

На правах рукописи

РЕЧИСТОВА ИРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ ЭКО У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ ТРУБНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ НА ОСНОВАНИИ
ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ РЕАКЦИЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА**

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Иваново 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Посисеева Любовь Валентиновна

доктор медицинских наук, профессор

Сотникова Наталья Юрьевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
кафедры женских болезней и
репродуктивного здоровья
ФГУ «Национальный медико-хирургический
центр им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России

Самойлова Татьяна Евгеньевна

доктор медицинских наук, профессор,
заведующая учебной частью кафедры
акушерства и гинекологии Института
последипломного образования ГБУО ВПО
Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова"
Минздрава России

Овсянникова Тамара Викторовна

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «_____» февраля 2016 года в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д208.028.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, 20.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Ив НИИ М и Д имени В.Н. Городкова» Минздрава России, сайт www.niimid.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ирина Александровна Панова

Актуальность исследования

Проблема бесплодия в супружеских парах остается одной из наиболее актуальных и социально значимых. Доля бесплодных браков на территории России колеблется от 8 до 17,5% и в настоящее время не имеет тенденции к снижению [Мартынова М.В. с соавт., 2013]. До 60-70% женского бесплодия составляет трубно-перитонеальный фактор, частота бесплодия в сочетании с эндометриозом колеблется от 20 до 48% [Калинина Е.А. с соавт., 2013].

Одним из эффективных и в ряде случаев единственным методом лечения бесплодия является ЭКО. Однако, несмотря на достигнутый прогресс в разработке протоколов стимуляции суперовуляции яичников и методах культивирования эмбрионов, частота наступления беременности после ЭКО, по данным разных центров, остается невысокой и колеблется в пределах 20-40% [Мартынова М.В. с соавт., 2013]. Важным критерием удачного исхода программы ЭКО является качество переносимых эмбрионов [Fatemi H.M. e.a., 2013]. Предполагается, что качество эмбриона, полученного в ходе оплодотворения *in vitro*, во многом зависит от исходного состава фолликулярной жидкости. Известно, что в фолликулярной жидкости, кроме гормонов, содержатся различные белки и цитокины, в том числе ингибины А и В, TGF β [Knight P.G., Glistler C., 2006; Wen X. e.a., 2006], VEGF [Gao M.Z. e.a., 2012], IGF-1 [Mehta B.N. e.a., 2013], IL-12 [Malhotra N. e.a., 2013; Sarapik A; e. a., 2012], IL-6 [Wu R. e.a., 2004] и др. Высокое содержание IL-12 в фолликулярной жидкости рассматривают как маркер качества эмбрионов и успешной имплантации [Sarapik A e.a., 2012], а уровень АМГ в фолликулярной жидкости – как показатель оплодотворения и исхода ЭКО [Lehmann P. e. a., 2014].

Менее изучено содержание хемокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости у женщин, участвующих в программе ЭКО. Ранее было доказано, что хемокины играют важную роль в регуляции различных этапов репродуктивных процессов, включая овуляцию, пролиферацию и

децидуализацию эндометрия и имплантацию [Hammadeh M.E. e. a., 2002; Caballero-Campo P. e.a., 2002; Xu H. e.a., 2006]. Между тем, отсутствуют данные о связи хемокинов с качеством ооцита и эмбриона. Известно, что основными продуцентами и клетками-мишенями хемокинов являются эффекторные клетки врожденного иммунитета – моноциты и макрофаги, однако особенности функционирования этих клеточных популяций у женщин с бесплодием различной этиологии изучены недостаточно. Установлено, что макрофаги являются наиболее многочисленной популяцией клеток иммунной системы, присутствующей в яичниках и участвующей в регуляции ангиогенеза и фолликулогенеза [Turner E.C. e.a., 2011]. Их роль в регуляции овариальных процессов и обеспечении качества зачатия до конца не установлена.

Таким образом, определение особенностей функционального состояния фагоцитов и содержания хемокинов в фолликулярной жидкости и периферической крови является актуальной задачей современной науки и имеет большое значение для практики.

Цель исследования:

Разработать новые критерии прогноза качества эмбрионов при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе на основании комплексного изучения содержания хемокинов и оценки функционального состояния моноцитов/макрофагов периферической крови и фолликулярной жидкости

Задачи исследования:

1. Установить наиболее значимые клинические факторы, определяющие развитие бесплодия и качество эмбрионов при проведении ЭКО, у женщин с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с эндометриозом.
2. Оценить содержание хемокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного

происхождения и с эндометриозом в зависимости от качества эмбрионов, полученных при проведении ЭКО.

3. Определить особенности экспрессии функциональных молекул моноцитами крови и макрофагами фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом в зависимости от качества эмбрионов, полученных при проведении ЭКО.
4. Разработать новый способ прогноза качества эмбрионов при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом.

