

ВЕЛИЕВА

ЭЛЬНУРА ЭЛЬХАН КЫЗЫ

**ЗНАЧЕНИЕ ЛИМФОЦИТОИММУНОТЕРАПИИ В
ОПТИМИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С СОВМЕСТИМОСТЬЮ
ПО АНТИГЕНАМ HLA-СИСТЕМЫ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2010

Работа выполнена в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия и лаборатории клинической иммунологии Федерального государственного учреждения «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения и социального развития России

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Вероника Юрьевна Смольникова

доктор медицинских наук

академик РАМН, профессор

Геннадий Тихонович Сухих

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Ходжаева Зульфия Сагдуллаевна
(ФГУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова
Минздравсоцразвития России)

доктор медицинских наук,

профессор

Александр Александрович Ярилин
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России

Ведущая организация: ГУЗ «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «21» декабря 2010 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного совета Д.208.125.01 при ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России по адресу: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2010г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Елена Анатольевна Калинина

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Согласно результатам эпидемиологических исследований, частота бесплодия в браке колеблется от 8 до 29% (Кулаков В.И., 2002, Агаюе М.О., 2003, Andersen A.N., 2006) и в настоящее время имеет тенденцию к увеличению.

Одним из наиболее современных и перспективных методов лечения бесплодия является экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов (ЭКО и ПЭ). ЭКО и ПЭ успешно применяют при лечении абсолютного женского бесплодия (при отсутствии или полной непроходимости маточных труб), мужском бесплодии, а также неэффективном консервативном и оперативном лечении других форм бесплодного брака (Кулаков В.И., 1999, Корсак В.С., 2006, Simon C., 1999, Nygren K.G., 2002).

Согласно данным Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE), в европейских странах частота наступления беременности в программе ЭКО и ПЭ в расчете на перенос эмбриона в полость матки составляет около 30%. Пациенты с многократными неэффективными попытками ВРТ составляют около 30% от всех пациентов, которые получают лечение методом ЭКО (Судома И.А., Маслий Ю.В., 2007).

Чрезвычайно важными остаются вопросы обследования и подготовки супружеских пар к проведению ЭКО с учетом многообразия этиологических и патогенетических факторов бесплодия (Микаелян В.Г., 2005, Maman E. et al., 1998, Krey L. et al., 2001).

Вовлеченность иммунной системы в управление различными биологическими процессами диктует необходимость рассмотрения функциональной активности ее компонентов у пациенток с бесплодием на этапе подготовки к применению методов ВРТ. В настоящее время большое внимание уделяется изучению иммунологических механизмов, лежащих в основе нарушений репродуктивной функции. Среди иммунологических причин выделяют так называемые аллоиммунные нарушения: совместимость супругов по системе HLA-антигенов (Human Leucocyte Antigens), высокий уровень NK

клеток (Natural killer cell) в периферической крови и отсутствие блокирующих факторов в сыворотке крови женщины.

Исследование HLA-совместимости не является обязательным при предварительном обследовании бесплодных пар, его рекомендуют проводить после 2-х и более неудачных попыток ЭКО и ПЭ. Еще в 1995 г. Jin K. и соавт. (Jin K., 1995) обнаружили высокую частоту совместимости в парах по HLA-DR у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе, а у пар с необъяснимым бесплодием - по HLA-DQ.

Многие исследователи ставят под сомнение существование этой проблемы, принимая во внимание, что классические антигены HLA не экспрессируются на трофобласте (С.В.Сoulam, 1992).

На сегодняшний день в качестве основного метода терапии аллоиммунных нарушений предлагается активная иммунизация аллогенными лимфоцитами - лимфоцитоиммунотерапия (ЛИТ). Механизм терапии состоит в реактивации ослабленного местного иммунного ответа материнского организма, активации цитокинов, стимулирующих инвазию трофобласта и плацентацию. Первые работы по проведению ЛИТ принадлежат В.И. Говалло и В.М. Сидельниковой (1983). Отношение к данному методу терапии неоднозначно, помимо сторонников имеются и противники (Ober C.L. et al., 1983, Hill J.A., 1996, Reindollar R., 2000). ЛИТ клетками мужа или донора является чрезвычайно дискуссионным методом терапии, нет четких критериев отбора пациенток и сроков проведения терапии, отсутствуют достоверные данные об эффективности различных доз вводимых лимфоцитов. Таким образом, роль иммунологических и иммуногенетических факторов в успехе проведения ЭКО и последующем благоприятном течении беременности требует дальнейшего изучения, что и позволило определить цель настоящего исследования.

Цель исследования: повышение результативности лечения бесплодия методом ЭКО и ПЭ у супружеских пар с совместимостью по HLA антигенам путем применения лимфоцитоиммунотерапии.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-анамнестические данные и особенности кариотипа у пар с бесплодием, имеющих совместимость по системе HLA.
2. Определить параметры фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза с учетом выявленной совместимости супружеской пары по антигенам HLA системы.
3. Исследовать антигены системы HLA и провести анализ частоты встречаемости совпадений по антигенам HLA I и II класса у супружеских пар программы ЭКО и ПЭ.
4. Провести анализ показателей интерферонового статуса и их динамических изменений в ответ на применение иммуномодулирующей терапии у пациенток.
5. Оценить эффективность применения ЛИТ у супружеских пар с совместимостью по системе HLA на основании динамических изменений показателей иммунного статуса и блокирующих свойств сыворотки крови пациенток.
6. Разработать алгоритм обследования и предварительной подготовки к программе ЭКО пациенток с совместимостью по HLA антигенам с супругом.

