однако однозначного мнения в отношении эффективности данного метода так и не сложилось.

Большинство авторов подчеркивают высокую эффективность АИЛ в лечение ПНБ [9, 13, 15, 16, 19, 23, 29]. В то же время в ряде исследований не выявлено достоверного увеличения числа родов на фоне АИЛ [30, 37].

В 2004 г. Pandey М.К. с соавторами опубликовали данные, анализирующие результаты 56 клинических испытаний АИЛ [26]. Половина исследований из этого списка представляла контролируемые испытания, причем 11 были выполнены в дизайне рандомизированных клинических исследований (табл. 1).

Авторы обратили внимание на существенную вариабельность протоколов АИЛ. В 32-х исследованиях процедура АИЛ проводилась однократно, в 16-ти – курсом от 4 до 6 раз, в 8-и – более 6 раз. При этом количество клеток для иммунизации варьировало от 10 до 200 млн и более. Введение клеток производилось с использованием различных путей – внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно или используя комбинированный тип. В большинстве исследований АИЛ проводили только до беременности, в 5 случаях только во время беременности и в 7 случаях иммунотерапию начинали до беременности и продолжали во время I триместра гестации. Анализ переносимости и безопасности АИЛ не выявил каких-либо осложнений или особенностей поствакцинальных реакций [18]. В ран-

\* 1 – Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine. 2 – Center for Reproductive Immunology, San Francisco; University of Texas; Cincinnati Children's Hospital Medical Center; Center for Reproductive Medicine, Cleveland. 3 – Department of Molecular Medicine, McMaster University. 4 – Liverpool Women's Hospital, University of Liverpool. 5 – University Medical Center Schleswig-Holstein; Fertility Center, Hildesheim; DRK – Blutspendedienst, Rostock. 6 – Department of Medical Genetics. 7 – Department of Gynecology, Medical University, Lodz). 8 – Clinic of Pediatrics, Hippokraton Hospital, Thessaloniki. 9 – Immunogenetics Laboratory, Department of Genetics, Porto Alegre. 10 – Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai. 11 – Department of Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz. 12 – Philippine General Hospital, Immunology Laboratory.

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АИЛ

Дизайн исследования	Неконтролируемые – 18 Контролируемые – 27 Рандомизированные – 11
Источник клеток	Лимфоциты донора крови – 1
	Лимфоциты мужа/партера – 55
Доза клеток на 1 введение	10-20 млн – 1
	21-40 млн – 13
	41-80 млн – 5
	81-100 млн – 9
	101-150 млн – 14
	151-200 млн – 8
	Более 200 млн – 7
Количество процедур	Однократно – 32
	2-3 процедуры – 13
	4-6 процедур – 3
	Более 6 процедур – 8
Интервал между процедурами (недели)	Однократно – 34
	2-3 недели – 6
	4-6 недель – 13
	7-8 недель – 3
Пути введения	Подкожно – 8
	Внутрикожно – 19
	Внутримышечно – 1
	Внутривенно – 9
	Смешанный путь – 19
Тактика ведения	До беременности – 34
	В течение беременности – 5
	До и в течение беременности – 7
Иммунологическое обследование перед АИЛ	Проводилось – 5
	Не проводилось – 51

доминированных исследованиях частота родов на фоне АИЛ составляла 68% и достоверно превышала таковую в контрольной группе (54%;  $p = 0,02$ ). При объединении рандомизированных и нерандомизированных исследований различия были еще более явными (67 против 36%;  $p < 0,05$ ). Тем не менее, в 5 из 27 контролируемых исследований авторам не удалось выявить клинической эффективности АИЛ. При этом важно отметить, что только в 5-ти клинических испытаниях при отборе женщин и оценке эффективности терапии учитывали активность БФ. Поэтому единого мнения о том, насколько клинический эффект АИЛ ассоциируется с появлением БФ, также не сложилось. В целом причина данных разночтений объясняется, по-видимому, использованием различных протоколов и принципов отбора пациентов [26]. Причиной недостаточной эффективности АИЛ может быть также исполь-

зование в некоторых исследованиях криоконсервированных лимфоцитов, отличающихся низкой экспрессией толерогенных молекул CD200 в связи с процедурой замораживания и размораживания клеток [9].

