

На правах рукописи



Андреева Евгения Александровна

**ИММУНОАКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ
У ЖЕНЩИН В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Хонина Наталья Алексеевна

Официальные оппоненты:

Чистякова Гузель Нуховна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Трунов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии естественных наук, заведующий научным отделом Федерального государственного автономного учреждения Национального медицинского исследовательского центра Межотраслевого научно-технического комплекса «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Иваново (ФГБУ «Ив НИИ МиД им. В.Н. Городкова» Минздрава России)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г.Новосибирск, ул.Ядрицевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте: <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «__» _____ 2021г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук**

**Облеухова Ирина
Александровна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования Появление методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволило повысить эффективность лечения женского и мужского бесплодия. Вместе с тем, успешные протоколы ВРТ по разным данным не превышают 50%. В первую очередь это связано с нарушением фолликулогенеза, что приводит к образованию ооцитов низкого качества. Известно о тесном взаимодействии иммунной и эндокринной систем на каждом из этапов репродуктивного процесса [Ye H. et.al., 2016]. В органах репродуктивной системы обнаружены все типы иммунокомпетентных клеток (ИКК), содержание которых в периферической крови меняется в динамике менструального цикла [Espy L. et.al. 1980; Oakley O. R. et.al. 2010]. Особое значение в репродуктивном процессе имеют Т-регуляторные клетки (Т-рег). Данные клетки обладают супрессорным потенциалом и играют важную роль при наступлении беременности, способствуют поддержанию толерантности к полуаллогенному эмбриону [Lee S.K. et al., 2015; Esteve-Solé A. et al., 2018]. Снижение Т-рег ассоциировано с угрозой невынашивания и самопроизвольного прерывания, а также развитием преэклампсии [Zenclussen M.L. et al., 2015; Jiang R. et al., 2017]. Но данные об их влиянии на ранние этапы репродукции отсутствуют. Известно, что при физиологической беременности происходит переключение Th1/Th2 в сторону доминирования иммуносупрессорных цитокинов и активации Т-рег. Созревание овуляторных фолликулов и последующая овуляция сопровождаются воспалительной реакцией, которая контролируется иммунокомпетентными клетками (ИКК), в том числе Th17 и FoxP3⁺. В этом аспекте особенно интересна роль IL-6, который регулирует баланс Th17/FoxP3⁺ -клеток, подавляя генерацию последних [Korn T. et al., 2008; Zhu L. et al., 2017]. В исследовании Kimura A., 2010 показано, что снижение соотношения Трег/Th17 в крови у женщин с привычным невынашиванием ассоциировано с повышенным уровнем в сыворотке крови IL-6 [Kimura A. et al., 2010]. Учитывая, что в ФЖ также присутствуют цитокины, включая IL-6 [Altun T. et al., 2011], можно предполагать их участие в регуляции активности Т-рег. Рост и развитие фолликулов сопровождается активацией одних и гибелью других ИКК и клеток гранулезы, в результате чего в фолликулярную жидкость (ФЖ) секретируются экстраклеточные везикулы (микровезикулы, МВ), высвобождаются апоптотические тельца и свободная ДНК (свДНК), которые могут обладать иммунорегуляторной активностью. Свободная ДНК обнаруживается практически во всех средах организма [Hoque M.O. et al.,

2006; Li H.G. et al., 2009]. Есть данные, что повышенный уровень свДНК отмечается при патологиях репродукции. Показано, что концентрация свДНК возрастает при целом ряде заболеваний (онкологические, аутоиммунные заболевания, посттравматический синдром) [Козлов В.А., 2013], включая акушерско-гинекологическую патологию [Boeckel S.R. et al., 2017]. В исследованиях Boeckel S.R., 2017 продемонстрировано повышение уровня свДНК в сыворотке крови женщин с высоким риском преждевременных родов [Boeckel S.R. et al., 2017] и при осложнениях беременности. Более того продемонстрировано, что концентрация свДНК ассоциирована со степенью тяжести преэклампсии [Levine R.J. et al., 2004]. Представленные данные обуславливают интерес к исследованию диагностической и прогностической значимости свДНК при акушерской патологии. В единичных исследованиях представлены данные о наличии свДНК в ФЖ женщин [Scalici E. et al., 2014; Traver S. et al., 2015], однако, взаимосвязь свДНК с параметрами оо/эмбриогенеза не изучена. Также остается неясным происхождение свДНК и регуляция ее выброса. Известно, что процесс овуляции происходит с вовлечением провоспалительных цитокинов и рекрутированием нейтрофилов, что сопровождается выбросом в межклеточное пространство сетеподобных структур - «нейтрофильных внеклеточных ловушек» (НВЛ), в составе которых находится свДНК, гистоны, различные белки и ферменты [Брызгунова О.Е. и др., 2015; Konečná V. et al., 2018]. Данный процесс получил название нетоза и в качестве одного из ведущих цитокинов, стимулирующих образование НВЛ, рассматривается IL-8. Учитывая, что в ФЖ одновременно регистрируются свДНК и IL-8, представляется интересным исследовать их взаимодействие и влияние на ранние этапы репродукции. Другим продуктом ИКК являются МВ, которые экспрессируют маркеры материнских клеток и сохраняют их иммунорегуляторную активность [Tricarico C. et al., 2017]. В настоящее время МВ используют при оценке тромботических рисков, таргетной терапии, реакции трансплантанта против хозяина. Показано, что МВ вырабатываются клетками трофэктодермы эмбриона, опосредует его поведение во время имплантации. При развитии преэклампсии наблюдается увеличение уровня МВ плацентарного происхождения. В экспериментальной работе было выявлено изменение уровня МВ в ФЖ в зависимости от качества ооцитов.

Таким образом, наличие неэффективных циклов ЭКО при хороших клинических и эмбриологических показателях диктует необходимость выявления новых биомаркеров, обладающих прогностической значимостью. На основании чего была сформулирована **цель работы:**

изучить содержание регуляторных клеток, уровень свободной ДНК, цитокинов (IL-6, IL-8) и микровезикул в фолликулярной жидкости женщин с различными показателями овариальной функции и эмбриогенеза, охарактеризовать прогностическую значимость указанных показателей как потенциальных биомаркеров эффективности циклов экстракорпорального оплодотворения.

Для достижения поставленной цели были сформированы следующие **задачи:**

1. Оценить содержание регуляторных клеток в фолликулярной жидкости у женщин с различными параметрами овариальной функции, эмбриогенеза и эффективностью ЭКО.
2. Исследовать содержание свДНК в фолликулярной жидкости у женщин в зависимости от параметров оо/эмбриогенеза и исходов ЭКО.
3. Изучить концентрацию цитокинов (IL-6, IL-8) в фолликулярной жидкости у женщин и их взаимосвязь с содержанием регуляторных клеток и свДНК на различных этапах оо/эмбриогенеза.
4. Исследовать содержание лейкоцитарных микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции, эмбриогенеза и эффективности стимуляции суперовуляции.
5. Оценить прогностическую значимость содержания регуляторных клеток, цитокинов, свободной ДНК, микровезикул как потенциальных биомаркеров исходов ЭКО.

Научная новизна

Впервые показано наличие различных субпопуляций FoxP3⁺ - регуляторных клеток (CD4⁻FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺, CD4⁺FoxP3⁺CD25⁻) в ФЖ женщин не только в стимулированных гонадотропинами циклах ЭКО, но и в естественных циклах. При этом обнаружена их взаимосвязь с ранними этапами репродуктивного процесса, а именно: показано, что более высокое содержание CD4⁻FoxP3⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ - клеток в ФЖ сопряжено с числом преовуляторных фолликул и формированием бластоцист лучшего качества и позитивными исходами ЭКО. Выявлена обратная взаимосвязь низкого числа CD4⁻FoxP3⁺ - клеток с высоким уровнем IL-6 в ФЖ, что ассоциировано с низким качеством бластоцист.

