

СОСТОЯНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА И ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ У ЖЕНЩИН С ТРОМБОФИЛИЕЙ

Д. Ш. ТАРАВНЕХ

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

Изучено состояние иммунологического статуса и цитокинов при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) у женщин с тромбофилией. У пациенток с наступившими беременностями в ходе программ ЭКО изначально активировано гуморальное звено иммунной системы, а у женщин с неэффективными программами ЭКО — клеточное. Стимуляция суперовуляции снижает уровень IL-8 у женщин в группе ЭКО+ и тем самым нивелирует проявления гуморального звена и мало влияет на клеточный иммунитет.

Ключевые слова: иммунологический статус, экстракорпоральное оплодотворение, тромбофилия, трубное бесплодие.

Одним из направлений лечения бесплодия является применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в том числе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [1]. Повышение эффективности ЭКО связано с исследованиями, направленными на изучение иммунологической регуляции репродуктивной функции женщины [2]. Известно, что иммунокомпетентные клетки (макрофаги, лимфоциты) и продуцируемые ими цитокины (интерлейкины, ростовые факторы, хемокины) принимают участие в механизмах фолликулогенеза, овуляции, формирования и функционирования желтого тела, циклических морфофункциональных изменений эндометрия, оплодотворения и имплантации [3].

Генетически обусловленные и приобретенные — антифосфолипидный синдром, дефекты гемостаза — могут усугублять воздействие на иммунологические механизмы, влияющие на процессы оплодотворения [4]. У женщин с тромбофилией наблюдается значительное снижение чувствительности рецепторного аппарата эндометрия вследствие введения больших доз препаратов, применяемых для контролируемой стимуляции суперовуляции, во время проведения ЭКО [5]. При тромбофилии у пациенток повышается риск развития повышенного внутрисосудистого свертывания крови с образованием в ней множества микросгустков фибрина и агрегатов клеток крови (тромбоцитов, эритроцитов), блокирующих микроциркуляцию в органах и тканях, в том числе в матке и эндометрии [6]. По некоторым данным, одной из вероятных причин плохой «приживаемости» эмбриона является изначально высокая иммунореактивность организма [7].

На сегодняшний день не существует полной картины, отражающей состояние иммунологического статуса и цитокинов в исходе программ ЭКО у пациенток с тромбофилией и бесплодием трубного генеза. Однако эти процессы имеют большое

значение для получения основных показателей иммунологической системы при проведении ВРТ с целью определения патологических маркеров, приводящих к неудачным попыткам ЭКО.

Цель настоящего исследования — выяснение состояния иммунологического статуса у женщин с тромбофилией и неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

После проведения ЭКО обследованы 65 пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и тромбофилией, которые составили основную группу. Контрольная группа сформирована из 30 здоровых женщин на ранних сроках гестации, у которых беременность наступила самостоятельно.

Основная группа была разделена на две подгруппы: в I вошли 30 пациенток с тромбофилией и неудачной попыткой ЭКО (ЭКО-), во II — 35 женщин на ранних сроках гестации, у которых беременность наступила вследствие проведения ВРТ (ЭКО+).

Пациентки основной и контрольной групп были сопоставимы по возрасту, данным акушерско-гинекологического анамнеза, частоте сопутствующей гинекологической и экстрагенитальной патологии и лабораторным показателям обследования. Возраст обследуемых варьировал от 25 до 42 лет и составил в среднем $30,6 \pm 0,5$ года. Пациентки основной группы — нерожавшие, у каждой из них в анамнезе от 2 до 9 неудачных попыток ЭКО.

