

На правах рукописи

ДОНЦОВА

Татьяна Владимировна

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРОГРАММЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С
УЧЕТОМ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА
СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ

14.01.01- акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор биологических наук

Калинина Елена Анатольевна
Николаева Марина Аркадьевна

Официальные оппоненты:

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, руководитель

Серебренникова Клара Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУЗ «Центральная клиническая больница» РАН, научный руководитель по акушерству и гинекологии

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита состоится «18» февраля 2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/DontsovaTVdis2_2.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время с появлением успешных методов лечения бесплодия и развитием методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) существенно возросла необходимость внедрения новых способов диагностики, мониторинга, лечения и прогноза исходов процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) (Mascarenhas M.N. et al., 2019). Повышение результативности ВРТ невозможно без изучения механизмов регуляции имплантации (Серебренникова К.Г. и соав., 2017; Fox C. et al., 2016).

В последние несколько лет появились данные о том, что взаимодействие женского репродуктивного тракта с семенной плазмой (СП) – этап, необходимый не только для оплодотворения и имплантации, но и для полноценного протекания беременности (Robertson S.A. et al., 2016).

При спонтанной беременности ее иммунорегуляция начинается с момента контакта женского репродуктивного тракта с СП. Известно, что СП содержит различные иммунорегуляторные факторы, которые влияют на физиологию женского репродуктивного тракта и, тем самым, увеличивают шанс наступления беременности и успешного ее течения, так как имплантация и ранние стадии гестации протекают на благоприятно измененном иммунологическом фоне (Robertson S.A. et al., 2016). Имеются данные о том, что СП содержит цитокины и простагландины, синтезируемые в предстательной железе. При попадании в женский репродуктивный тракт они взаимодействуют с рецепторами эпителиальных клеток в цервикальном канале и матке, что приводит к их структурным и функциональным изменениям (Гзгзян А.М. и соав., 2019; Sharkey D.J. et al., 2018). Особенностью программы ВРТ в отличие от естественного цикла зачатия является отсутствие контакта с СП. Поэтому в зарубежных исследованиях неоднократно предпринимались попытки использовать введение СП в женские половые пути при проведении программы ВРТ с целью повышения эффективности лечения. Однако имеющиеся данные о влиянии аппликации СП в день трансвагинальной

пункции яичников (ТВП) на результативность лечения бесплодия носят весьма противоречивый характер (von Wolff M. et al., 2019). Лишь при анализе иммунологических биомаркеров СП впервые было показано, что СП человека содержит факторы, оказывающие не только благоприятное, но и негативное влияние на имплантацию эмбриона, а эффективность программы ВРТ при интравагинальной аппликации СП зависит от концентрации этих факторов (Nikolaeva M.A., Kalinina E.A. et al., 2016; Бабаян А.А., 2017).

Очевидно, что половые контакты в цикле овариальной стимуляции также могут программировать успешность имплантации, что может определяться разнонаправленными эффектами множества компонентов СП, поступающих в репродуктивный тракт пациентки. До сих пор в единичных работах, посвященных влиянию половой жизни на результативность программы ВРТ, состав СП не принимался во внимание.

Являясь значимой иммунорегуляторной молекулой СП, трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) выступает ключевым компонентом развития толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. Усиливая хемотаксис, TGF- $\beta 1$ стимулирует развитие посткоитального воспаления, необходимого для имплантации эмбриона, и ограничивает его за счет индукции противовоспалительных реакций. Кроме того, СП содержит целый ряд провоспалительных (IFN γ , IL-1 β , IL-18, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) и противовоспалительных (IL-4, IL-5, IL-10) цитокинов. Поэтому нельзя исключить, что баланс про- и противовоспалительных цитокинов в СП партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, в том числе при ВРТ, также может влиять на эффективность имплантации эмбриона. Кроме того, рост уровня простагландина (PG) E₂ отмечается в зонах повышенной проницаемости сосудов эндометрия, а значит PG E₂, содержащийся в СП, также может являться фактором иммунорегуляции имплантации (Kenedy T.G. et al., 2019).

Основным звеном, обеспечивающим формирование и поддержку периферической толерантности к аллоантигенам плода при беременности,

являются регуляторные Т клетки (Treg) (Robertson S.A. et al., 2016). Предполагается, что одним из механизмов влияния СП на имплантацию эмбриона является усиление миграции Treg из периферической крови в матку (Nikolaeva et al., 2019). До сих пор не изучалось влияние цитокинового состава СП, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах в программе ВРТ, на состояние клеточного звена иммунной системы.

Таким образом, представляется актуальным, современным и перспективным изучение роли иммуномодулирующего потенциала СП партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, для предикции эффективности имплантации эмбриона, что может способствовать внедрению в клиническую практику персонализированного режима половых контактов в цикле ВРТ.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на очевидность воздействия СП, возможность влияния ее компонентов при половых контактах в цикле ВРТ на реализацию репродуктивной функции женщины до сих пор не изучена. В единичных работах, посвященных влиянию половых контактов на результативность программы ВРТ, состав СП не анализировался (Tremellen K.P. et al., 2000).

Отсутствуют данные о механизмах реакций клеточного звена иммунитета женщины на введение СП, поэтому выявление роли СП в иммунорегуляции имплантации эмбриона является теоретическим обоснованием усовершенствования алгоритма обследования супружеских пар, вступающих в программу ВРТ, и разработки критериев прогнозирования успешного наступления беременности на основании комплексного скринингового иммунологического исследования СП. Понимание механизмов иммуномодулирующего действия СП позволит разработать принципиально новые персонализированные подходы к лечению бесплодия в программе ВРТ.

Цель исследования

Изучение клинико-прогностической значимости иммуномодулирующего потенциала семенной плазмы партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, для предикции эффективности программы вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования

1. Провести анализ данных анамнеза, параметров клинического и гормонального статуса, особенностей фолликуло-, оо- и раннего эмбриогенеза у супружеских пар с трубно-перитонеальным фактором бесплодия в программе ВРТ.

2. Оценить уровни маркеров, определяющих иммуномодулирующий потенциал семенной плазмы полового партнера, при проведении программы ВРТ: содержание интерлейкинов (IL) -1 β , -6, -8, -10, -12p70, -17A, -18, -23, -33, интерферона (IFN) α 2 и γ , фактора некроза опухоли (TNF- α), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), уровень трансформирующего фактора роста (TGF β 1) и простагландина E₂ (PGE₂).

3. Провести анализ влияния половых контактов в программе ВРТ на частоту наступления беременности у пациенток в зависимости от содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и простагландина E₂ в семенной плазме партнера.