Научная новизна

В результате проведенного исследования определены особенности HLA-фенотипа супружеских пар с бесплодием. Проведен углубленный анализ встречаемости антигенов системы HLA I и II класса у пациенток программы ЭКО и ПЭ. Отмечено повышение частоты встречаемости аллеля A24 у женщин и B60 у мужчин по HLA I класса и аллеля DRB1 11 у женщин, DRB1 12 у мужчин и DQB1 0602-8 у женщин и мужчин HLA II класса.

Проведенное комплексное изучение анамнестических данных, соматической, гинекологической заболеваемости, состояния эндокринной системы и гормонального статуса позволило дополнить существующие представления о характере имеющих место нарушений у супружеских пар с совместимостью по HLA антигенам.

Проанализирована частота и научно обоснована значимость совпадений антигенов по локусам HLA системы у супружеских пар с бесплодием. На основании проведенного исследования иммунного и интерферонового статуса и показателей функционального состояния иммунной системы установлено, что для пациенток с бесплодием являются характерными высокий уровень NK клеток, повышенный уровень провоспалительных цитокинов, в частности сывороточного интерферона в периферической крови, низкий уровень показателя блокирующего фактора и антиотцовских антилейкоцитарных антител.

Впервые проведена и подтверждена эффективность лимфоцитоиммунотерапии у супружеских пар с бесплодием, имеющих 3 и более «общих» аллеля.

Практическая значимость

На основании проведенной работы обосновано включение в схему предварительного обследования пациенток с повторными неудачами имплантации иммуногенетического обследования, позволяющего выявить супружеские пары с совместимостью по 3-м и более антигенам HLA-системы и подготовить их к программе с использованием лимфоцитоиммунотерапии. Показана значимость блокирующего фактора для оценки эффективности иммуномодулирующей терапии. В результате проведенной работы определены наиболее значимые критерии наступления беременности в программе ЭКО у пациенток, совместимых с супругом по HLA- антигенам. Разработан алгоритм обследования и комплексной подготовки таких пациенток перед проведением ЭКО.

Положения, выносимые на защиту

1. У супружеских пар с бесплодием неблагоприятными аллоиммунными факторами являются: совместимость супругов по антигенам HLA-системы, повышение частоты встречаемости A24, DRB1 11 у женщин и B60, DRB1 12 у мужчин, DQB1 0602-8 у женщин и у мужчин.

2. Эффективным методом прегестационной подготовки пациенток с совместимостью по HLA-антигенам супругов к программе ЭКО и ПЭ является ЛИТ. При этом наблюдается статистически достоверное повышение уровней блокирующего фактора и антиотцовских антилейкоцитарных антител. Достоверное повышение уровня блокирующего фактора в группе женщин, где был зафиксирован факт беременности после ЭКО, является значимым для имплантации, но не свидетельствует о пролонгировании беременности и ее успешном завершении.

3. Предварительная подготовка к программе ЭКО с применением лимфоцитотерапии позволила получить успешный результат: наступление беременности после ЭКО и ПЭ у пациенток, которым проводили лимфоцитотерапию, было отмечено в 1,7 раза чаще, чем без нее. В частности, при совпадении по 3-м и более аллелям HLA системы наступление и благополучный исход беременности отмечался в 3,7 раз чаще.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы доложены на IV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2010) и на Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая практика – новые горизонты» (Москва, 2010). Работа обсуждена на клинической конференции сотрудников отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия ФГУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова» Минздравсоцразвития России 30.04.2010 и заседании апробационной комиссии ФГУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России 12.05.2010.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенных исследований внедрены в практику работы отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России.

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в т.ч. 2 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, определенных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста, состоит из введения и 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение), а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 11 рисунками. Используемая литература включает 52 источника на русском и 114 источника на английском языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

В соответствии с целью исследования и поставленными для ее решения задачами в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГУ «НЦ АГ и П им. академика В.И.Кулакова» Минздравсоцразвития России было обследовано 206 супружеских пар репродуктивного возраста с трубно - перитонеальным фактором бесплодия.

Все пациенты прошли обследование с помощью следующих лабораторно-инструментальных методов исследования: гормональное обследование, анализ крови на наличие аутоантител (антифосфолипидные антитела, волчаночный антикоагулянт), антител к хорионическому гонадотропину, комплексное микробиологическое исследование, цитологическое исследование мазков шейки матки, кольпоскопия, инфекционное исследование эпителиальных клеток цервикального канала на наличие хламидий, уреоплазмы, ВПГ, ЦМВ, токсоплазма и краснухи методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), ультразвуковое исследование органов малого таза, спермограмма мужа.

Специальные методы исследования включали: цитогенетическое исследование, иммуногенетическое типирование: исследование антигенов HLA I класса (A, B, C) проводилось на лимфоцитах периферической крови путем использования стандартного метода «комплементзависимой цитотоксичности», разработанного П. Тerasаки (1991). Определение антигенов HLA II класса проводилось методом ПЦР – типирование локусов DRB1, DQB1, DQA1. Иммунологические методы исследования: анализ субпопуляционного состава

лимфоцитов периферической крови; оценка интерферонового статуса; оценка функционального состояния иммунной системы женщины (определение блокирующих свойств женской сыворотки (БФ) и антиотцовских антилейкоцитарных антител (АОАТ)).