Проведенные нами ранее исследования, направленные на поиск биомаркеров, ассоциированных с бесплодием неясного генеза, продемонстрировали, что среди ряда параметров (ответ в СКЛ, активность БФ, оценка активированных НК клеток, Трег и цитокинового баланса), дефицит БФ являлся наиболее частым нарушением, выявляемым у преобладающего большинства женщин как при вторичном, так и при первичном бесплодии. Причем в половине случаев отсутствие БФ не было ассоциировано с низким пролиферативным ответом в СКЛ, отражающим сходство партнеров по HLA-антигенам [1, 15]. Настоящая работа посвящена оценке влияния

АИЛ на генерацию БФ и анализу клинической эффективности иммунотерапии при бесплодии неясного генеза в зависимости от наличия или отсутствия БФ. Отличительными особенностями этого исследования являлись следующие моменты: отбор пациентов с учетом активности БФ и включение в исследование женщин не только с вторичным (ПНВ), но и с первичным бесплодием.

## Материалы и методы

В исследование были включены женщины с первичным (группа 1) и вторичным (женщины с ПНВ в анамнезе; группа 2) бесплодием. Первую группу составили 90 женщин в возрасте от 26 до 39 лет (в среднем  $34,4 \pm 2,6$  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 14 лет и в среднем составила  $5,1 \pm 2,3$  лет. Во вторую группу было включено 97 женщин в возрасте от 27 до 38 лет (в среднем  $35,3 \pm 2,5$  года), у которых в анамнезе регистрировалось не менее 3 беременностей, которые закончились потерей плода. Из исследования были исключены женщины с хромосомными aberrациями плода. Забор крови для иммунологического обследования и процедуры АИЛ проводился после получения информированного согласия. Иммунологическое обследование проводилось на 16-22 день менструального цикла до и после проведения АИЛ.

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Пролиферативный ответ МНК женщин оценивали в однонаправленной 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 часа митомицином С ( $40 \text{ мкг/мл}$ ). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в полной среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 10% инактивированной сыворотки доноров IV (AB) группы крови либо 10% аутологичной сыворотки женщины при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Пролиферативный ответ в СКЛ исследовали на 5 сутки по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, вводимого за 18 часов до окончания культивирования. О наличии в сыворотке крови женщин блокирующих факторов (БФ) судили по индексу влияния  $\text{ИВ}_{\text{БФ}}$ ,

рассчитанному по формуле  $\text{ИВ}_{\text{БФ}} = \text{O} / \text{K}$ , где O – интенсивность пролиферации МНК, культивируемых в присутствии 10% аутологичной сыворотки (опыт); K – интенсивность пролиферации МНК, культивируемых в присутствии 10% сыворотки АВ (IV) группы (контроль). В качестве позитивного контроля оценивали пролиферацию МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А (Sigma-Aldrich,  $15 \text{ мкг/мл}$ ). Нормативный диапазон иммунологических параметров был определен на основании значений интерквартильного диапазона значений в контрольной группе фертильных женщин. Интенсивность пролиферации МНК в СКЛ в присутствии сыворотки доноров  $< 8900 \text{ имп/мин}$  расценивалась как снижение ответа. Значения  $\text{ИВ}_{\text{БФ}} > 0,7$  расч. ед. интерпретировались как снижение/отсутствие активности БФ.

Процедуру АИЛ проводили согласно разработанной нами ранее и утвержденной методике (ФС № 2009/179). Схема иммунизации включала 3 иммунизации в течение 3-х последующих менструальных циклов. Процедура АИЛ проводилась после полного обследования партнера на наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса и вирусных гепатитов (В, С). Повторное обследование проводили после 2-ой процедуры АИЛ. Клиническую эффективность оценивали по количеству родов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6,0». Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона-Уитни для независимых непрерывных переменных и точного метода Фишера (Ртмф) и  $\chi^2$  для дискретных переменных.

## Результаты

Иммунологическое обследование женщин в сформированных группах до проведения АИЛ показало (табл. 2), что средние значения  $\text{ИВ}_{\text{БФ}}$  в обеих группах превышали 1,0, что указывало на отсутствие активности БФ. При этом анализ индивидуальных значений пролиферативного ответа в СКЛ выявил снижение пролиферативной активности у 51% женщин с первичным и у 48% женщин с вторичным бесплодием.

