

Диагностическая значимость определения лимфоцитов периферической крови для прогноза наступления беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации в группах с разными протоколами программы вспомогательных репродуктивных технологий

Т.С.Амян[✉], Л.В.Кречетова, С.Г.Перминова, В.В.Вторушина, Ф.Н.Селимова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Цель – исследование диагностической значимости определения лимфоцитов периферической крови с фенотипами, значимо отличающимися от контрольных значений, для прогноза наступления беременности в группах с разными протоколами программы вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Материал и методы. В исследование были включены 70 пациенток с повторными неудачами имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения: 33 женщины в протоколе с антагонистом гонадотропин-рилизинг-гормона, 37 – в криоцикле.

Результаты исследования. У пациенток в стимулированном цикле выявлена высокая диагностическая значимость определения субпопуляции лимфоцитов, относящихся к врожденному иммунитету (CD3⁺CD8⁺, CD56⁺), а у женщин в криоцикле – с одной стороны субпопуляции лимфоцитов, относящихся к адаптивному иммунитету (CD3⁺), а с другой – сумма CD8⁺, которая включает субпопуляции лимфоцитов и врожденного, и адаптивного иммунитета.

Заключение. Высокая специфичность указанных тестов позволяет выявлять пациенток с перспективой наступления беременности.

Ключевые слова: повторные неудачи имплантации, CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD8⁺, CD3⁺, γδ⁺T-клетки, диагностическая значимость, специфичность, чувствительность.

[✉]amyantanya@rambler.ru

Для цитирования: Амян Т.С., Кречетова Л.В., Перминова С.Г. и др. Диагностическая значимость определения лимфоцитов периферической крови для прогноза наступления беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации в группах с разными протоколами программы вспомогательных репродуктивных технологий. Гинекология. 2017; 19 (5): 26–29. DOI: 10.26442/2079-5696_19.5.26-29

Diagnostic significance of the determination of peripheral blood lymphocytes in predicting the onset of pregnancy in patients with repeated implant failures in groups with different protocols of the assisted reproductive technology program

T.S.Amyan[✉], L.V.Krechetova, S.G.Perminova, V.V.Vtorushina, F.N.Selimova
V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, ul. Akademika Oparina, d. 4

Purpose of the study. Study of the diagnostic significance of the determination of peripheral blood lymphocytes with phenotypes significantly different from the control values for predicting the onset of pregnancy in groups with different protocols of the assisted reproductive technology program in patients with repeated implant failures.

Material and methods. The study included 70 patients with repeated failures of implantation in the in vitro fertilisation program: 33 patients in a protocol with a gonadotropin-releasing hormone antagonist (antHNRH), 37 patients in a cryocycle.

Results of the study. Patients in the stimulated cycle showed a high diagnostic significance of the definition of a subpopulation of lymphocytes related to congenital immunity (CD3⁺CD8⁺, CD56⁺), and in patients in the cryotype, on the one hand subpopulation of lymphocytes related to adaptive immunity (CD3⁺), and on the other CD8⁺, which includes subpopulations of lymphocytes and congenital, and adaptive immunity.

The conclusion. High specificity of these tests allows to identify patients with the prospect of pregnancy.

Key words: repeated failures of implantation, CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD8⁺, CD3⁺, γδ⁺T cells, diagnostic significance, specificity, sensitivity.

[✉]amyantanya@rambler.ru

For citation: Amyan T.S., Krechetova L.V., Perminova S.G. et al. Diagnostic significance of the determination of peripheral blood lymphocytes for predicting the onset of pregnancy in patients with repeated implant failures in groups with different protocols of the assisted reproductive technology program. Gynecology. 2017; 19 (5): 26–29. DOI: 10.26442/2079-5696_19.5.26-29

Несмотря на значительные достижения в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), существенному проценту супружеских пар, прибегающих к ВРТ, не удается достичь наступления беременности после повторных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Повторные неудачи имплантации – неспособность достижения клинической беременности после переноса по крайней мере четырех эмбрионов хорошего качества как минимум в трех лечебных циклах ЭКО или криопротоколах у женщин в возрасте до 40 лет [1]. Повторные неудачи имплантации – серьезная проблема, решению которой посвящено большое количество как клини-

ческих, так и фундаментальных исследований в области репродукции человека. Наименее изученными являются иммунологические аспекты неудач имплантации.