4. Выявить прогностическую значимость определения содержания цитокинов и PGE₂ в семенной плазме для оценки эффективности программы ВРТ с рекомендованными половыми контактами и без них.

5. Изучить влияние половых контактов на состояние клеточного звена иммунитета женщин с помощью анализа взаимосвязи между цитокиновым профилем семенной плазмы и уровнем регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток при проведении программы ВРТ.

6. На основании комплексной оценки иммуномодулирующих свойств семенной плазмы разработать алгоритм персонафицированной подготовки и

проведения программы ВРТ, предусматривающий включение или отмену половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

Научная новизна

Впервые обнаружена зависимость эффективности программы ВРТ от цитокинового профиля семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала лечения, на фоне отмены половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

С помощью мультиплексного анализа определены уровни цитокинов (IFN α , IL-12p, IL-10, TNF α , IFN γ , IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8, TGF, MCP1) и PGE₂ в СП партнера при проведении программы ВРТ.

Впервые установлено влияние цитокинов семенной плазмы полового партнера, поступающей в женский репродуктивный тракт при естественных половых контактах в период проведения программы ВРТ, на реализацию репродуктивной функции у пациенток.

Выявлены механизмы реализации иммуномодулирующего потенциала семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, связанные с влиянием цитокинового состава СП на состояние Т-клеточного звена иммунной системы пациенток в программе ВРТ.

Практическая значимость

Обоснована целесообразность персонализированного подхода к назначению режима половых контактов при проведении программы ВРТ.

Установлены параметры цитокинового статуса семенной плазмы, определяющие оптимальный режим половых контактов при проведении программы ВРТ и являющиеся значимым фактором повышения эффективности лечения бесплодия.

Определен пороговый уровень содержания регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток для прогноза успешности имплантации в программе ВРТ.

Разработан алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ у супружеских пар с учетом цитокинового профиля семенной

плазмы партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациентки и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное и ретроспективное обследование супружеских пар, проходящих лечение бесплодия методом ВРТ. Пациенты были подготовлены в соответствии с приказом министерства здравоохранения РФ №107н от 30.08.2012 г. В работе использовались клинические, лабораторные, инструментальные методы, а также статистический анализ данных. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток и цитокинового профиля СП проводили с использованием проточной цитофлуориметрии. Содержание РГ E₂ в СП осуществляли с помощью иммуноферментного анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Во время лечения бесплодия методами ВРТ половые контакты могут оказывать как благоприятное, так и негативное влияние на процессы имплантации эмбриона. Частота наступления клинической беременности при наличии или отсутствии половых контактов связана с содержанием и соотношением провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IFN α , IL12p, IL-18, IL-10) в семенной плазме полового партнера, что свидетельствует о влиянии семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала и во время овариальной стимуляции, на эффективность программы ВРТ.

2. Содержание цитокинов (IL-10, TNF α) в семенной плазме полового партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала овариальной стимуляции, является одним из факторов, определяющих состояние клеточного звена иммунитета пациентки и эффективность имплантации эмбриона. Повышение содержания регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток (>6,6%) в день трансвагинальной пункции является благоприятным прогностическим фактором имплантации в группе пациентов без половых контактов во время программы ВРТ.

3. Взаимосвязь между режимом половых контактов, иммуномодулирующими свойствами семенной плазмы партнера и частотой наступления беременности является основанием для персонификации протокола ВРТ. Наиболее значимым показателем, определяющим эффективность рекомендации или ограничения половых контактов в цикле овариальной стимуляции, является содержание противовоспалительного цитокина IL-10 в семенной плазме.

Личный вклад автора

Автор лично принимала участие в выборе темы диссертационной работы, разработке цели и задач, анализе, научном обобщении и статистической обработке полученных результатов. Автор непосредственно принимала участие в сборе биологического материала, ведении пациенток на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ и переносе эмбрионов, анализировала и научно интерпретировала полученные результаты настоящего исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты настоящего исследования соответствуют пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация результатов

Работа рассмотрена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени Б.В. Леонова (21.06.2019) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (24.06.2019).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в клинической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, 4 статьи входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, 1 в зарубежном журнале.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 157 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственные результаты и обсуждение, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и литературы. В работе представлены 21 таблица и 22 рисунка. Библиографический указатель состоит из 212 литературных источников, из которых 9 русскоязычных и 203 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Обследовано 60 супружеских пар на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова и лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Критерии включения: возраст женщин 20-38 лет, мужчин 20-50 лет, трубно-перитонеальный фактор бесплодия, сохраненный овариальный резерв, нормальный кариотип партнеров, селективный перенос одного эмбриона, отсутствие урогенитальных инфекций, регулярные половые контакты в паре, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие противопоказаний к ВРТ, тяжелая форма патозооспермии, любые состояния и осложнения, требующие отмены переноса эмбриона в исследуемом цикле, использование донорского материала. Все пациенты обследованы согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Исследование направлено на выявление взаимосвязи эффективности лечения бесплодия методом ВРТ и комплекса иммунных факторов СП, поступающей в репродуктивный тракт пациенток при половых контактах. Для этого сформировано две группы. Первую составили пациенты с

рекомендованными половыми контактами во время программы ВРТ за 3-5 дней до трансвагинальной пункции (ТВП) (n=33), второй группе рекомендован половой покой в период проведения овариальной стимуляции (n=27). Каждая группа разделилась на две подгруппы по факту наступления или отсутствия клинически подтвержденной беременности.

Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с препаратами антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ).

Эякулят полового партнера оценивали согласно стандартному протоколу ВОЗ (2010) и использовали для оплодотворения и получения СП. С помощью микросферного мультиплексного анализа определяли концентрации цитокинов TGF- β 1, IFN α , TNF α , IFN γ , IL-12p, IL-10, IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8, MCP1 в образцах СП, полученных в день ТВП. Содержание PG E₂ в СП оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Оценку цитокинового профиля СП и выявление Трег проводили с использованием проточной цитофлуориметрии. Анализировали регуляторные Т (Трег) клетки с фенотипом (CD4+CD25highCD127low/-) среди CD4+ лимфоцитов периферической крови пациенток в день ТВП.

Морфологическую характеристику эмбрионов проводили в соответствии с классификацией Гарднера. Осуществлялся селективный перенос эмбриона, ведение посттрансферного периода и диагностика беременности проводилась по стандартизированным методикам.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью пакета прикладных программ MSExcel и MedCalc.

Результаты исследований и их обсуждение

При анализе клиничко-anamнестических данных пациенток исследуемых групп статистически значимых различий не выявлено, что свидетельствует об однородности и сопоставимости анализируемых параметров. Все пациенты отвечали критериям включения и исключения. Не выявлено различий в схемах

стимуляции, показателях фолликуло-, оо- и раннего эмбриогенеза. При анализе основных показателей спермограммы половых партнеров не было отмечено статистически значимых меж- и внутригрупповых различий в концентрации, подвижности, числе морфологически патологических форм сперматозоидов и количестве лейкоцитов.