Научная новизна исследования

Установлено, что развитие бесплодия как трубного происхождения, так и при эндометриозе, сопровождается снижением сывороточного содержания хемокина RANTES и нарушением функционального состояния моноцитов с угнетением экспрессии CD16 молекул и повышением экспрессии CD86 молекул.

Выявлено, что нарушение фертильности у пациенток с эндометриозом ассоциировано с более выраженными иммунологическими нарушениями, чем у женщин с бесплодием трубного происхождения, проявляющимися более высоким уровнем внутриклеточной продукции IL-8 и угнетением экспрессии CD49e молекул моноцитами при сниженном сывороточном содержании MCP-1.

Выявлены особенности содержания хемокинов в фолликулярной жидкости относительно уровня хемокинов в крови у пациенток с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом, связанные со значительным повышением в фолликулярной жидкости содержания IL-8, умеренным увеличением уровня MCP-1 и снижением RANTES.

Установлено, что в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом в отличие от пациенток с бесплодием трубного

происхождения повышено содержание CD16+, CD11b+ и CD86+ макрофагов и снижен уровень CD49e+ макрофагов.

Показано, что получение эмбрионов низкого качества у пациенток с бесплодием трубного происхождения ассоциировано с низким содержанием RANTES и CD86+ фолликулярных макрофагов при высокой внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами и повышенном уровне CD16+ моноцитов.

Выявлено, что у женщин с бесплодием и эндометриозом получение эмбрионов низкого качества сочетается с высоким содержанием в крови IL-8+ моноцитов, низким уровнем CD49e+, HLA-DR+ и CD11b+ моноцитов и HLA-DR+ фолликулярных макрофагов.

Впервые показано, что получение эмбрионов высокого качества у женщин с бесплодием как трубного происхождения, так и связанного с эндометриозом, ассоциировано с высоким относительным содержанием в крови HLA-DR+ моноцитов.

Практическая значимость исследования

В клиническую практику предложен «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием», основанный на определении в периферической крови количества HLA-DR+ моноцитов (патент №2441243 от 27.01.2012).

Выявлено, что к факторам, определяющим качество эмбрионов, полученных при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения, относятся количество полученных при оплодотворении эмбрионов, толщина эндометрия, уровень ФСГ и АМГ в крови, а у женщин с бесплодием и эндометриозом - гиперплазия эндометрия в анамнезе, количество полученных эмбрионов и ооцитов, оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе.

Методология и методы исследования: Для достижения поставленной цели проведено обследование кагортным методом пациенток с

бесплодием трубного происхождения и с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии, обратившихся в отделение вспомогательных репродуктивных технологий для проведения ЭКО. При обследовании пациенток использовался комплекс современных клинических, иммунологических методов исследования. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета современных компьютерных программ прикладного статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

Механизмы нарушения фертильности у пациенток как с бесплодием трубного происхождения, так и с эндометриозом связаны с нарушением регуляции реакций врожденного иммунитета, которые проявляются угнетением системной продукции хемокина RANTES и изменением экспрессии CD16 и CD86 молекул моноцитами периферической крови и фолликулярными макрофагами.

Получение эмбрионов низкого качества при бесплодии трубного происхождения связано с низким сывороточным содержанием RANTES, высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами, сниженной экспрессией CD11b молекул моноцитами и CD86 молекул фолликулярными макрофагами. У женщин с бесплодием и эндометриозом получение эмбрионов низкого качества ассоциировалось со сниженным содержанием HLA-DR+, CD11b+, CD49e+ моноцитов в крови и HLA-DR+ макрофагов в фолликулярной жидкости.

При значениях относительного содержания HLA-DR+ моноцитов крови 68% и более прогнозируется получение эмбрионов высокого качества у пациенток с бесплодием как трубного происхождения, так и связанного с эндометриозом.

Апробация работы

Основные результаты исследований по теме диссертации докладывались и обсуждались на: XIII Всероссийском научном Форуме с

международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009), Международных Конгрессах с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний (Москва, 2009, 2010), научно-практической конференции ЦФО РФ с международным участием «Инновации и информационные технологии в диагностической, лечебно-профилактической и учебной работе клиник» (Тверь, 2009), Республиканской научно-практической конференции «Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности» (Белоруссия, Минск, 2009), Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая практика - новые горизонты» (Москва, 2010), VIII Конференции иммунологов Урала (Сыктывкар, 2010), IV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2010), конференции молодых ученых, посвященной 30-летию со дня основания Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова (Иваново, 2010), 90-ой юбилейной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию ИвГМА (Иваново, 2010).

Внедрение результатов в практику

Разработанный «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием» прошел предрегистрационное испытание в отделении вспомогательных репродуктивных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личное участие автора

Самостоятельно проводились отбор пациенток в группы, согласно критериям включения и исключения, клиническое обследование пациенток. Принимала участие в проведении иммунологических исследований.