Проведение АИЛ у женщин с первичным бесплодием сопровождалось достоверным возрастанием реактивности МНК к аллоантигенам партнера. Это проявлялось возрастанием среднего уровня пролиферативного ответа в СКЛ в присутствии контрольной сыворотки и уменьшением доли пациентов со сниженным ответом в СКЛ с 52,3% до 17,7% ( $\chi^2 = 0,015$ ), т.е. у 34% (16 из 47) женщин регистрировалось восстановление исходно низкой пролиферативной активности

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА ДО НАЧАЛА И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АИЛ

Параметры	Группа 1 (n = 90) (первичное бесплодие)		Группа 2 (n = 97) (вторичное бесплодие)	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Ответ МНК в СКЛ (имп/мин) – в присутствии АВ-сыворотки	9900±721	13121±705**	10375±415	12779 ±403**
– в присутствии аутологичной сыворотки	11076±741	6775±572**	11526±698	6654±354**
Индекс влияния БФ – ИВ <sub>БФ</sub> (расч. ед.)	1,18±0,04	0,52±0,03**	1,09±0,05	0,56±0,02**
Пролиферативный ответ МНК в Кона-стимулированных культурах (имп/мин)	29399±1950	29751±1538	25948±1071	27583±793

**Примечание.** Данные представлены в виде  $M \pm S.E.$ ; \*\* –  $p_u < 0,001$  – достоверность различий показателей до и после проведения АИЛ.

МНК. В то же время процедура АИЛ не приводила к возрастанию неспецифической пролиферативной активности МНК в ответ на стимуляцию Кона. Кроме того, после проведения АИЛ отмечалось 2-кратное снижение ИВ<sub>БФ</sub>, что свидетельствовало о появлении активности БФ. При учете индивидуальных показателей наличие БФ после АИЛ регистрировалось у 75% женщин.

Изменения пролиферативного ответа МНК в СКЛ и активности БФ после АИЛ у женщин с вторичным бесплодием имели сходный характер. В целом по группе уровень ответа в СКЛ в присутствии контрольной сыворотки значимо возрастал. Восстановление исходно сниженного ответа регистрировалось у 29% (13 из 41) женщин. Реактивность МНК на стимуляцию Кона при этом не менялась. Проведение АИЛ сопровождалось также появлением активности БФ, на что указывало 2-кратное снижение ИВ<sub>БФ</sub> ( $p < 0,001$ ). Появление БФ отмечалось у 74% женщин.

Чтобы выяснить, различается ли эффективность генерации БФ при проведении АИЛ в группах с сохранным (группа А) и сниженным (группа В) ответом в СКЛ, мы также проанализировали частоту появления БФ в указанных подгруппах. В группе с первичным бесплодием сохранный ответ в СКЛ (1А) отмечался у 43 и сниженный ответ в СКЛ (1В) – у 47 женщин. Как следует из данных рисунка 1, появление активности БФ после 2-х процедур АИЛ в группах 1А и 1В отмечалось, соответственно, в 81% (35/43) и 70% (33/47) случаев, т.е. происходило с одинаковой частотой. В группе с вторичным бесплодием у 56 женщин (2А) ответ в СКЛ был сохранным и у 41 женщины (2В) – сниженным. После АИЛ наличие БФ регистрировалось у 77% (43/65) в группе 2А и 71% (39/41) женщины в группе 2В. Таким образом,

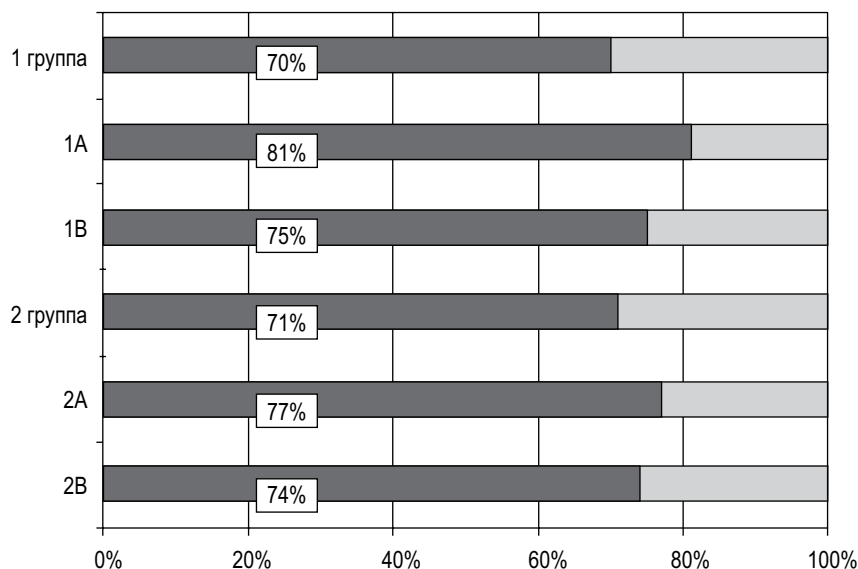
эффективность генерации БФ после АИЛ у женщин с ПНБ в подгруппах со сниженным и сохранным ответом в СКЛ также не различалась.