Основные популяции и субпопуляции лимфоцитов Т- и В-систем иммунитета были исследованы с использованием моноклональных антител (ООО «Сорбент», РФ). Концентрацию иммуноглобулинов классов А, М и G устанавливали методом радиальной иммунодиффузии по Манчини и др. (1965). Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и интерлейкинов проводили с применением тест-систем фирмы Bender Medsystems (Австрия). Выбор методов исследования тромбофилии осуществлялся в соответствии

Таблиця 1

Состояние клеточного иммунитета
обследованных пациенток

Показатель	Основная группа		Контроль- ная груп- па, n = 30
	I подгруп- па, n = 30	II подгруп- па, n = 35	
Лейкоциты $\times 10^9$	7,8 \pm 0,40*	6,6 \pm 0,30	6,7 \pm 0,50
Лимфоциты $\times 10^9$	2,3 \pm 0,03*	1,5 \pm 0,05	1,9 \pm 0,06
%	29,8 \pm 0,50*	27,1 \pm 0,50	27,4 \pm 0,40
CD3 ⁺ $\times 10^9$	1,4 \pm 0,06	0,9 \pm 0,02	1,0 \pm 0,03
%	59,5 \pm 1,70	55,8 \pm 1,20	57,0 \pm 2,00
CD4 ⁺ $\times 10^9$	0,64 \pm 0,01*	0,48 \pm 0,01	0,51 \pm 0,02
%	30,1 \pm 1,50	28,7 \pm 1,40	28,3 \pm 1,40
CD8 ⁺ $\times 10^9$	0,25 \pm 0,07*	0,20 \pm 0,03***	0,47 \pm 0,02
%	23,4 \pm 1,20	21,6 \pm 1,10	28,8 \pm 1,30
CD16 ⁺ $\times 10^9$	0,12 \pm 0,04*	0,14 \pm 0,03*	0,18 \pm 0,01
%	7,2 \pm 1,10	8,3 \pm 1,20	9,7 \pm 1,20
CD22 ⁺ $\times 10^9$	0,8 \pm 0,04*	1,0 \pm 0,02*	0,16 \pm 0,03
%	5,8 \pm 0,30	6,1 \pm 0,20	7,8 \pm 0,40
T/V $\times 10^9$	7,2 \pm 0,10*	6,7 \pm 0,20*	6,3 \pm 0,10
%	8,1 \pm 0,20	8,9 \pm 0,10	7,3 \pm 0,20

* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой;** $p < 0,05$ – по сравнению с данными I подгруппы

с рекомендациями по лабораторной диагностике системы гемостаза [8]. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программной системы STATISTICA 10,0, во всех случаях статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Проведенное нами иммунологическое обследование наблюдавшихся пациенток выявило определенные отклонения от характерного для здоровых беременных иммунного статуса (табл. 1). Эти изменения выражались по-разному в зависимости от результатов ЭКО. В I подгруппе пациенток при отрицательных результатах ЭКО отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества лейкоцитов, во II – с положительными результатами ЭКО – этот показатель практически не отличался от группы здоровых женщин.

У пациенток при неудачных попытках ЭКО по сравнению с женщинами контрольной группы абсолютное количество лимфоцитов было немного увеличено, а при ЭКО+ (II подгруппа) – уменьшено. В I подгруппе пациенток отмечалось повышение активности T-системы иммунитета, преимущественно за счет абсолютного содержания CD4⁺ (0,64 \pm 0,01), в контрольной группе – 0,51 \pm 0,02.

При оценке субпопуляционного состава T-клеток обращало на себя внимание снижение концентрации клеток T-супрессорного ряда – CD8⁺ как при ЭКО– (0,25 \pm 0,07), так и при ЭКО+ (0,20 \pm 0,03) по сравнению с контрольной группой (0,47 \pm 0,02; $p < 0,05$).

