

**ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА
ИММУНИТЕТА В Фолликулярной жидкости
У ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ
БЕСПЛОДИЕМ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЕТОДАМИ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

**Н.Г.Грищенко, В.И.Грищенко, А.Н.Гольцев,
Ю.А.Котлик, А.Г.Геродес**

*Харьковский национальный медицинский университет
Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины (Харьков)*

Центр репродукции человека "Имплант" (Харьков)

Вступление

Проблема репродуктивного здоровья в современной медицине в настоящее время становится все более актуальной. Хорошо известно, что воспалительные заболевания органов малого таза, частота которых в последние годы значительно возросла - одна из основных причин трубно-перитонеального бесплодия [11, 9]. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) - один из основных методов лечения женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия. Однако хронические воспалительные заболевания органов малого таза (ХВЗОМТ), а также их последствия могут снижать эффективность данной терапии, так как очаги длительно персистирующей инфекции являются антигенным резервуаром, потенцирующим иммунопатологический ответ [8]. В последние годы, благодаря широкому распространению вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), стало возможным изучение роли антител в патогенезе нарушения репродуктивной функции на уровне взаимодействия сперматозоида и яйцеклетки [1].

Патологические иммунные реакции, сопутствующие ХВЗОМТ, могут приводить как к образованию изоиммунных и аутоиммунных специфических антител: антигаметный иммуни-

тет (антиспермальные антитела, антитела к блестящей оболочке яйцеклетки), антитела к ткани яичника (антиовариальные антитела), так и неспецифических антител: гетерофильные гемолизины, антитела к собственным лимфоцитам (лимфоцитотоксические аутоантитела), антитела к лимфоцитам мужа (лимфоцитотоксические аллоиммунные антитела), провоспалительные цитокины, ЦИК [1, 2, 5, 7, 9, 11]. Описана роль антиспермальных антител (АСАТ) при нарушении репродуктивной функции. Многочисленные исследования подтверждают влияние АСАТ на репродуктивную функцию на этапах оплодотворения, имплантации и ранней гестации [19, 20, 21].

Не вызывает сомнения тот факт, что антиовариальные антитела (АОА) могут быть причиной формирования нарушений репродуктивной функции. Их выявление наиболее часто ассоциируется с развитием преждевременного истощения функции яичников [17, 22]. Известно, что у пациенток с аутоиммунными процессами, сопровождающимися аутоагрессией по отношению к овариальной ткани, результативность ВРТ существенно ниже, чем у женщин без этой патологии. В литературе встречаются сообщения, что при наличии АОА снижается ответ на стимуляцию гонадотропинами и достоверно уменьшается количество получаемых ооцитов а, следовательно, вероятность наступления беременности [17, 22].

Лимфоцитотоксические аутоантитела, гетерофильные гемолизины и ЦИК являются показателями неспецифической иммунной реактивности организма. Важным фактором, препятствующим имплантации, является наличие цитотоксических антител [5]. Лимфоцитотоксические антитела были обнаружены в 60-х годах прошлого века у женщин с невынашиванием беременности [10]. В последние годы появились исследования, подтверждающие негативное влияние аутоиммунных лимфоцитотоксических антител (антител к собственным лимфоцитам) и гетерофильных гемолизин (гетероиммунных антител) на наступление беременности [7].

Развитие ВРТ сделало возможным исследование фолликулярной жидкости (ФЖ), как микроокружения ооцита. Изме-

нения иммунного гомеостаза в ФЖ имеют свою специфику, связанную с тем, что биохимический состав этой среды не совпадает с составом плазмы крови [19]. Значение этого факта усиливается уникальностью гормонального спектра фолликулярной жидкости. Известно, что продукты эндокринной системы, в т.ч., половые стероиды, являются мессенджерами иммунных процессов [1, 6]. В 1975 году было достоверно установлено, что концентрация стероидных гормонов в ФЖ варьирует в зависимости от фазы менструального цикла и размера фолликула и отличается от аналогичных показателей в периферической крови [18]. В ФЖ были обнаружены как провоспалительные (IL-2, IL-6), так и противовоспалительные (IL-4, IL-10) цитокины [1] и еще целый ряд биологически значимых веществ.

Таким образом, не вызывает сомнений, что ХВЗОМТ могут оказывать влияние на состояние иммунного гомеостаза пациенток. При этом иммунный дисбаланс в материнском организме, предположительно, может быть причиной неудовлетворительных результатов экстракорпорального оплодотворения при лечении трубно-перитонеального бесплодия. Фолликулярная жидкость является микроокружением ооцита, и ее состав не только отражает процессы, происходящие в фолликуле, но также оказывает непосредственное влияние на ооцит в динамике его созревания.