Получены новые данные о наличии в ФЖ женщин как в стимулированных, так и в естественных циклах детектируемого уровня свДНК. При этом показано, что уровень свДНК при стимулированной овуляции значимо выше, чем в естественных циклах. Впервые показано, что

более высокое содержание свДНК в ФЖ ассоциировано с длительностью бесплодия, большим числом антральных фолликулов (АФ) и высоким уровнем антимюллера гормона (АМГ). При этом высокий уровень свДНК сопряжен с низким качеством бластоцист и отрицательным исходом ЭКО. Показано, что концентрация свДНК может рассматриваться как один из маркеров наступления и развития беременности. Согласно полученным данным, выброс свДНК не связан с действием IL-8 и образованием нейтрофильных ловушек. Расширены представления о роли МВ в репродуктивном процессе, в частности обнаружена их прогностическая значимость.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о влиянии FoxP3⁺ клеток, цитокинов и иммуноактивных факторов на различные параметры оо/эмбриогенеза при стимуляции гонадотропинами и в естественных циклах. Выявлены позитивные и негативные факторы, влияющие на развитие фолликулов, формирование бластоцист, имплантацию и, как следствие, эффективность программы ЭКО.

Показано, что FoxP3⁺ клетки оказывают влияние не только на вынашивание беременности, но и на более ранние этапы эмбриогенеза. Впервые продемонстрировано, что в контроле над ранними этапами эмбриогенеза принимают участие не только CD4⁺FoxP3⁺T-рег, но и CD4⁺FoxP3⁺-клетки. Так, выявлена сопряженность высокого содержания CD4⁺FoxP3⁺-клеток и формирования бластоцист высокого качества, имплантации и развития беременности. Показано, что низкое содержание CD4⁺FoxP3⁺-регуляторных клеток ассоциировано с высоким уровнем IL-6 в ФЖ, что оказывает негативное влияние на ранний эмбриогенез.

Получены новые данные, что стимуляция гонадотропинами сопровождается появлением более высокого уровня свДНК в ФЖ, превышающего таковой у женщин в естественном цикле. При этом выброс свДНК не обусловлен повышением уровня IL-8 и образованием нейтрофильных ловушек. Данные факторы являются независимыми, имеют различную направленность эффектов (позитивную для IL-8 и негативную для свДНК) и влияют на различные этапы оо-эмбриогенеза. Высокий уровень свДНК в ФЖ можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак для наступления беременности, что подтверждается проведенным ROC-анализом.

Представлены новые данные об увеличении доли Ann⁺CD206⁺ МВ Ann⁺CD107a⁺МВ, уровень которых повышается в ФЖ у женщин с высоким качеством бластоцист и эффективным циклом ЭКО. Проведенный ROC-

анализ позволил оценивать показатели содержания $\text{Ann}^+\text{CD}206^+\text{MB}$ и $\text{Ann}^+\text{CD}107a^+\text{MB}$ в ФЖ как прогностические критерии при стимуляции гонадотропинами.

Значение работы в прикладном аспекте заключается в выявлении новых биомаркеров, характеризующих эффективность стимуляции суперовуляции в циклах ЭКО. Эффективные циклы ЭКО ассоциированы с более высокими показателями – количества $\text{FoxP}3^+$ регуляторных клеток, уровня IL-8 , а также содержания $\text{AnnV}^+\text{CD}107a^+$ и $\text{AnnV}^+\text{CD}206^+$ микровезикул в ФЖ. В то же время высокий уровень свДНК и IL-6 ассоциирован с отрицательным исходом ЭКО. Определены пороги содержания свДНК ($<34,7$ нг/мл), $\text{Ann}^+\text{CD}206^+\text{MB}$ ($>12,7$ МВ/мкл), $\text{Ann}^+\text{CD}107a^+\text{MB}$ ($>9,6$ МВ/мкл), которые можно рассматривать как прогностические критерии позитивных исходов ЭКО. Определение данных биомаркеров у женщин в стимулированных циклах позволит провести своевременную коррекцию терапии сопровождения и повысить эффективность ЭКО. Полученные данные используются при подготовке студентов НГУ по программе «Клиническая иммунология».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Относительное содержание $\text{CD}4^+\text{FoxP}3^+$ и $\text{CD}4^+\text{FoxP}3^+$ клеток в ФЖ женщин ассоциировано с эффективностью оплодотворения, лучшим качеством эмбрионов и наступлением беременности в программах ЭКО.
2. Уровень свободной ДНК в ФЖ женщин прямо коррелирует с параметрами овариального резерва и обратно ассоциируется с качеством бластуляции и наступлением беременности.
3. Содержание свДНК, $\text{AnnV}^+\text{CD}206^+$ и $\text{AnnV}^+\text{CD}107a^+$ МВ в ФЖ характеризуются прогностической значимостью в качестве предикторов эффективности циклов ЭКО.

Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным фактическим материалом и использованием современных методов исследования. Апробация диссертации состоялась 18 февраля 2021 г. на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии. Основные положения диссертации доложены и обсуждены: на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск 2016, 2017), XVI Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (8 июня 2017, г. Санкт-Петербург), III и IV международных конгрессах «Новые технологии в акушерстве, гинекологии,

перинатологии и репродуктивной медицине» (апрель 2017, 2019 гг. Новосибирск), 18 всемирном конгрессе «Международного общества гинекологической эндокринологии» ISGE 2018 (8 марта 2018, г.Барселона, Испания). Автор лично участвовал в разработке дизайна исследования, рекрутировании пациентов и проведении иммунологических исследований. Обработка полученных данных и статистический анализ проведены автором самостоятельно.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 143 страницах машинописного текста, включающего 14 таблиц, 16 рисунков и 1 формулу. Работа выполнена на базе ООО «Клиника профессора Пасман» (г.Новосибирск) и лаборатории клеточной иммунотерапии клиники иммунопатологии НИИФКИ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, из них 1 статья, индексируемая в базе Web of Science.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа основана на результатах обследования 89 женщин: из них 10 женщин участвовали в программе донации ооцитов, 75 женщин с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО в цикле стимулированной овуляции, 4 - в естественном цикле (без стимуляции гонадотропинами). Всем женщинам проводилось комплексное обследование в соответствии с приказом №107н. Исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия. Возраст женщин, проходивших лечение бесплодия, варьировал от 25 до 46 лет (медиана 34,0), из них женщины раннего репродуктивного возраста (<35 лет) составили 61,8%, позднего (≥ 35 лет) – 38,2 %; длительность бесплодия – от 1 года до 18 лет (медиана 7,5). Первичное бесплодие было диагностировано у 52%, вторичное – у 48% пациенток. Гормональный статус определяли на 2-3 день менструального цикла у каждой женщины (табл 1).

Таблица 1 - Клиническая характеристика группы женщин с бесплодием (n=79)

Параметры	Исследуемая группа	Параметры	Исследуемая группа
ФСГ (МЕ/л)	7,2 (5,9-9,3)	Е ₂ (пмоль/л)	115,0 (70,5-207,0)
ЛГ (МЕ/л)	4,8 (3,5-7,3)	АМГ (нг/мл)	1,9 (1,0-3,5)

Таблица 1 (продолжение) - Клиническая характеристика группы женщин с бесплодием (n=79)

Параметры	Исследуемая группа	Параметры	Исследуемая группа
ТТГ (мМЕ/л)	1,3(0,9-1,7)	Тестостерон (нмоль/л)	1,2 (0,9-2,0)
Св.тестостерон	12,4 (11,6-13,4)	Пролактин (мМЕ/мл)	286,0 (196,0-397,0)
М-эхо в день переноса (мм)	10,6 (10,0-12,0)	17-ОН прогестерон (нмоль/л)	2,8 (2,0-4,3)

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me) и интеринтерквартильного диапазона (LQ-UQ).

Причиной бесплодия в 13% случаев был мужской фактор, в 47,9% случаев – женское бесплодие: из них на долю трубно-перитонеального фактора приходится 34%, на эндокринный фактор – 13,9%. Сочетанное бесплодие диагностировалось в 39,1% случаев. Достоверных отличий по клиническим параметрам в группе женщин, участвующих в донации ооцитов и женщин с бесплодием обнаружено не было. Процедура ЭКО (инсеминация *in vitro*) была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 53%. Оценка полученных зигот проводилась по принятой методике. На основании чего рассчитывался индекс оплодотворения (ИО) - (Формула-1).

$$ИО = \text{кол-во зигот (2pn 2pb)} / \text{кол-во полученных ооцитов (1)}$$

По происшествию 3 суток с момента оплодотворения осуществлялась оценка развития эмбрионов согласно классификации Ebner T., 2001, а по истечению 5 суток - по принятой международной классификации Gardner D.K., 1999. После оценки перспективности бластоцисты проводился перенос эмбриона в полость матки женщины. Диагностика беременности проводилась по уровню хорионического гонадотропина (ХГЧ). Биохимическая беременность регистрировалась при значениях ХГЧ >5 Ед/мл; клиническая – при визуализации плодного яйца в полости матки методом УЗИ на пятой неделе гестации.

