

УДК: 618.177 - 089.888.11:618.11 - 008.61:612.017

© Коллектив авторов, 2010

ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОК С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ БЕСПЛОДИЕМ ПРИ ИНДУКЦИИ СУПЕРОВУЛЯЦИИ В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Грищенко Н.Г.^{1,4}, Грищенко В.И.^{1,2,4}, Чайка В.К.³, Гольцев А.Н.², Геродес А.Г.^{2,4}

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков¹; Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, Харьков²; Донецкий региональный центр охраны материнства и детства, Донецк³; Центр репродукции человека «Имплант», г. Харьков⁴

Грищенко Н.Г., Грищенко В.И., Чайка В.К., Гольцев А.Н., Геродес А.Г. Динамика цитокинового профиля периферической крови у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием при индукции супероувляции в программе экстракорпорального оплодотворения // Украинський морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, № 4. – С. 47-50.

Были исследованы уровни про- и противовоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10, а также ИЛ-1 β и ФНО α в сыворотке крови 30 здоровых доноров яйцеклеток и 41 женщины с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза в анамнезе, а также влияние на исследуемые показатели контролируемой гиперстимуляции яичников при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения у данных пациенток. Выявлены различия в цитокиновом профиле исследуемых групп, что, по-видимому, определяется перенесенными воспалительными заболеваниями, их длительностью и течением. Установлена достоверная положительная динамика изменения показателя ИЛ-1 β (уменьшение в 1,34 раза и приближение к показателям контроля) после индукции супероувляции. Тем не менее, контролируемая гиперстимуляция яичников, оказывая определенное влияние на обмен некоторых цитокинов, не приводила к выраженной структурной перестройке цитокинового профиля в целом.

Ключевые слова: бесплодие, экстракорпоральное оплодотворение, цитокины, хронические заболевания органов малого таза.

Грищенко М.Г., Грищенко В.И., Чайка В.К., Геродес Г.Г. Динаміка цитокинового профілю периферичної крові у пацієнток з трубно-перитонеальним безпліддям при індукції супероувляції в програмі екстракорпорального запліднення // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, № 4. – С. 47-50.

Були досліджені рівні про-і протизапальних цитокинів ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-4, ІЛ-10, а також ІЛ-1 β та ФНП α в сироватці крові 30 здорових донорів яйцеклітин і 41 жінки з хронічними запальними захворюваннями органів малого таза в анамнезі, а також вплив на досліджувані показники контрольованої гіперстимуляції яєчників при лікуванні безпліддя методом екстракорпорального запліднення у цієї групи пацієнтів. Були виявлені відмінності в цитокиновому профілі досліджуваних груп, які можна розцінювати як наслідки перенесених запальних захворювань органів малого таза у групі хворих з трубно-перитонеальним безпліддям. Встановлена достовірна позитивна динаміка зміни показника ІЛ-1 β (зменшення в 1,34 рази і наблизнення до показників контролю) після індукції супероувляції. Тим не менш, контрольована гіперстимуляція яєчників, надаючи певний вплив на обмін деяких цитокинів, не призводила до вираженої структурної перебудови цитокинового профілю в цілому.

Ключові слова: безпліддя, екстракорпоральне запліднення, цитокини, хронічні запальні захворювання органів малого таза.

Gryshchenko N.G., Gryshchenko V.I., Chajka V.K., Gerodes A.G. Dynamics of peripheral blood cytokine profile in IVF-patients with tubal infertility during the superovulation induction // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, № 4. – С. 47-50.

Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines IL-2, IL-6, IL-8, IL-4, IL-10 as well as IL-1 β and TNF-alpha in serum of 30 healthy oocyte donors and 41 infertile patients with chronic inflammatory disease of the pelvic organs in history have been investigated. Effect of controlled ovarian hyperstimulation on the studied parameters in these patients was determined. Differences in the cytokine profile of patients with tubal infertility and the control group were found. Apparently, these differences are explained by the presence of inflammatory diseases of the pelvic organs in history of patients with tubal infertility. Significant changes in the level IL-1 β after superovulation induction were observed (decrease of 1.34 times and the approach to that of the control group). Nevertheless, controlled ovarian hyperstimulation, providing a definite influence on the level of IL-1 β not led to a severe restructuring of cytokine profile and did not affect the levels of other cytokines.

Key words: infertility, IVF, cytokines, chronic inflammatory disease of the pelvic organs.