Проводила систематизацию, статистическую обработку, анализ и описание полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 – в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы и практические рекомендации. Библиографический указатель включает 230 источников, в том числе 63 отечественных и 167 иностранных источников. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 7 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ (директор – д.м.н. А.И. Малышкина). Исследования проводились на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий (зав. – д.м.н., профессор И.К. Богатова), в лаборатории клинической иммунологии (зав. – д.м.н., профессор Н.Ю. Сотникова).

Всего было обследовано 162 женщины из супружеских пар, участвующих в программе ЭКО, из них 99 женщин с бесплодием трубного происхождения (1 группа) и 63 женщины с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии (2 группа). В результате проведения экстракорпорального оплодотворения в зависимости от качества полученных эмбрионов ретроспективно были выделены 4 подгруппы: 1а подгруппа – 53 женщины с эмбрионами высокого качества при бесплодии трубного происхождения; 1б подгруппа - 46 женщин с эмбрионами низкого качества при бесплодии трубного происхождения; 2а подгруппа – 23 женщины

с эмбрионами высокого качества при бесплодии и эндометриозе; 2б подгруппа - 40 женщин с эмбрионами низкого качества при бесплодии и эндометриозе.

Женщины обеих групп перед программой ЭКО обследовались в соответствии с приказом № 107 («О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению») Минздрава РФ от 30 августа 2012г. На каждую пациентку заполнялась специально разработанная «Индивидуальная карта обследования», в которую вносились данные анамнеза, результаты клинико-лабораторных исследований, сведения о тактике ведения и исходах программы ЭКО из истории болезни. Обследование женщин проводилось дважды при поступлении в отделение и в день проведения TVP яичников.

Материалом для исследования служили: периферическая венозная кровь и фолликулярная жидкость. Периферическая венозная кровь забиралась дважды – перед началом протокола стимуляции суперовуляции (для оценки показателей овариального резерва) и непосредственно перед проведением TVP яичников (для оценки иммунологических показателей). Фолликулярная жидкость для исследования аспирировалась в момент TVP яичников под контролем УЗИ. При оценке иммунологических показателей и параметров овариального резерва использовали имеющиеся в лаборатории клинической иммунологии нормативные показатели периферической крови здоровых небеременных женщин фертильного возраста (контрольная группа, n=23).

Клинические методы обследования включали сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, стандартные лабораторные обследования, необходимые для женщин, планирующих проведение ЭКО,

Оценка овариального резерва проводилась с определением концентрации ингибина В и АМГ в сыворотке крови, забранной перед началом протокола стимуляции суперовуляции методом ИФА.

УЗИ органов малого таза включало измерение объема яичников, числа антральных фолликулов и выполнялось перед вступлением в программу ЭКО с использованием интравагинального и абдоминального датчиков.

Эмбриологические методы оценки качества эмбриона включали оценку скорости дробления, формы и размер бластомеров, степени фрагментации и вакуолизации цитоплазмы с помощью визуальной микроскопии. На основании стандартной классификации (Элдер К., Эйвери С., Милез К., 1990) проводили выделение подгрупп с эмбрионами высокого и низкого качества. В подгруппы женщин с эмбрионами высокого качества были отнесены пациентки, у которых преобладали эмбрионы класса А или В, а в подгруппы женщин с эмбрионами низкого качества – пациентки с преобладанием эмбрионов класса С и Д.

Иммунологические методы исследования включали:

- выделение мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови и фолликулярной жидкости стандартным методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($d=1,078$);
- оценку экспрессии HLA-DR, CD16, CD11b, CD49e, CD86 молекул и внутриклеточной продукции IL-8 в популяции моноцитов крови и макрофагов фолликулярной жидкости с помощью моноклональных антител методом проточной цитометрии на цитометре FACScan (Becton Dickinson, USA);
- определение содержания в сыворотке крови и фолликулярной жидкости хемокинов RANTES, MCP-1 и IL-8 методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем на микропланшетном ридере Multiscan EX (Labsystems, Finland).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых методов вариационной статистики после проверки рядов данных на нормальность распределения. В зависимости от типа распределения данных достоверность различий между показателями

независимых выборок оценивалась по непараметрическому критерию U (Манна-Уитни) или по t-критерию. Для оценки относительного риска получения эмбрионов низкого качества при проведении программы ЭКО рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ – 95%). Статистический анализ осуществлялся в пакете прикладных лицензионных программ «Statistica 6.0», «MicrosoftOffice 2007», «GenStat», «MedCalc» и «OpenEpi».