Иммунологические методы исследования фолликулярной жидкости. Через 36 часов с момента введения триггера овуляции проводили извлечение ооцитов с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации. В случае видимого загрязнения кровью образцов ФЖ, образцы не включались в исследование. Затем проводили центрифугирование ФЖ с относительным ускорением 800g в течение 10 мин для осаждения клеток и крупного клеточного дебриса, после чего отбирали 1500 мкл для исследования микровезикул, а остальные образцы замораживали при t - 80°C.

Исследование относительного содержания регуляторных клеток ($CD4^+Foxp3^+$, $CD4^-Foxp3^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ и $CD4^+CD25^-Foxp3^+$) в фолликулярной жидкости оценивали методом проточной цитометрии, используя анти-CD25 (FITC, «BD Biosciences», США), анти-CD4 (PerCP, «BD Biosciences», США), анти- Foxp3 (PE, «BD Biosciences») моноклональные антитела. Фиксацию и пермеабиллизацию клеток для оценки внутриклеточной экспрессии Foxp3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов (CD25 и CD4); использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя («BD Biosciences»). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), («BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США)», «CellQuest Software», США).

Исследование уровня свДНК в фолликулярной жидкости производили с помощью набора «BioSilica», производства г.Новосибирск К 100-200 мкл образца добавляли два объема раствора для сорбции, перемешивали на Vortex, затем на подготовленную колонку с фильтром и с 100 мкл раствора для промывки вносили выделяемый образец. Центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин. После чего, поочередно наносили на фильтр 300 мкл, дважды по 500 мкл раствора для промывки с последующим удалением фильтрата. Пробирку с микроколонкой центрифугировали в течение 30 сек при 13000 об/мин для удаления остатков раствора, после чего ее извлекали и помещали в новую 1,5 мл пробирку. Далее наносили на фильтр 50 мкл дистиллированной воды, инкубировали микроколонку 2 минуты при комнатной температуре, содержимое центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин. После подготовительного этапа проводили измерение флуориметрическим методом с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers. Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ ДНК

Исследование уровня цитокинов в фолликулярной жидкости оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем 8-Plex (определяемый динамический диапазон 2-32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Оценка результатов проводили на проточном флуориметре. С помощью стандартных калибровочных разведений концентрация исследуемых 8 цитокинов в тестируемых образцах

фолликулярной жидкости высчитывается автоматически на персональном компьютере с использованием программы «Bio-Plex Manager».

Для выделения микровезикул из фолликулярной жидкости использовали 1500 мкл из верхней трети надосадочной жидкости, не тревожа осадок, переносили в микроцентрифужную пробирку (Axygen Scientific Inc., США), которую центрифугировали с относительным ускорением 13000g в течение 10 мин. Фенотипическую характеристику продуцируемых МВ проводили методом проточной цитометрии. После размораживания пробирки с образцами ультрацентрифугировали (20800g в течение 30 мин при $t -4^{\circ}\text{C}$). Показатели прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP-Cy 5.5), FL-4 (APC) оценивали по логарифмическим шкалам. Область гейтирования МВ определяли с помощью латексных бус (LB-11, Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля использованы аннексин V-связывающий буфер и немеченные моноклональными антителами МВ. Определяли относительное содержание CD45^+ , CD206^+ , CD14^+ , CD107a^+ аннексин V^+ МВ. Абсолютное количество МВ оценивали с использованием технологии TruCount (BD Biosciences).

Методы статистической обработки. Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Данные представлены Таблицы и рисунки содержат информацию в виде медианы (Me) и интерквартильных диапазонов (LQ-UQ), а также в отдельных случаях представлены значения средних арифметических величин (M) и стандартных ошибок средних (S.E.), максимальных и минимальных значений. Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни (p_u). Корреляционный анализ с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Различия считали статистически значимыми при уровне $p_u < 0,05$. Метод ROC – анализа использован для определения чувствительности и специфичности изучаемых факторов. По вертикальной оси графика ROC-кривой представлена чувствительность, а по горизонтальной – специфичность с построением ROC-кривых и вычислением площади под ними (AUC). Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор. Визуализацию показателей получали с помощью программы «GraphPad Prism5».

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование ФЖ у женщин после стимуляции суперовуляции позволило выявить наличие в ней FoxP3^+ клеток как в

популяции $CD4^+$ ($CD4^+FoxP3^+$), так и $CD4^-$ ($CD4^-FoxP3^+$) -клеток. Отмечается, что $FoxP3^+$ -клетки были обнаружены среди $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ лимфоцитов. Относительный уровень $CD4^+FoxP3^+$ -клеток составил 2,0% (1,0-3,7 %), $CD4^-FoxP3^+$ -клеток – 3,0 % (1,3-5,0 %). Относительное содержание $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ и $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ -клеток составило 4,0 % (2,0-6,7 %) и 6,0 % (3,5-8,0 %), соответственно. Учитывая выраженные вариации в количестве созреваемых фолликулов при стимуляции суперовуляции, все пациентки были разделены на 3 группы: с количеством фолликулов <6 (группа 1), 6-12 (группа 2) и >12 (группа 3). Анализ данных субпопуляций регуляторных клеток в выделенных группах показал, что образцы ФЖ женщин в группе 1 отличались более высоким содержанием $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ -клеток, доля которых составляла 6,0 % (6,0-19,0 %) и была значимо выше, чем в группах 2 и 3: 5,0 % (3,3-9,0 %), $p_u=0,04$, и 4,6 % (3,3-6,0 %), $p_u=0,03$, соответственно (рис. 1А).

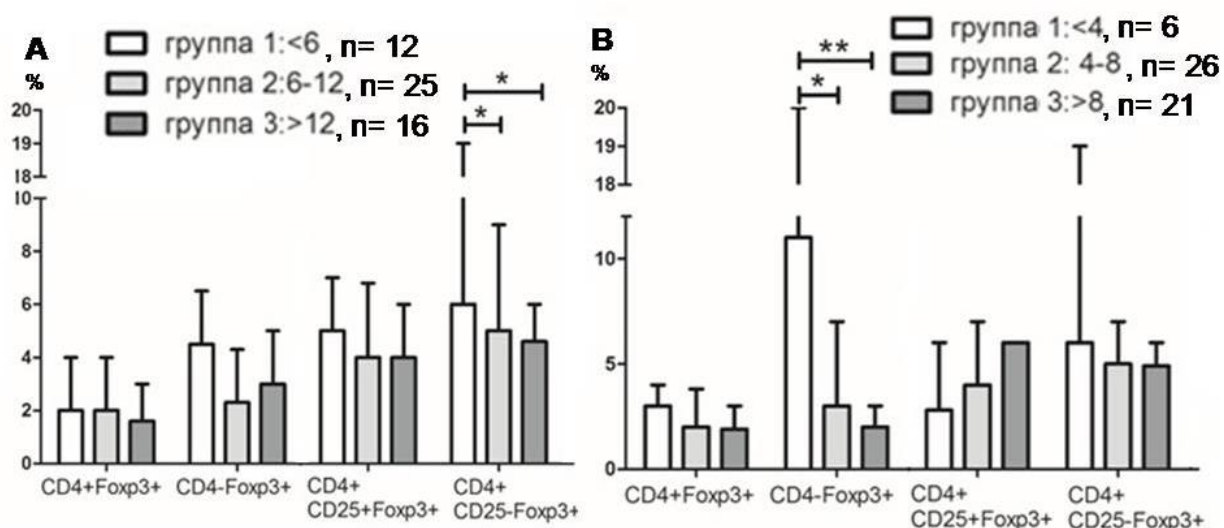


Рисунок 1. Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших программу ЭКО, в зависимости от фолликулогенеза. Представлены данные относительного содержания субпопуляций регуляторных клеток в ФЖ в зависимости от количества созревших фолликулов (А) и от количества ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников (В). Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ-UQ), * $p_u<0,05$, ** $p_u<0,01$ – значимость отличий между показателями.