Активность естественных киллеров (CD16⁺) была достоверно снижена как в I, так и во II подгруппе ($p < 0,05$) по сравнению с физиологической беременностью. Можно предположить, что при проведении ЭКО под воздействием гормональной стимуляции суперовуляции имел место выброс в периферическую кровь незрелых, функционально неполноценных естественных киллеров. Среди других изменений следует отметить увеличение соотношения T/V-лимфоцитов в I подгруппе, что, видимо, стало следствием не только изменения содержания T-лимфоцитов (CD3⁺), но и снижением концентрации B-лимфоцитов (CD22⁺). Отмечено также процентное увеличение T/V-лимфоцитов при положительных результатах ЭКО за счет снижения содержания как CD3⁺, так и CD22⁺, что подтверждает информативность этого показателя для наступления беременности. В результате проведенного исследования обнаружено значительное снижение абсолютного количества CD22⁺ (0,8 \pm 0,04) у пациенток I и II (1,0 \pm 0,02) подгрупп по сравнению с контролем (0,16 \pm 0,03; $p < 0,05$).

Нами установлено, что в I подгруппе пациенток с тромбофилией, которым проводилась стимуляция суперовуляции, есть изменения клеточного иммунитета: увеличение абсолютного и относительного количества лимфоцитов, популяции T-клеток (CD3⁺), выраженное снижение концентрации T-супрессоров (CD8⁺), уменьшение естественных киллеров (CD16⁺), а также B-клеток

(CD22⁺). Во II подгруппе при ЭКО+ отмечено существенное угнетение активности факторов иммунитета, что выражалось в уменьшении содержания T-клеток (CD3⁺), значительном снижении концентрации T-супрессоров (CD8⁺), повышении концентрации естественных киллеров (CD16⁺) и B-клеток (CD22⁺).

Стимуляция суперовуляции в программах ЭКО у женщин с тромбофилией существенно отражается и на состоянии показателей их гуморального иммунитета. Нами изучено содержание иммуноглобулинов классов A, M и G в сыворотке крови у обследованных пациенток (табл. 2). Концентрация IgM в I подгруппе была достоверно повышена (1,64 \pm 0,03; $p < 0,05$), во II – достоверно снижена (0,96 \pm 0,03; $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (1,19 \pm 0,04 г/л). Повышение уровня IgM в I подгруппе указывает на наличие стимуляции иммунной системы пациенток. Уровни IgA и IgG были достоверно ($p < 0,05$) снижены у пациенток основной группы: IgA – 1,05 \pm 0,04 г/л – в I подгруппе; 1,29 \pm 0,02 г/л – во II подгруппе, по сравнению с контролем (1,58 \pm 0,06 г/л); IgG (9,28 \pm 0,4 г/л – в I подгруппе; 11,06 \pm 0,3 г/л – во II подгруппе и 16,97 \pm 0,4 г/л – в контроле, $p < 0,05$), что, очевидно, связано с избыточной стимуляцией иммунной системы, а затем, как следствие, истощением реактивности гуморального звена общего иммунитета.

Таблиця 2

Состояние гуморального иммунитета
обследованных пациенток

Показатель	Основная группа		Контроль- ная группа, n = 30
	I подгруп- па, n = 30	II подгруп- па, n = 35	
IgA, г/л	1,05±0,04*	1,29±0,02*	1,58±0,06
Ig M, г/л	1,64±0,03*	0,96±0,03**	1,19±0,04
Ig G, г/л	9,28±0,40*	11,06±0,30**	16,97±0,40
ИГИ	9,3±0,40*	11,5±0,60*	18,6±0,80
ЦИК, ед./мл	99,8±1,40*	90,5±1,60*	73,2±1,50

Для более объективной оценки концентрации иммуноглобулинов мы вычисляли иммуноглобулиновый индекс (ИГИ), характеризующий соотношение двух ведущих классов иммуноглобулинов в сыворотке – IgG и IgM, что может быть использовано для идентификации особенностей изменения состояния гуморального звена иммунитета. Так, в контрольной группе беременных наблюдалось почти двукратное повышение ИГИ по сравнению с основной группой пациенток, что свидетельствует о смещении продукции иммуноглобулинов в сторону IgG, что играет важную роль в обеспечении нормального развития беременности, поскольку именно этот иммуноглобулин проходит трансплацентарный барьер, обеспечивая инфекционную защиту плода. У женщин основной группы с тромбофилией и стимуляцией суперовуляции во время подготовки к ЭКО ИГИ был ниже по сравнению с контролем (9,29±0,4 в I подгруппе; 11,5±0,6 – во II и 18,6±0,8 – в контроле, $p < 0,05$).