После проведения обследования из 206 супружеских пар были отобраны 168 (63,6%) супружеских пар, которые отвечали следующим критериям: возраст женщины от 23 до 37 лет; регулярный менструальный цикл; совместимость антигенов HLA системы у супругов; отсутствие патологии эндометрия по данным УЗ-исследования и гистероскопии в анамнезе; отсутствие анатомических и аутоиммунных причин бесплодия; отсутствие тяжёлых соматических, хронических инфекционных заболеваний и системных аутоиммунных заболеваний; фертильная сперма мужа.

В I группу (основную) вошла 131 супружеская пара (63,6%), которым с целью подготовки к программе ЭКО и ПЭ провели активную иммунизацию аллогенными лимфоцитами мужа. Во II группу (группу сравнения) были включены 37 супружеских пар с трубно-перитонеальным бесплодием и с совместимостью антигенов системы HLA у супругов, которым не проводилась лимфоцитоиммунотерапия.

Всем женщинам проводилась стимуляция суперовуляции по т.н. «длинному» протоколу препаратами агонистов гонадотропин - релизинг гормона (а-ГнРГ) и рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ).

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 7.0, StatSoft Inc. (США). Сравнение параметров I и II группы проводилось с помощью использования; непараметрического Т-критерия Вилкоксона или Т-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались отличия при $P < 0,05$ (95%-й уровень значимости) и при $P < 0,01$, $P < 0,001$ (99%-й уровень значимости).

Клиническая часть работы выполнена в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия (руководитель – д.м.н. Калинина Е.А.) и в

лаборатории клинической иммунологии (руководитель – академик РАМН, профессор Сухих Г.Т.).

Результаты исследования и их обсуждение

Основная часть супружеских пар относились к русской национальности, проживали в одинаковых климатогеографических условиях, преимущественно в Москве и Московской области.

Возраст обследованных пациенток не различался между исследуемыми группами и колебался от 23 до 37 лет, составляя в среднем $33,2 \pm 3,1$ года.

При анализе данных инфекционной заболеваемости у исследуемых групп женщин отмечался высокий инфекционный индекс.

Менархе у большинства пациенток (56,5%) наступило своевременно, в 12-14 лет.

При анализе структуры гинекологической патологии было отмечено, что наиболее часто диагностируемым гинекологическим заболеванием были заболевания шейки матки (эктопия шейки матки, лейкоплакия шейки матки), имевшиеся в анамнезе у 64 (38,1%) из 168 обследованных пациенток.

Следует отметить высокую частоту ранее перенесенных инфекций передающихся половым путем (ИППП) и воспалительных заболеваний половых органов, на которые указали 60 (35,7%) и 54 (32,1%) больных соответственно. Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) в структуре гинекологических заболеваний составляют 60-65%, бесплодие развивается у 13% пациенток, перенесших один эпизод ВЗОМТ и у 75% – с тремя и более эпизодами и являются одной из причин неудач программ ВРТ (Земляная А.А., 1993).

Средняя продолжительность бесплодия колебалась от 1 до 18 лет и составила в среднем $5,8 \pm 0,3$ года.

Анализируя репродуктивный анамнез пациенток с вторичным бесплодием, было выявлено, что доля потерь беременности в сроке 5-7 недель составила 39,0% из числа беременностей, тогда как в сроке 8-12 недель - у 23% пациенток.

Из 168 исследуемых пациенток 72,1% имели в анамнезе 1 и более неэффективные попытки ЭКО. Среднее количество неудачных циклов ЭКО составило $3,1 \pm 0,3$. Большинство женщин (72,1%) имели 2 неудачные попытки ЭКО в анамнезе.

Изучая параметры стимуляции суперовуляции у обследованных пациенток, не выявлено статистически значимых различий между группами пациенток в отношении течения стимуляции суперовуляции, параметров фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика параметров стимуляции суперовуляции, фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток исследуемых групп

Параметры	I группа (n=131)	II группа (n=37)
Стартовая доза рФСГ, МЕ	167,3±12,8	181,7±9,6
Длительность стимуляции, дни	11,4±1,3	9,3±0,2
Общая доза рФСГ, МЕ	1890,9±153,2	1830,8±54,1
Среднее количество фолликулов диаметром ≥ 18 мм, в день введения овуляторной дозы ХГ	10,8±3,9	11,7±0,7
Среднее количество полученных ооцитов	8,2±2,9	7,9±0,6
Среднее количество зрелых ооцитов	6,2±0,9	6,6±0,7
Доля зрелых ооцитов, %	91,9	83,5
Среднее количество оплодотворенных ооцитов	5,8±0,9	6,1±0,7
Процент оплодотворяемости, %	93,5	92,4
Среднее количество эмбрионов	4,4 ±0,6	4,1±0,4
Процент дробления, %	43,2	46,3
Среднее количество перенесенных эмбрионов	1,9±0,1	1,9±0,1

$p > 0,05$ статистически значимых различий не выявлено

Принимая во внимание существующее представление о вкладе генетического фактора в структуру причин нарушения репродуктивной функции, было проведено цитогенетическое обследование супружеских пар.

Результаты цитогенетического обследования у супружеских пар показали наличие нормального кариотипа (46, XX; 46, XY) у 163 (96,2%) женщин и у

164(97,6%) мужчин. Всего особенности кариотипа выявлены у 9 (5,4%) человек, из них у 5 (3,8%) женщин, и у 4 (2,4%) мужчин. При этом не было выявлено сочетания особенностей кариотипа у обоих супругов. Учитывая тот факт, что в большом проценте женщин исследуемой группы отмечался отягощенный акушерский анамнез, им всем во время беременности была предложена консультация врача генетика для решения вопроса о необходимости проведения пренатальной диагностики (Каретникова Н.А., 1998).