Результаты исследования и их обсуждение

Возраст обследованных женщин варьировал от 23 до 45 лет. По возрастному составу женщины обеих клинических групп достоверно не различались ($p=0,55$). У 27,0% пациенток с бесплодием отмечалось НМФ в виде НЛФ, что достоверно чаще, чем у женщин с бесплодием трубного происхождения (9,5%, $p=0,003$). Пациентки 1 группы чаще страдали вторичным бесплодием – 75,8%, чем пациентки 2 группы – 42,9% ($p=0,000$), при этом у них достоверно чаще (17,2%) отмечалась меньшая длительность бесплодия (3 года и менее) по сравнению с группой женщин с эндометриозом – 6,3% ($p=0,036$). У пациенток 2 группы первичное бесплодие отмечалось в 57,1% случаях, а в 1 группе им страдали 24,2% женщин ($p=0,000$). Полученные нами данные подтверждают мнение о преобладании первичного бесплодия у женщин с эндометриозом [Лугонова О.Н., Сонова М.М., 2011, Корнеева И. Е. с соавт., 2007].

У всех пациенток с бесплодием трубного происхождения в анамнезе было диагностировано воспаление придатков матки в анамнезе ($p=0,000$), окклюзия или отсутствие маточных труб ($p=0,000$). Согласно имеющимся литературным данным, именно данная патология является одной из основных причин возникновения бесплодия трубного происхождения [Сметник В.П., Тумилович Л.Г., 2005; Белобородов С. М., 2001]. У этих женщин также достоверно чаще отмечался в анамнезе бактериальный вагиноз ($p=0,029$). У женщин с бесплодием и эндометриозом чаще в анамнезе был диагностирован

хронический эндометрит (1 группа = 13%, 2 группа = 37,9% , $p=0,000$) и оперативные вмешательства на яичниках (1 группа = 25,3%, 2 группа = 47,6% , $p=0,003$). У всех пациенток 2 группы был диагностирован эндометриоз маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии ($p=0,000$).

Перед вступлением в программу ЭКО у всех женщин оценивали овариальный резерв. По нашим данным, средний уровень ФСГ был повышен в обеих обследованных группах по сравнению со здоровыми фертильными женщинами (контрольная группа – $4,21\pm 0,4$ мЕд/л, 1 группа - $6,69\pm 0,22$ мЕд/л, $p=0,000$; 2 группа - $6,20\pm 0,30$ мЕд/л, $p=0,007$), а средний уровень ингибина В – снижен (контрольная группа – $67,16\pm 8,7$ пг/мл, 1 группа - $44,61\pm 4,92$ пг/мл, $p=0,041$, 2 группа - $43,08\pm 0,28$ пг/мл, $p=0,043$). Нами не было выявлено различий в показателях сывороточного содержания АМГ у женщин 1 и 2 групп по сравнению со здоровыми женщинами.

При проведении иммунологического обследования пациенток основных клинических групп было установлено, что у женщин с бесплодием трубного происхождения сывороточный уровень хемокина MCP-1 ($286,33\pm 16,75$ пг/мл) был повышен по сравнению с контрольной группой ($219,19\pm 22,35$ пг/мл, $p=0,038$) и с группой женщин с бесплодием и эндометриозом ($237,73\pm 17,72$ пг/мл, $p=0,019$). Содержание хемокина RANTES в периферической крови женщин обеих клинических групп было достоверно снижено по сравнению с контрольной группой (контрольная группа – $41002,6\pm 3468,76$ пг/мл, 1 группа - $34628,38\pm 2482,53$ пг/мл, $p=0,033$, 2 группа - $31223,06\pm 2278,60$ пг/мл, $p=0,014$). Известно, что дефицит продукции RANTES ассоциируется с усилением активности реакций гуморального звена иммунитета, в том числе и аутоиммунных реакций [Murooka T.T. et al., 2006]. Поскольку аутоиммунные нарушения вызывают нарушение репродуктивной функции [Cervera R., Balasch J., 2008; Cline A.M, Kutteh W.H., 2009], то выявленное нами снижение системной продукции RANTES можно расценивать как важный фактор, определяющий развитие бесплодия у

пациенток как с трубным фактором, так и эндометриозом. Только у пациенток с бесплодием и эндометриозом в крови было повышено содержание IL-8+ моноцитов по сравнению с группой контроля (контрольная группа – 46,18±5,16%, 2 группа - 63,56±2,42%, p=0,018) и с группой женщин с бесплодием трубного происхождения (55,88±1,72%, p=0,016). IL-8 является сильным хемоаттрактантом для различных типов лейкоцитарных клеток, участвующих в развитии воспалительной реакции (Shimizu T. et al., 2012., Chen S. U. et al., 2008). Выявленное нами усиление продукции IL-8 моноцитами у пациенток с эндометриозом хорошо укладывается в рамки гипотезы о ведущей роли системного воспаления в механизмах развития эндометриоза [Khoufache K. et al., 2012, Lousse J. C. et al., 2012].