Для исследования возможной связи регуляторных клеток с количеством получаемых ооцитов, все женщины также были поделены на 3 группы - с числом ооцитов <4 (группа 1), 4 - 8 (группа 2) и >8 (группа 3). Образцы ФЖ пациенток группы 1 и 2 содержали значимо большее количество $CD4^-FoxP3^+$ клеток по сравнению с группой 3, что составило: 11,0% (2,0-20,0) vs 2,0%

(1,0-3,0), $p_u=0,006$ и 3,0% (1,0-7,0) vs 2,0% (1,0-3,0), $p_u=0,03$ соответственно (рис. 1B). Учитывая, что ооциты, полученные во время пункции яичников различались по степени зрелости и способности к оплодотворению, мы также сравнили уровень регуляторных клеток в группах женщин с высоким и средним индексом оплодотворения (ИО): 0,75-1,0 и $<0,75$, соответственно. Как следует из рисунка 2А, у женщин с ИО $>0,75$ по сравнению с оппозитной группой регистрировалось значимо большее число $CD4^+FoxP3^+$ клеток, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 3,0% (1,0-4,0), $p_u=0,04$. Количество клеток в других исследуемых субпопуляциях было сопоставимо. Следующим шагом явился ретроспективный анализ содержания $FoxP3^+$ клеток в ФЖ в зависимости от качества 3-х и 5-суточного эмбрионов. Значимых различий в содержании регуляторных клеток при разном качестве эмбрионов на 3 сутки обнаружено не было. На основании показателей качества бластоцист женщины были разделены 2 группы – с высоким качеством (классы А и В) и низким (класс С). Обнаруживалось более высокое содержание $CD4^+FoxP3^+$ популяции в ФЖ у женщины с высоким качеством бластоцист, по сравнению с группой женщин с низким качеством бластоцист, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 1,0% (1,0-3,0), $p_u=0,04$. Аналогично, содержание $CD4^+FoxP3^+$ составило 3,0% (1,0-4,1) vs 1,0% (1,0-2,0), $p_u=0,04$ (рис. 2В).

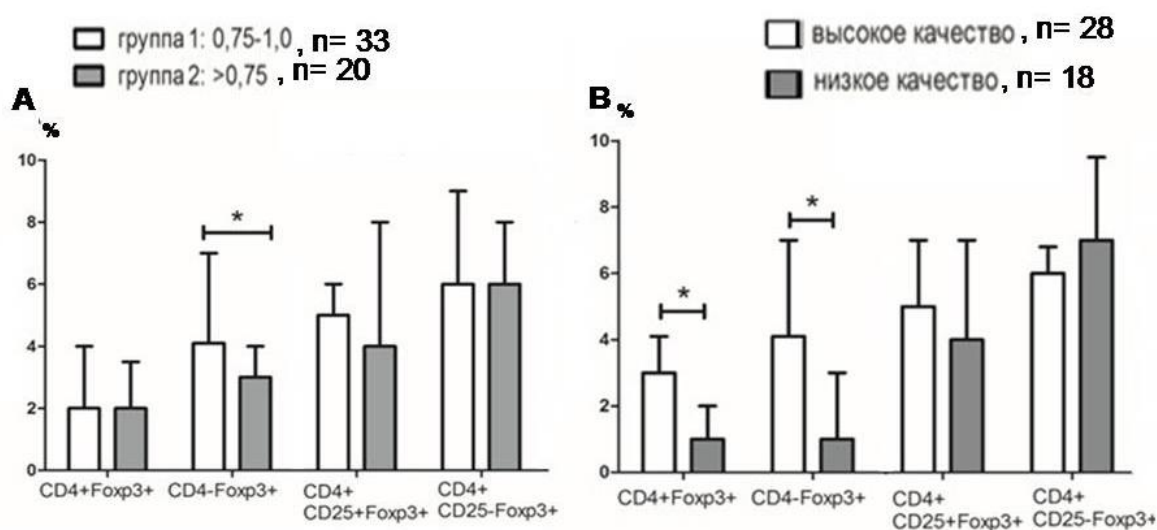


Рисунок 2. Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших программу ЭКО, в зависимости от качественных показателей. Представлены данные характеристика относительного содержания субпопуляций регуляторных клеток в ФЖ в зависимости от значения индекса оплодотворения (А) и от качества бластоцист (В). Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ-UQ), $*p_u<0,05$ – значимость отличий между показателями.

Качество бластоцисты является основополагающим фактором, влияющим на имплантацию эмбриона и наступление беременности. Далее мы провели

ретроспективный анализ взаимосвязи между содержанием регуляторных клеток в ФЖ и исходами ЭКО в группах женщин с клинической беременностью, биохимической беременностью и отрицательными исходами (табл.2).

Таблица 2 - Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости у женщин с разными исходами цикла ЭКО

Параметры	Клиническая беременность (n=15)	Биохимическая беременность + эктопическая (n=18)	Отрицательный исход (n=16)	Значимость (p_u)
	1	2	3	
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	5,3±1,4 4,2 (1,6-7,0)	4,8±1,3 3,0 (2,0-4,0)	2,2±0,5 1,0 (1,0-3,0)	$P_{1-2}=0,83$ $P_{1-3}=0,04$ $P_{2-3}=0,92$
CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺	4,4±1,3 3,2 (2,4-4,0)	7,8±1,3 6,5 (4,0-9,0)	7,2±1,0 6,0 (4,5-9,5)	$P_{1-2}=0,09$ $P_{1-3}=0,10$ $P_{2-3}=0,72$

Примечание: представлены данные относительного содержания CD4⁺Foxp3⁺ в виде процента от количества лимфоцитов, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ в виде процента от CD4⁺-клеток. Биохимическая беременность считалась при уровне ХГЧ >5Ед/мл, клиническая беременность - при визуализации плодного яйца. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p_u - U-критерий Манна-Уитни.

Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺ клеток в ФЖ женщин с наступившей и прогрессирующей беременностью было значимо выше, чем в ФЖ женщин с отрицательными исходами ЭКО. Обнаружено, что отсутствие беременности на уровне тенденции ассоциировано с более высоким уровнем в ФЖ CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ клеток.

Таким образом, было обнаружено наличие в ФЖ различных типов FoxP3⁺ клеток, а также обнаружено, что CD4⁺FoxP3⁺ клетки, максимальное содержание которых, наряду с CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ регистрировалось в группе женщин с наименьшим числом фолликулов и ооцитов, а также наибольшее число CD4⁺FoxP3⁺ - клеток регистрировалось в ФЖ женщин с высоким индексом оплодотворения. Более того, ретроспективный анализ выявил, что лучшее качество бластоцист было ассоциировано с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺FoxP3⁺ и CD4⁺FoxP3 клеток.

Исследование содержания уровня свДНК в ФЖ выявило наличие свДНК в ФЖ женщин в цикле стимуляции суперовуляции, концентрация которой варьировала в диапазоне 19,8 - 65,9 нг/мл (медиана 40,3 нг/мл). Интересно отметить, что образцы ФЖ, полученные в естественном цикле (без введения гонадотропных препаратов), имели достоверно меньшие концентрации свДНК, чем ФЖ женщин со стимулированной овуляцией (рис. 3А). Анализ образцов ФЖ женщин статистически достоверные различия в концентрации свДНК были выявлены в группах с разной продолжительностью бесплодия. Так, в ФЖ женщин с бесплодием ≤ 5 лет уровень свДНК был ниже, чем в группе с длительностью бесплодия >5 лет (рис. 3В).