Для решения поставленных задач исследования проводилось определение антигенов системы HLA у 168 супружеских пар, которое включало определение антигенов HLA I и II класса; анализ частоты совпадений аллелей I и II классов у супружеской пары; исследование частоты встречаемости аллелей, а также анализ особенностей системы HLA супругов.

При анализе антигенов системы HLA I класса выявлено, что в бесплодном браке наиболее часто как женщины, так и мужчины являются носителями антигена A2 – 48,9% и 54,2% соответственно. На втором месте по частоте встречаемости стоит аллель B7 – в 20,55% случаев у женщин и аллель A3 – в 30,5% случаев у мужчин. У женщин отмечено повышение антигена A24 ($p<0,05$) в 3 раза, что ранее было описано в работе Петросян Л.А (2009). При сопоставлении с популяционной частотой встречаемости антигенов как у женщин, так и у мужчин было выявлено снижение частоты встречаемости антигенов A9 ($p<0,001$) в 7,1 и 3,7 раза и A10 ($p<0,05$) в 3,6 и 3,7 раза соответственно. Анализ локуса В показал снижение встречаемости антигенов B5 и у женщин и у мужчин 3,2 раза ($p<0,05$). У мужчин в исследуемых супружеских парах достоверно чаще, чем в популяции встречался антиген B60 ($p<0,001$). По данным анализа было отмечено снижение частоты антигена Cw4 как у женщин, так и у мужчин по сравнению с популяцией ($p<0,05$). Достоверно реже, чем в популяции у мужчин встречался антиген Cw2 ($p<0,001$). Аналогичные данные были показаны в исследованиях Шахгюлян Я.Л. (2006).

При анализе аллелей по локусам системы HLA II класса было выявлено повышение частоты встречаемости аллеля 11 по локусу DRB1 у женщин ($p<0,05$) и аллеля 12 у мужчин ($p<0,01$). Увеличение частоты аллеля 11 в локусе

DRB1 в российской популяции по сравнению с европейской было отмечено в работах Т.С. Бескоровойной (2005) и Петросян Л.А. (2009).

По локусу DQB1 у женщин и у мужчин чаще, чем в популяции отмечен аллель 0602-8 ($p < 0,05$). Значительно реже, чем в популяции встречались следующие аллели: по локусу DRB1 у женщин аллель 03 ($p < 0,01$), аллель 04 ($p < 0,001$), аллель 06 ($p < 0,001$), аллель 13 ($p < 0,05$), тогда как у мужчин только аллель 03 ($p < 0,01$) и аллель 06 ($p < 0,001$), по локусу DQA1 у женщин и у мужчин аллель 0102 ($p < 0,001$), по локусу DQB1 у женщин аллель 0502 ($p < 0,05$). Снижение частоты встречаемости аллеля 03 ($p < 0,01$) локуса DRB1 как у женщин, так и у мужчин согласуется с данными Т.С.Бескоровойной (2005).

Возможно, что негативное действие определенных аллелей HLA усиливается при совпадении супругов по большому числу локусов. На первый взгляд, теоретическая вероятность HLA-совместимости с партнером по браку более чем ничтожна из-за крайне высокой степени полиморфизма системы. Полиморфизм генов HLA признан наибольшим из всех известных генов человека (Хаитов Р.Н., 2000). Однако, на практике такая вероятность значительно выше.

Преобладало совпадение по двум локусам системы HLA I класса у 20 (15,5%) супружеских пар, совпадение по трем локусам отмечено лишь у 1 (0,8%) супружеской пары.

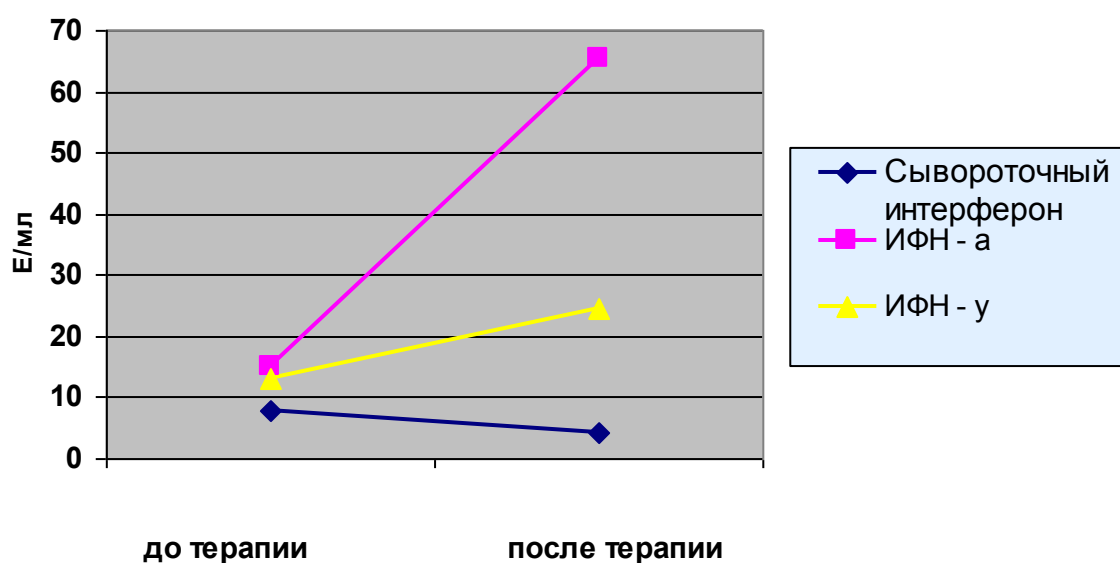
При анализе распределения супружеских пар, по «общим» аллелям по локусам системы HLA II класса было выявлено, что среди супружеских пар I и II группы преобладали пары имеющие совпадения по 1 или 2 аллелям (50,4% и 48,6%). Каждая третья супружеская пара (36,6% и 37,8%) имела 3 «общих» аллеля. При наличии 3-4-х и более идентичных аллелей в фенотипах супругов – прогноз неблагоприятный, а именно, привычное невынашивание беременности и бесплодие, как правило, составляют 100% (Серова Л.Д., 1998).