Целью исследования было определение ряда показателей гуморального звена иммунитета в фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза и сопоставить результаты с показателями здоровых доноров.

Материалы и методы исследования

Было проведено обследование 71 пациентки. Первую клиническую группу составили больные с бесплодием, обусловленным перенесенными хроническими заболеваниями органов малого таза (n = 41), обратившейся в Центр репродукции "Имплант" (Харьков). Контрольную группу (II группа) составили клинически здоровые женщины - добровольные доноры яйцеклеток (n = 30).

Перед включением в протокол индукции суперовуляции 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 суперовуляции был использован общепринятый "длинный протокол" с десенситизацией гипофиза, начинающейся в лютеиновой фазе цикла, предшествующего лечебному, с использованием "дейли" - форм аналогов гонадотропин - рилизинг гормона (Трипторелин, Dipherelin, "Beaufour Ipsen Pharma"). Для контролируемой гиперстимуляции яичников применяли препарат рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (Gonal-F, "Serono"). Для мониторинга фолликулогенеза и изменения структуры эндометрия проводили динамическую фолликулометрию при помощи ультразвукового сканирования органов малого таза с интервалом 1 - 3 суток. Исследование проводили при помощи ультразвукового экспертного монохромного сканера 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).

Эмбриолог проводил поиск в аспиратах ооцит-кумулясных комплексов и перенос их в среду культивирования. Образцы ФЖ отбирали для исследования. При получении образцов стремились избежать контаминации ФЖ кровью.

Антиовариальные, антиспермальные антитела и антитела к zona pellucida определяли иммуноферментным методом с использованием набора реактивов DRG anti-Ovarian Ab ELISA (EIA-2937), DRG Sperm Antibody EIA-1826, DRG Zona Pellucida Ab Ig-Typing (EIA-3778), DRG International, Inc., U.S.A., соответственно с рекомендациями производителя.

Лимфоцитотоксические аутоантитела в фолликулярной жидкости определяли путем проведения лимфотеста по методике Ivashkova в модификации Ю.П.Делевского [5, 10].

Гетерофильные гемолизины определяли по методике Антипенской [2]. Исследование ЦИК осуществляли согласно методике, предложенной В.Г.Передерием в 1995г. [12].

Сопоставление исследуемых показателей в группах проводилось с помощью неоднородной последовательности процедур Вальда-Генкина с распределением каждого значения показателя в диапазоне с последующим определением прогностического коэффициента и информативности градации определения [4].

Полученные результаты и их обсуждение

Результаты оценки показателей гуморального звена иммунитета в микроокружении ооцита представлены в табл. 1

Таблица 1

Значения показателей гуморального иммунитета в фолликулярной жидкости в выделенных клинических группах ($M \pm m$)

Показатель	Больные с ХВЗОМТ в день получения ооцитов, n=48	Контроль (здоровые доноры ооцитов), n=30
Антиспермальные АТ, Е/мл	15,9 ± 1,3	12,3 ± 1,5
Антитела к ZP, Е/мл	1,2 ± 0,1 *	0,8 ± 0,1
Антиовариальные АТ, Е/мл	2,8 ± 0,2 *	1,9 ± 0,2
ЦИК, е.о.п.	не выявлены	не выявлены
Лимфоцитотоксические аутоантитела, %	не выявлены	не выявлены
Гетерофильные гемолизины, е.о.п.	не выявлены	не выявлены

Примечание. * - $P < 0,05$ при сравнении с контролем

Как следует из табл. 1, среди изученных показателей достоверные отличия от контроля установлены в отношении антиовариальных антител, уровень которых на 47,4% превышал норматив ($P < 0,05$), а также антител к ZP, уровень которых превышал контрольный на 50% ($P < 0,05$). Что касается АСАТ, то отмечена тенденция к увеличению их содержания у больных с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ.

Лимфоцитотоксические аутоантитела, ЦИК и гемолизины в ФЖ использованными нами методами обнаружены не были.

Более выраженная значимость отклонения показателей местного гуморального иммунитета была обнаружена при анализе распределения больных согласно значениям доверительного интервала норматива (табл.2) [4].

Таблица 2

Распределение больных с трубно-перитонеальным бесплодием согласно значениям доверительного интервала норматива показателей местного гуморального иммунитета

Показатель	Градация показателя	%
		фолликулярная жидкость
Антиспермальные антитела	ниже норматива	33,75
	выше норматива	44,04
	нормативный	22,21
		$P < 0,01$
Антитела к ZP	ниже норматива	40,32
	выше норматива	43,55
	нормативный	16,13
		$P < 0,01$
Антиовариальные антитела	ниже норматива	26,98
	выше норматива	52,38
	нормативный	20,64
		$P < 0,01$

Было установлено, что доля больных с нормативными значениями исследуемых показателей варьировала от 16,13% до 22,21%, тогда как среднее число больных с отклоненными значениями показателей составило 79,78%. Т.е. очевидно, что для всех показателей в группе пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием доля больных с отклоненными значениями показателей была в 4-5 раз выше и достоверно превышала долю пациентов с нормативными их значениями ($P < 0,01$).

Из табл. 2 также видно, что доля лиц с повышенным содержанием АСАТ составила 44,04%, антител к ZP - 43,55% и АОА 52,38%. При сравнительном анализе было установлено, что именно антиовариальные антитела и антитела к блестящей оболочке имели достоверные различия их содержания в сравнении с контролем.

На основании результатов проведенного исследования можно предположить, что показатели местного гуморального иммунитета у женщин с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза по сравнению с контрольной группой имеют существенные отклонения по типу аутоиммунного процесса, что выражается в сенсibilизации к антигенам репродуктивных структур. Наиболее показательным является достоверное ($P < 0,05$) повышение уровня АОА и антител к блестящей оболочке яйцеклетки в фолликулярной жидкости. Согласно данным литературы, у женщин с высокой концентрацией АОА в периферической крови снижен ответ на стимуляцию гонадотропинами и достоверно уменьшается количество получаемых ооцитов а, следовательно, вероятность наступления беременности [22]. Обнаружение повышенного уровня АОА и антител к zona pellucida в непосредственной близости от ооцита свидетельствует о том, что пациентки с бесплодием, обусловленным ХВЗОМТ, уже на старте протокола ВРТ находятся в неблагоприятных условиях, т.к. явления аутосенсibilизации на уровне антигенных структур ооцита могут оказывать негативное влияние на его созревание, способность к оплодотворению. Известно, что иммунные механизмы принимают участие в индукции процессов апоптоза, в том числе и в яичнике [3]. В настоящий момент убедительно доказано, что процессы апоптоза непосредственно участвуют в определении судьбы фолликула и играют большую роль в процессах фолликулярной атрезии [13]. Логичным представляется предположение, что именно иммунные механизмы индукции апоптоза в репродуктивных клетках и ткани яичника являются причиной преждевременной яичниковой недостаточности, которая, в свою очередь, часто ассоциируется с выявлением АОА [17].

В ряде работ была отмечено негативное влияние повышенного уровня АСАТ в ФЖ на результаты ЭКО [14, 21]. Тем не менее, мнения о роли АСАТ, изложенные в различных источниках, нередко неоднозначны. Рабочая группа ESHRE составила и опубликовала анализ исследований, которые свидетельству-

ют о том, что вероятность наступления беременности у пар с АСАТ в периферической крови при проведении программы ЭКО, не отличалась от контрольной группы [16]. Другие источники литературы свидетельствуют о том, что АСАТ обнаруживаются у 9 - 36% бесплодных пар, в то время как в популяции у фертильных супружеских пар они выявляются только в 0,9 - 4% случаев [14]. Наши данные показали, что доля женщин с повышенным содержанием АСАТ в группе пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием была достаточно высока - 44,04%, хотя достоверных отличий от контроля этот показатель не имел.

До конца остается неясной роль лимфоцитотоксических аутоантител, гетерофильных гемолизина, а так же ЦИК в микроокружении ооцита, что подтверждается и установленным нами фактом их отсутствия в ФЖ.

Выводы

Обнаружено достоверное увеличение содержания антиовариальных антител, а также антител к ZP в фолликулярной жидкости пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием ($P < 0,05$) по сравнению с показателями здоровых доноров ооцитов.

Установлено, что у больных с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза отмечаются признаки сенсibilизации к антигенам репродуктивных структур, проявляющиеся на местном уровне, то есть в микроокружении ооцитов - фолликулярной жидкости. При этом доля больных с нормативными значениями варьировала от 16,13% до 22,21%, более чем у 40% пациенток выявлено увеличение показателей содержания АОА, АТ к ZP и АСАТ в сравнении с контролем.