Частота наступления клинической беременности в первой группе с рекомендованными половыми контактами составила 25,0%, во второй – 33,3%. Полученные результаты демонстрируют отсутствие статистически значимых различий в отношении частоты наступления клинической беременности в исследуемых группах ($p=0,92$), не выявлено зависимости наступления беременности от наличия или отсутствия половых контактов в цикле лечения бесплодия (табл. 1).

Таблица 1

Исходы программы ВРТ у пациенток исследуемых групп

Показатель, единицы измерения	Группа с половыми контактами (n=33)	Группа без половых контактов (n=27)	Уровень значимости различий - p
Частота имплантации, %	25,0	44,4	0,48
Частота наступления клинической беременности, %	25,0	33,3	0,92
Частота прерывания беременности %	19,5	11,1	0,41
Частота родов, %	80,5	88,9	0,12

$p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Следующим этапом исследования явилась оценка зависимости наступления беременности от уровня содержания цитокинов IFN α , TNF α , IFN γ , IL-12p, IL-10, IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8, MCP1, TGF- β 1 в СП партнера в группе пациентов с половыми контактами в программе ВРТ. В группе пациентов с половыми контактами во время лечения большая частота наступления беременности отмечалась у пациенток, в СП партнера которых выявлено повышение содержания IL-18 ($p=0,017$) и снижение IL-10 ($p=0,01$) в СП (рис.1).

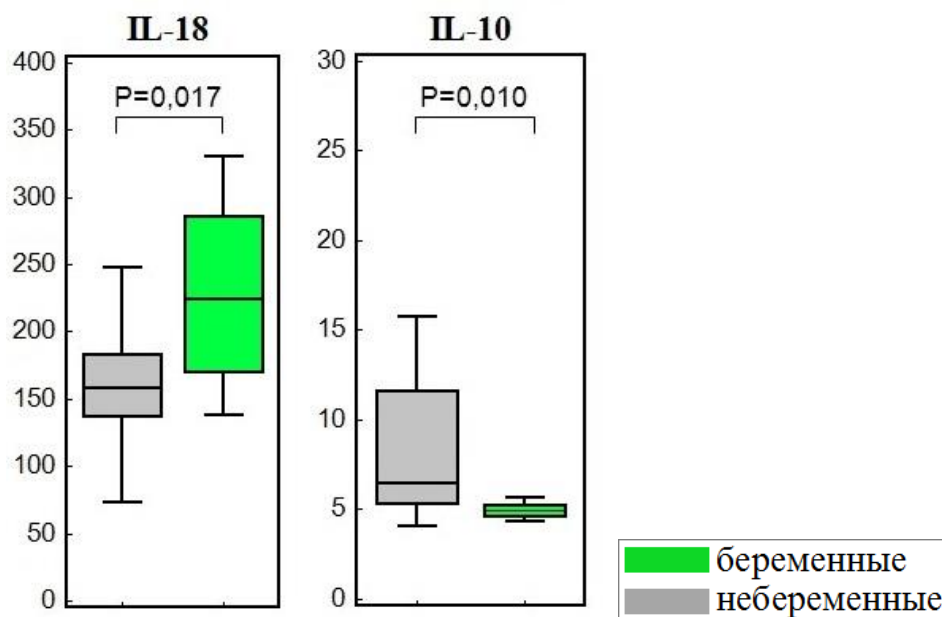


Рисунок 1. Содержание IL-18 и IL-10 (пг/мл) в СП партнера группы пациентов с половыми контактами во время ВРТ при отсутствии и наступлении беременности

Установлено, что Th1/Th2 баланс цитокинов в СП был существенно выше в подгруппе пациенток с наступившей беременностью по сравнению с аналогичными показателями в подгруппе с отрицательным результатом лечения: отношение уровня провоспалительных цитокинов IFN α , IL-18, IL-12, IL-33, IL-8, TNF α к противовоспалительному IL-10 в подгруппе пациенток с наступившей беременностью было в 1,3; 2,4; 1,3; 1,2; 2,9; 1,7 раз выше, чем в группе пациенток с отсутствием беременности.

Увеличение содержания противовоспалительного цитокина IL-10 и снижение уровня Th1/Th2 баланса в группе пациенток с ненаступившей беременностью свидетельствуют о том, что формирование воспалительной реакции в микроокружении эмбриона от СП выступает благоприятным фактором для имплантации, в то время, как вклад СП в усиление противовоспалительной направленности иммунных реакций, способен препятствовать наступлению беременности.

Для оценки клинической значимости определения уровня исследованных цитокинов в СП полового партнера и прогнозирования исходов программы ВРТ в группе пациенток с половыми контактами был проведен ROC-анализ

полученных результатов. Прогностическая значимость показателя IL-10 была достаточно высокой: площадь под кривой (AUC) составила 0,75, чувствительность 87,5%, специфичность 71,4% при значении показателей $\leq 5,7$ пг/мл ($p=0,024$). Для IL-18 AUC составила 0,79, чувствительность 62,5%, специфичность 95,2% при значении показателей $>210,4$ пг/мл ($p=0,006$) (рис.2).

Выявлено, что соотношения IL-18/IL-10 и IL-12/IL-10 в СП являются наилучшими предикторами для прогнозирования исходов ВРТ (рис.2 табл.2).