При исследовании интерферонового статуса у женщин исследуемой группы был выявлен дисбаланс системы интерферона: средний уровень сывороточного интерферона у этих женщин, составил $7,7 \pm 0,5$ Е/мл, что оказалось выше нормативных значений ($p < 0,05$). Титры интерферона при

анализе спонтанной интерфероновой реакции лейкоцитов (ИРЛ) были в пределах нормы. В то же время ответ лимфоцитов на индукторы интерфероногенеза оставался сниженным: средний показатель ИФН- α составил $15,0 \pm 1,1$ Е/мл ($p < 0,05$), а продукция лимфоцитами ИФН- γ при индукции фитогемагглютинином составила $13,2 \pm 1,0$ Е/мл ($p < 0,05$).

В связи с выявленными нарушениями подготовку к ЭКО и ПЭ начинали с проведения терапии с использованием индукторов интерферона. Наибольшее число пациенток были чувствительны к галавиту (50,0% случаев), каждая третья (38,1%) - к иммуномаксу, чувствительность к имунофану отмечена у (28,6%) женщин, что согласуется с результатами исследований других авторов (Петросян Л.А., 2009, Тетруашвили Н.К., 2008).

Динамика параметров интерферонового статуса через 21 день после проведенной терапии представлена на рис.1.



** $p < 0,001$

Рис.1 Сравнение показателей интерферонового статуса до и после терапии иммуномодуляторами (n=90).

У женщин исследуемой группы было отмечено статистически достоверное снижение уровней сывороточного ИФН в 2 раза и повышение продукции ИФН- α и ИФН- γ .

После нормализации показателей интерферонового статуса, а также учитывая наличие совместимости супругов по HLA антигенам, в качестве

заключительного этапа подготовки к программе ЭКО пациенткам I группы проводилась лимфоцитоиммунотерапия клетками мужа в дозе 50-100 млн клеток, под контролем показателей функционального состояния иммунной системы женщины.

Хотя, несомненно, не стоит механически приравнивать неудачу имплантации после переноса эмбрионов в полость матки в рамках применения вспомогательных репродуктивных технологий к самопроизвольному выкидышу, однако, успех применения ЛИТ при невынашивании беременности заставил нас обратить на эту методику пристальное внимание.

Согласно данным литературы, механизм действия ЛИТ состоит в формировании распознавания иммунной системой матери бластоцисты на ранних сроках гестации. Получены результаты, свидетельствующие об эффективности использования лимфоцитов и отца, и донора (Christiansen O.B., 2004).

В зарубежной литературе все чаще встречается термин «пациенты с привычным выкидышем и плохим прогнозом», относящийся к женщинам с многократными потерями беременности на ранних этапах и не отвечающих ни на один из видов терапии (гормональной, антитромботической, попытки ЭКО). Именно у такой категории женщин методы иммунологического обследования и иммунокоррекции – лимфоцитоиммунотерапия (ЛИТ) и внутривенное введение иммуноглобулинов (ВВИГ) дают наилучшие результаты (Christiansen O.B., 1998, Carp H.J., 2007).

На сегодняшний день данные мировой литературы весьма противоречивы по иммунным аспектам и по возможным методам терапии иммунных нарушений. Наиболее рациональная тактика лимфоцитоиммунотерапии (сроки проведения, кратность и доза) при подготовке к беременности женщин с привычным невынашиванием представлена в работе Петросян Л.А. (2009). Автор предложила увеличивать дозу вводимых лимфоцитов (50, 100 или 150 млн. клеток) в зависимости от количества совпадений по HLA антигенам и уровня CD3-56+16+. Имеются данные о том, что проведение ЛИТ у пациенток с

повышенным содержанием CD 56+ клеток увеличивает процент наступления беременности в программе ЭКО и ПЭ (Дьяконов С.А., 2006).

В соответствии с поставленной целью пациентки I группы (n=131) были иммунизированы на этапе подготовки к ЭКО и ПЭ.

Процедуру ЛИТ проводили с периодичностью 1 раз в цикле, начиная за 2-3 месяца до проведения программы ЭКО и ПЭ. Введение лимфоцитов осуществлялось на 5-9 день цикла однократно. Оценка функционального состояния иммунной системы (анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, контроль показателей блокирующего фактора (БФ) и антиотцовских антилейкоцитарных антител (АОАТ)) и сопоставление полученных результатов с показателями до проведения ЛИТ проводились через 21 день. Одной из задач было выявление иммунологических показателей, которые изменились под влиянием ЛИТ.

При анализе показателей иммунного статуса до процедуры ЛИТ было отмечено превышение нормативных количеств CD56+, CD3-CD56+,16+, CD5+CD19+ -клеток. После проведения процедуры ЛИТ статистически достоверных изменений в соотношении субпопуляций лимфоцитов выявлено не было ($p > 0,05$).