Клиническая эффективность оценивалась по исходам беременности. Наступление беременности регистрировали в течение 12 месяцев после проведения АИЛ (табл. 3). В целом у женщин с первичным бесплодием беременность наступила в 44% случаев (40 из 90), и в 40% (36 из 90) завершилась родами. В группе 1А беременность прогрессировала и завершилась родами у 46% (20 из 43) женщин, причем у женщин с наличием БФ этот показатель был в 4,3 раза выше, чем у женщин с сохраняющимся отсутствием БФ (54,3 vs 12,5%,  $R_{тмф} = 0,037$ ). В группе 1В беременность завершилась родами у 34% (16 из 47) женщин. Количество родов также было существенно выше у женщин с наличием БФ, чем в оппозитной группе (45,5 vs 7,2%;  $R_{тмф} = 0,01$ ).

У женщин с вторичным бесплодием (ПНБ) беременность наступила у 88,8% (87 из 97) женщин и завершилась родами у 65,5% (57 из 87), что было достоверно чаще, чем при первичном бесплодии (65,5% vs 40%;  $\chi^2 = 0,05$ ). Как и при первичном бесплодии, частота родов в группе 2В была несколько ниже, чем в группе 2А (53,7% vs 76,8%), однако различия были недостоверны. При этом успешная беременность у женщин с наличием БФ была достоверно выше, чем у женщин с отсутствием БФ (28 против 70,4%). Частота родов в подгруппах со сниженным и сохранным ответом в СКЛ также не различалась.

## Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют, что после проведения АИЛ две трети женщин, имеющих в анамнезе ПНБ,



**Рисунок 1.** Частота встречаемости женщин с наличием блокирующих факторов в исследуемых группах после проведения аллоиммунизации

**Примечание.** Группа 1 – женщины с первичным бесплодием, группа 2 – женщины с вторичным бесплодием. 1А, 2А – женщины с сохранным ответом в СКЛ; 1Б, 2В – женщины со сниженным ответом в СКЛ.

**ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА РОДОВ В ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ БЛОКИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ**

Группы	Число случаев родов (%)		
		ИВ <sub>БФ</sub> < 0,7	ИВ <sub>БФ</sub> > 0,7
Первичное бесплодие	40% (36/90)	50% (34/68)	9% (2/22)
Группа 1А (n = 43)	46% (20/43)	54,2% (19/35)*	12,5% (1/8)
Группа 1В (n = 47)	34% (16/47)	45,5% (15/33)*	7,1% (1/14)
Вторичное бесплодие	59% (57/97)	70,4%(50/71)#	28% (7/25)
Группа 2А (n = 56)	62% (35/56)	69,7% (30/43)*	38,4% (5/13)
Группа 2В (n = 41)	54% (22/41)	68,9% (20/29)*	16,6% (2/12)

**Примечание.** \* – Р<sub>тмф</sub> < 0,05 – достоверность различий значений в группах женщин с наличием и отсутствием БФ в сыворотке крови после аллоиммунизации; # – в группах женщин с первичным и вторичным бесплодием. 1А, 2А – женщины с сохранным ответом в СКЛ; 1Б, 2В – женщины со сниженным ответом в СКЛ.

успешно вынашивают беременность, которая заканчивается родами. Эти результаты полностью согласуются с данными других авторов, продемонстрировавших высокую эффективность АИЛ в профилактике невынашивания беременности. Так, успешной беременности, завершившейся родами, после проведения АИЛ удается достичь у 40-80% женщин с ПНБ [27, 28, 39, 40, 43]. В то же время, учитывая полученные ранее данные о сходстве иммунных нарушений при первичном и вторичном бесплодии и, в частности, отсутствии БФ [1], нами впервые предпринята попытка применить метод АИЛ для лечения infertility у женщин с первичным бесплодием неясной этиологии. Данный подход оказался вполне оправданным, поскольку наступление беременности, закончившейся родами, удалось добиться у 40% женщин. И хотя появление методов

вспомогательных репродуктивных технологий позволило существенно продвинуться в терапии первичного бесплодия, лечение данной патологии представляет существенные трудности. Поэтому полученный результат, на наш взгляд, свидетельствует о перспективности применения АИЛ для лечения infertility у женщин данной категории.