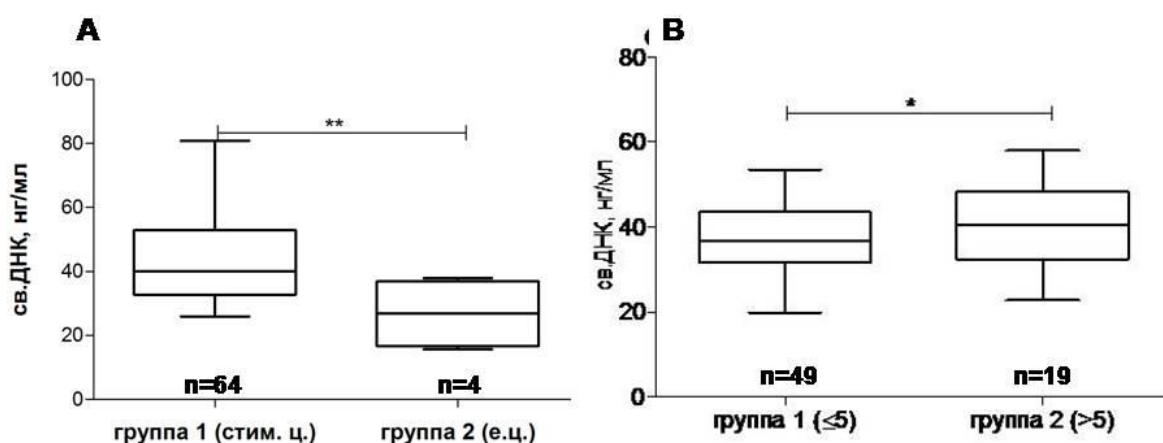


Рисунок 3. Уровень свДНК в ФЖ женщин, проходивших программу ЭКО, с различными клиническими параметрами: А — в стимулированном (группа 1) и естественном (группа 2) циклах; В – в группах с продолжительностью бесплодия ≤ 5 лет (группа 1) и > 5 лет (группа 2). Представлены данные в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * $p_u < 0,05$, ** $p_u < 0,01$ – значимость отличий между показателями.

Одним из важных параметров является овариальный резерв женщин, включающий оценку числа АФ и уровня АМГ. Поэтому в зависимости от количества АФ, способных отвечать на стимуляцию суперовуляции, женщин разделили на 3 группы: АФ < 5 - группа 1; АФ 5-14 - группа 2; и АФ > 14 - группа 3. Из данных рисунка 4А видно, что уровень свДНК в группе 3 был в 1,3 раза выше, чем в группе 1. Тем не менее, достоверной корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ($r_s = 0,22$; $p_u = 0,1$).

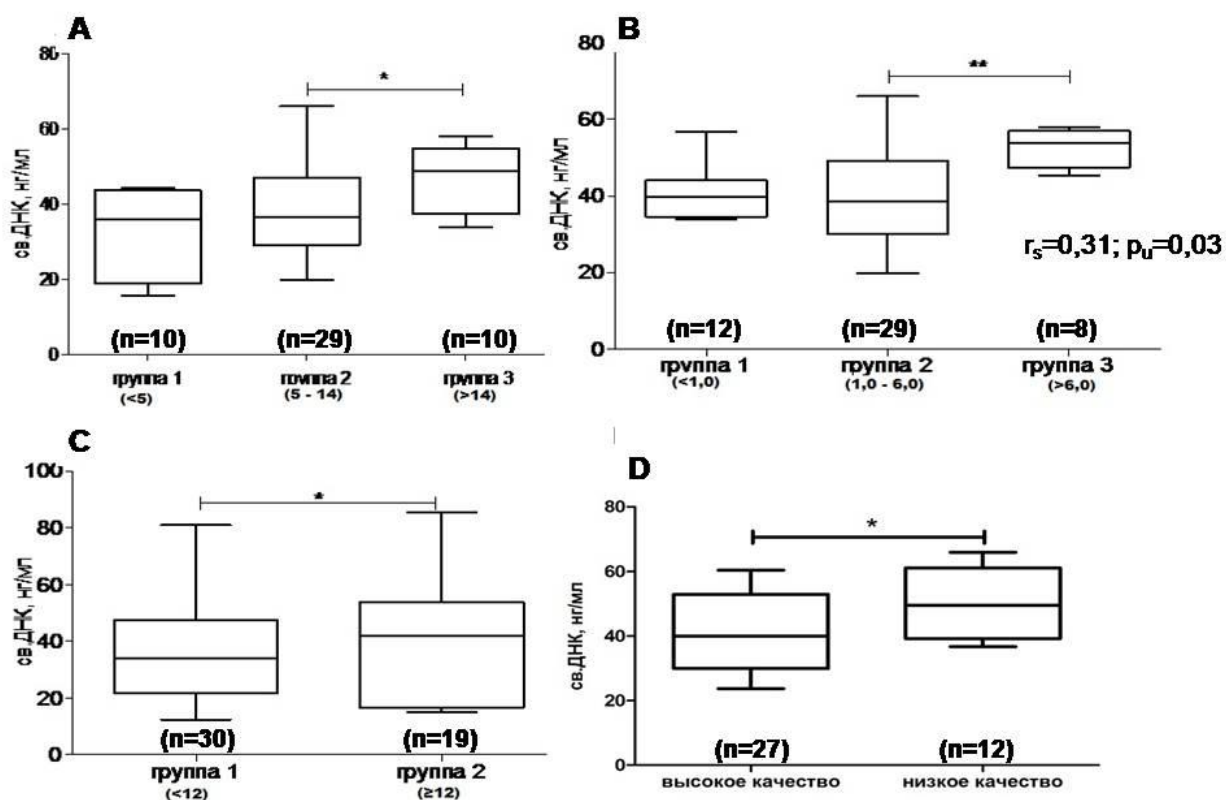


Рисунок 4. Уровень свДНК в ФЖ женщин, проходивших программу ЭКО, в зависимости от следующих показателей: А - количество антральных фолликулов; В – уровень АМГ; С - количество овуляторных фолликулов; Д - 5сутки развития эмбрионов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. * $p_u < 0,05$, ** $p_u < 0,01$ – значимость отличий между показателями.

В зависимости от уровня АМГ все женщины также были разделены на три группы - с низким (<1,0 нг/мл; группа 1), средним (1,0 - 6,0 нг/мл; группа 2) и высоким (> 6,0 нг/мл; группа 3) уровнем гормона. Содержание свДНК в ФЖ у женщин 3-ей группы было достоверно выше, чем у женщин 2-ой группы и в виде выраженного тренда превышало аналогичный показатель в 1-ой группе (рис. 3В). При этом между уровнем АМГ и концентрацией свДНК отмечалась умеренная прямая корреляционная взаимосвязь ($r_s=0,31; p_u=0,03$). Ответ яичников на стимуляцию существенно различался, подтверждением тому являются вариации в количестве овуляторных фолликулов и полученных ооцитов. Оценка содержания свДНК с учетом данных параметров показала, что концентрация свДНК в образцах ФЖ женщин с высоким количеством овуляторных фолликулов (≥ 12) составляла 44,2 нг/мл и была достоверно выше, чем у женщин с меньшим (<12) количеством фолликулов 36,6 нг/мл (рис. 4С). Уровень свДНК в группе женщин с высоким

(классы А и В) качеством бластоцит был достоверно ниже (39,3 нг/мл), чем у женщин с низким (класс С) качеством (49,5 нг/мл) (рис. 4D). Далее был проведен ретроспективный анализ взаимосвязи между содержанием в ФЖ свДНК и исходами ЭКО. Для этого уровни свДНК проанализировали в образцах ФЖ в группах женщин с клинической беременностью; с отсутствием беременности и с биохимической беременностью (табл.3).

Таблица 3 - Содержание свободной ДНК у женщин с различными исходами ЭКО

Клиническая беременность (n=17)	Биохимическая беременность (n=19)	Биохимическая беременность + отрицательный исход (n=35)	Значимость (p _u)
1	2	3	
33,8 ± 3,7 31,9 (19,9-43,8)	46,8 ± 3,5 52,2 (40,0-57,9)	44,2 ± 2,6 41,2 (31,6-53,6)	P ₁₋₂ =0,017 P ₁₋₃ =0,02

Примечание: концентрацию свДНК исследовали с помощью флуориметрического метода с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers. Концентрация свДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ ДНК. Биохимическая беременность считалась при уровне ХГЧ >5Ед/мл, клиническая беременность - при визуализации плодного яйца. Данные представлены в виде М± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p_u- U-критерий Манна-Уитни.

Сравнительный анализ выявил значимо более низкий уровень свДНК у женщин с клинической беременностью (группа 1) по сравнению с группой женщин группы 2 (биохимическая беременность). Более того, у женщин с клинической беременностью уровень свДНК в ФЖ был в 1,6 раз достоверно ниже, чем у женщин группы 3 с неэффективными циклами ЭКО.