Нормальное развитие и функционирование репродуктивной системы происходит при тесном взаимодействии иммунной и эндокринной систем [1]. Гормональная регуляция репродуктивных процессов на клеточном уровне реализуется через пептидные ростовые факторы, среди которых особая роль отводится цитокинам, продуцируемым иммунокомпетентными клетками (ИКК) [5, 6]. Вместе с тем роль иммунной системы в регуляции самых ранних этапов репродуктивного процесса — фолликулогенеза, овуляции, донимплантационных этапов развития эмбриона и имплантации изучена недостаточно. Возможность для исследования иммунных механизмов регуляции этих процессов у человека появилась с внедрением в практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и, в частности, экстракорпо-

рального оплодотворения (ЭКО).

Трубно-перитонеальное бесплодие, обусловленное нарушением проходимости или функциональной несостоятельностью маточных труб, по данным различных авторов выявляется у 35 – 60% пациенток с нарушением репродуктивной функции. Наиболее частой причиной возникновения этой формы бесплодия являются воспалительные заболевания органов малого таза и их последствия [4, 3]. Явления иммунодефицита, которыми сопровождается хронический воспалительный процесс, в значительной степени влияют на его течение и обусловлены длительностью и тяжестью перенесенного заболевания [5, 9].

В условиях широкого применения ВРТ в клинике лечения бесплодия проблема хронических воспалительных заболеваний органов малого таза

(ХВЗОМТ) остается актуальной несмотря на то, что ЭКО позволяет достичь наступления беременности даже при отсутствии у пациентки маточных труб. При этом эффективность лечения трубно-перитонеального бесплодия при использовании ВРТ достигает 40% на один лечебный цикл [6]. Но даже при относительно высокой эффективности необходимо продолжать поиск причин неудач. В литературе есть сообщения о том, что ХВЗОМТ являются фактором, ухудшающим прогноз эффективности ВРТ [16].

Известно, что хронические воспалительные процессы любой локализации, в том числе и в малом тазу, оказывают влияние на иммунный статус пациенток [2,8], а его дисфункция может приводить к нарушению процессов созревания ооцитов, взаимодействия гамет и имплантации эмбрионов при проведении ЭКО [13].

Целью данной работы была оценка характера измененной цитокиновой профили у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием при контролируемой гиперстимуляции яичников (КГЯ) в рамках процедуры ЭКО и сопоставление полученных данных с контрольными значениями, полученными у здоровых женщин.

Материалы и методы. Было проведено обследование 41 супружеской пары с бесплодием, обусловленным перенесенными ХВЗОМТ, обратившейся в Центр репродукции «Имплант» (Харьков) и 30 добровольных доноров яйцеклеток. Перед включением в протокол КГЯ бесплодные супружеские пары и доноры ооцитов были обследованы в общепринятом объеме, согласно клиническому протоколу МЗ Украины, регламентирующему тактику ведения женщин с бесплодием (Наказ №582 від 15.12.2003 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги»).

При индукции супероуляции был использован общепринятый «длинный протокол» с десенсибилизацией гипофиза, начинающейся в лютеиновой фазе цикла, предшествующего лечебному, с использованием «дейли» - форм аналогов гонадотропина - рилизинг гормона (Грипторелин, Dipherelin, «Beaufour Ipsen Pharma»). Для индукции фолликулогенеза применяли препарат рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (Gonal-F, «Serono»). Мониторинг фолликулогенеза и изменения структуры эндометрия проводили при помощи ультразвукового сканирова-

ния органов малого таза с интервалом 1 – 3 суток на ультразвуковом экспертном монохромном сканере Falcon 2101 EXL B-K Medical, Дания. При этом использовался вагинальный секторальный датчик с частотой сканирования 7,5 МГц. Через 34 – 35 часов после введения триггерной дозы хорионического гонадотропина (10000 ЕД, Прегнил, «Schering-Plough»), имитирующего эндогенный пик лютеинизирующего гормона, у всех пациенток, включенных в исследование, под ультразвуковым контролем в асептических условиях была проведена аспирация содержимого фолликулов с использованием специализированного аспиратора (Cook Aspiration Unit, K-MAR-5200 Vacuum Pump, COOK MEDICAL INC).