Проведенные исследования показали, что, независимо от того, является ли бесплодие первичным или вторичным, в обоих случаях АИЛ сопровождается эффективной генерацией БФ у большей части (74-75%) женщин. При этом генерация БФ наблюдается как у женщин со сниженным ответом клеток в СКЛ, так и в группах женщин с изолированным дефицитом БФ при сохранном ответе в СКЛ. Согласно данным литературы, недостаточная продукция БФ может

быть следствием высокой степени гистосовместимости партнеров по антигенам HLA-DR/DQ локусов, которые отвечают за уровень иммунного ответа на аллоантигены [21, 36]. Запуск иммунного ответа возможен только при достаточных различиях партнеров по HLA-антигенам, а сходство свыше 25% расценивается как неблагоприятный фактор для репродукции [14, 36]. Согласно полученным нами данным, снижение ответа в СКЛ регистрировалось только у половины женщин с дефицитом БФ, тогда как у другой половины отсутствие БФ не сопровождалось низким ответом МНК на стимуляции лимфоцитами партнера. Это означает, что отсутствие БФ может быть обусловлено причинами, не связанными со сходством супружеских пар по аллоантигенам. Действительно, если ранее предполагалось, что низкая реактивность лимфоцитов женщины к аллоантигенам партнера в СКЛ и дефицитом БФ у женщин с привычным невынашиванием неясного генеза ассоциированы со сходством супружеских пар по антигенам гистосовместимости [7, 17], то ряд более поздних исследований не подтвердил однозначность этих предположений [21, 32].

Как известно, генерация блокирующих факторов отражает активацию гуморального иммунного ответа против фетальных аллоантигенов, и этот процесс может в значительной степени усиливаться на фоне Th1→Th2 переключения или генерации регуляторных Т-клеток, подавляющих клеточный иммунитет. Соответственно, можно полагать, что при нарушениях «супрессорной» перестройки иммунной системы, генерация БФ может быть снижена. Проведенные нами ранее исследования показали, что дефицит БФ у женщин с сохранным ответом в СКЛ ассоциирован с низким количеством CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток, высоким уровнем продукции IFN $\gamma$ , IL-17 и низким содержанием IL-6 [1]. Дефицит числа

Treg и повышенная активность провоспалительных цитокинов, как возможная причина бесплодия, обсуждаются и другими авторами [5, 12, 41]. В этом аспекте заслуживают внимания данные о том, что проведение АИЛ сопровождается возрастанием количества циркулирующих Treg [42] и смещением цитокинового баланса в сторону доминирования Th2-цитокинов [11, 40, 43].

С другой стороны, можно предположить, что способность сывороток женщин блокировать ответ в СКЛ обусловлена не только действием БФ, но и другими ингибирующими факторами, концентрация которых может возрастать на фоне АИЛ. Так, например, было показано, что АИЛ сопровождается повышением продукции прогестерон-индуцирующего блокирующего фактора (PIBF), который продуцируется CD8 Т-клетками (в основном T $\gamma\delta$ ) и играет важную роль в переключении цитокинового баланса в сторону доминирования Th2-цитокинов [8, 31].

Еще одним важным моментом настоящего исследования явились данные, подтверждающие значительную роль БФ в обеспечении успешной беременности. Как при первичном бесплодии, так и в группе с ПНБ частота родов у женщин с наличием БФ превышала таковую в группах с дефицитом БФ, соответственно, в 5,5 и 2,5 раза. Генерация БФ после проведения АИЛ у женщин с привычным невынашиванием является хорошо известным фактом [23, 29]. В то же время выявление взаимосвязи между успешной беременностью и появлением БФ на фоне первичного бесплодия продемонстрировано нами впервые.

Таким образом, будучи одной из давно разработанных технологий, метод аллоиммунизации отцовскими лимфоцитами в сопровождении иммунологического мониторинга может занять определенную нишу в лечении бесплодия, причем не только вторичного, но и первичного генеза.

## Список литературы

1. Хонина Н.А., Тихонова М.А., Дзутцева И.Б., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Иммунные дисфункции у женщин с бесплодием неясного генеза // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 6. – С. 511-520.