В фолликулярной жидкости сравнительный анализ содержания и продукции хемокинов у пациенток с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом не выявил достоверных различий между этими группами.

У женщин обеих клинических групп в крови было снижено содержание CD16+ моноцитов (контрольная группа – 60,69±1,59%, 1 группа - 49,89±2,21%, p=0,000, 2 группа - 50,43±2,49%, p=0,002), но повышен уровень CD86+ моноцитов (контрольная группа – 41,20±5,80 %, 1 группа - 56,85±4,02%, p=0,051, 2 группа - 67,79±2,12%, p=0,004). По данным литературы, снижение количества CD16+ моноцитов часто ассоциируется с развитием аутоиммунных заболеваний [Wolff A.S. et al., 2010, Zhu H. et al., 2014]. Повышенная экспрессия CD86 молекул фагоцитами также выявляется при ряде аутоиммунных заболеваний [Gerl V. et al., 2010]. По-видимому, выявленные нами изменения в экспрессии CD16 и CD86 молекул моноцитами могут свидетельствовать об усилении активности аутоиммунных реакций у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе.

Только для пациенток с эндометриозом было характерно снижение уровня HLA-DR+ моноцитов (70,38±1,57% - контроль, 59,24±3,47% - 2 группа, p=0,007) и CD49e+ моноцитов (63,39±3,59% - контроль, 50,91±2,50% -

2 группа, $p=0,012$). Экспрессия CD49e молекул в этой группе была также ниже аналогичного показателя в группе женщин с трубным фактором ($62,64\pm 2,18\%$, $p=0,002$). Известно, что HLA-DR молекулы участвуют в распознавании антигенов и запуске адаптивного иммунитета [Ярилин, А. А., 2010], а CD49e молекулы способствуют адгезии клеток к внеклеточному матриксу путем связывания фибронектина [Bowen J.A., Hunt J.S., 2000]. Угнетение способности фагоцитарных клеток к полноценному распознаванию антигенов и взаимодействию с другими клеточными типами может лежать в основе эктопического роста клеток при эндометриозе.

При сравнении функционального состояния макрофагов фолликулярной жидкости пациенток основных групп было установлено, что при эндометриозе уровень CD49e+ макрофагов снижен ($52,98\pm 3,38\%$ - 2 группа, $63,88\pm 2,98\%$ - 1 группа, $p=0,023$), а количество CD16+ ($54,88\pm 3,33\%$ - 2 группа, $44,65\pm 2,12\%$ - 1 группа, $p=0,015$), CD11b+ ($61,26\pm 2,67\%$ - 2 группа, $49,83\pm 3,09\%$ - 1 группа, $p=0,008$) и CD86+ ($48,61\pm 2,74\%$ - 2 группа, $36,17\pm 3,57\%$ - 1 группа, $p=0,013$) макрофагов - повышено по сравнению с аналогичными показателями в группе женщин с бесплодием трубного происхождения. Выявленные изменения позволяют говорить о более выраженных нарушениях иммунного ответа при эндометриозе, которые проявляются усилением активности аутоиммунных процессов непосредственно на уровне яичников и могут оказывать дополнительное негативное влияние на репродуктивную функцию этих пациенток.

В результате проведения программы ЭКО беременность чаще наступала у женщин с бесплодием трубного происхождения ($39,4\%$) по сравнению с пациентками с бесплодием и эндометриозом ($25,4\%$, $p=0,044$), что согласуется с данными литературы [Амирова А.А. с соавт., 2010; Фанченко Н. Д. с соавт., 2000]. В результате оплодотворения *in vitro* эмбрионы высокого качества достоверно чаще были получены в 1 группе (1 группа - $53,5\%$, 2 группа - $36,5\%$, $p=0,025$), а эмбрионы низкого качества – во

2 группе (1 группа – 46,5%, 2 группа - 63,5%, $p=0,025$). Нами был проведен дифференцированный анализ клинических данных у женщин обеих групп наблюдения в зависимости от качества полученных эмбрионов и выявлены факторы риска получения эмбрионов низкого качества. В группе с бесплодием трубного происхождения к этим факторам относились: возраст 38 лет и старше (скорректированное ОШ 5,4; 95% ДИ 1,08-26,73; $p=0,027$), наличие хронического эндометрита в анамнезе (скорректированное ОШ 7,1; 95% ДИ 1,46-34,28; $p=0,007$), наличие ИППП в анамнезе (скорректированное ОШ 4,0; 95% ДИ 1,70-9,39; $p=0,001$), толщина эндометрия менее 7мм (скорректированное ОШ 10,1; 95% ДИ 2,13-47,41; $p=0,001$), объем яичников менее 8см³ (скорректированное ОШ 3,0; 95% ДИ 1,31-6,94; $p=0,007$), получение менее 5 ооцитов при TVP (скорректированное ОШ 4,7; 95% ДИ 1,91-11,53; $p=0,000$) и получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (скорректированное ОШ 36,7; 95% ДИ 11,81-113,5; $p=0,000$), уровни ФСГ в крови более 10мЕд/л (скорректированное ОШ 9,3; 95% ДИ 1,10-79,00; $p=0,018$), АМГ менее 1нг/мл (скорректированное ОШ 8,8; 95% ДИ 1,25-62,19; $p=0,034$). У женщин с бесплодием и эндометриозом факторами риска получения эмбрионов низкого качества являлись: гиперплазия эндометрия в анамнезе (скорректированное ОШ 8,3; 95% ДИ 1,00-69,57; $p=0,022$), оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе (скорректированное ОШ 3,1; 95% ДИ 1,04-9,17; $p=0,034$), получение менее 5 ооцитов при TVP (скорректированное ОШ 4,3; 95% ДИ 1,38-13,09; $p=0,009$) и получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (скорректированное ОШ 7,9; 95% ДИ 2,48-25,05; $p=0,000$).