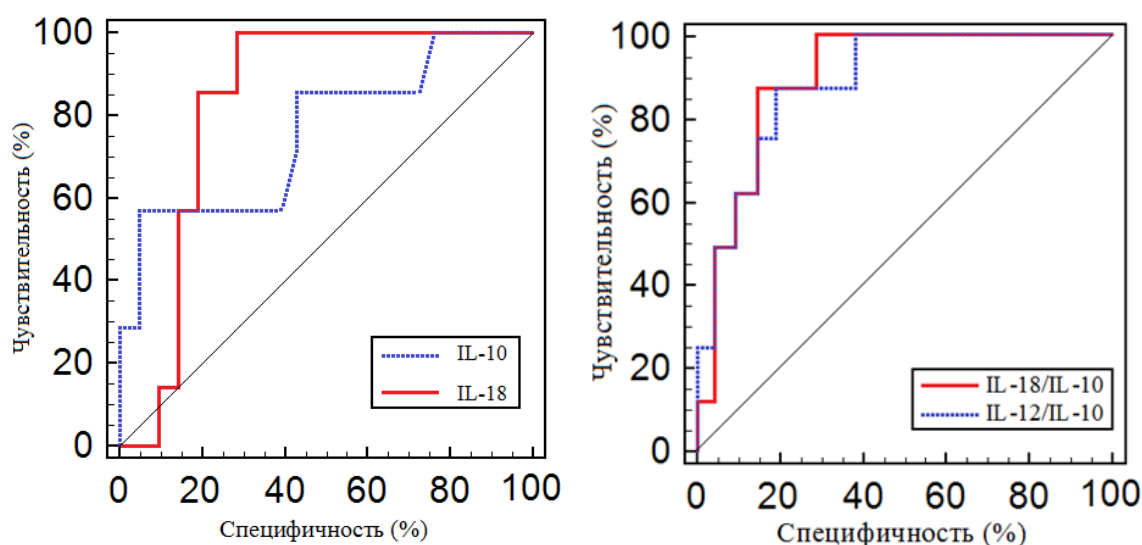


Рисунок 2. ROC-кривые содержания IL-18 и IL-10 (пг/мл) и соотношений IL-18/IL-10 и IL-12/IL-10 в СП для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ в группе пациентов с половыми контактами

Таблица 2

Клинико-прогностическая значимость соотношения уровня цитокинов в СП для исходов программы ВРТ в группе пациентов с половыми контактами

Параметр	AUC	Точка отсечки	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Значение Р
IL-18/IL-10	0,899	$>33,2$	87,5	85,7	70,0	94,7	$<0,0001$
IL-12/IL-10	0,887	$>0,8$	87,5	81,0	63,6	94,4	$<0,0001$

+ ПЦ – положительная прогностическая ценность

- ПЦ – отрицательная прогностическая ценность

Исходя из вышесказанного, противовоспалительный цитокиновый профиль СП, обусловленный преобладанием цитокина IL-10, прогнозирует низкую частоту наступления беременности при ВРТ с половыми контактами. Вероятно, более эффективным способом лечения бесплодия в данном случае может стать ограничение поступления несбалансированной СП в репродуктивный тракт пациентки в цикле овариальной стимуляции. Это предположение подтвердилось при ретроспективной оценке состава цитокинов СП партнеров в группе пациентов без половых контактов во время лечения.

Установлена взаимосвязь между содержанием цитокинов и наступлением беременности в группе, где половые контакты прекращались перед началом программы ВРТ. В подгруппе пациенток с наступившей беременностью в СП партнеров выявлена существенно большая концентрация провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-17A и противовоспалительного IL-10 (рис.3).

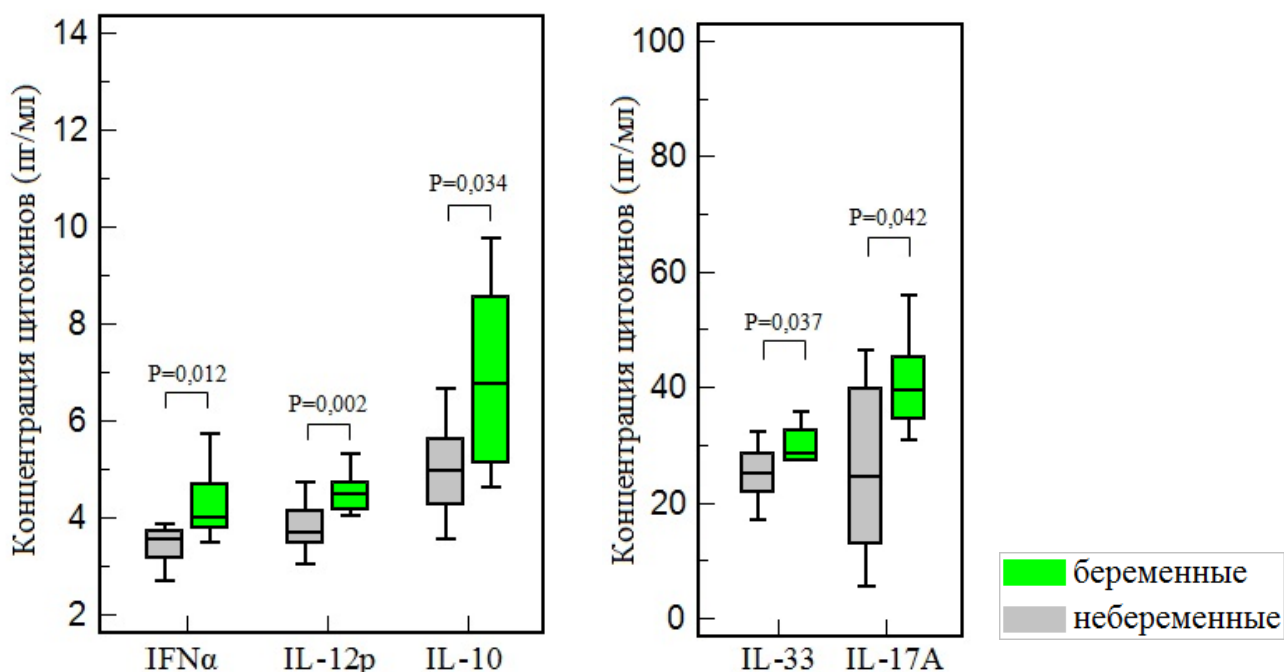


Рисунок 3. Концентрация цитокинов (пг/мл) IFN α , IL12p, IL-10, IL-33, IL-17A в СП партнера группы пациентов без половых контактов во время программы ВРТ при отсутствии и наступлении беременности

При этом Th1/Th2 баланс (соотношения IL-12p/IL-10 и TNF α /IL-10) был существенно ниже в группе пациенток с наступившей беременностью.

Проведен ROC-анализ для группы пациентов с отсутствием половых контактов во время лечения. Установлено, что концентрация IFN α , IL-12p и IL-10 в СП являются оптимальными предикторами исходов ВРТ в данной группе пациентов (табл.3).

Таблица 3

Клинико-прогностическая значимость уровня цитокинов в СП партнера для исходов программы ВРТ в группе пациентов без половых контактов

Параметр	AUC	Порог отсечки, пг/мл	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Уровень значимости различий - p
IL-12p	0,889	>4,0	100,0	71,4	69,2	100,0	<0,0001
IFN α	0,817	>3,8	77,8	85,7	77,8	85,7	0,0006
IL-10	0,796	>6,6	66,7	93,3	85,7	82,4	0,0030

Отмена половых контактов в группе пациентов с высоким содержанием IFN α , IL-12p и IL-10 и низким уровнем соотношений IL-12/IL-10 и TNF α /IL-10 приводила к существенному повышению частоты наступления беременности от 4,5 до 5,6 раз (табл.4, рис.4).