*Ссылки 2-43 см. в References (стр. 68-70). See References for numbers 2-43 at pp. 68-70.*

## References

1. Honina N.A., Tikhonova M.A., Dzutseva I.B., Pasma N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Immunnye disfunktsii u zhenshchin s besplodiem neyasnogo geneza [Immune dysfunctions in women with unexplained infertility]. *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 2010, vol. 12, no.6, pp. 511-520.

2. Agarwal S., Kishore R., Halder A, Sharma R.K., Agarwal S.S. Outcome of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion following immunotherapy with allogeneic lymphocytes. *Hum. reprod.*, 1995, vol. 10, pp. 2280-2284.

3. Agerwal N., Gosh R., Jain A., Arya S.C. Elevated peripheral natural killer cell and infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, vol. 56, pp. 77-78.



4. Aoki K., Kajiura S., Matsumoto Y., Yagani Y. Clinical evaluation of immunotherapy in early pregnancy with X-irradiated paternal cells for primary and recurrent aborters. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, vol. 169, pp. 649-653.
5. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, pp. 2572-2578.
6. Askelund K., Liddell H.S., Zanderigo A.M., Fernando N.S., Khong T.Y., Stone P.R., Chamley L.W. CD83dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta*, 2004, vol. 25, pp. 140-145.
7. Beer A.E., Quebbeman J.F., Ayers J.W., Haines R.F. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1981, vol. 141, pp. 987-999.
8. Check J.H., Arwitz M., Gross J., Peymer M., Szekeres-Bartho J. Lymphocyte immunotherapy (LI) increases serum levels of progesterone induced blocking factor (PIBF). *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1997, vol. 37, pp. 17-20.
9. Clark D.A. Cell surface CD200 may predict efficacy of paternal mononuclear leukocyte immunotherapy in treatment of human recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009, vol. 61, pp. 75-84.
10. Clift L.E., Andriikova P., Frolikova M., Stopka P. Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice. *Reprod. Biol. Endocrinology*, 2009, vol. 7, pp. 1-9.
11. Gharesi-Fard B., Zolghadri J., Haghbin H. Soluble CD30 (sCD30) and effectiveness of leukocyte therapy in recurrent pregnancy loss patients. *J. Reprod. Immunol.*, 2013, vol. 97, pp. 240-244.
12. 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, pp. 301-308.
13. Kano T., Mori T., Furudono M., Ishikawa H., Watanabe H., Kikkawa E., Warita T., Onizuka M., Takahashi M., Maeda Y., Naruse T., Inoko H., Agrawal S., Kishore R., Halder A. Human leukocyte antigen may predict outcome of primary recurrent spontaneous abortion treated with paternal lymphocyte alloimmunization therapy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, vol. 58, pp. 383-387.
14. Karagozoglu H., Karlikaya G., Ismailoglu B. Clinical outcomes of 6 year-experience on HLA-typing. *Fert. Steril.*, 2008, vol. 90, pp. 308-309.
15. Khonina N.A., Broitman E.V., Shevela E.Y., Pisman N.M., Chernykh E.R. Mixed lymphocyte reaction blocking factors (MRL-Bf) as potential biomarker for indication and efficacy of paternal lymphocyte immunization in recurrent spontaneous abortion. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2013, DOI 10.1007/s00404-013-2832-x.
16. Kim D. Ly, Aziz N., Safi J., Agarwal A. Evidence-Based Management of Infertile Couples with Repeated Implantation Failure Following IVF. *Current Women's Health Reviews*, 2010, vol. 6, pp. 200-218.
17. Kishore R., Agrawal S., Halder A., Das V., Shukla B.R. HLA sharing, anti-paternal cytotoxic antibodies and MLR blocking factors in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 1996, vol. 2, pp. 177-183.
18. Kling C., Steimann J., Westphal E., Magez J., Kabelitz D. Adverse effects of intradermal allogeneic lymphocyte immunotherapy: acute reactions and role of autoimmunity. *Hum. Reprod.*, 2006, vol. 21, pp. 429-435.
19. Kling C., Schutzler A., Wilke G. Two-year outcome after recurrent implantation failure: prognostic factors and additional interventions. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2008, vol. 278, pp. 135-142.
20. Martínez F.F., Knubel C.P., Sánchez M.C., Cervi L., Motrán C.C. Pregnancy-specific glycoprotein 1a activates dendritic cells to provide signals for Th17-, Th2-, and Treg-cell polarization. *Eur. J. Immunol.*, 2010, vol. 42, pp. 1573-1584.
21. Moghraby J.S., Tamim H., Anacan V., Al Khalaf H., 21by S.A. HLA sharing among couples appears unrelated to idiopathic recurrent fetal loss in Saudi Arabia. *Hum. Reprod.*, 2010, vol. 25, pp. 1900-1905.
22. Mjösberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas. *Biol. Reprod.*, 2010, vol. 82, pp. 698-705.
23. Nonaka T., Takakuwa K., Ooki I., Akashi M., Yokoo T., Kikuchi A., Tanaka K. Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions – prospective non-randomized cohort study. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, vol. 58, pp. 530-536.
24. Payne R., Rolfs M.R. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J. Clin. Invest.*, 1958, vol. 37, pp. 1756-1763.

25. Pandey M.K., Saxena V., Agrawal S. Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies in human pregnancy. *Pregnancy Childbirth*, 2003, vol. 3, pp. 1-7.
26. Pandey M.K., Agrawal S. Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: a current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization for women with recurrent spontaneous abortion. *International Immunopharm*, 2004, vol. 4, pp. 289-298.
27. 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, no. 3, pp. 161-172.
28. Pandey M.K., Rani R., Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2005, vol. 272, pp. 95-108.
29. Pandey M.K., Halder A., Agarwal S., Srivastava M., Agarwal S.S., Agrawal S. Immunotherapy in recurrent spontaneous abortion: randomized and non-randomized trials. *Internet J. Gynecol. Obstetrics*, 2006, ISSN: 1528-8439.
30. Porter N.F. La Coursiere Y., Scot J.R. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2006. CD 000112.
31. Raghupathy R., Al-Mutawa E., Al-Azemi M., Makhseed M., Azizieh F., Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, vol. 80, pp. 91-99.
32. Rull K., Nagirnaja L., Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet*, 2012, vol. 3: 34.doi: 10.3389
33. Shetty S., Ghosh K. Anti-phospholipid antibodies and other immunological causes of recurrent foetal loss – a review of literature of various therapeutic protocols. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009, vol. 62, pp. 19-24.
34. Smith J.B., Cowchock F.S. Immunological studies in recurrent spontaneous abortion: effects of immunization of women with paternal mononuclear cells on lymphocytotoxic and mixed lymphocyte reaction blocking antibodies and correlation with sharing of HLA and pregnancy outcome. *J. Reprod. Immunol.*, 1988, vol. 14, pp. 99-113.
35. Taglauer E.S., Adams Waldorf K.M., Petroff M.G. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, vol. 54, pp. 421-430.
36. Takakuwa K., Honda K., Yokoo T., I.Hataya, Tamura M., Tanaka K. Molecular genetic studies on the compatibility of HLA-class II alleles in patients with unexplained recurrent miscarriage in the Japanese population. *Clin. Immunol.*, 2006, vol. 118, pp. 101-107.
37. The practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil. Steril.*, 2006, vol. 86, pp. 111-114.
38. Umopathy S., Shankarkumar A., Ramrakhiyani V., Ghosh K. Role of anti-human lymphocyte culture cytotoxic antibodies in recurrent spontaneous pregnancy loss women. *J. Hum. Reprod. Sci.*, 2011, vol. 4, pp. 17-19.
39. Wegener S., Schnurstein K., Hansch S., Briese V., Busecke A., Müller H. Immunotherapy with Paternal Lymphocytes for Recurrent Miscarriages and Unsuccessful in vitro Fertilization Treatment. *Transfusion Med. Hemother*, 2006, vol. 33, pp. 501-507.
40. Wilczyński J.R., Radwan P., Tchórzewski H., Banasik M. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2012, vol. 60, pp. 151-160.
41. Winger E.E., Reed J.L. Low circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, vol. 66, pp. 320-328.
42. Yang H., Qiu L., Di W., Zhao A., Chen G., Hu K., Lin Q. Proportional change of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil. Steril.*, 2009, vol. 92, pp. 301-305.
43. Yokoo T., Takakuwa K., Ooki I., Kikuchi A. Tamura M., Tanaka K. Alteration of TH1 and TH2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion before and after immunotherapy with the husband's mononuclear cells. *Fertil. Steril.*, 2006, vol. 85, pp. 1452-1458.