Таким образом, изучение иммунного статуса пациенток, страдающих бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза является перспективным с точки зрения совершенствования методов иммунокоррекции, направленных на уменьшение сенсibilизации к овариальным антигенам перед реализацией программы ВРТ при лечении данной группы больных.

Литература

1. Айзикович Б.И. Иммунологические аспекты регуляции ранних этапов репродуктивного процесса (обзор литературы) / Б.И.Айзикович, И.В.Айзикович, Н.А.Хонина // Проблемы репродукции. - 2005. - № 6. - С.7-13.
2. Антипенская Л.В. Способ диагностики преждевременного прерывания беременности / Антипенская Л.В., Щербакова В.В., Тагаева Л.А. - Авторское свидетельство №1345111 от 1987 г.
3. Барышников А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю.Барышников, Ю.В.Шишкин. - М.: Эдиториал УРСС, 2002. - 320 с.
4. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов / Гублер Е.В. - Л.: Медицина, 1978. - 295с.
5. Исаева А.Д. Профилактика и лечение невынашивания беременности и лейкоцитарной несовместимости: методические рекомендации / А.Д.Исаева, Т.М.Новаченко, Ю.П.Делевский, В.В.Щербакова. - Харьков: Изд-во ХГУ, 1975. - 19с.
6. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник. - Москва, МИА, 2003. - 603 с. (С.300)
7. Котлик Ю.А. Нарушения в организме женщин при бесплодии иммунологического генезаи способы их коррекции: дис. на соискание научной степени канд. мед. наук:14.01.01 "Акушерство и гинекология" / Ю.А. Котлик. - Харьков, 2004. - 124 с.
8. Линева О.И. Патологоиммунологические аспекты развития хронического сальпингоофорита и пути их коррекции / О.И.Линева, Е.П.Шатунова, М.А.Каганова // Русский медицинский журнал. - 2006. - № 18. - С.1301.
9. Маргиани Ф.А. Женское бесплодие: медицинские и социальные аспекты / Ф.А. Маргиани // Проблемы репродукции. - 2002. - №5. - С.28-33.
10. Профилактика и лечение невынашивания беременности при лейкоцитарной несовместимости: методичес-

кие рекомендации / Харьков: Украинский институт усовершенствования врачей, 1975. - 24 с.

11. Пархоменко А. В. Реабилитация репродуктивной функции женщины после перенесенного сальпингоофорита / А. В. Пархоменко // Репродуктивное здоровье женщины. - 2002. - Т. 10, № 1. - С. 36-38.
12. Передерий В.Г. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В.Г.Передерий, А.М.Земсков, Н.Г.Бычкова, В.М. Земсков. - Киев, 1995. - 147 с.
13. Cytokine profile of normal and malignant ovary / F.Burke, M.Relf, R.Negus, F.A.Balkwill // Cytokine. - 1996. - Vol. 8. - P. 579-585.
14. Claman P. The presence of serum antibody to the chlamydial heat-shock protein (CHSSP60) as a diagnostic test for tubal factor infertility / P.Claman, L.Honey, R.Peeling [e.a.] // Fertil. Steril. - 1997. - Vol. 67. - P. 501-504.
15. Feldmann, G. Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success? / G.Feldmann, J.L.Benifla, P.Madelenat // Gynecol.Obstet. Fertil. - 2006. - Vol. 34 (7-8). - P. 547-582.
16. Male infertility update. The ESHRE Capri Workshop Group // Hum Reprod. - 1998. - Vol. 13(7). - P. 2025-2032.
17. Horejsi J. Autoimmune antiovarian antibodies and their impact on the success of an IVF/ET program / J. Horejsi, J. Martinek, D. Novakova [e.a.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2000. - Vol. 900. - P.351-356.
18. Mc Natty K.P. Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle / K.P.Mc Natty, W.M.Hunter, A.S.Mc Neilley, P.S. Sawers // J. Endocrinol. - 1975. - Vol. 64. - P. 555.
19. Quality of embryo does not affect the implantation rate of IVF-ET in infertile women with antisperm antibody / K. Nakagawa, Y.Yamano, M.Kamada [e.a.] // Fertil. Steril. - 1999. - Vol. 72, Is 6. - P. 1055-1060.