Среди лимфоцитов наиболее значимыми для реализации репродуктивной функции, а следовательно, для наступления беременности считаются субпопуляции с цитотоксической функцией, а именно: большие гранулярные лимфоциты с естественной киллерной активностью (NK-клетки) и фенотипом CD56⁺, CD16⁺, лимфоциты с цитотоксической функцией CD3⁺CD8⁺, которые так же, как и киллерные клетки, являются представителями врожденного иммунитета, и лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺, появляющиеся

Таблица 1. Содержание лимфоцитов различных фенотипов в периферической крови у пациенток в стимулированном цикле и криоцикле (М±m)		
Фенотип субпопуляций лимфоцитов, %	Содержание субпопуляций лимфоцитов, %	
	у пациенток в стимулированном цикле (n=27)	у пациенток в криоцикле (n=21)
CD3 ⁺	69,4±1,6	69,0±1,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,5±1,8	21,0±1,3 (p=0,008)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	6,9±1,0	4,3±0,5
CD16 ⁺	12,7±1,7	10,7±1,1
CD56 ⁺	20,7±2,6	17,7±1,5
CD56,16 ⁺	10,6±1,4	8,9±1,2
CD56 ⁺ γδТКР ⁺	2,5±0,4	3,1±0,4 (p=0,001)
γδ ⁺ Т-лимфоциты	12,3±1,4	15,6±2,3 (p=0,005)
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}	7,4±0,4	6,8±0,3

Примечание: n – число обследованных в группе.

в результате активации реакций адаптивного иммунитета. Несмотря на большое количество исследований по оценке лимфоцитов указанных субпопуляций в репродукции, роль их для наступления и пролонгирования беременности остается невыясненной [1].

Большое значение для формирования механизмов толерантности к аллоантигенам плода в процессах наступления и развития беременности принадлежит Т-лимфоцитам с фенотипом CD4⁺CD25⁺ и внутриклеточной экспрессией фактора Foxp3⁺ – клеткам с естественной регуляторной функцией, или Т-регуляторным клеткам (T-reg), а также γδТ-клеткам [2, 3]. Важной особенностью γδТ-клеток является способность регулировать работу Т-reg путем взаимодействия с их рецепторами к интерферону. Было показано, с одной стороны, что γδТ-клетки, несущие маркер НК-клеток (CD56⁺/TCRγγ), продуцируют цитокины Th1-типа (провоспалительные), с другой – что они имеют прогестероновые рецепторы и вырабатывают прогестерониндуцированный блокирующий фактор, что способствует переключению Th1-типа иммунного ответа на Th2-тип, необходимый для успешной имплантации [4].

В настоящее время отсутствует единая точка зрения на целесообразность проведения персонализированных иммунологических исследований и назначения различных видов иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации.

Целью настоящей работы явилось исследование диагностической значимости определения лимфоцитов периферической крови с фенотипами, значимо отличающимися от контрольных значений, для прогноза наступления беременности в стимулированном цикле и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Материалы и методы

В исследование были включены 70 пациенток: 1-ю группу составили 33 женщины, которым проводилась стимуляция суперовуляции препаратами рекомбинантного фолликуло-стимулирующего гормона (рФСГ) или человеческого менопаузального гонадотропина в протоколе с антагонистом гонадотропин-рилизинг-гормона (антГнРГ); 2-я группа представлена 37 пациентками, которым проводился криоцикл.

Критериями включения в обе группы явились: возраст до 37 лет включительно, неудачные попытки ЭКО как минимум в трех свежих циклах стимуляции суперовуляции или криоциклах, перенос эмбрионов хорошего качества в неудачных программах ЭКО и криоциклах.

Критериями невключения в исследование стали: наличие системных аутоиммунных заболеваний, мужской фактор (выраженная патозооспермия); патология матки: врожденные аномалии матки, внутриматочные синехии, интерстициальная или субсерозная миома матки более 4 см, полипы эндометрия, наружный и генитальный эндометриоз III–IV стадии; тонкий эндометрий (М-эхо≤7), гидросальпинкс и/или тубоовариальное образование с одной

или обеих сторон, синдром поликистозных яичников, бедный ответ яичников на гонадотропную стимуляцию, хромосомные аномалии супругов.

Методы исследования

Пациентам проводили полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом Минздрава России от 30.08.2012 №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Программу ЭКО осуществляли в протоколе с антГнРГ. Со 2–3-го дня менструального цикла начинали стимуляцию суперовуляции препаратами рФСГ или человеческого менопаузального гонадотропина. При достижении максимального фолликула диаметром 18 мм назначали триггер овуляции. В качестве триггера овуляции использовали препарат человеческого хорионического гонадотропина в дозировке 10 000 МЕ за 35–36 ч до проведения трансвагинальной пункции. Перенос эмбрионов в полость матки выполняли на 3 или 5-е сутки после трансвагинальной пункции. В пост-трансферном периоде проводили поддержку препаратами микронизированного прогестерона в дозе 600 мг/сут.

Проведение криоцикла осуществляли с использованием заместительной гормональной терапии, которую с 4–5-го дня менструального цикла начинали препаратами эстрогенов. При достижении М-эхо≥8 добавляли микронизированный прогестерон вагинально. На 6-е сутки после начала приема прогестерона выполняли перенос замороженного эмбриона в полость матки под ультразвуковым контролем.

Поверхностный фенотип клеток периферической крови определяли с помощью стандартного набора моноклональных антител, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) или фикоэритрином (ФЭ), против антигенов CD3 (ФИТЦ), CD8 (ФЭ), CD16 (ФЭ), CD56 (ФЭ), CD56 (ФИТЦ), γδТ-клеточного рецептора – γδТКР (ФЭ) [Becton Dickinson и eBioscience, США]. Оценивали содержание регуляторных γδ⁺Т-лимфоцитов, а также субпопуляцию естественных T-reg как субпопуляцию с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/. Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью моноклональных антител к CD45, меченных перидинин-хлорофилл-протеином – Per-CP (Dako, Дания). Для оценки позитивно окрашенных субпопуляций использовали соответствующие ФИТЦ или ФЭ-меченные изотипические иммуноглобулины G. Для оценки процентного содержания T-reg применяли набор, содержащий моноклональные антитела к антигенам CD4, меченные Per-CP (eBioscience, США), CD25, меченные ФИТЦ (Becton Dickinson, США) и CD127, меченные ФЭ (eBioscience, США). Оценивали долю T-reg среди CD4⁺-клеток. Моноклональные антитела добавляли непосредственно к цельной крови, затем лизировали с помощью раствора FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest.

Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами вариационной статистики. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. Соответствие расчетных выборок показателей нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка с использованием пакета MedCalc 12 для Windows 7. Значимость наблюдаемых отклонений средних значений измеренных параметров оценивали с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента с различными дисперсиями для средних значений с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007. Для оценки диагностической значимости тестов фенотипирования лимфоцитов периферической крови женщин с бесплодием использовали ROC-анализ пакета MedCalc 12 для Windows 7.

Результаты

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов был проведен у пациенток обеих групп, выделенных по типу программы ВРТ (1-я группа – стимулированный цикл, 2-я – криоцикл). Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 2. Диагностическая значимость определения тестов фенотипирования лимфоцитов в периферической крови пациенток с повторными неудачами имплантации для прогноза наступления беременности

Показатель, единица измерения, %	Специфичность	Чувствительность	Площадь под кривой (AUC)	Пороговое значение	
В группе со стимулированным циклом	CD3 ⁺	85,7	40	0,529	>71,8%
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	42,3	100	0,671	≤20,1
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	60	100	0,814	>15,1
	CD16 ⁺	64,3	60	0,529	>15,6
	CD56 ⁺	92,9	60	0,729	>28,9
	CD56,16 ⁺	71,4	60	0,529	>14,6
В группе с криоциклом	CD3 ⁺	100	35,7	0,688	>60,9
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	62,5	78,6	0,665	≤16,6
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	100	42,9	0,585	≤7,9
	CD8 ⁺	50	100	0,741	≤19,7
	CD56 ⁺	87,5	64,3	0,616	≤16,3
	CD56 ⁺ γδTKP ⁺	50	71,4	0,563	≤1,6
	γδ ⁺ T-лимфоциты	75	64,3	0,571	≤10,1

В группе пациенток в криоцикле снижено общее содержание CD8⁺ лимфоцитов, увеличено содержание γδ⁺T-лимфоцитов и клеток с естественной киллерной активностью, экспрессирующих на своей поверхности γδ⁺T-клеточный рецептор, в сравнении с аналогичными показателями в группе пациенток в стимулированном цикле.

В исследуемых группах рассчитана диагностическая значимость определения лимфоцитов периферической крови с фенотипами, значимо отличающимися от контрольных значений, для прогноза наступления беременности в подгруппах с разными протоколами программы ВРТ. Результаты представлены в табл. 2.

Исходя из данных табл. 2 для прогноза наступления беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации, вступивших в программу ЭКО в протокол с анТнРГ, значимо определение содержания в периферической крови лимфоцитов с фенотипом CD56⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺, а для пациенток, вступивших в криопротокол, – определение содержания CD8⁺-лимфоцитов.

На момент написания статьи исходы известны у 66 из 70 пациенток. Беременность наступила у 24 (36,4%) из 66, из них у 9 (27,3%) из 33 женщин в группе со стимулированным циклом и 15 (45,4%) из 33 – в группе с криоциклом.

Обсуждение полученных результатов

К настоящему времени в области репродуктивной иммунологии достигнуты значительные успехи, свидетельствующие о том, что нормальное осуществление репродуктивной функции возможно благодаря наличию уникальных врожденных и приобретенных иммунологических механизмов [3]. Сложный процесс имплантации эмбриона характеризуется скоординированными во времени и пространстве эффектами многочисленных эндокринных и иммунных факторов. Имеются существенные доказательства, что нарушение экспрессии неклассических молекул HLA, дисбаланс цитокинов, а также изменение в количестве и активности NK-клеток вносят свой вклад в нарушение репродуктивной функции.

В данной работе оценивались особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией, а также диагностическая значимость определения тестов фенотипирования лимфоцитов в периферической крови для прогноза наступления беременности у женщин с повторными неудачами имплантации в различных программах ВРТ.

Установлено, что в группе пациенток в криоцикле снижено содержание CD3⁺CD8⁺ по сравнению с аналогичным показателем в группе пациенток в стимулированном цикле, а также отмечен более высокий уровень CD56⁺γδTKP⁺-клеток, чем в группе пациенток в стимулированном цикле, что может отражать разное состояние иммунной системы пациенток в стимулированном и криоцикле.

Большой интерес вызывают γδ⁺T-клетки, проявляющие регуляторные функции и играющие существенную роль в физиологии репродукции [5], они действуют как клетки врожденного иммунитета и напрямую распознают белковые и небелковые фосфолиганды без участия молекул главного комплекса гистосовместимости [6]. Известно, что γδ⁺T-клетки способны регулировать работу T-рег путем взаимодействия с их рецепторами к интерферону [7], которые являются важной составляющей в регулировании воспалительного иммунного ответа [4]. Было показано, с одной стороны, что γδT-клетки, несущие маркер NK-клеток (CD56⁺TCRγδ⁺), продуцируют цитокины Th1-типа (провоспалительные), с другой – что они имеют прогестероновые рецепторы и вырабатывают прогестерониндуцированный блокирующий фактор, что способствует переключению Th1-типа иммунного ответа на Th2-тип, необходимый для успешной имплантации [4].

Известно, что любое гормональное воздействие приводит к изменению состояния иммунного статуса женщин [8]. Есть данные о влиянии эстрогенов на уровень T-рег-клеток и прямой зависимости концентрации этих клеток от уровня эстрадиола в периферической крови у пациенток с повторными неудачами имплантации [9].

В нашей работе показано, что значимых отличий в уровне T-рег-клеток в группе пациенток в стимулированном цикле от аналогичного показателя в группе женщин в криоцикле нет. Однако у последних отмечен более высокий уровень γδ⁺T-клеток, что связано, вероятно, с воздействием препаратов эстрогенов, используемых для подготовки эндометрия у пациенток в криоцикле.

Учитывая, что периферическую кровь для анализа иммунного статуса забирали на фоне гонадотропной стимуляции или приема препаратов эстрогенов, возникает необходимость оценки иммунного статуса пациенток вне протокола для понимания динамики субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, в том числе T-рег-клеток, у женщин с повторными неудачами имплантации в ходе протокола.

