



УДК 618.177-02:618.13-002-036.12]-089.888.11-037:612.017

© 2011

Академік НАН України **В. І. Грищенко**,
академік НАН України **А. М. Гольцев**, **М. Г. Грищенко**

Прогнозування ефективності екстракорпорального запліднення у жінок з безпліддям, обумовленим хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу, на підставі вивчення імунного гомеостазу

Проведено статистичний аналіз показників системного клітинного, гуморального імунітету та цитокінового профілю у жінок з безпліддям, обумовленим хронічними запальними процесами органів малого тазу, та їх вплив на результативність лікування безпліддя методом екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). Виявлено особливості зміни стану вивчених показників, які визначають прогноз лікування з використанням допоміжних репродуктивних технологій. Виділено критерії прогнозування та вивчено їх прогностичну значущість. На користь позитивного ефекту ЕКЗ свідчать низька концентрація NK-клітин T-лімфоцитарного ряду ($CD16^+56^+CD3^+$), висока концентрація T-регуляторних клітин ($CD4^+CD25^+$), нормативне значення загального вмісту T-лімфоцитів ($CD3^+$), низька концентрація $ИФ\gamma$ та $IL-10$ в периферичній крові. Найбільш високу прогностичну значущість встановлено для показників клітинної ланки імунітету ($I = 0,96$), дещо меншу — для цитокінового профілю ($I = 0,95$) і найменшу — для гуморального імунітету ($I = 0,67$).

Безпліддя в шлюбі є актуальною медичною, соціальною і економічною проблемою як для подружньої пари, так і для держави. Частота безпліддя не має тенденції до зниження і, за даними вітчизняних і зарубіжних фахівців, становить від 15 до 20% [1]. Безпліддя призводить до погіршення демографічної ситуації, яка в Україні визнана незадовільною [1]. Тому проблема безпліддя в Україні визнана на державному рівні, що знайшло своє відображення у відповідних документах.

Запальні захворювання органів малого тазу, як причина порушення репродуктивної функції, звертають на себе пильну увагу дослідників досить давно. За даними різних джерел, частота безпліддя, зумовленого хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу (ХЗЗОМТ), становить 35–60% серед жінок з порушенням репродуктивної функції [1].

За останні десятиліття допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) зайняли міцну позицію в арсеналі методів подолання безплідності. При цьому абсолютним показанням для проведення курсу лікування безплідності методами ДРТ за бюджетні кошти є нормогонадотропне безпліддя трубного походження, тобто відсутність або повна непрохідність маткових труб. Таким чином, спрямованість державного фінансування ДРТ визначає актуальність поліпшення результатів лікування у пацієнок з безпліддям запальної етіології, тому що основну частину в структурі хворих, яким надається допомога за бюджетні кошти, складають саме вони.

Ефективність лікування безпліддя методами ДРТ в Україні в середньому становить 33,5% [1]. Незважаючи на досить високу результативність, очевидно, що ефективність ДРТ все ще далека від абсолютної.

Сформовані погляди на етіопатогенетичні особливості порушення репродуктивної функції в результаті ХЗЗОМТ насамперед спрямовані на анатомо-функціональні порушення стану маткових труб, вплив злукового процесу в малому тазі і в порожнині матки. Такий підхід не може пояснити механізми зниження результативності ДРТ у пацієнок з безпліддям трубно-перитонеального генезу. Зустрічаються публікації, які свідчать про те, що ХЗЗОМТ є обтяжливим чинником при проведенні ДРТ і погіршують прогноз лікування [2]. У той же час із загальноновизнаної точки зору, ефективність ДРТ і, зокрема, екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) у подібних пацієнок повинна бути дуже високою, тому що стан маткових труб у разі відсутності саккатних утворень не справляє істотного впливу на результати ЕКЗ. Велика кількість пацієнок починає лікування методами ДРТ вже після видалення маткових труб.