Таблица 4

Клинико-прогностическая значимость определения соотношений цитокинов в СП для исходов программы ВРТ в группе пациентов без половых контактов

Параметр	AUC	Порог отсечки	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Уровень значимости различий - p
TNF α /IL-10	0,800	\leq 0,98	75,0	86,7	75,0	86,7	0,0078
IL-12/IL-10	0,754	\leq 0,58	55,6	100,0	100,0	77,8	0,0371

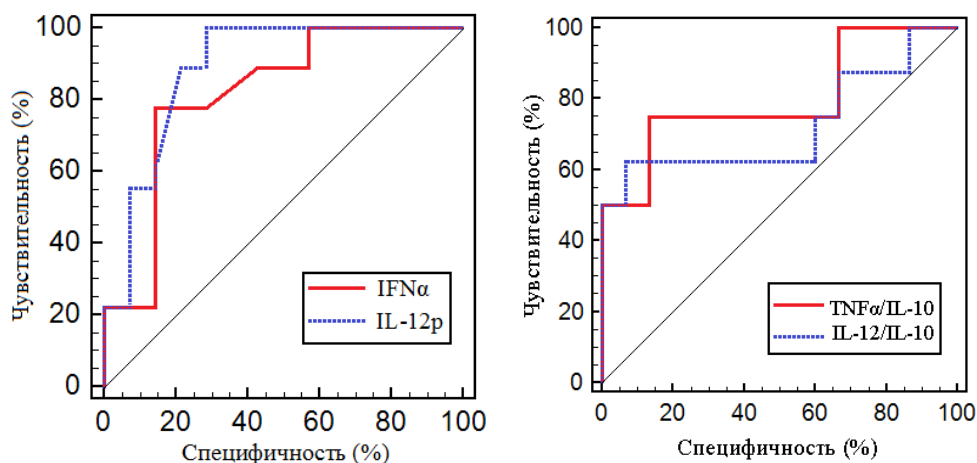


Рисунок 4. ROC-кривые содержания IFN α , IL-12p и IL-10 (пг/мл) в СП группы пациентов без половых контактов для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ.

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии СП на эффективность программы ВРТ. В зависимости от содержания цитокинов СП, от режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции, может наблюдаться как положительное влияние на имплантацию эмбриона, так и снижение частоты наступления беременности. Очевидно, что анализ индивидуального статуса цитокинов СП представляет собой перспективный персонализированный подход к повышению эффективности лечения бесплодия с помощью выбора режима половых контактов в программе ВРТ. Однако необходимо отметить, что в данном исследовании состав СП анализировался в день ТВП, в то же время для персонализированного подхода к режиму половых контактов в программе ВРТ информацию о цитокиновом составе СП рациональнее иметь перед началом овариальной стимуляции, то есть на 1-3 день менструального цикла женщины.

Стратегия оценки содержания цитокинов СП для персонализации режима половых контактов в программе ВРТ возможна только в случае низкого уровня внутрииндивидуальной вариабельности цитокинов. Проведена оценка вариабельности уровня цитокинов СП, полученной в двух временных точках: в начале менструального цикла пациентки и в день ТВП. Низкая вариабельность отмечалась у IFN α и IL-10, умеренная - IFN γ , IL-12, IL-33, IL-17, MCP и

высокая вариабельность - IL-6, IL-23, IL-8, IL-18, TNF α , IL-1b. Таким образом, подтверждена перспективность использования ключевого противовоспалительного цитокина IL-10 в качестве прогностического маркера наступления беременности в программах ВРТ при наличии и отсутствии половых контактов на фоне овариальной стимуляции.

В ходе ретроспективного анализа данных определено, что при содержании IL-10 $\leq 6,6$ пг/мл в СП частота наступления беременности 42,1%, следовательно, целесообразным является рекомендация половых контактов в цикле стимуляции. При относительно высоком содержании IL-10 $> 6,6$ пг/мл и отмене половых контактов частота наступления беременности достигла 85,7 % (рис.5).

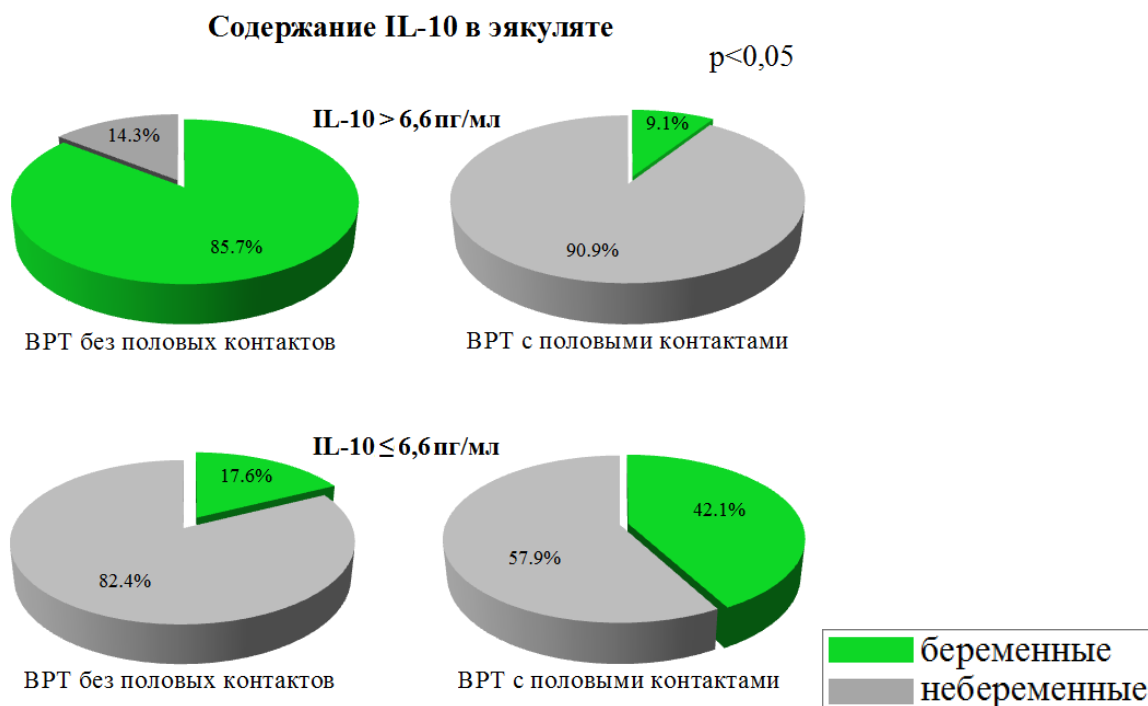


Рисунок 5. Частота наступления беременности при разных уровнях IL-10 в СП в группах пациентов с половыми контактами и без в программе ВРТ

Выявленная взаимосвязь между иммуномодулирующими свойствами СП партнера пациенток и частотой наступления беременности позволяет оптимизировать программу ВРТ с помощью выбора режима половых контактов в период лечения.

На следующем этапе работы сравнили содержание PG E₂ в СП между группами пациентов с половыми контактами и без, а также внутри групп в зависимости от факта наступления беременности. Статистически достоверных различий выявлено не было. Однако, в группе пациентов без половых контактов при успешном результате лечения отмечена тенденция к повышению содержания PG E₂ в СП (p=0,08).

Ранее было показано, что одним из механизмов иммуномодулирующего действия цитокинов СП на репродуктивный тракт женщины является их влияние на клеточное звено иммунитета пациенток. Изменения уровня регуляторных Т клеток (Трег) в периферической крови в день ТВП связаны с индуцируемой СП миграцией Трег в матку, необходимой для регуляции воспалительных реакций в эндометрии на стадии имплантации эмбриона (Nikolaeva et al., 2016, 2019). Установлено, что уровень Трег в периферической крови может зависеть от цитокинового профиля СП, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах и являться потенциально значимым прогностическим маркером исходов программы ВРТ.

В соответствии с поставленными задачами был проведен анализ клеточного звена иммунитета пациенток. Не выявлено взаимозависимости между содержанием Трег в крови пациенток группы с половыми контактами во время ВРТ и наступлением беременности. Однако, определено, что при низком уровне Трег ($\leq 6,3$ %) в периферической крови пациенток группы с половыми контактами частота наступления беременности может быть увеличена в 3,8 раза при интравагинальной аппликации СП в день ТВП по сравнению с группой пациентов без аппликации (71,4% и 18,8%, соответственно, p<0,05) (Бабаян А.А. и соавт., 2017).

Выявлено, что повышение содержания Трег клеток в периферической крови пациенток в день ТВП более 6,6 % является позитивным прогностическим фактором успешной имплантации в программе ВРТ без половых контактов (рис.6).

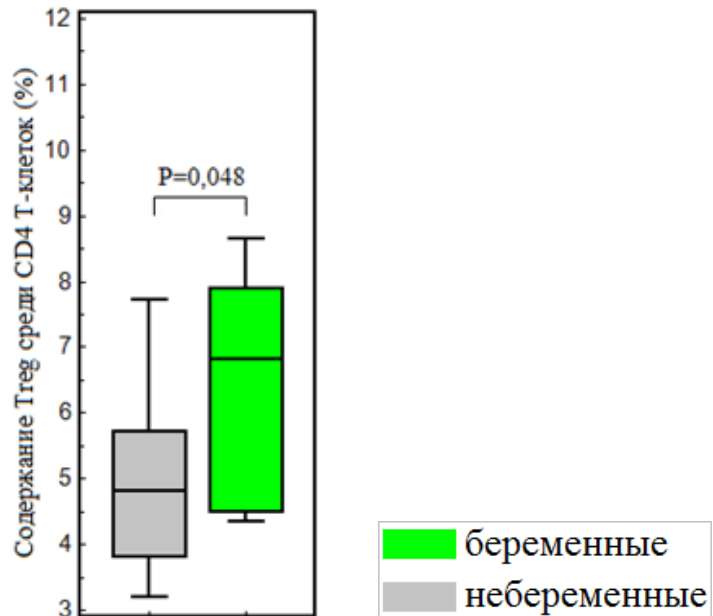


Рисунок 6. Процентное содержание Трег в периферической крови пациенток в группе без половых контактов при отсутствии и наступлении беременности

Для группы пациентов без половых контактов во время ВРТ обнаружена прямая корреляционная связь между содержанием Трег клеток (%) в периферической крови пациенток и концентрацией ИЛ-10 (пг/мл) в СП партнера, а также концентрацией TNF α (пг/мл) в СП. Следовательно, с увеличением содержания ИЛ-10 и TNF α в СП партнера связан высокий уровень Трег клеток (%) в крови пациенток и улучшение исходов лечения (рис.7).

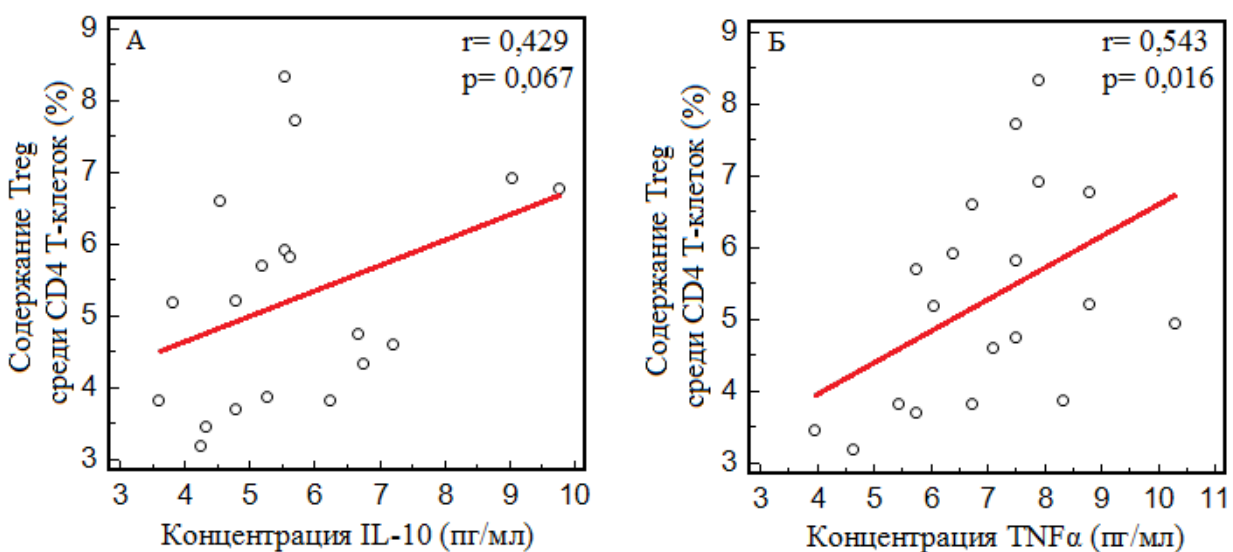


Рисунок 7. Корреляционная зависимость процентного содержания Трег в периферической крови пациенток от концентрации ИЛ-10 и TNF α (пг/мл) в СП партнера в группе без половых контактов во время ВРТ

Проанализированные данные позволяют заключить, что СП, поступающая во время половых контактов в репродуктивный тракт пациентки, влияет на ее клеточный иммунитет, изменяя уровень регуляторных Т клеток в периферической крови в день ТВП, влияя на исходы программы ВРТ.

Установлено, что отмена половых контактов в цикле овариальной стимуляции для пациентов с повышенным уровнем как провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-17A, так и IL-10, приводит к повышению содержания циркулирующих Трег в периферической крови в день ТВП и является предиктором наступления беременности. В то же время при отмене половых контактов у пациентов со сбалансированным содержанием цитокинов в СП низкое содержание Трег в периферической крови пациенток сопровождается снижением частоты наступления беременности.

Таким образом, согласно полученным данным поступление цитокинов СП в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах способно программировать исходы ВРТ. Попадание цитокинов СП в репродуктивные пути пациентки при половых контактах до начала цикла овариальной стимуляции может также влиять на характер перераспределения пула регуляторных Т клеток в лечебном цикле, что в свою очередь, определяет эффективность последующих этапов иммунорегуляции имплантации и наступления беременности.

На основании проведенного исследования предложен алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ у супружеских пар с учетом цитокинового профиля СП партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациенток и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции (рис.8).

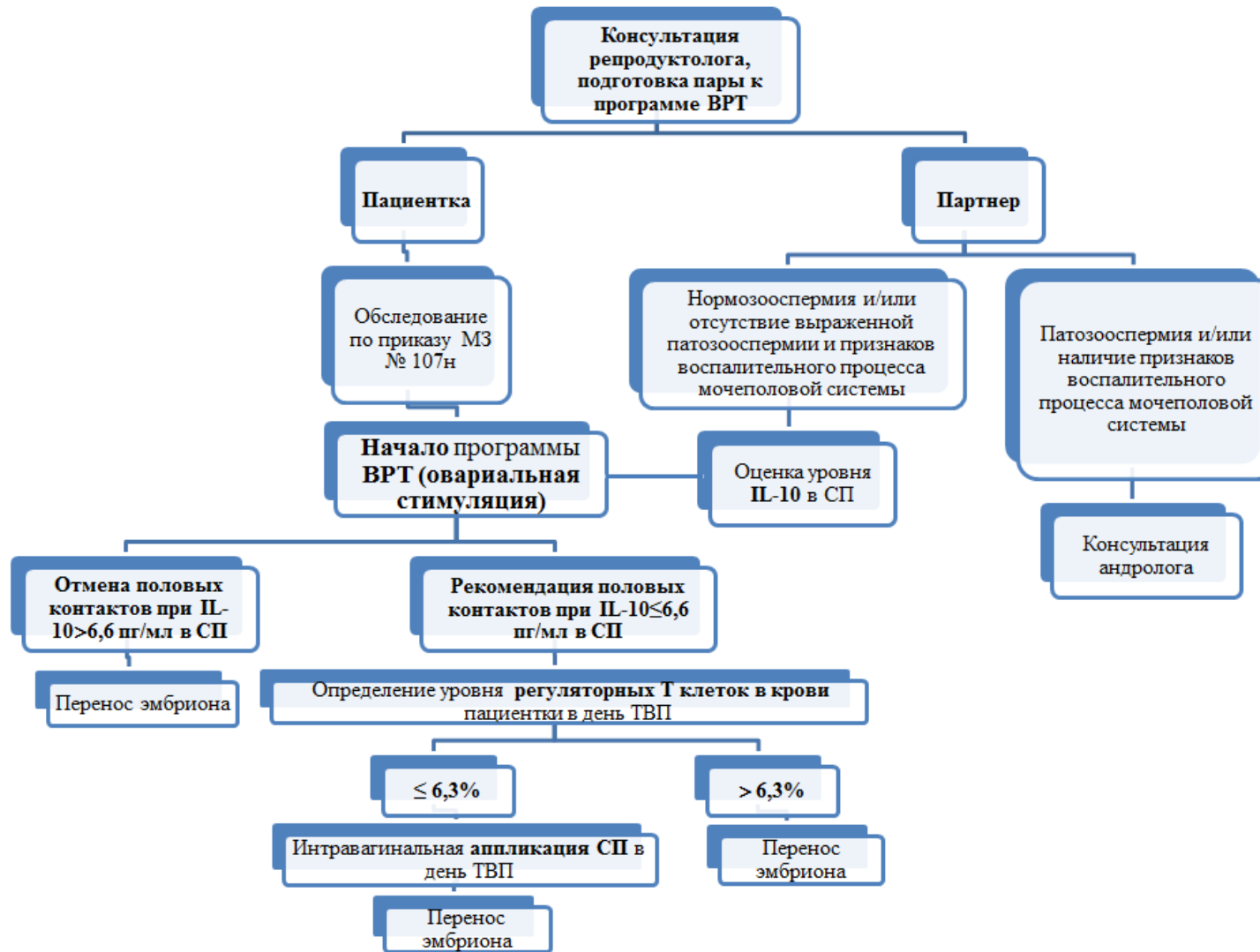


Рисунок 8. Алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ с учетом цитокинового профиля СП партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациенток и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции

ВЫВОДЫ

1. Для исследуемых пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, характерен молодой репродуктивный возраст ($31,7 \pm 3,6$), нормальные показатели индекса массы тела ($24,9 \pm 4,1$) и овариального резерва, не более двух программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в анамнезе. Частота наступления беременности при проведении программы ВРТ не зависела от клинико-anamнестических данных, параметров оо- и раннего эмбриогенеза, основных показателей спермограммы партнера и не отличалась в группах пациентов с половыми контактами и без них.

2. Иммуномодулирующий потенциал СП полового партнера пациенток в программе ВРТ определяется широким спектром маркеров. Интерлейкины (IL) -1 β , -6, -8, -10, -12p70, -17A, -18, -23, -33, интерферон (IFN) α и γ , фактор некроза опухоли (TNF- α), моноцитарный хемоаттрактантный протеина-1 (MCP-1), трансформирующий фактор роста (TGF β_1) и простагландин E₂ (PGE₂) обладают высоким уровнем межиндивидуальной вариабельности. Концентрация каждого из маркеров в семенной плазме не зависит от возраста, индекса массы тела, курения и основных параметров спермограммы пациентов.

3. Выявлена зависимость частоты наступления беременности в цикле ВРТ с половыми контактами от содержания цитокинов в СП партнера. В группе пациенток с наступившей беременностью уровень IL-18 был в 1,4 раза выше, а уровень IL-10 в 1,3 раза ниже по сравнению с группой пациенток с отсутствием беременности. В группе пациенток с наступившей беременностью определено смещение баланса цитокинов в сторону провоспалительного профиля и увеличения соотношений IFN α /IL-10, IL-18/IL-10, IL-12/IL-10, IL-33/IL-10, IL-8/IL-10, TNF α /IL-10.

4. Наступление беременности при отмене половых контактов в цикле ВРТ связано с содержанием в СП провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-17A и противовоспалительного цитокина IL-10, концентрация которых была значимо выше в группе пациенток с наступившей

беременностью. Для группы пациенток с наступившей беременностью было характерно смещение баланса цитокинов в сторону противовоспалительного профиля: отношения $TNF\alpha/IL-10$ и $IL-12/IL-10$ были в 1,3 и 1,4 раза ниже по сравнению с группой пациенток с не наступившей беременностью.

5. Одним их наиболее значимых предикторов наступления беременности у пациенток группы с половыми контактами в программе ВРТ является соотношение $IL-18/IL-10$ в СП. При смещении баланса цитокинов в сторону провоспалительного профиля ($IL-18/IL-10 > 33,2$) частота наступления беременности была выше в 2,4 раза по сравнению с группой пациенток с менее выраженной провоспалительной направленностью баланса цитокинов ($\leq 33,2$) и составляла 70,0% и 5,3%, соответственно. Наиболее значимым фактором, связанным с вероятностью наступления беременности при отмене половых контактов, является концентрация $IL-12p$ в семенной плазме партнера. При уровне $IL-12p$, превышающем найденное пороговое значение (4,0 пг/мл), частота наступления беременности составляла 69,2%, при уровне $IL-12p$ ниже порогового наступления беременности не наблюдалось.

6. Половые контакты до начала цикла ВРТ влияют на состояние клеточного звена иммунитета пациенток в день трансвагинальной пункции фолликулов. Выявлена прямая корреляционная связь между содержанием цитокинов $IL-10$ и $TNF\alpha$ в семенной плазме и содержанием Трег клеток в периферической крови пациенток, прекративших половые контакты до начала лечения. Содержание Трег клеток в периферической крови в день ТВП является значимым прогностическим фактором успешности имплантации у пациенток группы без половых контактов во время программы ВРТ. Частота наступления беременности составляла 85,7% при относительно высоком содержании Трег клеток ($> 6,6\%$) и 13,3% при относительно низком ($\leq 6,6\%$).

7. Противовоспалительный цитокин $IL-10$ является ключевым фактором СП, уровень которого ассоциирован с разнонаправленным действием на наступление беременности при наличии и отсутствии половых контактов в программах ВРТ. Половые контакты в цикле овариальной стимуляции при

содержании IL-10 \leq 6,6 пг/мл в СП, ведут к наступлению беременности в 2,4 раза чаще, чем при их отмене (42,1% и 17,6%, соответственно). Отмена половых контактов в программе ВРТ при содержании IL-10 $>$ 6,6 пг/мл в СП ведет к увеличению частоты наступления беременности в 9,4 раза по сравнению с группой пациентов с половыми контактами (85,7 % и 9,1%, соответственно).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Супружеским парам в программе ВРТ целесообразна оценка уровня IL-10 цитокинового профиля семенной плазмы партнера.

2. Супружеским парам следует соблюдать персональный режим половых контактов (каждые два дня в период с 5 по 10 день менструального цикла до ТВП) или их отмену в цикле ВРТ на основании данных о содержании IL-10 в СП партнера.

3. Половые контакты в цикле овариальной стимуляции рекомендуются при относительно низком содержании IL-10 в СП, не превышающем 6,6 пг/мл. При относительно высоком содержании IL-10 $>$ 6,6 пг/мл рекомендуется отмена половых контактов на время программы ВРТ.

4. При проведении программы ВРТ в группе пациентов с половыми контактами (IL-10 \leq 6,6 пг/мл в СП) и относительно низким содержанием регуляторных Т клеток \leq 6,3 % в периферической крови пациентки с целью повышения эффективности имплантации целесообразна аппликация СП в день трансвагинальной пункции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Прогностическая значимость содержания TGF- β 1 и IL-18 в семенной плазме партнера при оценке эффективности вспомогательных репродуктивных технологий. / Николаева М.А., Бабаян А. А., Степанова Е.О., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., **Донцова Т.В.**, Кречетова Л.В. // Материалы XI Международный конгресс по репродуктивной медицине. - М., 2017. - С. 416-417.

2. Влияние семенной плазмы на репродуктивную функцию женщин. / **Донцова Т.В.**, Калинина Е.А., Николаева М.А., Бабаян А.А., Алиева К.У. // **Акушерство и гинекология.** - 2017. - № 10. - С. 20-25.

3. Cytokine status of partner's seminal plasma, regulatory T cells of female patients and pregnancy establishment at IVF/ICSI treatment. / Nikolaeva M.A., Babayan A.A., Stepanova E.O., Arefieva A.S., **Dontsova T.V.**, Smolnikova V.Y., Kalinina E.A., Krechetova L.V., Sukhikh G.T. // The 15th International Symposium for Immunology of Reproduction "50 Years of International Coordination Committee for Immunology of Reproduction". - Varna, Bulgaria. – 2018. - P.31-32.

4. Роль иммунорегуляторного потенциала семенной плазмы в лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения. / Бабаян А.А., Николаева М.А., Смольникова В.Ю., Степанова Е.О., **Донцова Т.В.**, Ванько Л.В., Иванец Т.Ю., Калинина Е.А., Кречетова Л.В., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** – 2018. - №3. - С. 76-82.

5. Роль CD200/CD200R взаимодействия в формировании иммунологической толерантности при трансплантации и беременности. /Арефьева А.С., Бабаян А.А., Степанова Е.О., **Донцова Т.В.**, Павлович С.В., Кречетова Л.В., Николаева М.А. // **Медицинская иммунология.** - 2018. - Т.20, №6. - С. 807-814.

6. The link between seminal cytokine interleukin-18, female circulating regulatory T cells, and IVF/ICSI success. / Nikolaeva M.A., Babayan A.A., Stepanova E.O., Arefieva A.S., **Dontsova T.V.**, Smolnikova V.Y., Kalinina E.A., Krechetova L.V., Pavlovich S.V., Sukhikh G.T. // **Reproductive Sciences.** – 2019. - Vol. 26, №8. – P. 1034-1044.

7. Возможности и проблемы трансляционной медицины: использование иммуномодулирующих свойств семенной плазмы для повышения эффективности программ ВРТ. / Николаева М.А., Бабаян А.А., Арефьева А.С., **Донцова Т.В.**, Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Кречетова Л.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. - №4. – С. 52-53.

8. Особенности цитокинового профиля семенной плазмы и наступление беременности при проведении программы вспомогательных репродуктивных технологий. / **Донцова Т.В.**, Бабаян А.А., Николаева М.А., Арефьева А.С., Калинина Е.А., Кречетова Л.В. // **Гинекология.** – 2019. – Т.21, №4. – С. 9–13.