При изучении взаимосвязи между системной продукцией хемокинов у обследованных пациенток и качеством полученных у них эмбрионов было установлено, что у женщин с бесплодием трубного происхождения подгруппа с эмбрионами высокого качества характеризовалась повышенным по сравнению с показателями здоровых женщин уровнем MCP-1 (контрольная

группа – $219,19 \pm 22,35$ пг/мл, 1а подгруппа - $308,21 \pm 27,13$ пг/мл, $p=0,018$), тогда как в подгруппе с эмбрионами низкого качества сывороточный уровень RANTES был ниже, чем в контрольной группе (контрольная группа - $41002,6 \pm 3468,76$ пг/мл – 1б подгруппа - $31379,44 \pm 2449,13$ пг/мл, $p=0,019$). Известно, что MCP-1 играет важную роль в обеспечении успешной имплантации эмбриона [Bourdies A. et al., 2014]. По-видимому, усиление активности системных реакций, обусловленных MCP-1, ведет к созданию благоприятного иммунологического фона у женщин с бесплодием трубного происхождения, который способствует нормальному развитию яйцеклетки и получению впоследствии эмбрионов высокого качества. У пациенток с бесплодием и эндометриозом мы не выявили взаимосвязи между сывороточным содержанием хемокинов и качеством эмбрионов.

Как при бесплодии трубного происхождения, так и при эндометриозе получение эмбрионов низкого качества было ассоциировано с высоким содержанием в крови IL8+ моноцитов (контрольная группа – $46,18 \pm 5,16\%$, 1б группа - $58,77 \pm 1,78\%$, $p=0,050$, 2б группа - $64,04 \pm 2,70\%$, $p=0,016$). При бесплодии трубного происхождения низкое качество эмбриона отмечалось высоким уровне CD16+ моноцитов (1а подгруппа – $44,49 \pm 2,87\%$, 1б подгруппа - $53,85 \pm 2,85\%$, $p=0,030$) и низком количестве CD11b+ моноцитов (1а подгруппа – $70,24 \pm 3,90\%$, 1б подгруппа - $54,49 \pm 3,38\%$, $p=0,013$).

При эндометриозе отличительной характеристикой подгруппы женщин с эмбрионами низкого качества было сниженное содержание HLA-DR+моноцитов (2а подгруппа – $71,01 \pm 2,85\%$, 2б подгруппа - $50,68 \pm 3,99\%$, $p=0,001$), CD11b+ (2а подгруппа – $63,67 \pm 2,87\%$, 2б подгруппа - $50,65 \pm 3,64\%$, $p=0,026$) и CD49e+ моноцитов (2а подгруппа – $63,39 \pm 3,59\%$, 2б подгруппа - $49,20 \pm 3,44\%$, $p=0,014$). Таким образом, отмеченные нами ранее негативные изменения в экспрессии функциональных рецепторов моноцитами у женщин с эндометриозом в максимальной степени проявляются при получении эмбрионов низкого качества.

Проведенный нами индивидуальный анализ данных показал, что как у пациенток с бесплодием трубного происхождения, так и при эндометриозе высокие показатели HLA-DR+ моноцитов (68% и более) отмечались преимущественно у пациенток с эмбрионами высокого качества. На основании полученных данных нами был разработан «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием», на который получен патент. Точность прогнозирования получения эмбрионов высокого качества по данному способу составляет 80%, чувствительность – 71,4% , специфичность – 85,7%.

В фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения низкое качество эмбрионов было ассоциировано со сниженным содержанием CD86-позитивных макрофагов (1а подгруппа - $44,80 \pm 4,56\%$, 1б подгруппа - $29,23 \pm 4,38$, $p=0,040$), а у женщин с эндометриозом - со сниженным содержанием HLA-DR+ макрофагов (2а подгруппа – $61,23 \pm 3,34\%$, 2б подгруппа - $51,01 \pm 3,38\%$, $p=0,050$).