20. *The effect of antisperm autoantibodies in male or female partners undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / K. Pagidas, R. Hemmings, T. Falcone, P. Miron // Fertil. Steril. - 1994. - Vol. 62 (2). - P. 363.*

21. *Vujisic S. Antisperm antibodies in semen, sera and follicular fluids of infertile patients: relation to reproductive outcome after in vitro fertilization / S. Vujisic, S.Z. Lepej, L. Jerkovic [e.a.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2005. - Vol. 54 (1). - P. 13-20.*

22. *Zou S.H. Impact of antiovarian antibodies (AOA) on ovarian responsiveness in vitro fertilization and embryo transfer / S.H. Zou, P. Zhang, D.P. Song [e.a.] // Neuro. Endocrinol. Lett. - 2008. - Vol. 29 (6). - P. 949-952.*

Резюме

Грищенко Н.Г., Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Котлик Ю.А., Геродес А.Г. Показатели гуморального звена иммунитета в фолликулярной жидкости у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием при лечении методами вспомогательных репродуктивных технологий.

Проведено исследование ряда показателей гуморального звена иммунитета в фолликулярной жидкости 41-пациентки с бесплодием, обусловленным перенесенными хроническими заболеваниями органов малого таза, включенных в программу экстракорпорального оплодотворения и 30 добровольных доноров яйцеклеток. Более чем у 40% больных с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза обнаружены признаки сенсибилизации к антигенам репродуктивных структур, проявляющиеся на местном уровне, то есть в микроокружении ооцитов - фолликулярной жидкости. Наибольшие отклонения выявлены для показателей содержания антиовариальных антител и антител к блестящей оболочке, содержание которых в фолликулярной жидкости пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием было достоверно повышено ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Обнаружена также тенденция к повышению уровня антиспермальных антител в фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза.

Ключевые слова: бесплодие, хронические воспалительные заболевания органов малого таза, экстракорпоральное оплодотворение, гуморальный иммунитет.

Резюме

Грищенко М.Г., Грищенко В.И., Гольцев А.М., Котлик Ю.А., Геродес Г.Г. Показатели гуморальной ланки иммунитета в фолликулярной

рідини у жінок з трубно-перитонеальним безпліддям при лікуванні методами допоміжних репродуктивних технологій.

Проведено дослідження низки показників гуморальної ланки імунітету в фолікулярній рідині 41 пацієнтки з безпліддям, обумовленим перенесеними хронічними захворюваннями органів малого тазу, включених до програми екстракорпорального запліднення і 30 добровільних донорів яйцеклітин. Більш ніж у 40% хворих з безпліддям, обумовленим хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу виявлені ознаки сенсибілізації до антигенів репродуктивних структур, які проявляються на місцевому рівні, тобто в мікрооточенні ооцитів - фолікулярній рідині. Найбільші відхилення виявлені для показників антиоваріальних антитіл і антитіл до блискучої оболонки, вміст яких у фолікулярній рідині пацієнток з трубно-перитонеальним безпліддям був достовірно підвищений ($P < 0,05$) в порівнянні з контрольною групою. Виявлена також тенденція до підвищення рівня антиспермальних антитіл у фолікулярній рідині у пацієнток з безпліддям, обумовленим хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу.

Ключові слова: безпліддя, хронічні запальні захворювання органів малого тазу, екстракорпоральне запліднення, гуморальний імунітет.

Summary

Gryshchenko N.G., Gryshchenko V.I., Golcev A.N., Kotlik J.A., Gerodes A.G. Antiovarian and antisperm antibodies in follicular fluid of IVF patient with sterility caused by chronic inflammatory pelvic disease.

Analysis of follicular fluid antiovarian and antisperm antibodies in 41 IVF patient with sterility caused by chronic inflammatory pelvic disease and 30 oocyte donors was carried out. More than 40% of patients with tubal infertility revealed signs of sensitization to the antigens of the reproductive structures that appear at the local level, i.e. in the microenvironment of oocytes - follicular fluid. The largest deviations were found for antiovarian antibodies and antibodies to the zona pellucida. These rates were significantly elevated ($P < 0.05$) in follicular fluid of patients with tubal-peritoneal infertility compared with the control group. Tendency to increase the level of antisperm antibodies in follicular fluid of patients with infertility caused by chronic inflammatory diseases was also detected.

Key words: infertility, chronic inflammatory disease of the pelvic organs, in vitro fertilization, humoral immunity.

Рецензенти: д.мед.н., проф. П.Т.Лещинський
д.мед.н., проф. І.В.Лоскутова