Результати попередніх досліджень дозволяють стверджувати, що причини зниження репродуктивного потенціалу хворих з безпліддям, обумовленим ХЗЗОМТ, лежать в іншій площині і обумовлені більш глибокими наслідками хронічного запалення [3]. Отримали підтвердження дані про те, що ХЗЗОМТ супроводжуються явищами порушень імунного гомеостазу, які можуть зберігатися протягом тривалого часу навіть після клінічного одужання [3, 4]. Такі порушення можуть позначитися на ендокринній функції, яка нерозривно пов'язана зі станом імунного гомеостазу, і, як наслідок, негативно впливати на здатність яєчника відповідати на стимуляцію екзогенними гонадотропінами, рецептивність ендометрія і процеси дозрівання ооцитів та формування ембріонів. Результатом хронічного запалення також можуть бути явища імунної агресії щодо власних тканин [4].

Важливим для клініциста при проведенні ДРТ є можливість прогнозування результату лікування. Традиційно використовується поняття оваріального резерву [1]. Раннє прогнозування результатів ДРТ дає можливість проводити відбір хворих, що потребують додаткової підготовки перед спробою ДРТ. Дослідження нових патогенетичних та прогностичних факторів повинне задати напрямок пошуків терапевтичних впливів, спрямованих на корекцію виявлених порушень, що в підсумку сприятиме підвищенню ефективності відновлення репродуктивної функції у хворих з безпліддям, обумовленим ХЗЗОМТ.

Наша мета полягала у визначенні можливих предикторів настання вагітності в програмах ДРТ у пацієнок з ХЗЗОМТ на підставі аналізу лабораторних показників системного імунітету.

Матеріали та методи. Були проаналізовані 12 показників клітинної ланки імунітету (КЛІ), показники гуморальної ланки імунітету — антиоваріальні антитіла (АОА), антитіла до *zona pellucida* (АТ до ЗР) і антиспермальні антитіла (АСАТ) та вміст цитокінів ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІНФ γ у периферичній крові 88 хворих з безпліддям, обумовленим ХЗЗОМТ, які

були розподілені на альтернативні групи: I ($n = 39$) — з позитивним результатом лікування; II ($n = 49$) — з негативним результатом (відсутність вагітності).

Перед початком лікування всі безплідні подружні пари та донори яйцеклітин були обстежені за загальноприйнятою методикою згідно з клінічним протоколом МОЗ України стосовно тактики ведення жінок з безпліддям (Наказ № 582 від 15.12.2003 “Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги”).

При індукції суперовуляції були використані загальноприйняті протоколи з використанням препаратів ФСГ (Gonal-F, “Serono”) і аналога гонадотропін-рилізінг-гормона (Трипторелін, Dipherelin, “Beaufour Ipsen Pharma”). Через 34–35 год після введення тригерної дози ЧХГ (10000 ОД, Прегніл, “Schering-Plough”) у всіх пацієнток, що ввійшли в досліджувані групи, під ультразвуковим контролем в асептичних умовах була зроблена трансвагінальна пункція та аспірація вмісту фолікулів за допомогою спеціалізованого аспіраційного пристрою (Cook Aspiration Unit, K-MAR-5200 Vacuum Pump, COOK MEDICAL INC). Відразу ж після пункції виявлені ооцит-кумуляусні комплекси переносили з фолікулярної рідини в середовище для культивування.

Інсемінацію яйцеклітин та культивування ембріонів здійснювали в секвенційних комерційних культуральних середовищах COOK (WILLIAM A. COOK AUSTRALIA PTY. LTD) згідно із загальноприйнятими протоколами та рекомендаціями виробника. Контроль запліднення здійснювали через 18 год після інсемінації яйцеклітин. Ембріотрансфер проводили на 2-гу — 5-ту добу залежно від кількості, морфологічних характеристик та темпів розвитку ембріонів. Для переносу ембріонів до порожнини матки використовували катетер Wallace (Classic Embryo Replacement Catheter, Smiths Medical International, Велика Британія).

У периферичній крові пацієнтів досліджували такі субстрати КЛІ, як популяції і субпопуляції Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, НК-клітин. Крім того, розраховували імунорегуляторний індекс (ІРІ), як відношення вмісту (%) $CD4^+$ клітин (Т-хелпери) до $CD8^+$ (Т-супресори /цитотоксичні); оцінювали так само вміст клітин з фенотипом $CD4^+CD25^+$ (Т-reg) і клітин лімфоцитарного і нелімфоцитарного ряду, які експресують антигени головного комплексу гістосумісності — АГКГ II класу (HLA-DR). Основні технологічні процеси атестації вищезгаданих показників виконували на проточному цитометрі FACS-Calibur (США) з використанням моноклональних антитіл Becton Dickinson (США) до відповідних антигенних епітопів.

Концентрацію АОА, АСАТ, АТ до ZP, інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІНФ γ у периферичній крові визначали на мікропланшетному мікроаналізаторі Stat Fax 2100 (США) імуноферментним методом з використанням набору реактивів DRG® anti-Ovarian Ab ELISA (EIA-2937), DRG Sperm Antibody EIA-1826, DRG® Zona Pellucida Ab Ig-Typing (EIA-3778), DRG International, Inc., США, та набору реактивів ТОВ “Цитокин” (Росія) відповідно до рекомендацій виробника.

Аналіз досліджуваних показників у групах проводили за допомогою неоднорідної послідовної процедури Вальда–Генкіна (Є. В. Гублер, 1978). Значення кожного показника розподілялися на діапазони з наступним визначенням прогностичного коефіцієнта (ПК) і інформативності (І) ознаки [5]. Обраний статистичний метод належить до непараметричних методів статистики, не вимагає нормальності розподілу вибірки, є простим і близьким до лікарського мислення, адекватно враховує як кількісні, так і якісні ознаки, допускає пропуски в обстеженні хворого і забезпечує мінімізацію ознак, необхідних для прогнозу [5]. Вибір цього статистичного методу визначили його переваги перед такими методами, як регресійний і дискримінантний аналіз.

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані результати зведено в табл. 1. У таблицю ввійшли тільки показники з високими ($I \geq 1,0$) прогностичними властивостями. Серед вивчених показників ознак з дуже високою прогностичною інформативністю ($I \geq 30$) не виявлено.

Три показники КЛІ в периферичній крові мали високу прогностичну інформативність ($I \geq 1,0$), а саме концентрація Т-клітин, які експресують маркери НК-клітин (НКТ-клітини, $CD16^+56^+CD3^+$) ($I = 2,06$), Т-регуляторних клітин (Т-reg) з фенотипом $CD4^+CD25^+$ ($I = 1,52$) та відсоток загальних Т-клітин $CD3^+$ ($I = 1,42$).

Виходячи зі значень ПК (див. табл. 1), сприятливий прогноз визначають: зниження ($\leq 3\%$) концентрації $CD16^+56^+CD3^+$ клітин; збільшення концентрації Т-reg клітин ($CD4^+CD25^+$, $\geq 3,1\%$); нормативний (64–74%) вміст загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$).

Отримані результати є цілком логічними з урахуванням розуміння ролі цих клітин у реалізації імунозапальних реакцій, зокрема при трубно-перитонеальному безплідді. Кожна із зазначених популяцій клітин виконує певну функцію при розвитку імунозапальних реакцій. НК-клітини реалізують ефекторний потенціал лізису клітин-мішеней, інфікованих вірусами

Таблиця 1. Прогностична значущість показників системного імунітету у пацієнок з безпліддям, обумовленим хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу (показники з високими прогностичними властивостями, $I > 1$)

Показник	Градації показника	ПК	I
<i>Клітинна ланка імунітету</i>			
НКТ-клітини, $CD16^+56^+CD3^+$, %	≤ 3	+9,3	2,06
	4–9	0	
	10–27	–3,6	
	≥ 28	–5,8	
Ді нормативу: 4,93–7,67			
Т-reg, $CD4^+CD25^+$, %	$\leq 1,0$	–0,8	1,52
	1,1–3,0	0	
	$\geq 3,1$	+4,5	
Ді нормативу: 1,63–2,37			
Т-клітини, $CD3^+$, %	≤ 63	–3,0	1,42
	64–67	+1,8	
	68–74	+4,6	
	≥ 75	–3,6	
Ді нормативу: 63,4–69,39			
<i>Гуморальна ланка імунітету</i>			
—			
<i>Цитокіни</i>			
ІЛ-10, пкг/мл	0	–1,8	1,54
	0,1–10,0	+2,6	
	$\geq 10,1$	–6,2	
Ді нормативу: 6,58–11,82			
ІНФ γ , пкг/мл	≤ 100	–0,5	1,44
	101–250	+3,2	
	251–300	–4,3	
	≥ 301	–7,5	
Ді нормативу: 130–351,6			

Примітка. ПК — прогностичний коефіцієнт (знак “плюс” вказує на позитивний ефект ДРТ, а знак “мінус” — на негативний); I — інформативність ознаки; Ді — довірчий інтервал.

та іншими внутрішньоклітинними агентами [4]. У такому випадку розвиток ХЗЗОМТ індукує підвищення їх кількісного вмісту, що негативно позначається на ефективності ДРТ. Ці результати збігаються з даними оцінки ролі НК-клітин у випадках звичного невиношування вагітності [6]. Підвищення вмісту НК є визнаним імунологічним маркером порушення імплантації і чинником, що сприяє збільшенню частоти мимовільних абортів [6]. Проте цей показник не отримав ще широкого клінічного застосування у зв'язку з неоднорідністю результатів дослідження та відсутністю чіткого уявлення про механізми впливу цих клітин у периферичній крові, ендометрії і фолікулярній рідині на процеси імплантації. Є дані про позитивний ефект терапевтичних заходів, що сприяють зниженню концентрації цитотоксичних НК-клітин на результати допоміжних репродуктивних технологій [7].

Таким чином, встановлена нами найвища прогностична роль концентрації НК-клітин повністю узгоджується з даними літератури. Новизна результатів проведеного дослідження полягає у визначенні основної патогенетичної ролі НК-клітин Т-лімфоцитарного ряду (НКТ-клітини).

Особливий інтерес викликають результати оцінки прогностичної значущості ефективності ДРТ залежно від вмісту субпопуляції Т-рег клітин ($CD4^+CD25^+$). Ці клітини, як відомо, мають супресорну щодо аутоімунних процесів активність. Показано, що високі концентрації Т-рег клітин збільшують поріг розвитку аутоімунних захворювань [8]. Можна припустити, що великий вміст цих клітин супроводжує пригнічення аутоімунних процесів, що сприяє імплантації ембріона, але одночасно збільшує ризик хронізації процесу і перешкоджає елімінації інфекційного збудника. У той же час зменшення вмісту цих клітин супроводжується розвитком аутоімунних реакцій і також знижує ймовірність імплантації. Тому цілком закономірно підвищення ймовірності позитивного ефекту ДРТ при збільшенні їх концентрації.

Відомо, що одним з факторів, які призводять до безпліддя, є утворення ізоімунних (АСАТ) і аутоімунних (АОА, АТ до ZP) антитіл. За даними літератури, АСАТ виявляються у 9–36% безплідних пар, тоді як в популяції у фертильних подружніх пар вони виявляються тільки в 0,9–4% випадків [4]. На сьогодні показано, що АСАТ справляють істотний вплив на репродуктивну функцію на етапах запліднення, імплантації та ранньої гестації [4]. Однак дані про роль АСАТ, викладені в різних джерелах, нерідко є неоднозначними. Проведений робочою групою ESHRE аналіз наукових публікацій (з 1992 по 1995 рр.) щодо результативності ЕКЗ залежно від наявності АСАТ у сироватці крові [9] свідчить про те, що ймовірність настання вагітності у пар з АСАТ не відрізняється від такої в контрольній групі. Результати нашого дослідження також свідчать про низьку інформативність цього показника щодо прогнозу результатів ДРТ.