При определении БФ у женщин с бесплодием средний уровень составил $27,21 \pm 3,20$ %. После процедуры ЛИТ наблюдалось достоверное повышение значения ($p < 0,01$) в 1,4 раза. При определении АОАТ после процедуры ЛИТ было отмечено повышение его уровня в 3,1 раза: $11,07 \pm 2,11$ % по сравнению с $34,94 \pm 2,66$ % ($p < 0,05$). Повышение уровня БФ и АОАТ в ответ на иммуноцитотерапию показано в работе Петросян Л.А. (2009), где использовались высокие дозировки вводимых лимфоцитов (100 и 150 млн. клеток).

Беременность наступила у 40 (44,4%) женщин, у каждой второй пациентки (55,5%) отмечена неудачная попытка ЭКО. Из числа наступивших беременностей 62,5 % закончились рождением здорового потомства, у 15 (37,5%) пролонгировать беременность не удалось (самопроизвольные выкидыши и неразвивающиеся беременности).

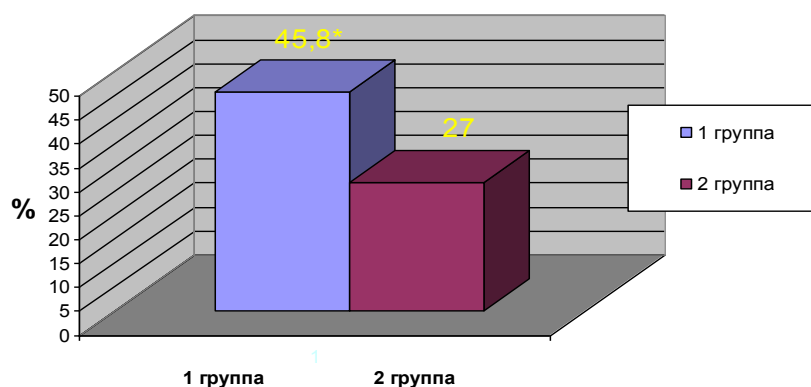
Анализ результатов ЭКО и ПЭ в зависимости от уровней показателей БФ и АОАТ у 90 пациенток I группы выявил статистически достоверное повышение уровня БФ после процедуры ЛИТ в группе, где был установлен факт беременности после ЭКО ($p < 0,01$). У женщин с неудачной попыткой ЭКО уровень данного показателя после ЛИТ достоверно не отличался от исходного ($p > 0,05$). При детальном изучении исходов наступивших беременностей было выявлено, что в группе женщин, у которых беременность закончилась рождением здорового потомства, средний уровень БФ после процедуры ЛИТ был статистически достоверно более высоким ($p < 0,01$).

Также были проанализированы пациентки, у которых беременность пролонгировать не удалось. Уровень показателя БФ после процедуры ЛИТ статистически достоверно увеличился ($p < 0,05$) и при сравнении его с показателем БФ у женщин с удачной попыткой ЭКО не было выявлено значимого отличия ($p > 0,01$). Таким образом, достоверное повышение уровня показателя БФ в группе женщин, где был зафиксирован факт беременности после ЭКО, является значимым для имплантации, но не свидетельствует о пролонгировании беременности и ее успешном завершении.

При анализе динамики содержания АОАТ было отмечено статистически достоверное повышение показателя после ЛИТ ($p < 0,05$) как у женщин с удачным исходом программы, так и при отрицательном результате ЭКО.

Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что единственным показателем, изменившимся после проведения ЛИТ оказался уровень БФ, который является значимым в определении удач или неудач имплантации при проведении программы ЭКО.

После проведенной лимфоцитоиммунотерапии в I группе частота наступления беременности (45,8%) была статистически достоверно выше, чем в контрольной II группе (27,0%) ($p < 0,05$) (рис.2). При этом преобладало наступление беременности у супружеских пар, имеющих более 3-х «общих» аллелей по системе HLA антигенов (20,6% по сравнению с 5,4%) ($p < 0,01$).



* $p < 0,05$

Рис.2 Частота наступления беременности у женщин I и II групп.

Частота неудачных попыток ЭКО и ПЭ между группами достоверно не отличалась (54,2% по сравнению с 67,8%) ($p > 0,05$). Во II группе неудачные попытки чаще были отмечены у супружеских пар, имеющих совпадения по 1, 2 или 3 антигенам HLA системы ($p < 0,01$).

Всем женщинам при установлении факта беременности проводилась ЛИТ в 4-5 недель беременности и далее каждые 3-4 недели до 12-14 недель беременности, под контролем клинического течения беременности, уровня БФ (Петросян Л.А., 2009, Веер А.Е., 2000).

При анализе клинических исходов беременностей в зависимости от количества совпадений по HLA антигенам I и II класса у пациенток исследуемых групп было выявлено, что благополучный исход беременности после ЭКО и ПЭ отмечен у 65,0% и 80,0% пациенток I и II группы соответственно, что достоверно не различалось. Несмотря на проводимую комплексную сохраняющую терапию, в I группе прерыванием в сроке до 9 недель, беременность завершилась в 30,0% случаев, у 1-й пациентки беременность была прервана индуцированными родами в 17-18 недель в связи с наличием синдрома каудальной регрессии, также был отмечен 1 случай антенатальной гибели плода в сроке 27 недель беременности. Во II группе было отмечено 2 (20,0%) неразвивающиеся беременности. Исходы беременности достоверно не различались между I и II группами.

Однако, при детальном анализе при помощи статистического показателя χ^2 результатов ЭКО в зависимости от количества совпадений по HLA-

антигенам было выявлено, что наступление и благополучный исход беременности в I группе превалировал у женщин, имеющих более 3-х «общих аллелей» с супругом ($p=0,02$), и был достоверно выше чем во II группе (36,7% по сравнению с 10,0%) ($p<0,01$).