Известно, что чувствительность теста – это вероятность того, что он будет положительным, если пациент действительно болен, и специфичность теста – вероятность того, что он будет отрицательным, если пациент здоров.

В подгруппе женщин в стимулированном цикле специфичность определения содержания CD56⁺ у пациенток 92,9% означает, что у данного процента с удачной имплантацией тест будет отрицательным, а примерно у 7% пациенток – положительным. Чувствительность определения этого теста 60% означает, что у 40% пациенток с удачной имплантацией тест будет отрицательным; 100% чувствительность тестов определения CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺ означает, что у всех женщин с повторными неудачами имплантации, у которых беременность наступит в программе ВРТ, тест будет положительным (соответственно каждому кон-

критерию), но он будет положительным и у 40% пациенток с отрицательным исходом программы ВРТ в случае использования теста CD3⁺CD8⁺ и примерно у 58% в случае использования теста CD3⁺CD8⁺.

В подгруппе пациенток с криоциклом с наступившей беременностью содержание CD3⁺-лимфоцитов будет выше критерияльного, но он будет таковым и у 65% с неудачами имплантации. У 50% пациенток с удачной имплантацией в криоцикле содержание CD8⁺-лимфоцитов будет выше критерияльного, но у всех женщин с удачной имплантацией тест будет ниже критерияльного.

Заключение

Таким образом, у женщин в стимулированном цикле высокая диагностическая значимость определения субпопуляции лимфоцитов, относящихся к врожденному иммунитету (CD3⁺CD8⁺, CD56⁺), а для пациенток в криоцикле – субпопуляции лимфоцитов, с одной стороны, относящихся к адаптивному иммунитету (CD3⁺), так как специфичность определения содержания данной субпопуляции лимфоцитов составляет 100%, а с другой стороны – сумма CD8⁺, которая включает субпопуляции лимфоцитов и врожденного, и адаптивного иммунитета. Высокая специфичность данных тестов позволяет выявлять пациенток с перспективой наступления беременности после повторных неудач имплантации в зависимости от вида протокола ВРТ.

Литература/References

1. Coughlan C, Ledger W, Wang Q et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014; 28 (1): 14–38.
2. Pei-Yan Liang, Liang-Hui Diao, Chun-Yu Huang et al. The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2015; 73: 12–21.
3. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммуные факторы в этиологии и патогенезе осложнений беременности. *Акуш. и гинекол.* 2012; 1. / Sukhikh G.T., Van'ko L.V. Immunnye faktory v etiologii i patogeneze oslozhenii beremennosti. *Akush. i ginekol.* 2012; 1. [in Russian]
4. Степанова Е.О., Николаева М.А., Бабаян А.А. и др. Роль регуляторных клеток в формировании иммунной толерантности при беременности. *Акуш. и гинекол.* 2013; 2: 24–8. / Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Babaian A.A. et al. Rol' regulatornykh kletok v formirovani immunoi tolerantsnosti pri beremennosti. *Akush. i ginekol.* 2013; 2: 24–8. [in Russian]
5. Aluwibare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5: 266–71.
6. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T-cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* 2007; 178: 2572–8.
7. Nikabava H, Kato T, Tawara I et al. IFN-γ controls the generation/activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell in antitumor immune response. *J Immunol* 2005; 175: 4433–40.
8. Fainboim L, Arruvito L, Sanz M, Alison H. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction. *J Immunol* 2017; 178: 2572–8.
9. Vrekoussis T, Kalantaridou SN, Mastorakos G. The role of stress in female reproduction and pregnancy: an update. *Acad Sci* 2010; 1205: 69–75.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Амян Татьяна Сергеевна – аспирантка отделения сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова».

E-mail: amyantanya@rambler.ru

Кречегова Любовь Валентиновна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова». E-mail: k_l_v_@mail.ru

Перминова Светлана Григорьевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова». E-mail: perisvet@list.ru

Вторушина Валентина Валентиновна – канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова».

E-mail: vtorushina@inbox.ru

Селимова Фатима Насрединовна – аспирантка отделения сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова».

E-mail: doc.fselimova@mail.ru