Виявлення АОА у жінок найбільш часто асоціюється з розвитком передчасної яєчничкової недостатності, вони можуть бути наявними й у пацієток з безпліддям нез'ясованої етіології [10]. Відомо, що у пацієток з аутоімунними оофоритами результативність ДРТ істотно нижча, ніж у жінок без цієї патології. У літературі зустрічаються повідомлення, що при наявності АОА знижується відповідь на стимуляцію гонадотропінами і достовірно зменшується кількість одержуваних ооцитів, а отже, ймовірність настання вагітності [10].

При аналізі результатів вивчення гуморальної ланки імунітету показники з високою прогностичною інформативністю ($I \geq 1,0$) нами не виявлені. Встановлені помірні предикторські властивості відносно рівня АОА ($I = 0,87$). При цьому підвищення рівня АОА було несприятливим прогностичним моментом.

Аналіз прогностичних властивостей показників цитокинового профілю виявив, що два цитокіни в периферичному руслі мали високу прогностичну інформативність: ІЛ-10 ($I = 1,54$) і ІНФ γ ($I = 1,44$). При цьому сприятливий ефект ДРТ визначають нормативні значення ІЛ-10 та нормативний рівень ІНФ γ . Для несприятливого прогнозу характерні підвищений рівень ІЛ-10 та підвищений і дуже високий рівень ІНФ γ .

Негативна роль підвищення рівня ІНФ γ пояснюється наявністю у цієї частини хворих активного персистуючого запального процесу (хронічного запалення). Паралельне підвищення у хворих протизапального цитокіна ІЛ-10 є, мабуть, проявом компенсаторних механізмів, оскільки протизапальні цитокіни виступають як контрфактор прозапальних.

Найвища прогностична значущість ІЛ-10, що визначає активність Th2, і ІНФ γ , що маркує активність Th1, свідчить про участь у патогенезі персистенції запального процесу порушень як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету. Також добре відомо, що абсолютна більшість цитокінів (інтерлейкіни, інтерферони і т. д.) є продуктами в першу чергу імунокomпетентних клітин [11].

Абсолютно для всіх цитокінів, незалежно запальних або протизапальних, закономірним був несприятливий прогноз ДРТ при максимально можливих їх концентраціях. Очевидно, що навіть превалювання концентрацій класичних протизапальних медіаторів (наприклад, ІЛ-10) може мінімізувати ефективність ДРТ. Більш того, ці дані підтверджують наявні результати про те, що прояв яким би то не було цитокіном стимулюючої або супресивної активності є суворо дозованим [4].

За даними порівняльного аналізу прогностичної значущості показників клітинного та гуморального імунітету, а також показників цитокинового профілю, найвищою вона виявилася для клітинного імунітету ($I = 0,96$), дещо меншою — для цитокінів ($I = 0,95$), і найменшою — для гуморального імунітету ($I = 0,67$).

Вищевказані результати підтверджують основний постулат імунології про те, що гармонійний стан імунологічної сфери, як втім і розбалансування її стану, у першу чергу визначається структурно-функціональним статусом субстратів клітинної ланки імунітету.

Таким чином, результати дослідження свідчать про те, що хронічна форма імунозапального процесу в репродуктивній системі справляє негативний вплив на результативність лікування безпліддя з використанням ДРТ у цілому. Встановлені головні патогенетичні чинники імунного гомеостазу, що впливають на настання вагітності при використанні ДРТ у жінок з безпліддям, обумовленим ХЗЗОМТ. До них можна віднести зміни вмісту NK Т-лімфоцитарного ряду ($CD16^+56^+CD3^+$), концентрації Т-регуляторних клітин ($CD4^+CD25^+$) та загального вмісту Т-лімфоцитів ($CD3^+$), концентрації в периферичній крові ІНФ γ та ІЛ-10. Найбільш високу прогностичну значущість визначено для показників клітинної ланки імунітету ($I = 0,96$), дещо меншу — для цитокинового профілю ($I = 0,95$) і найменшу — для показників гуморального імунітету ($I = 0,67$). Виявлені відмінності в показниках дають змогу створити алгоритм прогнозування результату лікування безпліддя методами ДРТ, який буде розширений завдяки подальшому аналізу показників локального імунітету, і використовувати їх у комплексі з клініко-анамнестичними та ембріологічними показниками.

1. *Основи репродуктивної медицини: Практич. руководство / Ред. В. К. Чайка. – Донецьк: ООО “Альматео”, 2001. – 618 с.*
2. *Yang X. E., Zhang S. Y. Effect of pelvic inflammatory disease grades on in vitro fertilization-embryo transfer outcome // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. – 2007. – 42, No 10. – P. 666–669.*

3. Грищенко В. И., Грищенко Н. Г. Иммунокомпетентные клетки фолликулярной жидкости при экстракорпоральном оплодотворении у женщин с бесплодием воспалительного генеза // Вестн. АН Молдовы. Медицина, Chisinau. – 2009. – № 2(21). – С. 216–219.
4. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Москва: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2003. – 604 с.
5. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов. – Ленинград: Медицина, 1978. – 295 с.
6. King K., Smith S., Chapman M. et al. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage // Hum. Reprod. – 2010. – **25**, No 1. – P. 52–57.
7. Van den Heuvel M. J., Peralta C. G., Hatta K. et al. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy // Amer. J. Reprod. Immunol. – 2007. – **58**, No 5. – P. 447–459.
8. Stephens L. A., Gray D., Anderton S. M. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity // Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – **102**, No 48. – P. 17418–17423.
9. Male infertility update. The ESHRE Capri Workshop Group // Hum. Reprod. – 1998. – **13**, No 7. – P. 2025. – 2032.
10. Zou S. H., Zhang P., Song D. P. et al. Impact of antiovarian antibodies (AOA) on ovarian responsiveness in vitro fertilization and embryo transfer // Neuro Endocrinol. Lett. – 2008. – **29**, No 6. – P. 949–952.
11. Айзикович Б. И., Айзикович И. В., Хонина Н. А. и др. Иммунологические аспекты регуляции ранних этапов репродуктивного процесса (обзор литературы) // Пробл. репродукции. – 2005. – № 6. – С. 7–13.

Харківський національний медичний університет
 Інститут проблем кріобіології
 і кріомедицини НАН України, Харків
 Центр репродукції людини “Імплант”, Харків

Надійшло до редакції 21.10.2010

Academician of the NAS of Ukraine **V. I. Gryshchenko**,
 Academician of the NAS of Ukraine **A. N. Golcev, N. G. Gryshchenko**

Predicting the outcome of IVF in women with infertility caused by chronic inflammatory pelvic diseases based on the study of immune homeostasis

The statistical analysis of peripheral blood immunocompetent cells, antiovarian and antisperm antibodies, and the number of pro-and anti-inflammatory cytokines in IVF patients with sterility caused by chronic inflammatory pelvic disease is carried out. Connection between immunologic consequences of the inflammatory process in the reproductive system and the deterioration of IVF results has been found. The most important criteria for the prediction are identified, and their predictive value has been determined. It is found that positive prognostic factors are: low concentration of NKT-cells (CD16⁺56⁺CD3⁺), high concentration of T-reg (CD4⁺CD25⁺), normative value of T-lymphocytes (CD3⁺), and low concentrations of INF γ and IL-10 in peripheral blood. The highest prognostic significance is found for immunocompetent cells ($\bar{I} = 0.96$) and for the cytokine profile ($\bar{I} = 0.95$). The lowest prognostic properties are found for antiovarian and antisperm antibodies ($\bar{I} = 0.67$) in peripheral blood.