Полученные в ходе выполнения данного исследования результаты свидетельствуют о несомненной связи между состоянием иммунной системы и эффективностью реализации программы ЭКО, что диктует необходимость совершенствования алгоритма исследования иммунологических показателей на этапе подготовки.

Одним из оптимальных путей повышения эффективности программ ВРТ является оценка состояния иммуногенетических показателей крови, в частности антигенов HLA системы, а также подготовка пациенток к проведению программы ЭКО с использованием лимфоцитоиммунотерапии под контролем показателя блокирующего фактора. Возможное влияние и определение роли данного показателя требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Супружеские пары, совместимые по HLA системе, характеризуются высокой частотой ранних гестационных потерь (62,0%) и наличием в анамнезе неудачных попыток ЭКО и ПЭ в 72,1% случаев. Нормальный кариотип выявлен в 95% случаев, особенности кариотипа в 5% случаев являлись «вариантом нормы».

2. Частота встречаемости 3-х и более общих антигенов по HLA системе у гистосовместимых супружеских пар составляет 72,5%. По встречаемости совпадений HLA I класса преобладает локус A – 56,8% случаев, по HLA системе II класса в 50,0% случаев отмечено 3 и более общих аллелей.

3. Среди исследуемых супружеских пар с бесплодием в системе HLA I класса достоверно чаще, чем в популяции встречается антиген A24 у женщин и B60 у мужчин. По системе HLA II класса чаще по сравнению с популяционными данными встречаются аллель 11 по локусу DRB1 у женщин и

аллель 12 по локусу DRB1 у мужчин, а также аллель 0602-8 по локусу DQB1 как у женщин, так и у мужчин.

4. В периферической крови исследуемых женщин наблюдается повышение уровня сывороточного интерферона и снижение интерфероновой реакции лейкоцитов. Применение иммуномодулирующей терапии с учетом чувствительности к иммуномодуляторам позволяет нормализовать параметры интерферонового статуса.

5. Проведение ЛИТ пациенткам перед программой ЭКО и ПЭ не оказывает существенного влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови. После проведения лимфоцитоиммунотерапии наблюдается повышение уровня блокирующего фактора в 1,4 раза, антиотцовских антилейкоцитарных антител – в 3,1 раза в сыворотке крови. Однако, корреляция с частотой наступления беременности выявляется только в отношении уровня блокирующего фактора: у пациенток с успешной попыткой ЭКО он был существенно выше (1,7 раз), чем при неудачной попытке.

6. Включение лимфоцитоиммунотерапии в алгоритм подготовки супружеских пар к ЭКО и ПЭ, имеющих совместимость по HLA, позволяет увеличить частоту наступления беременности в 1,7 раза. Наиболее выраженный эффект данной терапии наблюдается у супружеских пар, имеющих более 3-х «общих» антигенов по системе HLA: частота наступления беременности у них увеличивается в 3,7 раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Супружеским парам с бесплодием и неоднократными неудачами имплантации в анамнезе перед проведением программы ЭКО и ПЭ следует проводить исследование антигенов I и II класса HLA-системы с целью выявления гистосовместимости супругов и определения тактики подготовки пациентки к следующему циклу ЭКО.

2. Для пациенток, совместимых с супругом по HLA-антигенам, при подготовке к ЭКО и ПЭ рекомендуется исследование параметров иммунного статуса, уровней блокирующего фактора и антиотцовских антилейкоцитарных антител, а также параметров интерферонового статуса с проведением

иммуномодулирующей терапии с учетом чувствительности к иммуномодуляторам.

3. Выявление совместимости супругов по системе HLA по 3-м и более антигенам в комплексе прегестационной подготовки перед программой ЭКО и ПЭ является показанием для проведения лимфоцитоиммунотерапии в дозе 50-100 млн. клеток с использованием лимфоцитов мужа.

4. Для оценки эффективности лимфоцитоиммунотерапии через 3 недели после иммунизации следует проводить определение уровня блокирующего фактора. Показано, что достаточным является проведение ЛИТ в течение двух циклов подряд до планируемой программы ЭКО и ПЭ.