Таким образом, как у женщин с бесплодием трубного происхождения, так и у пациенток с эндометриозом получение эмбрионов низкого качества прогнозируется при нарушении системной продукции хемокинов RANTES и IL-8 и сниженной экспрессии моноцитами функциональных рецепторов CD11b и HLA-DR. Дополнительными прогностическими критериями получения эмбрионов низкого качества у женщин с бесплодием трубного происхождения является нарушение экспрессии CD86 молекул фолликулярными макрофагами, а у пациенток с эндометриозом - снижение экспрессии CD49e молекул моноцитами и угнетение экспрессии HLA-DR молекул фолликулярными макрофагами.

ВЫВОДЫ

1. Для пациенток с бесплодием трубного происхождения характерно: вторичное бесплодие (75,8%), высокая частота воспалительных процессов органов малого таза (100%), бактериального вагиноза (7,4%), внематочных

беременностей (48,5%) в анамнезе. Для женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии характерно: первичное бесплодие (57,1%), высокая частота нарушений менструальной функции по типу НЛФ (27%), хронического эндометрита (37,9%), оперативных вмешательств на яичниках (47,6%) в анамнезе. Получение эмбрионов высокого качества при проведении программы ЭКО чаще отмечается при бесплодии трубного происхождения (53,5%) по сравнению с бесплодием при эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии (36,5%).

2. Факторами риска получения эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения являются: получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (ОШ= 36,7), толщина эндометрия менее 7мм (ОШ=10,1), уровни ФСГ в крови более 10мЕд/л (ОШ=9,3) и АМГ менее 1нг/мл (ОШ=8,8), хронический эндометрит в анамнезе (ОШ=7,1), возраст пациенток 38 лет и старше (ОШ=5,4), получение менее 5 ооцитов (ОШ=4,7), ИППП в анамнезе (ОШ=4,0), объем яичников менее 8 см³ (ОШ=3,0). Факторами риска получения эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО у женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии являются: гиперплазия эндометрия в анамнезе (ОШ=8,3), получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (ОШ=7,9) и менее 5 ооцитов при TVP (ОШ=4,3), оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе (ОШ=3,1).

3. Пациентки, как с бесплодием трубного происхождения, так и с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии имеют сниженное содержание хемокина RANTES в периферической крови по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. Для пациенток с бесплодием трубного происхождения характерно повышенное сывороточное содержание MCP-1, а для женщин с эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – высокий уровень IL-8+ моноцитов. При бесплодии

трубного происхождения получение эмбрионов низкого качества связано с низким уровнем RANTES и высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами. При бесплодии и эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии получение эмбрионов низкого качества отмечается при высоком содержании в крови IL-8+ моноцитов.

4. У женщин с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии в периферической крови снижено содержание CD16+ моноцитов и повышено количество CD86+ моноцитов по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. У пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии снижено содержание HLA-DR+ и CD49e+ моноцитов. У женщин с бесплодием трубного происхождения и получением эмбрионов низкого качества в отличие от женщин, у которых были получены эмбрионы высокого качества, снижено содержание моноцитов с фенотипом CD11b+ и повышен уровень CD16+ моноцитов. У женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии при получении эмбрионов низкого качества в крови снижен уровень CD49e+ моноцитов и снижено содержание HLA-DR+ и CD11b+ моноцитов по сравнению с женщинами, у которых получены эмбрионы высокого качества.

5. Для фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием трубного происхождения и пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии характерно более высокое по сравнению с периферической кровью содержание IL-8 и MCP-1, но сниженный уровень RANTES. Отличительной характеристикой фолликулярных макрофагов женщин с бесплодием трубного происхождения является низкая экспрессия CD11b молекул, а в группе пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – сниженная внутриклеточная продукция IL-8 макрофагами по сравнению с показателями в популяции моноцитов.

6. В фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии по сравнению с пациентками с бесплодием трубного происхождения имеет место повышенная экспрессия CD16, CD11b и CD86 молекул и сниженная - CD49e молекул макрофагами. При этом получение эмбрионов низкого качества при бесплодии трубного происхождения ассоциировано со сниженным содержанием CD86+ макрофагов, а при бесплодии и эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – сниженным уровнем экспрессии HLA-DR молекул макрофагами фолликулярной жидкости по сравнению с показателями пациенток, у которых были получены эмбрионы высокого качества.