Таким образом, уровень свДНК сопряжен с нарушениями овариального резерва, низким качеством эмбрионов и отрицательным исходом программы ЭКО.

Следующим этапом было исследование содержания цитокинов в ФЖ женщин после стимуляции суперовуляции. Было выявлено, что все образцы ФЖ женщин содержали детектируемые концентрации IL-6 и IL-8,

медианный уровень с минимальным и максимальным значениями которые составляли 20,4 (8,0 - 1890,4) пг/мл и 851,3 (49,6 до 2830,7) пг/мл, соответственно. Было обнаружено, что содержание IL-6 в образцах ФЖ женщин с высоким количеством овуляторных фолликулов (>12) был достоверно выше, чем у женщин с меньшим (<6) количеством фолликулов, тогда как уровень IL-8 был достоверно выше в группе с минимальным количеством фолликулов (<6) (табл.4).

Таблица 4 - Уровень цитокинов (IL-6, IL-8) в ФЖ в зависимости от эмбриологических показателей

Параметры	IL-6 (пг/мл)				IL-8 (пг/мл)			
	M± S.E.	M	(LQ - UQ)	p _u	M± S.E.	M	(LQ - UQ)	p _u
Количество фолликулов:								
<6	23,8±7,3	10,0	10,0-36,4	1-2=0,13	1049,8±79,2	1092,8	784,5-1253,5	1-2=0,05
6-12	117,3±47,7	39,6	10,0-103,2	2-3=0,4	830,6±70,9	705,9	595,2-1218,8	2-3=0,3
>12	75,6±15,2	60,3	10,0-103,2	1-3=0,02	978,9±116,6	833,0	639,2-1126,2	1-3=0,6
Кач-во эмбрионов на 3-и сутки:								
Высокого качества	58,5±12,3	11,6	10,0-75,8	0,01	936,4±61,8	851,3	647,7-1189,4	0,7
Низкого качества	189,1±92,71	94,5	54,8-146,6		896,1±125,3	726,7	480,4-1233,8	
Кач-во бластоцист:								
Высокого качества	64,2±15,95	29,2	10,0-85,4	0,004	882,8±63,3	844,0	647,7-996,2	0,8
Низкого качества	270,3±139,2	135,4	103,2-278,2		857,6±172,6	649,7	449,1-1247,7	

Примечание: концентрацию цитокинов в ФЖ исследовали с помощью проточной флуориметрии с использованием тест-систем 8-Plex. Качество эмбрионов оценивали по принятой классификации Ebner T., 2001 и Gardner D.K., 1999.

Низкие концентрации IL-6 ассоциировались с эмбрионами лучшего качества на 3 сутки (p_u=0,01) и на 5 сутки (p_u=0,004) развития (табл.4).

По данным литературы показано, что цитокины способны оказывать иммуномодулирующее действие на окружающие клетки, в том числе влиять на численность регуляторных клеток и выброс свДНК поэтому было решено провести сравнительный анализ между содержанием FoxP3⁺ клеток, свДНК и уровнем цитокинов (IL-6, IL-8) при изучаемых параметрах (количество фолликулов/ооцитов, качеством эмбрионов на 3/5 сутки). Обнаружена обратная корреляционная зависимость между концентрацией IL-6 и количеством CD4⁺FoxP3⁺ клеток, которая была наиболее выраженная в группе женщин с большим числом овulatoryных фолликулов (рис.5А). Содержание свДНК находилось в обратной взаимосвязи с содержанием IL-8 при лучшем качестве blastocysts, но по другим параметрам корреляция отсутствовала (рис. 5В)

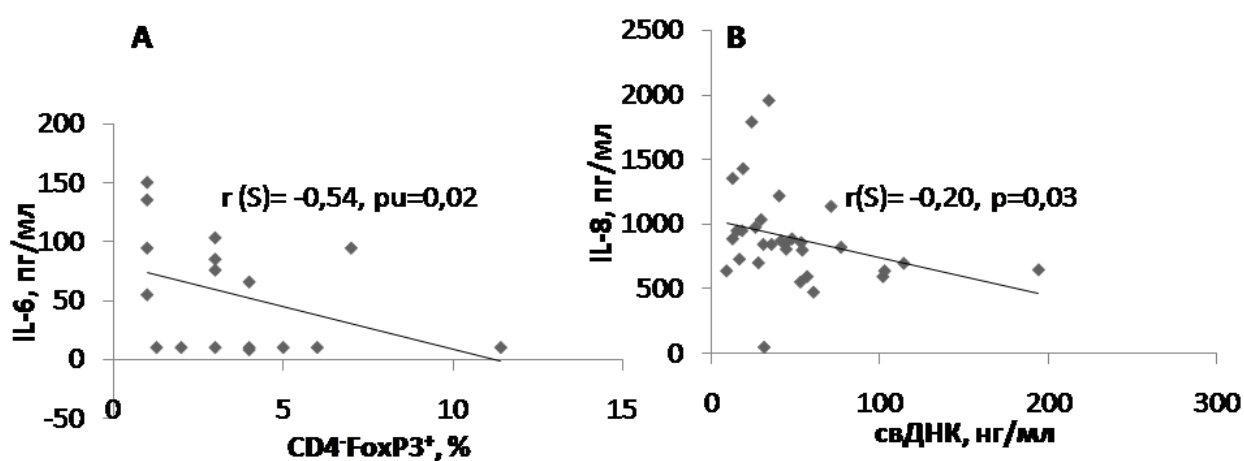


Рисунок 5. Корреляционная взаимосвязь уровней: А- IL-6 и CD4⁺FoxP3⁺ - клеток; В- IL-8 и свДНК в ФЖ женщин, проходивших программу ЭКО. Представлены данные в группе женщин с количеством овulatoryных фолликулов >12 (А), с лучшим качеством blastocysts (В).

Таким образом, выявлено, что уровень IL-6 обратно коррелирует с содержанием CD4⁺FoxP3⁺ клеток, что свидетельствует о вовлечении IL-6 в формировании пула регуляторных клеток в ФЖ. Содержание свДНК также находится в обратной взаимосвязи с содержанием IL-8 при лучшем качестве blastocysts, по другим параметрам корреляция отсутствовала, что свидетельствует о независимости данных факторов, о их различном влиянии на этапы репродуктивного процесса.

При анализе содержания МВ в ФЖ женщин было выявлено, что у женщин позднего (≥ 35 лет) репродуктивного возраста уровень AnnV⁺ был в 1,7, а AnnV⁺CD107a⁺ в 1,3 раза выше, чем у женщин <35 лет (табл. 5). Более того,

между возрастом женщин и содержанием AnnV⁺CD107a⁺ выявлялась тенденция к прямой корреляционной связи - $r(S)=0,34$, $p_u=0,05$.

Таблица 5 - Содержание микровезикул в ФЖ у женщин разных возрастных групп

Параметры МВ (мкл)	Возраст женщины (лет)		p_u
	<35 (n=26)	≥35 (n=11)	
AnnV ⁺	24,6±3,4 20,6(11,8-30,7)	41,6±8,5 34,9 (22,8-51,4)	0,03
AnnV ⁺ CD107a ⁺	13,7±1,7 11,7 (6,9-18,6)	23,6±6,2 15,6 (12,5-28,7)	0,04

Примечание: Фенотипическую характеристику МВ проводили методом проточной цитометрии. В качестве контроля использованы аннексин-связывающий буфер и немеченные моноклональными антителами МВ. Биохимическая беременность считалась при уровне ХГЧ >5Ед/мл, клиническая беременность - при визуализации плодного яйца. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы, интерквартильного диапазона (LQ-UQ); p_u - U-критерий Манна-Уитни.

Выявлено 1,5-кратное повышение содержания популяции AnnV⁺CD206⁺ МВ в ФЖ в группе с лучшим ИО по сравнению с группой женщин с низким ИО. 13,9 (8,9-19,2) vs 9,3 (5,6-10,3), $p_u=0,05$. Проведен ретроспективный анализ уровня МВ у женщин с различными исходами ЭКО. Как следует из данных таблицы 6, женщины с наступившей беременностью характеризовались достоверно более высоким содержанием AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ в ФЖ по сравнению с женщинами с отрицательным исходом программы (табл.6).

Таблица – 6 Содержание МВ в ФЖ в зависимости от исхода цикла ЭКО

Исследуемые популяции МВ (МВ/мкл)	Клинич.беременность (n=6)	Биохимическая беременность (n=15)	Отрицательный исход (n=12)	p_u
	1	2	3	
AnnV ⁺ CD107a ⁺	20,5±5,5 19,6 (8,7-29,6)	19,7±4,4 14,9 (11,1-25,6)	10,0±1,9 8,8 (4,7-12,9)	$_{1-2}=0,9$ $_{1-3}=0,04$ $_{2-3}=0,08$
AnnV ⁺ CD206 ⁺	18,3±5,4 13,9 (7,8-28,3)	16,4±3,3 13,9 (9,0-18,3)	7,4±0,9 9,1 (4,8-10,3)	$_{1-2}=0,7$ $_{1-3}=0,02$ $_{2-3}=0,03$

Примечание: Фенотипическую характеристику МВ проводили методом проточной цитометрии. В качестве контроля использованы аннексин-связывающий буфер и немеченные моноклональными антителами МВ. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы, интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p_u - U-критерий Манна-Уитни.

Таким образом, обнаружено повышение уровня $AnnV^+$ и $AnnV^+CD107a^+$ у женщин старшей возрастной группы. Достоверное высокий уровень $AnnV^+CD206^+$ отмечался в ФЖ женщин с высоким индексом оплодотворения ($>0,75$) по сравнению с женщинами с низким ИО (0,75); наступление клинической беременности ассоциировалось с повышенным уровнем $AnnV^+CD107a^+$ и $AnnV^+CD206^+$.

Для выявления значимых параметров, которые можно рассматривать в качестве прогностических маркеров эффективности циклов ЭКО, был проведен ROC- анализ, который показал, что уровень свДНК в ФЖ можно рассматривать как возможный предиктор наступления клинической беременности. Так, площадь под кривой составила 0,72 ($p = 0,009$), что соответствует хорошему качеству прогноза. Следовательно, концентрация свДНК выше 34,7 нг/мл позволяет прогнозировать отрицательный исход программы со специфичностью 74,3% и чувствительностью 70,6%. (рис. 7А).

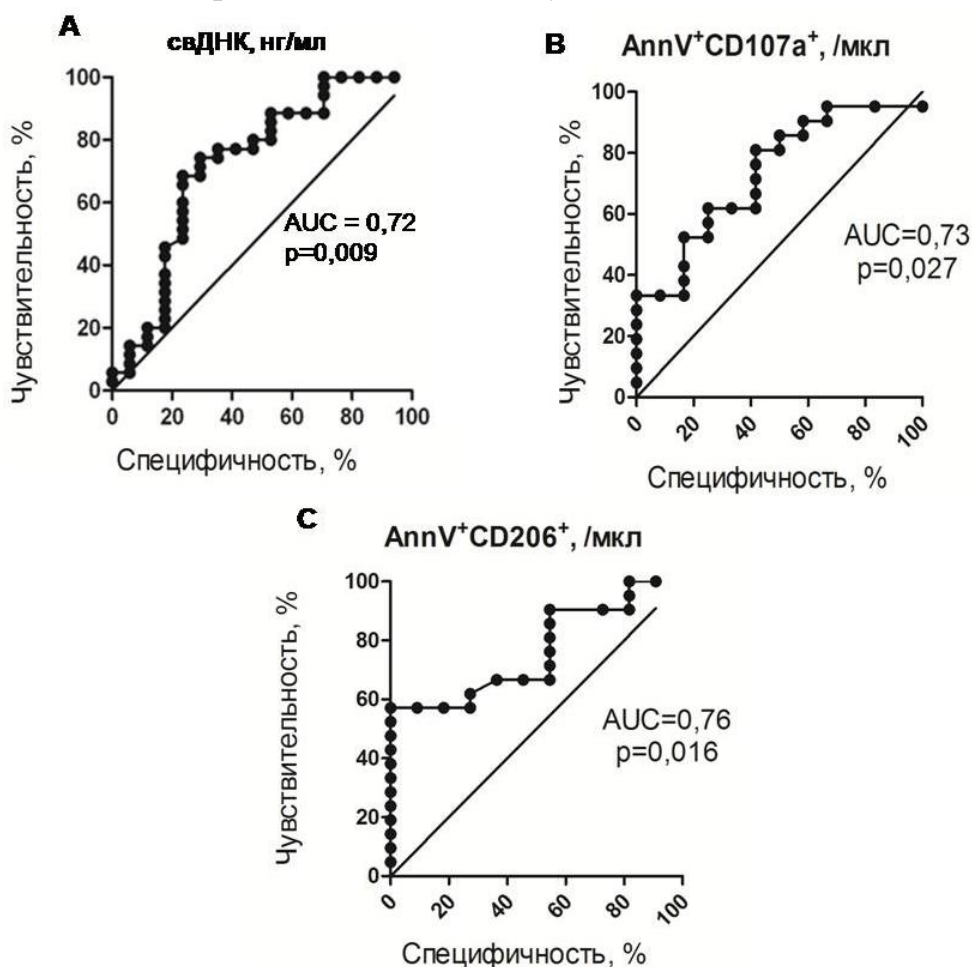


Рисунок 7. ROC – анализ прогноза наступления беременности: А- свДНК; В- Ann+CD107a⁺; С-AnnV⁺CD206⁺. ROC- кривая, представляет зависимость двух величин: чувствительности и специфичности. Чувствительность отражает долю (%) правильно классифицированных положительных наблюдений. Специфичность отражает долю (%) истинно-отрицательных классификаций в общем числе отрицательных наблюдений. Качество проведенного ROC- анализа оценивают как площадь под ROC-кривой - AUC (area under the curve). Значения AUC >0,7 свидетельствуют о хорошем качестве прогноза.

Другими прогностическими маркерами могут являться показатели уровня в ФЖ AnnV⁺CD107a⁺ и AnnV⁺CD206⁺ микровезикулы. Так, концентрация AnnV⁺CD107a⁺ >12,75 МВ/мкл в ФЖ позволяет прогнозировать наступление беременности со специфичностью 75,0% и чувствительностью 61,9% (рис.6В). У женщин достоверно чаще регистрируется беременность при концентрации в ФЖ AnnV⁺CD206⁺ >9,6 МВ/мкл, при этом специфичность составила 72,7%, чувствительность 62,9%, а площадь под кривой - 0,76, что свидетельствует о хорошей прогностической значимости данного маркера (рис. 6С). Выявление ранних прогностических биомаркеров наступления беременности в будущем может дать основу для своевременной терапии женщин в программах ЭКО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что в ФЖ женщин, проходивших стимуляцию суперовуляции по программе ЭКО, выявлены различные субпопуляции регуляторных клеток, свДНК, МВ и цитокины (IL-6 и IL-8), оказывающие влияние на процесс фолликулогенеза, оогенеза, раннего эмбрионального развития и наступления беременности. Впервые было показано присутствие в ФЖ женщин как в стимулированных гонадотропинами, так и в естественных циклах, не только CD4⁺FoxP3⁺, но и CD4⁺FoxP3⁺, а также FoxP3⁺клеток с наличием и отсутствием молекулы CD25. Более того, обнаружена взаимосвязь регуляторных клеток с ранними этапами репродуктивного процесса: CD4⁺FoxP3⁺ -клетки контролируют ранние этапы оогенеза, и, наряду с CD4⁺FoxP3⁺, опосредуют эффективную бластуляцию и последующее наступление беременности. При этом более высокое количество CD4⁺FoxP3⁺ -клеток сопряжено с прогрессированием беременности. Возрастание в ФЖ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ -клеток, напротив, ассоциировано с отрицательными исходами ЭКО.

Обнаружена обратная взаимосвязь содержания CD4⁺FoxP3⁺-клеток с уровнем IL-6, что косвенно свидетельствуют о вовлечении IL-6 в

формировании пула регуляторных клеток в ФЖ. Проведенные исследования продемонстрировали, что высокая концентрация IL-6 на фоне низкого содержания CD4⁺FoxP3⁺-клеток в ФЖ оказывает негативное влияние на качество эмбрионов и вероятность наступления беременности.

Исследования показали, что все образцы ФЖ овуляторных фолликулов содержат детектируемые количества свДНК. При этом впервые показано, что уровень свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией значимо выше, чем в естественных циклах. Показано, что содержание свДНК находится в обратной взаимосвязи с содержанием IL-8 при лучшем качестве blastocyst, по другим параметрам корреляция отсутствовала, что свидетельствует о независимости данных факторов, об их различной направленности на репродуктивный процесс. Более высокое содержание свДНК в ФЖ регистрируется у женщин с низким качеством blastocyst и отрицательным исходом программы ЭКО. Важным результатом работы является обнаружение в ФЖ различных типов MB: AnnV⁺CD107a⁺, AnnV⁺CD45⁺, AnnV⁺CD14⁺, AnnV⁺CD206⁺. При этом более высокий уровень AnnV⁺CD107a⁺ был выявлен у женщин ≥ 35 лет и коррелировал, на уровне тенденции, при длительном бесплодии ($r(S)=0,35$, $p_u=0,05$). Получены новые данные о сопряженности уровней AnnV⁺CD107a⁺ и AnnV⁺CD206⁺ в ФЖ с наступлением беременности. Проведенный ROC анализ позволил рассматривать содержание свДНК ($<37,4$ нг/мл), AnnV⁺CD107a⁺ ($>12,7$ MB/мкл) и AnnV⁺CD206⁺ ($>9,6$ MB/мкл) в ФЖ как прогностические критерии наступления беременности в программах ЭКО.

ВЫВОДЫ

1. В фолликулярной жидкости женщин выявляются различные субпопуляции FoxP3⁺ регуляторных клеток (CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), при этом более высокий уровень CD4⁺FoxP3⁺ клеток ассоциирован с лучшим индексом оплодотворения, высоким качеством эмбрионов и наступлением беременности, что свидетельствует о важной функции регуляторных клеток в оо/эмбриогенезе.
2. В фолликулярной жидкости женщин выявляется свДНК, содержание которой прямо коррелирует с параметрами овариального резерва и обратно ассоциировано с качеством blastocyst и наступлением беременности, что свидетельствует о значимости свДНК для оценки качества эмбрионов и наступления беременности.
3. Женщины с низким качеством эмбрионов и отрицательным исходом ЭКО характеризуются более высоким уровнем в фолликулярной жидкости IL-6, концентрация которого обратно коррелирует с содержанием CD4⁺FoxP3⁺

клеток, что свидетельствует о вовлечении IL-6 в формировании пула регуляторных клеток в ФЖ.

4. В фолликулярной жидкости определяются детектируемые уровни микровезикул с различным фенотипом, среди которых более высокое содержание AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ МВ сопряжено с наступлением беременности, что свидетельствует об участии МВ в реализации эффектов иммунных клеток на ранних этапах репродуктивного процесса.
5. Относительное количество свДНК, AnnV⁺CD206⁺МВ и AnnV⁺CD107a⁺ МВ в фолликулярной жидкости женщин являются диагностически значимыми биомаркерами качества эмбриона и наступления беременности. При этом уровень свДНК <34,7 нг/мл, AnnV⁺CD206⁺ ->9,6 МВ/мкл и AnnV⁺CD107a⁺ >12,7 МВ/мкл позволяет прогнозировать наступление беременности в циклах ЭКО.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Андреева Е.А.** Цитокины в регуляции овариального фолликулогенеза (обзор литературы)/ Е.А. Андреева, Н.А Хонина, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Проблемы репродукции. - 2017. - Т. 23. - С. 8-14. DOI: 10.17116/repro20172318-14
2. **Андреева Е.А.** Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО/ Е.А. Андреева, Н.А Хонина, М.А. Тихонова М.А., Е.В. Баторов, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20.- №5. - С. 657-666. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666.
3. **Андреева Е.А.** Свободная ДНК в фолликулярной жидкости женщин с различными показателями овариальной функции и исходами ЭКО/ Е.А. Андреева, Н.А Хонина, Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, Н.М. Пасман, В.А. Козлов, Е.Р. Черных // Бюллетень сибирской медицины. - 2019. –Т. 18. - № 2. - С. 16-23. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-16–23.
4. Хонина Н.А. Интерлейкин-6 как возможный регулятор интрафолликулярных FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток у женщин в цикле ЭКО/ Н.А Хонина, **Е.А. Андреева**, М.А. Тихонова, Е.В. Баторов, А.А. Останин, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Иммунология. - 2019. Т.40. - №2. - С. 30-38. DOI: 10.24411/0206- 4952-2019-12005.
5. **Андреева Е.А.** Свободная ДНК и IL-8 в фолликулярной жидкости у женщин в цикле экстракорпорального оплодотворения/ **Е.А. Андреева**, **Н.А. Хонина**, Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, А.А. Останин, Н.М. Пасман

- Е.Р. Черных // Гены & Клетки. – 2020. Т. XIV. - №2. - С. 96-100. DOI: 10.23868/202004017.
6. **Андреева Е.А.** Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием/ Е.А. Андреева, Н.А Хонина, М.А. Тихонова М.А., Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Материалы III-го международного конгресса Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине. Новосибирск, 26-29 апреля 2017. Сборник тезисов. – 2017. - С. 63-64.
 7. Казак Е.А. Новые направления в ВРТ: программы «отсроченное материнство и отцовство»/ Е.А. Казак, **Е.А. Андреева**, А.К. Ядрихинский, Н.В. Лученкова, Н.В. Воронова, С.В. Проничева // Материалы IIIго международного конгресса Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине. Новосибирск, 26-29 апреля 2017. Сборник тезисов. – 2017. - С. 105-106.
 8. Воронова Н.В. Особенности ВРТ у пациенток с низким овариальным резервом/ Н.В. Воронова, Н.В. Лученкова, **Е.А. Андреева**, С.В. Проничева Н.М. Пасман // Материалы IIIго международного конгресса Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине. Новосибирск, 26-29 апреля 2017. Сборник тезисов. 2017. - С. 81-82.
 9. **Андреева Е.А.** Регуляторные FoxP3+ Т-клетки в фолликулярной жидкости у женщин в циклах ЭКО/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, М.А. Тихонова М.А., Н.М. Пасман // XVI Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Медицинская иммунология. -2017. - специальный выпуск. - Т.19. - С. 175. DOI:10.15789/1563-0625-2017-0.
 10. **Андреева Е.А.** Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, О.П. Колесникова, Е.Н. Демченко, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // XXVII Ежегодная международная конференция РАРЧ. Санкт-Петербург, 6-9 сентября 2017. Сборник тезисов. – 2017.- С.99-100.
 11. **Андреева Е.А.** Цитокины в фолликулярной жидкости у женщин в программе ЭКО/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, А.А. Останин, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицины, инновации в репродуктологии» Самара, 23-24 августа 2018. Гены и клетки приложение 1. - 2018. - С. 40 - 41.
 12. **Андреева Е.А.** Микровезикулы в фолликулярной жидкости у женщин в программе ЭКО/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, Е.В. Баторов, Н.М. Пасман,

- Е.Р.Черных // Материалы V международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Научград Кольцово. Сборник тезисов OpenBio. – 2018. - С. 232-238.
13. **Андреева Е.А.** Иммуноактивные факторы в фолликулярной жидкости у женщин в программе ЭКО/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, М.А. Тихонова, А.А. Останин, Е.В. Баторов, Е.Н. Демченко, Е.Д, Гаврилова, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Материалы IVго международного конгресса Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине. Новосибирск, 24-27 апреля 2019. Сборник тезисов. 2019. - С. 75-78.
14. **Андреева Е.А.** Микровезикулы фолликулярной жидкости у женщин в цикле ЭКО/ **Е.А. Андреева**, Н.А Хонина, Н.М. Пасман // Российский иммунологический журнал, 2019 апрель-июнь. Т.13 (22). - №2. - С. 139-141.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ	Антимюллеров гормон
АФ	Антральные фолликулы
ВРТ	Вспомогательные репродуктивные технологии
ИКК	Иммунокомпетентные клетки
ИО	Индекс оплодотворения
МВ	Микровезикулы
НВЛ	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
свДНК	Свободная ДНК
Т-рег	Т-регуляторные клетки
ФЖ	Фолликулярная жидкость
ХГЧ	Хорионический гонадотропин человека
ЭКО	Экстракорпоральное оплодотворение
Th1, Th2, Th17	Субпопуляции Т-хелперных клеток 1,2, 17 типов