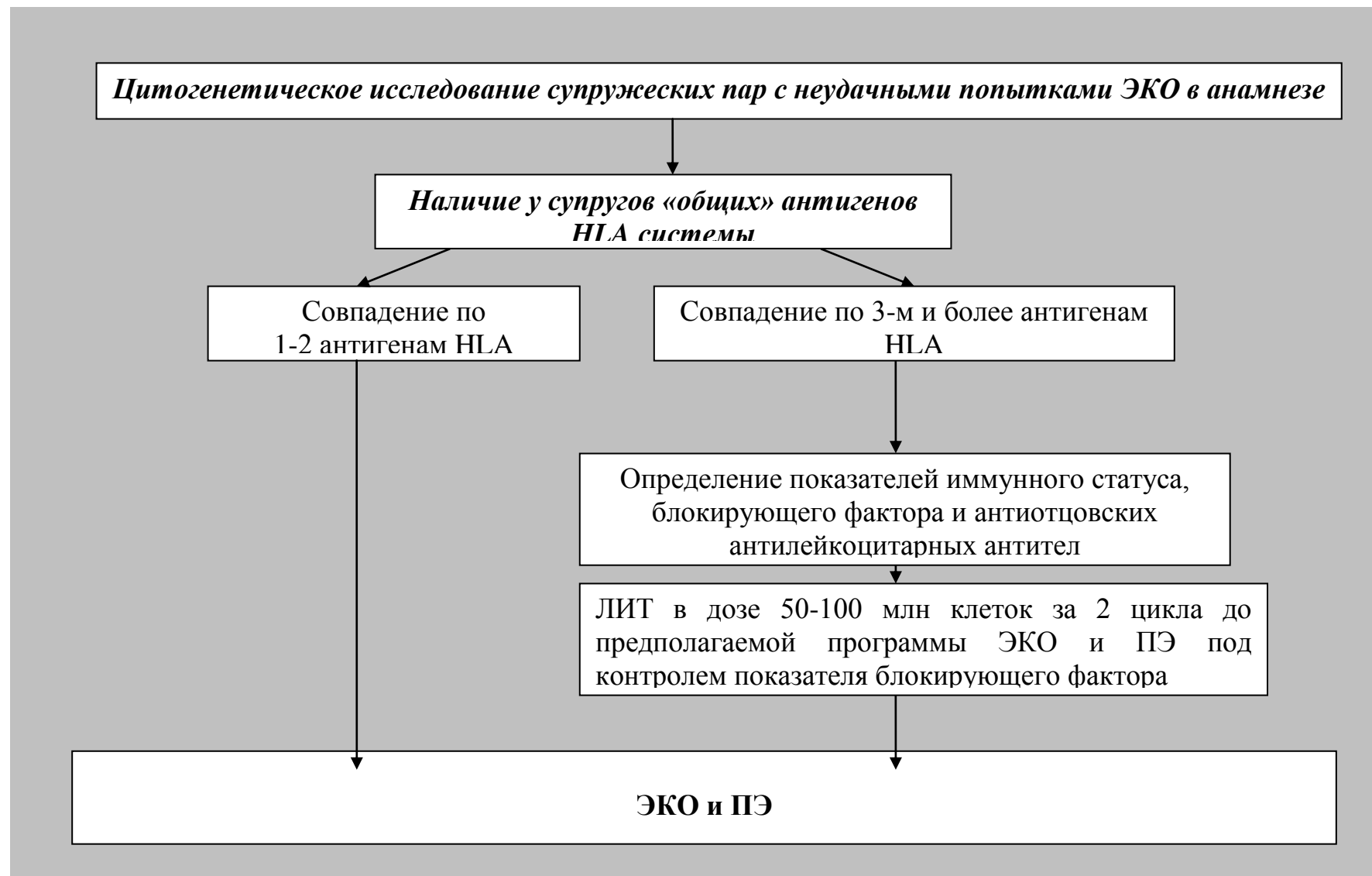


Рис. 3 Алгоритм прегестационной подготовки к программе ЭКО пациенток с совместимостью по HLA антигенам с супругом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Велиева Э.Э., Смольникова В.Ю., Кузьмичев Л.Н.** Роль иммуногенетического обследования в программе экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) // **Российский медицинский журнал.** - 2009. - №6. - С. 47 – 50.
2. **Велиева Э.Э.** Иммунологические аспекты бесплодия и прерывания беременности на ранних сроках в программе ЭКО / **Э.Э. Велиева, В.Ю. Смольникова, Л.Н. Кузьмичев, Е.Л. Голубева, Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина** // **Вестник Российского университета дружбы народов. Серия медицина.** – 2009. - №6. - С. 105-108.
3. **Велиева Э.Э., Кузьмичев Л.Н., Смольникова В.Ю.** Скрининговое HLA-типирование в программе ЭКО // **Репродуктивные технологии сегодня и завтра: материалы XVII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека.** – Казань, 2007. - С. 58.
4. **Велиева Э.Э., Кузьмичев Л.Н., Смольникова В.Ю.** Иммуногенетическое обследование в программе экстракорпорального оплодотворения // **Материалы IV съезда акушеров-гинекологов России.** – М., 2008. - С. 323.
5. **Велиева Э.Э., Смольникова В.Ю., Кузьмичев Л.Н.** Результат предварительного изучения иммунного статуса и его коррекция у пациенток в программе ЭКО // **Мать и дитя: материалы II регионального научного форума.** – Сочи, 2008. - С.130-131.
6. Иммунологическое обследование пациенток с бесплодием / **Э.Э. Велиева, Г.Т. Сухих, В.Ю. Смольникова, Л.Н. Кузьмичев, Е.Л. Голубева, Л.В. Кречетова, М.М. Зиганшина** // **Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: материалы XXII Международного конгресса с курсом эндоскопии.** – М., 2009. - С. 17-18.
7. Screening HLA-typing in IVF **Е. Е. Veliyeva, V. Y. Smolnikova, G. T. Sukhikh, L.N. Kuzmicev** // **Reproductive medicine and beyond. The 3-rd International IVI Congress – Madrid, Spain, 2009.** - P. 97.

8. Проведение скринингового HLA-типирования у бесплодных пар [Текст]
/ Э.Э. Велиева, В.Ю. Смольникова, Г.Т. Сухих, Л.Н. Кузьмичев // Амбулаторно-поликлиническая практика – платформа женского здоровья: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – М., 2009. - С.39-40.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОАТ – антиотцовские антилейкоцитарные антитела
БФ – блокирующий фактор
ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
ГнРГ – гонадотропин релизинг гормона
ИППП – инфекции, передающиеся половым путем
ИФН - интерферон
ЛИТ - лимфоцитоиммунотерапия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
ПЭ – перенос эмбриона
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
HLA – лейкоцитарные антигены человека
CD - кластеры дифференцировки
NK – натуральные киллерные клетки