Результаты проведенного исследования показали увеличение ЦИК у пациенток основной группы: в I подгруппе – в 1,4 раза, а во II – в 1,2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таким образом, механизм иммунных взаимодействий при стимуляции суперовуляции у женщин с тромбофилией при положительных или отрицательных результатах ЭКО достаточно сложный и имеет свои особенности, возможно, влияющие на результаты ВРТ.

Цитокины являются информационными молекулами, которые адаптируют защитные механизмы для поддержания гомеостаза организма. Нами изучено содержание интерлейкинов IL-1α, IL-1β, IL-8 и фактора некроза опухоли (TNFα) у обследованных пациенток. У пациенток I подгруппы наблюдалось достоверное повышение концентрации всех цитокинов по сравнению с контрольной группой: IL-1α в периферической крови – в 7,8 раза, TNFα – в 70 раз, IL-8 – в 1,6 раза, а показатель провоспалительного интерлейкина IL-1β – в 1,4 раза по сравнению со здоровыми беременными (табл. 3). У пациенток II подгруппы показатели изучаемых цитокинов были тоже повышены по сравнению с контрольной группой, но по абсолютным величинам значительно меньше, чем в I подгруппе.

Таблиця 3

Концентрация цитокинов в крови
обследованных пациенток

Цитоки- ны (пкг/мл)	Основная группа		Контроль- ная группа, n = 30
	I подгруппа, n = 30	II подгруп- па, n = 35	
IL-1α	96,0±7,0***	26,0±4,1*	12,3±3,1
IL-1β	11,0±2,0	7,0±2,0	8,1±2,2
IL-8	155,1±11,2**	54,1±7,2**	98,0±6,0
TNFα	1127,1±141,0***	92,0±16,0***	16,0±3,0

Примечание: Достоверность различий по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

В I подгруппе показатель IL-8 в периферической крови был в 2 раза меньше (54,1±7,2 пкг/мл), чем в контроле (98,0±6,0 пкг/мл), $p < 0,01$, а показатель провоспалительного интерлейкина IL-1β несколько уменьшался (до 7,0±2,0 пкг/мл) по сравнению с контрольной группой (8,1±2,2 пкг/мл) и не имел достоверных различий ни с I подгруппой, ни с контрольной группой ($p > 0,05$).

Высокий уровень IL-1α и TNFα в периферической крови основной группы пациенток, которым проводилась стимуляция суперовуляции во время программы ЭКО, отражает степень повышенной антигенной загрузки при тромбофилии.

На основании полученных данных исследования цитокинов можно предположить, что отрицательный результат проведения ЭКО заключается в повышенной иммунореактивности и значительном увеличении содержания IL-1α, IL-8 и TNFα в крови у женщин с тромбофилией. Однако тип иммунной реакции может быть различным, более того, от него напрямую зависит исход программы ЭКО. При тромбофилии формируется иммунный ответ в виде накопления патологических концентраций иммунных комплексов, которые способны выполнять роль первичных токсинов и приводить к развитию системного воспалительного ответа, что, возможно, обуславливает неудачные попытки ЭКО.

У женщин с наступившими беременностями в ходе программ ЭКО изначально активировано гуморальное звено иммунной системы, а у пациенток с неэффективными программами ЭКО – клеточное. Можно предположить, что стимуляция суперовуляции снижает уровень IL-8 у женщин в группе ЭКО+ и тем самым в определенной степени нивелирует проявления гуморального иммунитета и мало влияет на клеточный иммунитет. Стимуляция суперовуляции при ЭКО в целом оказывает положительное влияние на женщин с повышенной иммунореактивностью по гуморальному типу в отношении вынашивания плода. Высокая и не снижающаяся после стимуляции суперовуляции концентрация TNFα и, возможно, повышенная активность натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов, минимизируют возможность благоприятного исхода ВРТ.

Список літератури

1. Кулаков В. И. Медицинские аспекты репродукции: пути их решения / В. И. Кулаков, В. Н. Серов // Материалы XVI Международной конференции РАРЧ «Вспомогательные репродуктивные технологии сегодня и завтра». — Ростов-на-Дону, 2006. — С. 61–62.
2. Amato G. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles / G. Amato, M. Conte, G. Mazziotti // *Obstet. Gynecol.*— 2013.— Vol. 101, № 6.— P. 1177–1182.
3. Fasouliotis S. J. Maternal serum levels of interferon-gamma and interleukin 2 soluble receptor-alpha predict the outcome of early IVF pregnancies / S. J. Fasouliotis, S. D. Spandorfer, S. S. Witkin // *Hum. Reprod.*— 2014.— Vol. 19, № 6.— P. 1357–1363.
4. Iborra A. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman / A. Iborra, J. R. Palacio, P. Martinez // *Chem. Immunol. Allergy.*— 2015.— Vol. 88.— P. 150–162.
5. Kinnunen A. Chlamydia trachomatis heat shock protein-60 induced interferon-gamma and interleukin-10 production in infertile women / A. Kinnunen, H. M. Surcel, M. Halttunen // *Obstet. Gynecol.*— 2009.— Vol. 131, № 2.— P. 299–303.
6. Increased cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women after IVF / J. Y. Kwak-Kim, H. S. Chung-Bang, S. C. Ng, E. I. Ntrivalas // *Hum. Reprod.*— 2013.— Vol. 18, № 4.— P. 767–773.
7. Ng S. C. Expression of intracellular Th1- and Th2-cytokines in women with implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy / S. C. Ng, A. Gilman-Sachs, P. Thaker // *Am. J. Reprod. Immunol.*— 2012.— Vol. 48, № 2.— P. 77–86.
8. Тромбофилии и пути совершенствования анти-тромботической профилактики и терапии при беременности / З. С. Баркаган, Е. Ф. Котовщикова, Г. В. Сердюк [и др.] // *Сибирский мед. журн.*— 2014.— № 5.— С. 62–68.

СТАН ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАТУСУ І ЦИТОКІНІВ ПРИ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОМУ ЗАПЛІДНЕННІ У ЖІНОК ІЗ ТРОМБОФІЛІЄЮ

Д. Ш. ТАРАВНЕХ

Вивчено стан імунологічного статусу і цитокінів при екстракорпоральному заплідненні (ЕКЗ) у жінок із тромбофілією. У пацієнок із вагітностями, що настали, в ході програм ЕКЗ спочатку активовано гуморальну ланку імунної системи, а у жінок із неефективними програмами ЕКЗ — клітинну. Стимуляція суперовуляції знижує рівень ІЛ-8 у жінок у групі ЕКЗ+ і тим самим нівелює прояви гуморальної ланки і мало впливає на клітинний імунітет.

Ключові слова: імунологічний статус, екстракорпоральне запліднення, тромбофілія, трубне безпліддя.

THE STATE OF IMMUNE STATUS AND CYTOKINES AT IN VITRO FERTILIZATION IN WOMEN WITH THROMBOPHILIA

D. Sh. TARAVNEKH

The state of the immunological status and cytokines at in vitro fertilization (IVF) in women with thrombophilia was investigated. The humoral link of the immune system is originally activated in patients with pregnancies during IVF programs. In women with ineffective IVF programs, the cellular link is activated. Stimulation of superovulation reduces the level of IL-8 in women in group IVF+ and thus eliminates the manifestations of humoral link and has little effect on cellular immunity.

Key words: immunological status, in vitro fertilization, thrombophilia, tubal infertility.

Поступила 30.06.2016