До начала протокола стимуляции и в день получения яйцеклеток проводили забор образцов крови пациенток. Определение концентрации ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10, а также ИНФγ и ФНОα в периферической крови осуществляли на микропланшетном микроанализаторе Stat Fax 2100 (США) иммуноферментным методом с использованием набора реактивов ООО «Цитокин» (Россия) соответствии с рекомендациями производителя.

Собственные результаты и их обсуждение.

В таблице 1 приведены результаты определения содержания цитокинов в периферической крови в выделенных клинических группах. Существенные отличия от норматива у больных до КГЯ выявлены в содержании ИЛ-6 и ИЛ-4, уровни которых были соответственно в 2 и 1,7 раз ниже, чем в контроле ($P < 0,05$), а также уровни ИЛ-2 ($P < 0,05$), который определялся в группе больных с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ, и не был выявлен. Не удивительным является повышение содержания провоспалительного цитокина ИЛ-2 при развитии ХВЗОМТ [5]. Однако степень снижения содержания ИЛ-6, который также относится к тому же, что и ИЛ-2 паттерну, достаточно неожиданна.

В отношении остальных цитокинов достоверных отличий от норматива не установлено.

Обращает на себя внимание тот факт, что в крови пациенток не был выявлен ФНОα. Возможно, это связано с тем, что стимулирующий эффект ИЛ-2 относительно продукции ФНОα реализуется только при определенном базовом уровне ИЛ-2, концентрация которого как видно, не была достаточно высокой.

Таблица 1. Содержание цитокинов в периферической крови до и после индукции супероуляции в выделенных клинических группах ($M \pm m$)

Показатель	Больные с ХВЗОМТ до КГЯ, n=41	Больные с ХВЗОМТ в день получения ооцитов, n=48	Контроль (здоровые доноры в день получения ооцитов), n=30
ИЛ-6, пкг/мл	11,4 ± 1,1 *	10,4 ± 0,9 *	25,1 ± 3,0
ИЛ-8, пкг/мл	27,0 ± 2,6	32,3 ± 2,6	25,9 ± 3,0
ИЛ-2, пкг/мл	2,2 ± 0,3 *	2,5 ± 0,4 *	0
ИЛ-4, пкг/мл	0,7 ± 0,1 *	0,8 ± 0,1 *	1,2 ± 0,1
ИЛ-10, пкг/мл	11,6 ± 1,4	9,0 ± 0,7	9,2 ± 1,1
ИНФγ, пкг/мл	317,3 ± 30,0	236,3 ± 19,3 ⁰	240,8 ± 28,3
ФНОα	Не выявлен	Не выявлен	Не выявлен

Примечание. * - $P < 0,05$ при сравнении с контролем; ⁰ - $P < 0,05$ – при сравнении групп больных до и после КСО.

В связи с возможными разнонаправленными отклонениями значений изучаемых признаков от норматива было изучено распределение больных с различными векторами нарушений (табл. 2).

Данные табл. 2 указывают, что доля больных с отклоненными значениями показателей была достоверно выше ($P < 0,05$) таковой с нормативными значениями. Число больных с нормативными значениями цитокинов колебалось от 3,9% до 32,7%. Исключение составил ИЛ-2, который, как и в контроле, не определялся в периферической крови 70,6% больных, а в 29,4% он был повышенным (т.е. больше 0).

При этом доля больных с пониженным со-

держанием цитокинов (кроме ИЛ-2), существенно превышала таковую с повышенным его уровнем и была отмечена для всех цитокинов: ИЛ-6 – в 10 раз; ИЛ-8 – в 2,75 раз; ИЛ-4 – в 5,1 раз; ИЛ-10 – в 2,6 раза и для ИНФγ – в 1,9 раза.

В целом, у 61,38% больных до КГЯ отмечалась гипопродукция цитокинов и только у 17,83% – повышение их содержания. Эти данные, по-видимому, связаны с длительностью и тяжестью воспалительного процесса. При начальных его проявлениях происходит активация выработки как про- так и противовоспалительных цитокинов, а при длительном его персистировании – отмечается истощение их продукции [5, 9].

Таблица 2. Распределение больных согласно значениям доверительного интервала норматива показателей цитокинового профиля до и после индукции суперовуляции

Показатель	Градации показателя	%		Доверительный интервал
		до стимуляции	после стимуляции	
ИЛ-6, пкг/мл	ниже норматива	61,22	65,67	16,98-34,02
	выше норматива	6,12	7,46	
	нормативный	32,66	26,87	
		$P < 0,05$	$P < 0,01$	
ИЛ-8, пкг/мл	ниже норматива	67,35	61,19	16,98-34,2
	выше норматива	24,49	23,89	
	нормативный	8,16	14,92	
		$P < 0,01$	$P < 0,01$	
ИЛ-2, пкг/мл	ниже норматива	0	0	0
	выше норматива	29,41	30,0	
	нормативный	70,59	70,0	
		$P < 0,05$	$P < 0,05$	
ИЛ-4, пкг/мл	ниже норматива	80,39	73,13	0,7-1,7
	выше норматива	15,69	16,42	
	нормативный	3,92	10,45	
		$P < 0,01$	$P < 0,01$	
ИЛ-10, пкг/мл	ниже норматива	53,06	62,69	6,58-11,82
	выше норматива	20,41	17,91	
	нормативный	26,53	19,40	
		$P < 0,01$	$P < 0,01$	
ИНФγ, пкг/мл	ниже норматива	44,90	55,21	220,2- 265,1
	выше норматива	22,45	11,94	
	нормативный	32,65	32,85	
		$P < 0,05$	$P < 0,01$	

Особо следует подчеркнуть абсолютное превалирование больных женщин со сниженным содержанием противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10. Именно дефицит этих цитокинов является одной из основных причин активации воспалительных процессов и переходом их в хронические формы с индукцией аутоиммунной агрессии [5]. Этот тезис подтверждается и при ранжировании общесуммарной доли больных с отклоненными значениями показателей. Действительно, наиболее часто выявлялись нарушения продукции ИЛ-4 (96,08%) и ИЛ-8 (91,84%). Затем следует ИЛ-10 (73,47%), ИНФγ (67,35%) и ИЛ-6 (67,34%). И только последнее ранговое место принадлежит ИЛ-2 (29,5%). Надо понимать, что в ситуации, когда за условную норму принимается абсолютное отсутствие интерлейкина (в случае ИЛ-2) в периферической крови, значимость его обнаружения чрезвычайно возрастает. Тот факт, что ИЛ-2 находится на последнем месте в ранговой структуре, не может снизить его значимость,

тем более, что она статистически достоверна ($P < 0,05$ при сравнении с контролем).

При изучении влияния КГЯ характер продукции ИНФγ установлена достоверная положительная динамика его изменения (уменьшение в 1,34 раза и приближение к показателям контроля, $P < 0,05$) после индукции суперовуляции. Остальные показатели существенно не изменялись. При этом коэффициент ранговой корреляции сравнимых структур имел значение $\rho_s = 0,96$ ($P < 0,05$), что подтверждает достоверную идентичность (на 96%) ранговых структур. Эти данные свидетельствуют о том, что КГЯ, в основном, не оказывает выраженного влияния на состояние цитокинового профиля и в процессе стимуляции не происходит существенной структурной перестройки нарушенных цитокинового обмена.

Продукция цитокинов является мощным регулирующим фактором состояния не только в рамках иммунокомпетентной сферы, но и многих соподчиненных ей структур в других системах [11,

12, 14]. В этом смысле не является исключением и женская репродуктивная система [15, 17]. Выявленные изменения цитокинового профиля у пациенток с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ, могут быть причиной неудач при проведении ЭКО. [10, 13, 16]. Сохранение большинства показателей цитокинового профиля после КГЯ на том же уровне, что и до стимуляции говорит о том, что процессы, сопутствующие процедуре ЭКО, оказывая определенное влияние на продукцию ИНФγ, при этом не приводят к существенной перестройке цитокинового обмена в целом.

Выводы:

1. У женщин с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ, обнаружено повышение содержания провоспалительного цитокина ИЛ-2 и снижение содержания провоспалительного ИЛ-6 и противовоспалительного ИЛ-4 относительно контроля (P < 0,05). В периферической крови пациенток всех групп не был выявлен ФНОα.

2. В целом, у 61,4% больных с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ, до стимуляции отмечалась гипопродукция цитокинов и только у 17,8% повышение их содержания, что может быть связано с длительностью и тяжестью воспалительного процесса, истощением продукции как про- так и противовоспалительных цитокинов на этом фоне.

3. Установлена достоверная положительная динамика изменения показателя ИНФγ - уменьшение в 1,34 раза и приближение к показателям контроля после индукции суперовуляции.

4. Получены данные, свидетельствующие о том, что контролируемая гиперстимуляция яичников, оказывая определенное влияние на обмен цитокинов (ИНФγ), не приводит к выраженной структурной перестройке цитокинового профиля в целом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Айзикович Б.И. Иммунологические аспекты регуляции ранних этапов репродуктивного процесса (обзор литературы) / Б.И. Айзикович, И.В. Айзикович Н.А. Хонина [и др.] // Проблемы репродукции - 2005. - № 6. - С.7-13.
2. Гаспаров А.С. Характеристика клеточного иммунитета и цитокинового профиля перитонеальной жидкости больных с хроническим сальпингитом / А.С. Гаспаров, Т.В. Клинышкова, Т.Ф. Соколова [и др.] // Проблемы репродукции. - 2005. - Том 11, № 4. - С.14-18.
3. Дубоссарская З.М. Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов / З.М. Дубоссарская, А.И. Миляновский, В.Г. Коляденко. - К.: Здоров'я, 1991. - С.115-118.
4. Жилка Н. Стан репродуктивного здоров'я в Україні (медико-демографічний огляд) / Н. Жилка, Т. Іркіна, В. Стещенко. - Київ: Міністерство охорони здоров'я України, Національна академія наук: Інститут економіки, 2001. - 68 с.
5. Линева О.И. Патологоиммунологические аспекты развития хронического сальпингоофорита и пути их коррекции / О.И. Линева, Е.П. Ша-

тунова, М.А. Каганова // Русский Медицинский Журнал. - 2006. - № 18. - С. 1301.

6. Основы репродуктивной медицины: Практическое руководство / Под ред. профессора В.К.Чайки. - Донецк: Альматео, 2001. - 618 с.
7. Останин А.А. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии / А.А. Останин, Е.Р. Черных // Цитокины и воспаление. - 2005. - № 4. - С. 25-32.
8. Ромащенко О.В. Дослідження показників імунітету у хворих на хронічні інфекції сечової системи та при їх поєднанні з хронічними запальними захворюваннями геніталій / О.В. Ромащенко, М.О. Колесник, Л.Ф. Яковенко, Л.О. Лебідь // Педіатрія, акушерство та гінекологія. - 2007. - № 5. - С. 81-85.
9. Сидорова И.С. Принципы лечения хронического воспалительного процесса придатков матки / И.С. Сидорова, Н.А. Шенукова, Е.И. Боровкова // Акушерство и гинекология - 2003. - №5 - С.61-65.
10. Хонина Н.А. Регуляторные факторы и цитокины в сыворотке и фолликулярной жидкости у женщин при контролируемой овариальной гиперстимуляции / Н.А. Хонина, И.В. Айзикович, Е.Я. Шевела [и др.] // Цитокины и воспаление. - 2005. -Том. 4, № 2. - С. 32-35.
11. Al-Harathi L. The impact of the ovulatory cycle on cytokine production: evaluation of systemic, cervicovaginal and salivary compartments / L. Al-Harathi, D.J. Wright, D. Anderson // J. Interferon & Cyt Res. - 2000. - Vol. 20, № 8. - P. 719-724.
12. Bornstein S.R. Cytokines and steroidogenesis / S.R. Bornstein, H. Rutkowski, I. Vrezas // Mol. Cell. Endocrinol. - 2004. - Vol. 215. - № 1-2. - P. 135-141.
13. Hammadeh M.E. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome / M.E. Hammadeh, C. Fischer-Hammadeh, A.S. Amer, P. Rosenbaum // Chem. Immunol. Allergy. - 2005. - Vol. 88. - P. 80-97.
14. Machelon V. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary / V. Machelon, D. Emilie // Eur. Cyt. Network. - 1997. - № 8. - P. 137-143.
15. Maeda A. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries / A. Maeda, N. Inoue, F. Matsuda-Minehata // J. Reprod. Dev. - 2007. - Vol. 53, № 3. - P. 481-490.
16. Strandell A. Hum. Reprod. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates / A. Strandell, C. Bergh, K. Lundin. - 2000. - Vol. 15, № 12. - P. 2520-2525.
17. Zolti M. Cytokine involvement in oocytes and early embryos / M. Zolti, Z. Ben-Rafael, R. Meirum // Fertil. Steril. - 1991. - Vol. 6, № 2. - P. 265-272.

Надійшла 21.10.2010 р.

Рецензент: проф. В.В. Флегонтова