7. Показатель относительного содержания HLA-DR+ моноцитов периферической крови 68% и более позволяет прогнозировать получение эмбрионов высокого качества у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии при проведении программы ЭКО с точностью 80%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется проводить иммунологическое обследование женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии, планирующих проведение ЭКО, с определением в периферической крови относительного содержания HLA-DR+ моноцитов и при его значениях 68% и более прогнозировать получение эмбрионов высокого качества, а при значении менее 68% - получение эмбриона низкого качества с точностью 80% для своевременного назначения дополнительных лечебных мероприятий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Публикации в журналах, включённых в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ:

1. Сравнительная характеристика функционального состояния периферических и овариальных фагоцитов у женщин с бесплодием в

- зависимости от эффективности ЭКО / Л.В. Посисеева, Н.Ю. Сотникова, **И.В. Речистова**, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Е.В. Полумискова // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 414–415.
2. Характеристика системной и локальной продукции хемокинов у женщин с бесплодием при различной эффективности экстракорпорального оплодотворения / Н.Ю. Сотникова, Л.В. Посисеева, **И.В. Речистова**, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Н.В. Астраух // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. – № 2/1(29). – С. 206–207.
 3. Взаимосвязь иммунологических показателей крови и фолликулярной жидкости с наступлением беременности после проведения ЭКО у женщин с бесплодием / Н.Ю. Сотникова, В.П. Чернышов, Ю.С. Анциферова, Б.В. Донской, Л.С. Туманова, Л.В. Посисеева, **И.В. Речистова** // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7(16), № 1. – С. 55–62.
 4. Патент 2441243 Российская Федерация. МПК G01N33/53. Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием / Сотникова Н.Ю., **Речистова И.В.**, Посисеева Л.В., Анциферова Ю.С., Веденева М.В., Полумискова Е.В.; патентообладатель ФГБУ «Ив НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России. – № 2010146007/15; заявл. 12.11.2010; опубл. 27.01.2012 // Бюл. «Изобретения полезные модели»– 2012. – № 3.

Публикации в журналах, сборниках, материалах конференций и тезисы докладов:

1. Особенности функционального состояния фагоцитарных клеток крови и фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием и их взаимосвязь с качеством эмбрионов, полученных при проведении ЭКО / **И.В. Речистова**, Л.В. Посисеева, Н.Ю. Сотникова, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Е.В. Полумискова // Проблемы репродукции. – 2010. – Специальный выпуск. – С. 269–270.
2. Взаимосвязь показателей функционального состояния периферических и овариальных фагоцитов с эффективностью различных этапов ЭКО / Л.В. Посисеева, Н.Ю. Сотникова, **И.В. Речистова**, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Н.В. Астраух // Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: труды XXII междунар. конгр. – М., 2009. – С. 78–79.
3. Особенности функционального состояния фагоцитов крови и фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием различного генеза / Л.В. Посисеева, Н.Ю. Сотникова, **И.В. Речистова**, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Н.В. Астраух // Инновации и информационные технологии в диагностической, лечебно-профилактической и учебной работе клиник: матер. науч.- практ. конф. ЦФО РФ с междунар. участием. – Тверь, 2009. – С. 323–324.
4. Взаимосвязь показателей, характеризующих функциональное состояние фагоцитов фолликулярной жидкости, с наступлением

беременности у женщин с бесплодием при проведении программы ЭКО / Л.В. Посисеева, Н.Ю. Сотникова, **И.В. Речистова**, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова, Е.В. Полумискова // Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности: сб. науч. тр. и матер. республ. науч. - практ. конф. – Минск, 2009. – С. 165–169.

5. Иммунологические прогностические критерии качества эмбриона в программе ЭКО / Е.В. Полумискова, Н.Ю. Сотникова, **И.В. Речистова**, Л.В. Посисеева, М.В. Веденева, Ю.С. Анциферова // Амбулаторно- поликлиническая практика – новые горизонты: сб. тезисов всерос. конгр. – М., 2010. – С. 270–271.
6. Речистова И.В. Продукция хемокинов у женщин с бесплодием и эффективность экстракорпорального оплодотворения / **И.В. Речистова** // Неделя науки – 2010: матер. 90-ой юбилейной ежегодной науч. - практ. конф. студентов и молодых ученых ИвГМА, посвященной 80-летию академии. – Иваново, 2010. – С. 35.
7. Новые иммунологические критерии прогноза эффективности различных этапов ЭКО / Н.Ю. Сотникова, И.К. Богатова, Л.В. Посисеева, **И.В. Речистова**, Е.В. Полумискова, Ю.С. Анциферова // Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: труды XXIII междунар. конгресса. – М., 2010. – С. 208–209.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

ВМС – внутриматочное средство

ДИ - доверительный интервал

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИФА – иммуноферментный анамнез

НМФ – нарушение менструальной функции

НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы

ОШ – отношение шансов

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

TVР – трансвагинальная пункция фолликулов

CD – кластер дифференцировки

IL - интерлейкин

HLA-DR – человеческий лейкоцитарный антиген II класса

MCP-1 – макрофагальный хемотаксический протеин

RANTES - регулируемый активацией фактор, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками