

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



АНДРЕЕВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д-р мед. наук, Хонина Наталья Алексеевна

Новосибирск

2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
1.1. Иммунологические факторы в регуляции оогенеза.....	14
1.2. Регуляторные клетки в женской репродуктивной системе и их роль в формировании толерантности.....	16
1.3. Роль свободной ДНК в женской репродуктивной системе.....	21
1.4. Современные представления о влиянии цитокинов на этапы фолликулогенеза.....	26
1.5. Микровезикулы и их роль в репродуктивной системе женщин .....	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>46</b>
2.1. Характеристика женщин, включенных в исследование.....	46
2.2. Иммунологические методы исследования фолликулярной жидкости.....	50
2.3. Статистическая обработка полученных результатов .....	55
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>56</b>
3.1. Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин и их ассоциация с клиническими и эмбриологическими параметрами.....	56
3.2 Свободная ДНК в фолликулярной жидкости женщин и ее ассоциация с клиническими и эмбриологическими параметрами.....	65
3.3. Цитокины в фолликулярной жидкости женщин и их ассоциация с клиническими и эмбриологическими показателями.....	73
3.4. Микровезикулы в фолликулярной жидкости женщин и их ассоциация с клиническими и эмбриологическими параметрами.....	84

3.5	Прогностические	маркеры	эффективности	циклов	
	ЭКО.....				90
	<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>				<b>95</b>
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>				<b>104</b>
	<b>ВЫВОДЫ.....</b>				<b>106</b>
	<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>				<b>108</b>
	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>				<b>110</b>

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность исследования

Появление методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволило повысить эффективность лечения женского и мужского бесплодия. Вместе с тем, успешность протоколов ВРТ по разным данным не превышают 50%. В первую очередь это связано с нарушением фолликулогенеза, что приводит к образованию ооцитов низкого качества. Известно, что помимо клеток гранулезы и теки [Mascioetal., 1994] в преовуляторном фолликуле локализованы иммунные клетки, в частности Т-регуляторные клетки (Т-рег), моноциты, макрофаги. Из данных литературы показано участие Т-рег, главным образом, в формировании иммунной толерантности матери к антигенам плода [Zenclussen etal.,2010; Leeetal., 2015]. Было продемонстрировано, что физиологическая беременность сопровождается возрастанием численности Т-рег в периферической крови [Wangetal., 2017], а их низкий уровень связан с неудачами имплантации и ранними потерями плода [Zenclussenetal., 2015; Rahimzadehetal., 2016; Jiangetal., 2017, Schlossbergeretal., 2013]. Наряду с важной функцией индукции и поддержания толерантности при беременности Т-рег могут участвовать в регуляции инвазии трофобласта [Duetal., 2014] и ремоделировании сосудов плаценты [Morietal., 2016]. Однако, их причастность к контролю над ранними этапами эмбриогенеза, до настоящего времени остается неизученной. Единичные публикации свидетельствуют о взаимосвязи циркулирующих  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-клеток с исходами ЭКО, однако, полученные результаты неоднозначны. Так, по данным Zhouetal. повышенное содержание  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-клеток в периферической крови при проведении ЭКО ассоциировалось с наступлением беременности [Zhouetal., 2012], тогда как по данным Schlossbergeretal. количество

циркулирующих Т-рег в зависимости от исхода ЭКО не различалось [Schlossbergeretal., 2013]. Что касается роли регуляторных клеток на ранних этапах оогенеза и эмбриогенеза, то данные о их содержании и сопряженности с созревaniem ооцитов и формированием бластоцист отсутствуют.

Созревание овуляторных фолликулов и последующая овуляция сопровождаются воспалительной реакцией, которая контролируется иммунокомпетентными клетками (ИКК), в том числе Th17 и FoxP3<sup>+</sup> Т-рег. В этом аспекте особенно интересна роль IL-6, который регулирует баланс Th17/FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток, подавляя генерацию Т-рег [Korn et al., 2008; Fujimoto et al., 2011; Lin et al., 2012; Zhu et al., 2017]. В исследовании Drescheretal. показано, что снижение соотношения Трег/Th17 в крови у женщин с привычным невынашиванием ассоциировано с повышенным уровнем в сыворотке крови IL-6 [Drescheretal., 2020]. Учитывая, что в ФЖ также присутствуют цитокины, включая IL-6 [Altunetal., 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 жидкостях организма [Noque et al., 2006; Li et al., 2009]. Показано, что концентрация ДНК возрастает при целом ряде заболеваний (онкологические, аутоиммунные заболевания, посттравматический синдром) [Козлов, 2013], включая акушерско-гинекологическую патологию [Šonka et al., 2017; Voeckeleetal., 2017]. В исследованиях продемонстрировано повышение уровня свДНК в сыворотке крови женщин с высоким риском преждевременных родов [Farina et al., 2005; Voeckeleetal., 2017] и при поздних осложнениях беременности (преэклампсии). Более того продемонстрировано, что концентрация свДНК

ассоциирована со степенью тяжести преэклампсии [Levine 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 [Traveretal., 2015; Scalici et al., 2014], однако, взаимосвязь свДНК с параметрами оо/эмбриогенеза не изучена. 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 и др., 2015; Konečná 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 et al., 2017]. По данным литературы МВ оказывают разнонаправленное действие при беременности. Показано, что МВ участвуют в регуляции физиологической иммуносупрессии при беременности. Так, в работе Baiget al показано, что МВ, вырабатываемые клетками синцитиотрофобласта, ингибируют активность Т-клеток при физиологической беременности [Baiget al., 2014]. В другом исследовании представлены данные о способности циркулирующих МВ материнского и плацентарного происхождения участвовать в развитии воспаления при преэклампсии [Gilani et al., 2016]. В ФЖ также выявлены различные типы МВ, содержащие микроРНК (miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24, miR-222, miR-193b, miR-483-5p) [Sang et al., 2013; Santonocito et al., 2014]. По данным

MachtingeretalMB, содержащие микроРНК, могут участвовать в передаче сигналов при оогенезе [Machtingeretal., 2016], что свидетельствует об их участии в формировании зрелых овulatoryных фолликулов.

Эффективность протоколов ЭКО обусловлена качеством ооцитов, параметрами раннего эмбриогенеза, уровнем продукции гормонов и влиянием иммуноактивных факторов. Наличие неэффективных циклов ЭКО при хороших клинических и эмбриологических показателях диктует необходимость выявления новых биомаркеров, обладающих прогностической значимостью. На основании вышесказанного была сформулирована цель настоящего исследования:

### **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.

### **Задачи**

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<sup>+</sup> регуляторных клеток (CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) 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<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток в ФЖ сопряжено с числом преовуляторных фолликулов и формированием бластоцист лучшего качества и позитивными исходами ЭКО. Выявлена обратная взаимосвязь низкого числа CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> регуляторных 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 АМГ. При этом высокий уровень свДНК сопряжен с низким качеством бластоцист и отрицательным исходом ЭКО. Показано, что концентрация свДНК <34,7 нг/мл 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 обнаружено более высокое содержание  $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+$ ,  $\text{Ann}^+\text{CD14}^+$ ,  $\text{Ann}^+\text{CD206}^+$  МВ в ФЖ женщин, у которых впоследствии наступала и прогрессировала беременность.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о влиянии регуляторных клеток, цитокинов и иммуноактивных факторов на различные параметры оо/эмбриогенеза при стимуляции гонадотропинами и в естественных циклах. Выявлены позитивные и негативные факторы, ассоциированные с развитием фолликулов, формированием бластоцист, имплантацией и, как следствие, эффективностью программы ЭКО.

Показано, что регуляторные клетки оказывают влияние не только на вынашивание беременности, но и на ранние этапы эмбриогенеза. Впервые продемонстрировано, что в контроле над ранними этапами эмбриогенеза принимают участие не только  $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$ , но и  $\text{CD4}^-\text{FoxP3}^+$  -клетки. Так, выявлена сопряженность высокого содержания  $\text{FoxP3}^+$ -клеток и формирования бластоцист высокого качества, имплантации и развития беременности. Показано, что низкое содержание  $\text{CD4}^-\text{FoxP3}^+$  регуляторных клеток ассоциировано с высоким уровнем ИЛ-6 в ФЖ, что оказывает негативное влияние на blastogenesis.

Получены новые данные о том, 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 ИЛ-8 и образованием нейтрофильных ловушек. Данные факторы являются независимыми, имеют различную направленность эффектов (позитивную для ИЛ-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 МВ с фенотипом М2 макрофагов ( $\text{Ann}^+\text{CD206}^+$ ) и цитотоксических клеток ( $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+$ ), уровень которых повышается в ФЖ у женщин с высоким качеством blastocyst и эффективным циклом ЭКО. Проведенный ROC-анализ позволил оценить показатели содержания  $\text{Ann}^+\text{CD206}^+\text{MB}$  и  $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+\text{MB}$  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  $\text{FoxP3}^+$  регуляторных клеток, уровня IL-8, а также содержания  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  и  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$  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),  $\text{Ann}^+\text{CD206}^+\text{MB}$  ( $>12,7$  МВ/мкл),  $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+\text{MB}$  ( $>9,6$  МВ/мкл), которые можно рассматривать как прогностические критерии позитивных исходов ЭКО. Определение данных биомаркеров у женщин в стимулированных циклах в будущем 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  $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$  и  $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$  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,  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$  и  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  МВ в ФЖ характеризуются прогностической значимостью в качестве предикторов эффективности циклов ЭКО.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация написана в традиционном стиле и 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. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 252 литературных источников, в том числе 237 зарубежных. Работа выполнена на базе ООО «Клиника профессора Пасман» (г.Новосибирск) и лаборатории клеточной иммунотерапии клиники иммунопатологии НИИФКИ (г.Новосибирск).

### **Апробация материалов диссертации**

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). Апробация диссертации состоялась 18 февраля 2021 г. на семинаре клинического отдела 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.

### **Степень достоверности и личное участие автора**

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным дизайном исследования, использованием современных иммунологических методов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конгрессах. Автор лично участвовал в разработке идеи исследования и дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены непосредственно автором, либо при непосредственном его участии на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. Автор проводил сбор и пробоподготовку образцов ФЖ, рутинные процедуры ЭКО, а также заполнении медицинской документации на базе ООО «Клиника профессора Пасман» (г.Новосибирск). Автором проведена статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.-ру мед. наук., проф. НГУ Н.А. Хониной, д-ру. мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав.лаб. Е.Р. Черных за всестороннюю помощь при подготовке работы, д-ру мед. наук А.А. Останину, канд. биол. наук М.А.Тихоновой, канд. мед. наук Е.В. Баторову за помощь при проведении исследования, а также сотрудникам лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИФКИ: д-ру. мед. наук, зав.лаб О.П. Колесниковой, канд.хим.наук Е.Н. Демченко, канд.биол.наук

Е.Д. Гавриловой за помощь в измерении св.ДНК в исследуемых образцах. Отдельно выражает искреннюю благодарность д-ру мед наук, проф., директору ООО «Клиника профессора Пасман» Н.М. Пасман за предоставление возможности в осуществлении исследования.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Иммунологические факторы в регуляции оогенеза

Одним из важнейших условий успешного протокола ЭКО является извлечение во время трансвагинальной пункции зрелого ооцита МП (метафаза второго мейоза) [Ghaffarietal., 2015]. *In vivo* ооциты созревают в фолликуле, который окружают клетки гранулезы и теки [Satoetal., 2015]. В регуляции их функциональной активности принимают участие иммунокомпетентные клетки (ИКК) через продукцию иммунноактивных факторов, попадающих в фолликулярную жидкость (ФЖ). В регуляции участвуют как сами ИКК, так и их производные: цитокины, микровезикулы, свободная внеклеточная ДНК (свДНК). Концентрация этих веществ непостоянна и изменяется, как в зависимости, так и независимо от гормонального профиля [Баркалина, 2006]. Таким образом, обеспечивается завершение оогенеза и формирование зрелой яйцеклетки.

До 70-х годов XX века, считалось, что за функционирование яичников отвечает только взаимодействие яичник - гипоталамо-гипофизарная система. Позже стало известно, что оогенез является сложным многокомпонентным процессом, в осуществлении которого задействованы как гормональная, так и иммунная системы [Bukovskyetal., 2012]. Об этом свидетельствует ряд фактов: во-первых, показано, что ИКК способны экспрессировать рецепторы к половым гормонам, лютеинизирующему гормону (ЛГ) и гонадотропин-рилизинг-гормону (ГнРГ) [Walusimbietal., 2013]. Стоит отметить, что изменения концентрации гормонов в течение менструального цикла приводят к изменению активности ИКК как на локальном, так и на системном уровне, что влияет на концентрацию сывороточных цитокинов [Есина и др., 2013]. Однако, цитокины, синтезируемые лимфоцитами, также оказывают влияние на синтез половых гормонов. Во-вторых, отмечено, что

дисфункция иммунной системы связана с нарушениями репродуктивного процесса. В работе Nishizuka et al. на экспериментальной модели было показано, что тимэктомированные мыши бесплодны, а также имели нарушение фолликулярного роста, однако введение клеток или ткани тимуса восстанавливало фолликулярный рост [Nishizuka et al., 1969]. Стоит отметить, что у женщин при дисфункции синтеза эстрогенов обнаруживается повышенное количество CD8-лимфоцитов, а также пониженный индекс соотношения CD4/CD8 [Ho et al., 1991; Есина и др., 2013]. В-третьих, ИКК осуществляют немаловажную функцию после овуляции, участвуют в формировании желтого тела и его последующей регрессии. В 1980 году, Espey предположил, что процесс овуляции представляет собой воспалительную реакцию [Espey et al., 1980; Buculmez et al., 2000]. Контроль над овуляцией, и ее цикличностью, обеспечивается благодаря эндокринной системе. По прошествии 12 – 24 часов после эстрадиолового пика происходит подъем в секреции ГнРГ, а также резкий скачок секреции ЛГ по типу «положительной обратной связи». Данные изменения приводят к овуляции, что способствует активации протеолитических ферментов — коллагеназы и плазмина, которые разрушают коллаген в фолликулярной стенке и, тем самым, уменьшают ее прочность [Stouffer et al., 2007]. Одновременное повышение уровня простагландина, эстрадиола ( $E_2$ ) и окситоцина способствует разрыву фолликулярной стенки, сокращению гладких мышц и, как результат слаженной работы, выталкиванию ооцита с излитием ФЖ из стенок яичника [Баисова и др., 2012]. Это событие напрямую связано с иммунной системой, что было подтверждено позднее. Процесс овуляции связан с увеличением концентрации ИКК: эозинофилов, макрофагов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов внутри преовуляторного фолликула и в желтом теле [Espey et al., 1980; Oakley et al., 2010]. Однако отмечено, что В-клетки и натуральные киллерные клетки (НК-клетки) в тканях фолликула обнаруживаются в низких количествах, а их концентрация

не изменяется во время овуляции [Айзикович и др., 2005]. Важная роль в женской репродуктивной системе при наступлении беременности отводится регуляторным Т-клеткам, которые отвечают за формирование толерантности к аллоантигенам плода. Показано, что во время беременности происходит значительное повышение содержания регуляторных Т-клеток [Aluvihareetal., 2004; Zenclussenetal., 2015]. На экспериментальной модели мышей (BALB/c) продемонстрировано значительное повышение содержания Т-рег в тимусе мышей с нормально протекающей беременностью, по сравнению с самками с угрозой невынашивания. Однако, их причастность к контролю над фолликулогенезом, до настоящего времени остается мало изученной.

## **1.2. Регуляторные клетки в женской репродуктивной системе и их роль в формировании толерантности**

Регуляторные -клетки - ИКК, регулирующие иммунный ответ. Данный тип клеток способен подавлять активацию, пролиферацию, а также модулировать эффекторные функции большинства ИКК, включая  $CD4^{+}$  и  $CD8^{+}$  Т-клеток, НК - клеток и натуральных киллерных Т (НКТ)- клеток, В-, а также антиген-презентирующих клеток (АПК) как *invitro*, так и *invivo* [Raffinetal., 2020]. Первыми были охарактеризованы Т-клетки в 1995г Sakaguchi как  $CD4^{+}CD25^{+}$  Т-клетки при исследовании аутоиммунных дисфункций на модели мышей. Изучение Т-рег представляет определенные сложности в связи с отсутствием специфических маркеров и гетерогенностью данной популяции клеток. В 2001г супрессорные свойства данной популяции описаны у человека. Позднее, к 2003г был описан локализованный в X-хромосоме ген Foxp3 (forkhead helix protein 3), контролирующий развитие и функционирование Т-рег [Sakaguchietal., 2010]. Ключевую роль в их дифференцировке и функционировании выполняет Foxp3, с наличием которого связана



супрессорная функция клеток [Yagi et al., 2004; Fontenot et al., 2005; Meiet al., 2010; Ohkura et al., 2013; Chakraborty et al., 2017]. Супрессия определяется способностью Foxp3 ингибировать промоторную часть генов провоспалительных цитокинов, что снижает их экспрессию [Свиридова и др., 2010]. Мутация в этом гене у человека приводит к развитию синдрома IPEX (X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии) [Vacchetta et al., 2018]. Обнаружена взаимосвязь между мутациями и снижением количества Т-рег в периферической крови, что подтверждает его необходимость для дифференцировки и/или выживаемости Т-рег [Zhenget al., 2017]. Натуральные CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т регуляторные клетки (nT-рег), свое происхождение берут из тимуса под действием сигналов от Т-клеточного рецептора (TCR). У человека nT-рег составляют около 2-10% от всех CD4<sup>+</sup> Т-клеток крови [Свиридова и др., 2010]. Наивные CD4<sup>+</sup>Foxp3 клетки могут быть преобразованы в функциональные регуляторные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> с помощью микроокружения цитокинов (IL-10, TGF-β), и называются индуцибельные Т регуляторные клетки (iT-рег). Существует два типа iT-рег, которые были описаны на основе цитокинов, отвечающих за их преобразование: TGF-β и IL-10. Оба типа iT-рег обладают супрессивными свойствами как *invitro*, так и *invivo* [Jianget al., 2011]. Механизм супрессии регуляторных Т-клеток до сих пор остаётся открытым. Выделяют несколько разновидностей данного механизма: индукция цитолиза (путем синтеза гранзима А/В или перфорины) [Grossman et al., 2004]; метаболические нарушения в клетках-мишенях; секреция цитокинов (IL-4, 10, TGF-β, IL-35) [Сорочан и др., 2009; Chaturvedi et al., 2011]. К группе iT-рег клеток помимо описанных выше, экспрессирующий корецептор CD4<sup>+</sup>, относят также еще и CD8<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки, такие как CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 [Wanget al., 2006; Zhenget al., 2009]. Однако, у человека указанные маркеры не являются строго специфичными для Т-рег и могут экспрессироваться активированными Т-клетками [Rudensky et al., 2011]. Рядом

авторов показано, что  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  клетки, не экспрессирующие  $CD25$  молекулы, также могут обладать супрессорной активностью [Yagi et al., 2004]. Кроме того, транскрипционный фактор Foxp3 может экспрессироваться не только  $CD4^{+}$ , но и  $CD8^{+}$  Т-клетками, которые во многом схожи с  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  Т-рег, и их супрессорная активность нивелируется при «выключении» FoxP3<sup>+</sup> [Chaput et al., 2007; Kuniwa et al., 2007; Vieyra-Lobato et al., 2018]. В течение последних 15 лет было показано, что подмножество В-клеток также проявляет иммунорегуляторные функции с экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 и имеют сходное название - регуляторные В-клетки [Sakkas, 2017]. Регуляторные В-клетки (В-рег) - это особые субпопуляции В-клеток с иммунорегулирующими или иммуносупрессивными свойствами, которые играют роль в периферической толерантности. В-рег подавляют иммунный ответ путем ингибирования дифференцировки дендритных клеток, подавления пролиферации хелперных клеток Th1 и Th17, индуцируя дифференцировку FoxP3 регуляторных Т-клеток (Т-рег). Различные подмножества В-рег имеют разные фенотипы и маркеры, и по-разному участвуют в иммунной модуляции. Отсутствие или потеря В-рег усугубляет тяжесть многих аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и реакцию трансплантат против хозяина). В-рег также участвуют в иммуносупрессивном эффекте опухоли и подавляют противоопухолевый иммунный процесс [Cai et al., 2019]. Данные о их роли в репродуктивной системе отсутствуют. Тогда как показано, что Т-рег присутствуют во всех органах репродуктивной системы, включая яичники и эндометриальную ткань, и их количество в периферической крови меняется в динамике менструального цикла (в фолликулярную фазу наблюдается более высокая концентрация, чем в лютеиновую фазу) [Arruvito et al., 2007; Hosseini et al., 2016]. Т-рег участвуют в формировании иммунной толерантности матери к антигенам плода [Zenclussen et al., 2010; Lee et al., 2015]. В ряде работ было показано, что физиологическая беременность

сопровождается возрастанием численности Т-рег в периферической крови [Wangetal., 2017]. Низкое содержание  $CD4^+Foxp3^+$  в эндометрии связано с неудачами имплантации и ранними потерями плода [Schlossbergeretal., 2013; Zenclussenetal., 2015; Rahimzadehetal., 2016; Jiangetal., 2017; Ahmadietal., 2019]. Т-рег наряду с важной функцией индукции и поддержания толерантности, участвуют в регуляции инвазии трофобласта и ремоделировании сосудов плаценты [Duetal., 2014]. Замечено, что низкий уровень Т-рег до оплодотворения приводит к нарушению рецептивности эндометрия, характеризующийся наличием воспаления и фиброза. Нарушения имплантации отмечается у мышей с дефицитом CCR7 (C-C chemokine receptor type 7), при котором количество Т-рег в эндометрии резко уменьшалось [Telesetal., 2013]. Возможно, CCR7 опосредует приток Т-рег от клеток тимуса к тканям эндометрия. Присутствие Т-рег в период имплантации становится ключевым моментом для создания подходящего микроокружения в момент инвазии бластоцисты [Dimovaetal., 2011]. По данным литературы обнаружено увеличение популяции Т-рег в лимфатических узлах матки, а также в ткани эндометрия уже на 2-й день беременности [Robertson etal., 2009]. Кроме того, в экспериментальной работе Zenclussen, 2015 et. al. показано, что введение Т-рег перед имплантацией способствует иммуносупрессии, предотвращая тем самым плод от иммунологического отторжения, однако более позднее введение Т-рег не оказывало данного эффекта [Zenclussenetal., 2015]. Обнаружено, что у бесплодных женщин с эндометриозом и у женщин с преэклампсией более низкая экспрессия  $Foxp3^+$  в ткани эндометрия, по сравнению со здоровыми женщинами [Jasperetal., 2006; Tanakaetal., 2017; Yuetal., 2017]. При переходе от одной фазы менструального цикла к другой фазе, а также с наступлением беременности происходят колоссальные изменения уровня гормонов. Концентрация гормонов оказывают непосредственное воздействие на уровень популяции Т-рег. Показано, что с увеличением выброса в кровь  $E_2$ к

моменту овуляции происходит увеличение популяции  $CD4^+CD25^+$  клеток и усиление экспрессии ими Foxp3. Повышенное содержание данной популяции приводит к выработке хемокинов в высокой концентрации, которые, в свою очередь, способствуют привлечению, созреванию и локальному сохранению Т-рег клеток [Kallikourdis et al., 2007; Zhou et al., 2012].

Основными цитокинами, продуцируемыми Т-рег, являются IL-10 и TGF- $\beta$  [Robertson et al., 2014]. В последние годы стало известно, что Т-рег выделяют и другие, не менее важные факторы, например IL-6 и IL-8. Недавно проведенные исследования показали, что IL-6 является ключевым цитокином, регулирующим баланс двух оппозитных популяций - FoxP3 Т-рег и Т-хелперов 17 (Th17) [Korn et al., 2008; Fujimoto et al., 2011; Lin et al., 2012; Zhu et al., 2017]. Было показано, что IL-6 ингибирует преобразование Т-клеток в FoxP3 $^+$  Т-рег и, таким образом, регулирует их супрессорную активность [Korn et al., 2008; Drescher et al., 2020]. В то же время, согласно данным Nakagawa, IL-6 может индуцировать генерацию CD8 $^+$  FoxP3 $^+$  клеток [Nakagawa et al., 2009]. Неожиданными стали публикации о способности Т-рег продуцировать хемокины, в частности С-С хемокинов (CCL3, CCL4) [Patterson et al., 2016] и IL-8 [Himmele et al., 2011; Langhans et al., 2013]. Предполагается, что при воспалительных заболеваниях Т-рег способны индуцировать продукцию хемокинов CD4 $^+$  и CD8 $^+$  клетками [Patterson et al., 2016]. CD8 $^+$ FoxP3 $^+$  клетки могут обладать как иммуносупрессорными, так и провоспалительными свойствами [Kryczek et al., 2016]. Известно, что для успешного созревания ооцита необходима положительная обратная связь секреции гормонов и локального распределения факторов роста на каждом из этапов фолликулогенеза [Kranc et al., 2017]. На основании чего высказано предположение, о том, что супрессивный эффект на модуляцию  $CD4^+CD25^+$  Т-рег способна оказывать свободная ДНК [Tang et al., 2006, Козлов, 2013].

### **1.3. Роль свободной ДНК в женской репродуктивной системе**

Свободная ДНК (свДНК) представляет собой внеклеточную форму организации ДНК, определяется в различных жидкостях организма, таких как сыворотка, плазма [Tsanq et al., 2007], моча [Hoque et al., 2006], ФЖ [Scalici et al., 2014], семенная плазма [Li et al., 2009]. Стоит отметить, наличие детектируемого уровня свДНК в культуральной среде эмбрионов [Vera-Rodriguez et al., 2018; Munakata et al., 2019]. Интерес к свДНК продиктован, прежде всего, клиническими запросами. Концентрация свДНК рассматривается в качестве прогностического и диагностического маркера при онкологических [Ulrich et al., 2018], аутоиммунных заболеваниях, а также при лучевом облучении, неврологических расстройствах и посттравматическом синдроме [Козлов, 2013]. При данных нарушениях значительно изменяется не только уровень свДНК, но и ее фракционный состав. Обнаружение в плазме коротких фрагментов нити ДНК зафиксировано при развитии онкологии, сердечно-сосудистых нарушений [Vasilyeva et al., 2001]. Более того, отмечена диагностическая значимость уровня циркулирующей свДНК в зависимости от степени тяжести травмы, что дает возможность прогнозировать риск возникновения травматического шока [Lam et al., 2003]. Впервые внеклеточные нуклеиновые кислоты были описаны Mandel et al. [Mandel et al., 1948]. Фрагменты свДНК могут присутствовать в кровотоке в результате апоптотической гибели клеток, в первую очередь клеток иммунной системы, а так же и в процессе эритропоэза и тромбопоэза [Stroun et al., 2001]. Отмечен высокий уровень свДНК при патологиях в женской репродуктивной системе (рисунок - 1).



Рисунок 1 - Схематическая модель, обобщающая значимые ассоциации между высоким уровнем свДНК в плазме крови, фолликулярной жидкости женщин и акушерско-гинекологической патологией

При осложнениях беременности (преэклампсии) наблюдается увеличение уровня свДНК. Более того ее концентрация соответствует степени тяжести заболевания [Levine et al., 2004; Šonka et al., 2017]. В исследовании Farina et al. продемонстрировано повышение уровня свДНК в материнской сыворотке у женщин с высоким риском преждевременных родов [Farina et al., 2005; Voeske et al., 2018]. За три недели до появления симптомов уровень фетальной свДНК в плазме женщин, страдающих преэклампсией, увеличивается в 2–5 раз по сравнению с женщинами со здоровой беременностью [Enninga et al., 2015]. Фетальная свДНК представляет собой участки ДНК, отделившиеся от тканей плода, в том числе и от клеток трофобласта [Litton et al., 2009]. В исследовании Lo et al., впервые было описано наличие фетальной ДНК в плазме и сыворотке беременных женщин, показана положительная связь в зависимости от срока беременности [Lo et al.,

1997]. Механизм, по которому происходит данная тенденция, остается неясным. Возможно, к этому приводит усиление пролиферативных или апоптопических процессов в связи с активным ростом плода [Токарева и др., 2006]. В настоящее время по анализу свДНК возможно определение пола, резус-фактора плода, а также определение хромосомных аномалий, начиная с 10-й недели беременности [Gekasetal., 2016]. Показано, что анализ свДНК в качестве обнаружения хромосомных патологий является весьма перспективным методом, точность определения трисомий по 13, 18 и 21 хромосомам составляет порядка 89-98% [Gil etal., 2014; Chaveeva etal., 2015]. Позже в работе Gill etal. было показано, что скрининг трисомии по 21 хромосоме путем анализа свДНК в материнской крови превосходит анализ всех других традиционных методов скрининга с более высокой точностью [Gill etal., 2015, Lambert-Messerlian etal., 2017]. Было показано, что концентрация фетальной свДНК увеличивается в циркулирующей крови с течением беременности [Enningaetal., 2015]. В первом триместре уровень фетальной свДНК в плазме колеблется от 0,022 до 0,46 нг/мл, а к родам достигает концентрации 5,08 нг/мл [Pertletal., 2001]. Возможно, к концу беременности молекулы свДНК плода в высокой концентрации в материнской плазме могут распознаваться толл-подобными рецепторами (TLR) и обрабатываться миелоидными клетками (дендритными клетками) или НК-клетками, представляя фетальный антиген лимфоцитам, которые в свою очередь активируют острую воспалительную реакцию, что в конечном итоге индуцирует начало родов [Phillippeetal., 2014].

В работе O'Neiletal. было показано, что чужеродная ДНК распознается TLR9 на иммунных клетках, которые активируют воспалительные процессы. TLR9 обнаружен в эндосоме моноклеарных клеток периферической крови, таких как моноциты, макрофаги, Т-, В- и НК-клеток [O'Neilletal., 2013]. В исследовании на мышах уровня фетальной свДНК при преждевременных родах и при преэклампсии показано, что

высокие уровни фетальной свДНК стимулировал TLR9, инициируя тем самым острое воспаление. Однако нокаутированные мыши по TLR9 данный результат не вызывали [Scharfe-Nugentetal., 2012].

TLR9 представляет собой внутриклеточный рецептор, который воспринимает ДНК, в частности гипометилированные последовательности ДНК (CpG-участки). Было показано, что гипометилированное состояние CpG динуклеотидов в составе олигонуклеотидов обуславливает иммунностимулирующий эффект последних, проявляющийся в активации экспрессии молекул МНСII и костимулирующих молекул и в стимуляции продукции IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , а также антител В-клетками [Козлов, 2013].

Другой механизм узнавания свДНК является активация STING-пути участвующий в вирусной, бактериальной и «собственной» ДНК-опосредованной стимуляции [Barberetal., 2015]. Молекулярный стимулятор интерфероновых генов (STING) - это внутриклеточный белок, локализован на мембране эндоплазматического ретикулума. Экспрессируется в гемопоэтических клетках (включая Т-клетки, макрофаги и дендритные клетки), а также в эндотелиальных и эпителиальных клетках. Активация STING пути происходит в результате связывания ДНК с циклической GMP-AMP-синтазой (сGAS) и последующей продукцией циклических динуклеотидов. Кроме того, двухцепочечная ДНК может напрямую связываться с STING [Fűrietaletal., 2015]. После активации STING участвует в синтезе IFN- $\beta$  и IFN- $\alpha$  и других провоспалительных медиаторов в зависимости от типа клеток и стимуляции [Barberetal., 2015]. Обязательным условием активации STING-пути: свДНК должна транспортироваться в цитозоль [Boeckeletal., 2018]. В целом, TLR9 и провоспалительные цитокины сверхэкспрессируются у женщин, страдающих преэклампсией, по сравнению с женщинами со здоровой беременностью [Dabagh-Gorjanietal., 2014]. У женщин, страдающих от *Hyperemesis gravidarum* (неукротимой рвоты



беременных), было установлено, что уровни фетальной свДНК в 2,5 раза выше, чем у здоровых беременных, что предположительно связано с повышенной активацией материнской иммунной системы. Ее активация обусловлена повышенным уровнем цитотоксических Т-клеток и НК-клеток в децидуальной ткани и крови матери [Enningaetal., 2015].

Высокий уровень свДНК также ассоциирован с нарушениями овариального резерва (поликистозные яичники, низкий овариальный резерв), длительное бесплодие (>5 лет), при длинном (>10 дней) или высокодозном протоколе стимуляции суперовуляции ( $\geq 3000$  ME), небольшое количество получаемых ооцитов (<6) в процессе трансвагинальной пункции [Dimoroulou etal., 2014; Traver etal., 2015]. Наличие свДНК в ФЖ связано с апоптозом и некрозом клеток, окружающих растущий ооцит по мере интенсивного роста фолликула [Guanetal., 2017]. Обнаружено, что уровень свДНК в ФЖ сопряжен с размерами фолликулов [Traver etal., 2015], низким качеством ооцитов [Dimoroulou etal., 2014; Scalici etal., 2014; Traver etal., 2015], низким качеством эмбрионов [Scalici etal., 2014; Khan etal., 2019]. А также уровень свДНК был выше у женщин в ФЖ с негативным исходом цикла ЭКО [Al-Salehetal., 2010; Guanetal., 2017]. Отмечено, что концентрация свДНК в крови была значительно выше среди женщин, с отрицательным исходом цикла, по сравнению с теми, у кого беременность наступила [Traver etal., 2015]. В исследовании Rule etal. было обнаружено наличие свДНК в бластоцеле 5-суточных эмбрионов [Rule etal., 2018]. В связи с чем, свДНК является ранним фактором определения нарушений в организме, и, как следствие, может являться незаменимым маркером качества ооцитов в циклах ЭКО. Более того, свДНК при взаимодействии с паттерн - распознающими рецепторами, такими как Toll-подобные (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR) оказывают влияние на активацию врожденного иммунного ответа, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов [Cherepanovaetal., 2013].

## 1.4. Современные представления о влиянии цитокинов на этапы фолликулогенеза

### *Первый этап - рост примордиальных фолликулов*

Примордиальные фолликулы образуются в процессе митоза оогоний, поступивших в наружный корковый слой мезенхимной ткани половых валиков девочки на 6-й неделе беременности матери [Корсак, 2011]. Процесс развития и дифференцировки приводит к ряду изменений, и уже к 3-му месяцу эмбрионального развития примордиальный фолликул состоит из ооцита первого порядка (профаза мейоза I), окруженного клетками гранулезы. Развитие примордиального пула характеризуется взаимобусловленным влиянием цитокинов и ростовых факторов между ооцитом и окружающими клетками. Для клеток гранулезы характерно активное деление, на их поверхности имеются рецепторы к гормонам: фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) и ЛГ, а также к факторам роста: эпидермальному фактору роста (EGF), фактору роста фибробластов-2 (FGF-2), антимюллерову гормону (АМГ), функционирование которых зависит от стадии развития фолликула. Известно, что стадия роста примордиального фолликула гормононезависима [Skinneretal., 2005]. Клетки гранулезы на данном этапе способны синтезировать: фактор роста стволовых клеток (SCF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), лейкоингибирующий фактор (LIF) [Nóbregaetal., 2012], BMP-15 [Knight PG, 2003; Pasqualeetal., 2004; Castroetal., 2016]. Стоит отметить, что АМГ, вырабатываемый клетками гранулезы растущих фолликулов, блокирует выход примордиального фолликула из покоящегося пула, а также является антагонистом BMP-15 [Nilssonetal., 2007]. Одним из начальных событий перехода примордиального фолликула к преантральному является изменение клеток гранулезы от плоскоклеточной к кубоидальной морфологии [Lintern-Moore etal., 1979]. А также рекрутирование тека-клеток из популяции стромально-

интерстициальных, и их последующая пролиферация совместно с клетками гранулезы. [Skinneretal., 2005].

### *Второй этап - развитие преантральных фолликулов*

Процесс созревания фолликулов от стадии примордиального до преантрального фолликула активируется в период полового созревания девочек, что в свою очередь приводит к выходу ооцита из первого блока мейоза [Корсак, 2011]. В это время ооцит увеличивается и окружает себя *zona pellucida* [Pastoretal., 2008]. Клетки гранулезы начинают активно делиться, образуется слой теки из окружающей стромы. Клетки гранулезы способны синтезировать стероиды, при этом эстрогенов синтезируется гораздо больше, чем андрогенов и прогестерона [Dewaillyetal., 2016]. В этот период осуществляется рост и созревание фолликулов, за который отвечают локально вырабатываемые ростовые факторы и цитокины [Knight etal., 2003]. Затем подключаются ИИК, в частности макрофаги теки, синтезирующие IL-1 $\beta$ , IL-6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), которые оказывают стимулирующее действие на клеточную пролиферацию и ингибируют апоптоз клеток теки и гранулезы [Wuetal., 2004]. В этот период происходит рост нескольких фолликулов, которые в дальнейшем подвергаются отбору.

### *Третий этап - селекция антральных фолликулов*

Антральный фолликул состоит из нескольких слоев кубических клеток гранулезы, между которыми образуются лакуны, формируются слои и клетки *theca interna*, и *theca externa* [Youngetal., 2010]. Происходит накопление жидкости в щелях между гранулезными клетками, и в последующем образуется полость - *antrum* с ФЖ. Образование ФЖ происходит из общего кровотока, а также из компонентов, выделяемых соматическими клетками внутри фолликула, содержит множество молекул, включая стероиды, белок,

гормоны, антикоагулянты, ферменты и электролиты. ФЖ омывает ооцит по мере его развития и обеспечивает связь с окружающими клетками [Hennetetal., 2012]. Формирование пула антральных фолликулов осуществляется благодаря действию ФСГ. В этот период происходит отбор, в результате которого (в естественном цикле) остается единственный доминирующий фолликул с ооцитом на стадии герминативного пузырька (GV) [Gaafaretal., 2014]. Затем, уровень ФСГ в естественном цикле снижается, оставшиеся антральные фолликулы переходят в атрезию [Irving-Rodgers etal., 2001]. Созревание антрального фолликула усиливает синтез фактора роста и дифференциации-9 (GDF-9), BMP-15 - ооцитами; BMP-4, TGF- $\beta$  - клетками гранулезы; BMP-7, TGF- $\beta$  - клетками теки. Активация митоза клеток гранулезы, способствует усилению процессов ангиогенеза, и как следствие, активному росту фолликула. На данном этапе очень важно действие семейства ростовых факторов FGF и EGF участвующие в активном паракринном взаимодействии между ооцитом и клетками гранулезы [Chavesetal., 2012; Rimon-Daharietal., 2016]. Стоит отметить, что FGF опосредует переход предшественников эстрогенов в E<sub>2</sub>, подавляя при этом стимулирующее действие ФСГ [Mishraetal., 2016]. Важное значение для роста преовуляторных фолликулов имеет SCF, опосредующий взаимодействие между клетками теки и гранулезы, а также активирующий созревание ядра ооцита и стероидогенез [Gizzoetal., 2016]. В период селекции антральных фолликулов важную роль играют провоспалительные цитокины и факторы, такие как: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8. В свою очередь, TNF- $\alpha$ , взаимодействуя с IGF клеток гранулезы, инициируют ее пролиферацию [Wangetal., 2006]. Синтез IL-6 описан в клетках гранулезы, теки, в фолликуле и желтом теле. Данные цитокины участвуют в процессе созревания фолликулов [Runessonetal., 1996; Maliziaetal., 2010; Altunetal., 2011]. Размер фолликула, обусловлен быстрым накоплением ФЖ и увеличением клеток гранулезы, что приводит к процессу овуляции.

#### *Четвертый этап — овуляция*

Размер преовуляторного фолликула составляет 20-25 мм, представляет собой систему функционально связанных друг с другом элементов: ооцита, клеток гранулезы, теки, ФЖ и капилляров фолликула. Между овуляторным пиком ЛГ и овуляцией проходит около 36 - 48 часов. Преовуляторный подъем в крови уровня ЛГ является мощным стимулом, вызывающий завершение созревания ооцита (возобновление мейоза). Механизм овуляции является высокоскоординированным процессом разрыва стенки фолликула и выброса из него ооцита. В момент овуляции осуществляется активное ремоделирование внеклеточного матрикса, формирование бессосудистой области в месте будущего разрыва [Zackrissonetal., 2011]. Данный процесс схож с воспалительной реакцией, для которой характерен приток лейкоцитов [Oakleyetal., 2010; Bootsetal., 2015], секретирующих хемоаттрактанты, цитокины и вазоактивные факторы [Fieldetal., 2014]. Макрофаги принимают участие в фагоцитозе атретических клеток гранулезы, секреции матричных металлопротеиназ, опосредующие ремоделирование внеклеточного матрикса [Wuetal., 2004]. Стимулирует активацию и пролиферацию макрофагов - макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) [Adashi, 2013]. Индуцирующее действие на M-CSF оказывает TNF- $\alpha$ , принимающий активное участие в овуляции, усиливая продукцию хемокинов (MCP-1), а также запуская процесс апоптоза атретических клеток гранулезы [Kawanoetal., 2004]. Макрофаги продуцируют ряд провоспалительных цитокинов и факторов, в том числе TNF- $\alpha$ , IL-1, GM-CSF, *фактор*, регулирующий активацию нормальной Т-клеточной экспрессии (RANTES) и др. Экспрессия RANTES предполагается один из ключевых механизмов в воспалительном процессе, выступая посредником активации Т-клеток и хемоаттрактант для эозинофилов и тучных клеток [Wuetal., 2004]. После

завершения овуляции, из лопнувшего фолликула образуется желтое тело, отвечающее за синтез прогестерона.

### *Связь уровня цитокинов и наступления беременности*

Имплантация является ключевым этапом в наступлении беременности, и зависит от синхронизированных изменений между эндометрием и бластоцистой. Сигналы от эндометрия, первоначально участвуют в прикреплении бластоцисты к эпителию эндометрия, а затем в пролиферации и дифференцировке трофобласта с образованием плаценты [Modi et al., 2012]. После хетчинга бластоцисты, трофэктодермальные клетки становятся восприимчивыми к иммуноактивным факторам эпителия матки [Suman et al., 2013]. Восприимчивость определяется рядом факторов, таких как IGF-I, -II; факторов роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), факторов семейства трансформирующего фактора роста (TGF). Под действием данных факторов опосредуется качественный и количественный состав субпопуляций лейкоцитов, обуславливающих иммуносупрессию и восприимчивость эндометрия к клеткам трофэктодермы эмбриона [Крылова и др., 2013]. На этом этапе начинается перекрестная передача сигналов трофобласт - эндометрий, приводящая к прикреплению бластоцисты. Адгезия бластоцисты запускает дифференцировку трофобластов во внешний синцитиотрофобласт и внутренний цитотрофобласт [Suman et al., 2013]. Синцитиотрофобласт продуцирует несколько литических ферментов, которые разрушают внеклеточный матрикс и секретирует факторы, запускающие апоптоз эпителиальных клеток эндометрия в результате чего происходит внедрение бластоцисты. Инвазивные клетки трофобласта в конечном итоге достигают материнских спиральных артерий и замещают существующий эндотелиальный слой, формируя эндоваскулярный трофобласт [Soares et al., 2012]. LIF, интерлейкины IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, фактор роста

гепатоцитов (HGF), IGF, EGF, цитокины суперсемейства TGF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и др. являются основными факторами, присутствующими в период имплантации, обуславливая наступление беременности [Knöfler et al., 2010]. В настоящее время вопрос возможного влияния цитокинов, содержащихся в ФЖ, на наступление беременности в циклах ЭКО активно обсуждается. Но, стоит отметить, что имеющиеся данные о положительном или отрицательном влиянии некоторых цитокинов на получаемое при пункции количество ооцитов стадии МП, вероятность оплодотворения, наступление беременности различаются (таблица 1). Одним из наиболее исследованным цитокином, ассоциированным с ранним эмбриогенезом является представитель IL-6 семейства - LIF. Его уровень ассоциирован с процессом овуляции, продукцией эстрогена и прогестерона, с регуляцией роста и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток. [Aghajanova, 2004; Salleh et al., 2014; Winship et al., 2015; Devjak et al., 2016]. В экспериментальной работе Winship A. продемонстрировано, что нокаутные мыши по LIF были бесплодны [Winship et al., 2015]. Стоит отметить, связь колебаний уровня цитокинов TGF- $\beta$  семейства со всеми периодами фолликулогенеза, в том числе, замечено положительное влияние высокого уровня TGF- $\beta$  на качество ооцитов и эмбрионов. Данный цитокин участвует в имплантации, регулируя рецептивность эндометрия, а также предотвращает чрезмерную инвазию трофобласта [Wei et al., 2004]. Содержание TGF- $\beta$ 1 в ФЖ позитивно коррелирует с процентом оплодотворения и беременностью в цикле ЭКО [Field et al., 2014]. Схожей структурой обладает фактор BMP-15. Его повышенное содержание позитивно коррелировало с уровнем E<sub>2</sub> в ФЖ [Revell et al., 2009]. Высокий процент оплодотворения, скорость последующего дробления и, соответственно, высокое качество эмбрионов ассоциировано с повышенными уровнями BMP-15 и GDF-9 в ФЖ [Gode et al., 2011; Wu et al., 2012].

Для полноценного роста и развития ооцитов необходимы ростовые факторы, такие как инсулиноподобные факторы роста (IGF) и IGF-связывающие белки (IGFBP). При изучении уровня IGF-1 и IGF-2 в эпителии матки и экстрацеллюлярном матриксе во время имплантации на стадии инвазии трофобласта было показано, что IGF-1 экспрессировался в строме и железистом эпителии, участвуя в процессе адгезии бластоцисты, тогда как IGF-2 - в базальном слое на латеральных плазматических мембранах [Крылова и др., 2013]. Уровень IGF-2, IGFBP-3 и IGFBP-4 в ФЖ положительно связаны с количеством оплодотворенных ооцитов и последующим дроблением и развитием эмбриона [Wangetal., 2006; Cunha-Filhoetal., 2003]. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) продуцируется клетками гранулезы зрелых фолликулов, а также клетками трофобласта, влияя на децидуальные макрофаги. Ассоциируется с более высоким процентом оплодотворения и наступления беременности [Gaafaretal., 2014]. В работе Gleicheretal. было показано, что уровень G-CSF в ФЖ определяет успех ЭКО в естественном цикле [Gleicheretal., 2011]. С момента первого дробления эмбрион экспрессирует рецептор к гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (GM-CSF) [Moldenhaueretal., 2010]. Он оказывает влияние на функции гранулоцитов и моноцитов, проявляет антиапоптотический эффект, опосредует иммунные реакции в момент имплантации. Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) регулирует процесс стероидогенеза, усиливает влияние гонадотропина на клетки гранулезы [Mettieretal., 2004]

Умеренный уровень провоспалительных цитокинов в ФЖ необходим для усиления пролиферации клеток гранулезы, стимуляции апоптоза и атрезии фолликулов [Sarapiketal., 2012]. Однако, повышенное содержание таких цитокинов как: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 может оказывать негативное влияние на процесс раннего эмбриогенеза [Southcombeetal., 2013]. В работе Gaafaretal. показана связь уровня TNF- $\alpha$  с меньшим процентом



оплодотворенных ооцитов в цикле ЭКО [Gaafaretal., 2014]. Подтверждения этому служат экспериментальные исследования Sotoetal. показывающие, что повышенный уровень содержания TNF- $\alpha$  в ФЖ приводит к меньшему количеству МП и увеличению частоты хромосомных аномалий [Sotoetal., 2003]. Другой цитокин - IL-2 стимулирует секрецию IL-6 и TNF- $\alpha$ , вместе с IL-6 индуцирует созревание фолликулов, опосредует созревании желтого тела. В исследовании AltunT. было продемонстрировано, что концентрация IL-6 в ФЖ зрелых фолликулов значительно выше, чем в ФЖ незрелых фолликулов. Но высокий уровень IL-6 ассоциировался с неблагоприятным влиянием на качество ооцитов и эмбрионов, связан с отрицательным исходом ЭКО, а также с развитием синдрома гиперстимуляции яичников [Altunetal., 2011]. Показано, что IL-2 оказывает супрессорное действие на ХГЧ-стимулированную продукцию прогестерона клетками гранулезы, что в свою очередь негативно влияет на имплантацию эмбриона [Mendozaetal., 2002]. Развитие СГЯ также ассоциировано с повышенным содержанием IL-17 в ФЖ [Sabbaghietal., 2014]. При неудачных исходах ЭКО было более высокое содержание уровня IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  и RANTES в ФЖ, чем у пациенток с позитивным исходом и наступлением последующей беременности [Mendozaetal., 2002; Мотовилова и др., 2012]. В подтверждение этому служат данные, получены при исследовании содержания IL-4 и IL-12 в ФЖ, высокие значения которых связаны с более низким процентом оплодотворения, меньшем количестве зрелых ооцитов, низким качеством эмбрионов и неудачами ЭКО протокола [Вартанян и др., 2011; Sarapiketal., 2012; Malhotraetal., 2013]. Высокий уровень IFN- $\gamma$  участвует в ингибировании процесса овуляции, а также ассоциирован с ранними потерями беременности [Sarapiketal., 2012].

По данным одних авторов замечено позитивное влияние IL-8 на процесс созревания ооцитов [Sarapiketal., 2012]. Отмечается положительная ассоциация высокого уровня IL-8 с эмбрионами лучшего качества и

наступлением беременности [Huangetal., 2017]. Однако исследования Gazvanietal. не находят данной связи [Gazvanietal., 2000]. Обнаружена прямая корреляция уровня IL-8 с размером фолликула [Maliziaetal., 2010]. Его повышенная концентрация ассоциирована с большим количеством ооцитов [Вартанян и др., 2011; Sarapiketal., 2012] и синдромом гиперстимуляции яичников (СГЯ) [Daraï etal., 2003; Gutmanetal., 2004; Chenetal., 2010]. Уровень IL-8 в сыворотке крови женщин с отрицательным исходом был значительно выше, чем у женщин с наступившей беременностью [Xie etal., 2018]. В работе Günther предложено рассматривать IL-18 как позитивный прогностический маркер эффективности ЭКО [Güntheretal., 2016]. Другие исследователи ассоциируют высокую концентрацию IL-8 и IL-18 с идиопатическим бесплодием и неудачами цикла ЭКО [Вартанян и др., 2011; Sarapiketal., 2012; Malhotraetal., 2013]. Развитие СГЯ было связано с высоким содержанием VEGF в ФЖ. Повышенная концентрация VEGF в ФЖ отмечалась с низким процентом оплодотворения и преждевременной лютеинизацией [Chenetal., 2010; Savchevetal., 2010; Kudsyetal., 2016]. В исследовании Monteleoneetal. зафиксирована противоположная связь – ооциты, полученные из фолликулов с большим содержанием VEGF показали более высокий процент оплодотворения, эмбрионы лучшего качества и более высокую частоту наступления беременности [Monteleoneetal., 2008] (таблица 1).

Таблица 1- Ключевые иммуноактивные факторы фолликулярной жидкости как предикторы исхода цикла ЭКО

	Факторы, цитокины	Клетки продуценты	- Функции	Ссылки
Положительное влияние	LIF-	Клетки стормы	Влияет на количество и качество ооцитов и эмбрионов, коррелирует с уровнем E <sub>2</sub> и прогестерона в ФЖ.	Winship et al., 2015 Devjak et al., 2016
	GDF-9, BMP-15	Ооцит, клетки гранулезы	Улучшают показателями оплодотворения, дробления	Pasquale et al., 2004 Gode et al., 2011 Otsuka et al., 2011
	IGF-I,II	Клетки трофобласта	Позитивно влияют на ооциты, их последующее дробление и развитие эмбриона; уровни IGF-I и IGFBP-1 в ФЖ положительно коррелируют с качеством и зрелостью ооцитов	Wang et al., 2006 Robertson et al., 2014
	G-CSF M-CSF GM-CSF	Макрофаги теки, нейтрофилы	Участвуют в процессе овуляции, влияют на положительный исход цикла ЭКО	Adashi et al., 2013 Gaafar et al., 2014
Отрицательное влияние	IL-1 $\beta$	ИКК, клетки гранулезы, теки	содержание IL-1 $\beta$ в ФЖ выше у пациенток с отрицательным исходом ЭКО.	Mendoza et al., 2002 Мотовилова et al., 2012
	IL- 2, IL- 4, IL-12 TNF- $\alpha$ IL-6	T-клетки, НК	Негативно влияют на качество ооцитов и эмбрионов; коррелируют с отрицательным исходом ЭКО; Высокий уровень в (ФЖ) женщин, включенных в программу (ЭКО), негативно сказывается на качестве эмбрионов и исходах.	Mendoza et al., 2002 Wang et al., 2006 Malhotra et al., 2013 Altun et al., 2011 Hammadeh et al., 2005.
	ИФН-5	T-клетки, НК	Негативно влияет на оплодотворение; ингибирует овуляцию; вызывает ранние потери беременности	Sarapik et al., 2012
Противоположные данные литературы	IL- 8	макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки	Высокий уровень ассоциирован с высоким качеством эмбрионов и наступлением беременности как в ФЖ, так и в культуральной среде. Однако ряд других авторов не находят данной связи	Singh et al., 2016 Huang et al., 2017 Gazvani et al., 2000

Таблица 1(продолжение)- Ключевые иммуноактивные факторы фолликулярной жидкости как предикторы исхода цикла ЭКО

	Факторы, цитокины	Клетки - продуценты	Функции	Ссылки
Противоположные данные литературы	IL-18	Клетки гранулезы, теки	Положительно коррелируют с количеством ооцитов; ассоциированы с развитиемСГЯ.	Gutman et al., 2004 Runesson et al., 2006 Вартанян и др., 2011 Sarapiketal., 2012 Günther et al., 2016
	VEGF	клетками теки, гранулезы	Высокий уровень VEGF связан с положительными исходами ЭКО; высоким качеством ооцитов, эмбрионов. Содержание VEGF в ФЖ значительно ниже в группе беременных	Monteleone et al., 2008 Chen et al., 2010 Kudsy etal., 2016

Высокий уровень IL-6 в ФЖ женщин, включенных в программу ЭКО, негативно сказывается на созревании фолликулов и ооцитов, качестве эмбрионов и исходах программы [Amatoetal., 2003]. В то время как IL-8 коррелирует с количеством ооцитов и ассоциирован с развитием синдрома гиперстимуляции яичников [Sarapiketal., 2012]. Показано, что IL-8 в клетках-мишенях индуцирует ряд физиологических реакций: вызывает перестройку цитоскелета, увеличивает концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , активирует экзоцитоз гранулярных белков [Palominoetal., 2015]. Что в свою очередь, приводит к отделению от клеточной мембраны микровезикул, которые участвуют в межклеточной коммуникации [Гомзикова и др., 2013].

### 1.5. Микровезикулы и их роль в репродуктивной системе женщин

Везикулы, представляют собой структуры различного размера, отделяющиеся от цитоплазматической мембраны клеток, окруженные фосфолипидным бислоем. Везикулы содержат компоненты цитоплазмы (ферменты, факторы транскрипции, нуклеиновые кислоты и др.)

[Lawsonetal., 2016]. Долгое время считали, что внутриклеточные везикулы – всего лишь остатки жизнедеятельности клеток, однако более глубокое их изучение выявило существенную функцию в многочисленных физиологических и патологических процессах организма [Stahl etal., 2018]. Образование внутриклеточных везикул осуществляется как *invivo*, так и *invitro*, что является частью физиологии. Но, стоит отметить, что при клеточной активации, в результате стресса или апоптоза продуцируются существенно в больших количествах [Saginetal., 2018]. Выделяют несколько классов везикул: экзосомы, апоптозные тельца и микровезикулы (МВ), отличающиеся по размерам и происхождению. Экзосомы – самые мелкие частицы (30 – 100 нм), образуются при эндоцитозе поздних эндосом. Экзосомы высвобождаются во внеклеточную среду путем почкования в эндосому. Образуются преимущественно клетками иммунной системы – Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами [Raposoetal., 2013]. Экзосомы ассоциированы с трансмембранными липидсвязывающими белками тетраспанинами, интегринами, молекулами адгезии (СAM), рецепторами факторов роста и лактадхерином (MFGE8), несут белки теплового шока (Hsp), маркеры CD63, CD81, CD82, CD9, а также ассоциированный с лизосомой мембранный белок – 1 (LAMP1) [Пупышев, 2015]. Самыми крупными везикулами являются апоптопические тельца – диаметр частиц колеблется от 1 до 5 мкм, обогащены поверхностным фосфатидилсерином.

Микровезикулы (МВ) диаметром до 1000нм обнаружены практически во всех биологических жидкостях, атеросклеротических бляшках. МВ обогащены фосфатидилсерином, тканевыми факторами и клеточно-специфичными маркерами. Высвобождаются из плазматической мембраны путем непосредственного почкования в ответ на клеточную активацию или стресс [Todorovaetal., 2017]. Состав и расположение фосфолипидов на липидном бислое очень специфично: во внешнем слое мембраны

располагается фосфатидилхолин и сфингомиелин, в то время как на внутренней стороне - фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин. Данная асимметрия необходима и высокоспецифична, осуществляется и поддерживается благодаря концентрационным градиентам и активным АТФ-зависимым процессам [Seigneuret et al., 1984]. В ходе клеточной активации, а также в процессе гибели клеток (апоптоза или некроза) происходит потеря фосфолипидной асимметрии, что характеризуется перемещением фосфотидилсерина на внешнюю мембрану клетки [Rosing et al., 1988]. Миграция фосфотидилсерина на внешний липидный бислой сигнализирует макрофагам о необходимости удаления погибших клеток или фрагментов клеток [Schroit et al., 1984]. В осуществлении фосфолипидной асимметрии на поверхности липидного бислоя, а также в образовании МВ, ключевая роль отводится следующим ферментам: флоппаза, флиппаза, кальпаин и скрамблаза (рисунок - 2).

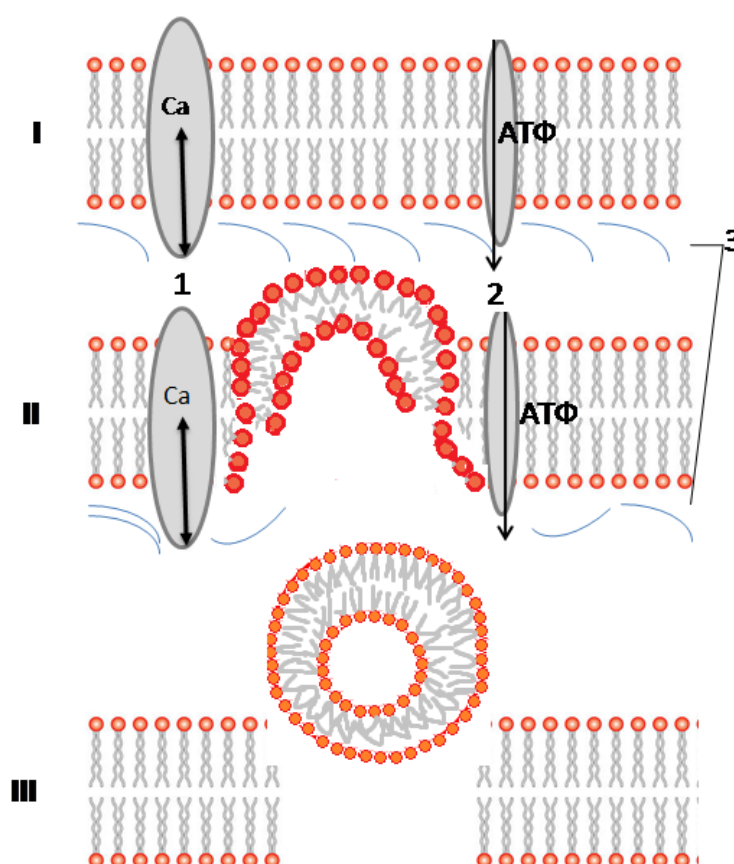


Рисунок 2 - Этапы образования микровезикул: I – высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме активирует: кальпаин (расщепляющий нити актина), скрамблазу (1), но инактивирует флиппазу (2); II - Разрушение цитоскелета (3), что приводит к отделению микровезикул (III).

Данные ферменты отвечают за устойчивое асимметричное положение липидного бислоя. При возрастании цитоплазматического уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , начинается перемещение фосфотидилсерина на наружную поверхность мембраны [Schroit et al., 1996]. Флиппаза относится к АТФ-зависимым ферментам, переносит фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин из наружного слоя - на внутренний [Hankinset al., 2015]. Активность флиппазы подавляется повышенной концентрацией цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Одновременно с данным процессом работает флоппаза, осуществляя перенос

липидов из внутреннего слоя во внешний слой клеточной мембраны. При этом скрамблаза регулирует перемещение липидов между слоями липидного бислоя [Montignyetal., 2016]. Стоит отметить, что высокий уровень  $\text{Ca}^{2+}$  ингибирует активность флиппазы, но стимулирует работу скрамблазы, способствуя потере асимметрии и миграции фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны. Данный механизм также активирует кальпаин, который участвует в разрушении филаментов цитоскелета, высвобождая МВ. Описанная модель образования МВ находится на стадии обсуждения. Однако, стоит отметить, что МВ способны образовываться и при других условиях. Согласно данным литературы часть циркулирующих МВ происходит в результате потери целостности мембраны или механического разрушения клеток после повреждения, что чаще всего происходит в результате некротических процессов в клетках. Большая часть белкового состава приходится на цитоплазматические и мембранные белки, среди которых преобладают белки сигнальных путей, цитоскелета, кавеолинзависимого эндоцитоза, белки острой фазы воспаления и интегрины [Gyorgyetal., 2011; Rukoyatkina et al., 2009]. В своем составе способны содержать: микроРНК, факторы адгезии клеток, молекулы липидов, жирных кислот, антигены классов МНСI и МНСII и др. [Raposo et al., 1996; Dignat-George et al., 2011; Кореньковидр., 2014; Pomatto et al., 2018]. Важным фактом является то, что в МВ и экзосомах содержатся мРНК и некодирующая микоРНК (цепочки от 17-24 нуклеотидов), мРНК способна транслироваться в белок в клетках-мишенях [Zhang et al., 2015]. Описано широкое разнообразие функций, выполняемых МВ: иммуносупрессивная, воспалительная, презентация антигена, рост опухоли, метастазирование и ангиогенез, клеточная адгезия [Tkachetal., 2016]. Считается, что выход МВ – это контролируемый процесс, вызванный различными стимулами, такими как стресс, комплементарная атака, проапоптотическая стимуляция или повреждение клеток [Rubin et al., 2010]. Достаточно долго полагали, что МВ



являются лишь второстепенными продуктами жизнедеятельности клеток и не несут функциональной активности. На данный момент, МВ приравнивают к клеточным эффекторам, вовлеченными в многочисленные процессы организма [Distler et al., 2005] и содержатся в различных его жидкостях [Lawson et al., 2016; Tkach et al., 2016]. Продуцировать МВ могут все типы клеток: лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные и эпителиальные клетки. Микровезикулы, содержащиеся в клетках крови, обладают различным патофизиологическим влиянием на иммунный ответ, процессы гемокоагуляции и воспаления [Pan et al., 2018]. Провоспалительное действие опосредовано биогенными липидами, цитокинами, мембрано-ассоциированными рецепторами и иммунными комплексами. Микровезикулы моноцитарного происхождения активируют NF- $\kappa$ B, синтез IL-8 и Моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1) в эндотелиальных клетках; противовоспалительное – МВ нейтрофильного происхождения, обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, участвуют в ограничении экссудативной стадии воспаления (усиливают секрецию TGF- $\beta$  макрофагами) [Lee et al., 2014]. Стоит отметить, что МВ принимают участие в запуске путей сигнализации при контакте с клеточными рецепторами и регуляция экспрессии генов через мРНК, но остается неясен механизм действия. В ряде исследований обнаружено, что МВ могут нести на себе молекулы-морфогены, такие как Wnt, отвечающие за дифференциацию клеток в процессе раннего развития [Grosset al., 2012]. Наиболее интересным представляется возможное участие МВ в регуляции иммунного ответа путем взаимообмена сигналами между клетками, вплоть до антиген-презентирования [Hwang et al., 2013]. Показано, что МВ, перенося на своей поверхности рецепторы, при слиянии с клеткой-мишенью, индуцируют активацию киназных каскадов, стимулируют экспрессию металлопротеиназ матрикса и сосудистого эндотелиального фактора роста

(EGF), подавляют апоптоз, вызывают хемотаксис и способствуют распространению метастазов [Zmigrodzkaetal., 2016].

В настоящее время МВ нашли применение в качестве диагностики многих заболеваний (оценка тромботических рисков, оценка реакции «трансплантат против хозяина») [Pihuschetal., 2006; Nomuraetal., 2015], а также при таргетной иммунотерапии при онко- и аутоиммунных заболеваниях [Akyureklietal., 2015; Oyeretal., 2015].

Показано, что МВ выполняют ряд функций в женской репродуктивной системе. Эмбриональные клетки также вырабатывают МВ, опосредуя поведение трофобласта во время имплантации [Red-Horse etal., 2004; Faderetal., 2008]. Было показано, что белки МВ, такие как, ламинин и фибронектин, взаимодействуют с интегринами вдоль поверхностей трофобласта, активируя две сигнальные киназы: киназу, фосфорилирующую белок (JNK) и фокальную адгезионную киназу (FAK), стимулируя инвазию трофобласта [Almeidaetal., 2000]. Также МВ синцитиотрофобласта, при нормальной беременности, взаимодействуют с моноцитами, гранулоцитами, Т-клетками и натуральными киллерами, оказывая влияние на их активность [Mincheva-Nilsson etal., 2014; Göhneretal., 2017]. В работе Desrochers etal. обнаружено, что введение МВ, выделенных из эмбриональных клеток бластоцисты, приводило к увеличению эффективности имплантации [Desrochersetal., 2016]. Во время беременности МВ обеспечивают специфическую иммуносупрессию. Так, циркулирующие МВ материнского и плацентарного происхождения усиливают реакции воспаления при преэклампсии [Gilanietal., 2016]. Зафиксировано, что при преэклампсии наблюдается увеличение уровня МВ плацентарного происхождения, причем отмечается корреляция уровня МВ в периферической крови женщин с систолическим артериальным давлением [Tongetal., 2015]. Характерный иммуносупрессивный эффект МВ оказывают также и в амниотической жидкости [Tannettaetal., 2014].

Известно, что МВ несут белковые маркеры и генетическую информацию, с помощью чего участвуют в межклеточной коммуникации. Впервые МВ в ФЖ были обнаружены на модели лошадей [Silveira et al., 2012], в ходе исследования была выделена микроРНК, идентичная соматическим клеткам (гранулезным и кумулюсным). А также в работе Silveira et al. обнаружено значительное повышение уровня МВ в ФЖ в зависимости от возраста кобыл и качества ооцитов [Silveira et al., 2012]. Аналогичные результаты получены при исследовании бычьей ФЖ, обнаружено, что МВ связанные с микроРНК, могут играть роль в регуляции фолликулогенеза [Andronico et al., 2019]. В исследованиях Diez-Fraile et al. и Sang et al. подтверждено наличие в МВ микроРНК у женщин в ФЖ [Sang et al., 2013; Diez-Fraile et al., 2014]. Содержащиеся в ФЖ МВ могут включать в себя микроРНК с потенциальной ролью участия в фолликулярном росте, возобновления мейоза ооцитов, стероидогенеза и профилактики полиспермии после оплодотворения [Santonocito et al., 2014; Andronico et al., 2019]. Обнаружено, что микроРНК-132 -320, -520C-3p, 24 и -222 регулируют концентрацию  $E_2$ , а микроРНК-24 -193b -483-5b - концентрацию прогестерона. Более того, микроРНК 132 и 320 имеет более низкую концентрацию в ФЖ у пациентов с поликистозными яичниками, чем без патологии [Sanget al., 2013].

В исследовании Machtinger et al. МВ были обнаружены в культуральной среде эмбрионов [Machtinger et al., 2016]. В другой работе Kurian et al. было продемонстрировано, что эмбриональные МВ поглощаются клетками эндометрия, что опосредует диалог между эндометрием и эмбрионом [Kurian et al., 2018]. Анализ культуральной среды может использоваться для оценки качества эмбрионов, что представляет собой инновационный неинвазивный метод оценки компетентности эмбрионов [Andronico et al., 2019]. Недавно было продемонстрировано, что эмбрионы способны секретировать МВ не только в культуральную среду (in vitro) или в

эндометрий (*in vivo*), но и внутри бластоцисты - в бластоцель [Battaglia et al., 2019].

Одна из доминирующих групп конститутивных белков в МВ – аннексины (Ann), особенно распространены AnnII и V [Hena et al., 2017]. Показано, что AnnV входит в состав липидного бислоя, опосредуя активность  $\text{Ca}^{2+}$  селективных каналов [Arispe et al., 1996]. Было описано, что AnnV участвует в многочисленных мембранно-связанных процессах (например, экзо- и эндоцитоз, перенос везикул, агрегация мембран, слияние и восстановление клеточной мембраны) [Bouter et al., 2015]. Источником внеклеточного AnnV являются апоптотические и разрушенные клетки. Одним из ранних признаков апоптоза служит наличие на клеточной мембране фосфатидилсерина. Этот процесс является неотъемлемой частью апоптоза, независимо от типа клеток и пускового механизма активации программы клеточной гибели [Simak et al., 2002]. Показано, что AnnI и AnnV важны для последовательных этапов слияния миобластов [Leikina et al., 2013]. Кроме того, следует отметить, что AnnV участвует в процессе инвазии клеток трофобласта в ткань эндометрия [Carmeille et al., 2015]. Другой антиген, опосредованно участвующий в процессе апоптоза - трансмембранная тирозинфосфатаза (CD45), также является общим лейкоцитарным маркером, экспрессируется на всех кроветворных клетках и присутствует в высоких концентрациях на МВ [Mercier et al., 2013]. Данный маркер передает сигнал внутрь клетки с Т и В-клеточного рецепторов [Tian et al., 2017]. Регулирует различные клеточные процессы, включая рост клеток, дифференцировку, митоз и онкогенную трансформацию [GeneCard database]. Регуляция апоптоза сложна и зависит от сигналов активации и выживания. При активации клеток - натуральных киллеров (НК-клеток), запускается синтез протеолитических ферментов, в результате экспрессируется маркер CD107a, характеризующий цитотоксический потенциал НК и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток [Alter et al., 2004]. НК-клетки участвуют в

процессе имплантации, защищая от инфекции и одновременно предотвращая отторжение полуаллогенного плода [Yougbaré et al., 2017]. Механизм их активации до сих пор не ясен [Zhang et al., 2017]. Тесное взаимодействие между НК-клетками и трофобластом обеспечивает ремоделирование спиральных артерий, при этом НК-клетки предотвращают чрезмерную инвазию клеток трофобласта [Fu et al., 2013]. Материнские антитела способны связываться с клетками трофобласта, образуя иммунные комплексы, которые распознаются НК-клетками, что в дальнейшем инициирует каскад передачи сигналов и активации НК-клеток, и, в конечном итоге, активацию p46 и CD107 с высвобождением перфорины. Впоследствии активированные НК-клетки окружают спиральные артерии, вызывая апоптоз внедрившихся клеток трофобласта, тем самым препятствуя чрезмерной его инвазии [Yougbaré et al., 2017]. Возникшие апоптопические тельца фагоцитируются окруженными макрофагами (МФ), посредством скавенджер-рецепторов (рецепторов-«мусорщиков»): CD206 связывает сульфированные и несulfированные полисахариды, а также структуры с высоким содержанием манноз [Agudelo et al., 2017]; CD14 - рецептор комплекса липополисахарида связывающего протеина с липополисахаридом [Tapping et al., 2000]. Макрофаги обнаруживаются во всех женских репродуктивных тканях, включая яичник, матку, маточные трубы и молочную железу [Wu et al., 2004]. В яичнике МФ являются наиболее распространенными иммунными клетками и локализуются в компартментах текальной, лютеиновой и интерстициальной ткани, а также в атретическом фолликуле [Duncan et al., 1998]. Участвуют в различных функциях яичников, таких как фолликулогенез и овуляция [Wu et al., 2004], проявляют иммуносупрессивные функции, способствующие поддержанию беременности [Liu et al., 2018].

Согласно данным литературы МВ участвуют в росте фолликула, мейозе ооцитов, стероидогенезе и профилактике полиспермии, однако данных о влиянии МВ, содержащихся в ФЖ недостаточно. Можно только

предполагать, что МВ играют роль в регуляции фолликулогенеза, посредством взаимообмена сигналами с клетками иммунной системы

\*\*\*

За последнее время изучение иммунных механизмов, лежащих в основе регуляции фолликулогенеза, приводит к пониманию роли иммуноактивных факторов в наступлении и поддержании беременности. Наступление беременности в первую очередь зависит от качества получаемых ооцитов при трансвагинальной пункции в циклах ЭКО, но оценка компетентности ооцита весьма затруднительна. На сегодняшний день невозможно предугадать какой ооцит даст наиболее перспективный эмбрион, и последующее наступление беременности в программе ЭКО. В этом плане очень важно понимание роли ИКК и их производных на этапы фолликулогенеза. Эти знания позволят расширить представление о вовлечении иммунной системы в репродуктивную систему женщин, их механизм действия и взаиморегуляцию, что возможно приблизит к поиску маркеров качества ооцитов/эмбрионов и вероятности наступления беременности. При необходимости даст возможность в будущем скорректировать функциональные дефекты на этапе фолликулогенеза.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика женщин, включенных в исследование

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. Работа выполнена в соответствии с этическими стандартами, разработанными в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденной приказом Минздрава РФ от 19.06.2003г. №266. Сбор материалов исследования проводился в ООО «Клиника профессора Пасман» в 2015–2019 гг.(г.Новосибирск), последующую обработку ФЖ проводили в лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ «Института Фундаментальной и Клинической Иммунологии» (г.Новосибирск). 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 ( $\geq 35$  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 (Таблица 2).

Таблица 2 - Клиническая характеристика группы женщин с бесплодием

Параметры	Исследуемая группа (n=79)	Параметры	Исследуемая группа (n=79)
Возраст (лет)	34,0 (25,0-46,0)	ФСГ (МЕ/л)	7,2 (5,9-9,3)
Менархе (лет)	13,0 (13,0-14,0)	ЛГ (МЕ/л)	4,8 (3,5-7,3)
Продолжительность цикла (дни)	29,0 (28,0-30,0)	E <sub>2</sub> (пмоль/л)	115,0 (70,5-207,0)
Длительность бесплодия (лет)	5,0 (3,0-10,0)	АМГ (нг/мл)	1,9 (1,0-3,5)
Количество попыток ЭКО	1,0 (1,0-1,0)	ТТГ (мМЕ/л)	1,3 (0,9-1,7)
Количество рожденных детей (n=11)	1,0 (1,0-1,0)	Св.тестостерон	12,4
М-эхо в день переноса (мм)	10,6 (10,0-12,0)	T4 (нмоль/л)	(11,6-13,4)
		17-	2,8
		ОНпрогестерон (нмоль/л))	(2,0-4,3)
		Тестостерон (нмоль/л)	1,2 (0,9-2,0)
		Пролактин (мМЕ/мл)	286,0 (196,0-397,0)

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

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. Клиническая характеристика группы женщин, участвующих в программе донации ооцитов приведена в Таблице 3.



Таблица 3 - Клиническая характеристика группы женщин, участвующих в программе донации ооцитов

Параметры	Исследуемая группа (n=10)	Параметры	Исследуемая группа (n=10)
Возраст (лет)	28,0 (24,0-30,0)	ФСГ (МЕ/л)	6,7 (5,5-8,0)
Количество фолликулов	17,0 (15,0-25,0)	ЛГ (МЕ/л)	5,1 (3,9-8,4)
Количество ооцитов	15,5 (12,0-24,0)	Е <sub>2</sub> (пмоль/л)	133,0 (126,0-140,0)
		АМГ (нг/мл)	6,5 (4,4-8,3)
		ТТГ (мМЕ/л)	1,3 (1,2-1,4)
		Св.тестостерон	12,9
		Т4 (нмоль/л)	(12,2-12,9)
		Пролактин (мМЕ/мл)	241,0 (213,0-312,5)

*Примечание:* данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильных диапазонов (LQ-UQ), min-max.

Достоверных отличий по клиническим параметрам в группе женщин, участвующих в донации ооцитов и женщин с бесплодием обнаружено не было.

Программа ЭКО осуществлялась по общепринятому протоколу. Выбор протокола стимуляции опирался на анамнез и овариальный резерв женщины: 72 из них стимулировали по протоколу антагонистов (короткий протокол), 5 женщин – по протоколу агонистов ГнРг (длинный протокол). Стимуляция яичников проводилась препаратами ФСГ. Ответ яичников на стимуляцию контролировали путем ультразвуковой оценки роста фолликулов и эндометрия. Третью группу составили 4 женщины в естественном цикле без введения препаратов ФСГ. При достижении трех и более

фолликулами диаметра 18 мм проводили индукцию овуляции инъекцией 250 мкг хорионического гонадотропина (ХГЧ) в 90% случаев или 0,2 мг агонистами гонадотропин-релизинг гормоном (аГнРГ), в 10% случаев. Через 36 часов с момента введения триггера овуляции проводили извлечение ооцитов с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации.

#### *Процедура аспирации ооцитов*

Аспирация фолликулов осуществлялась при помощи специальной вакуумной помпы с использованием аспирационных игл под ультразвуковым исследованием (УЗИ – контролем). Аспират, содержащий фолликулярную жидкость с ооцит-кумулюсным-комплексом (ОКК) сканировался под стереомикроскопом. После чего ОКК отмывались от ФЖ в специализированной коммерческой среде и инкубировались 4-5 часа при уровне CO<sub>2</sub> 5-6 %, O<sub>2</sub> 5-8%, t+37 °C до момента оплодотворения.

#### *Методика оплодотворения invitro*

Процедура ЭКО (инсеминация *invitro*) была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 53%.

#### *Культивирование эмбрионов*

По прошествии 16-18 часов после оплодотворения проводилась оценка полученных зигот по количеству пронуклеусов. В норме зигота должна иметь два пронуклеуса (2PN) в цитоплазме клетки и два полярных тельца (2pV) в перивителлиновом пространстве. На основании чего рассчитывался индекс оплодотворения (ИО) - (Формула-1).

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

Аномальные зиготы изолировались или утилизировались. Следующая оценка развития эмбрионов проводилась после 72 часов с момента оплодотворения согласно классификации Ebner T., 2001 [Ebner et al., 2001]. Подсчитывалось количество бластомеров и наличие фрагментации, по клиническим показаниям проводился эмбриотрансфер или продолжалось культивирование до 5 суток, когда эмбрион должен образовать бластоцисту. По истечении 5 суток проводилась оценка перспективности бластоцисты и ее пригодность к переносу/криоконсервации по принятому международному морфологическому критерию оценки развития бластоцист по Gardner D.K., 1999 [Gardner et al., 1999]. Данный критерий включает в себя шкалу цифр (от 1 до 6), обозначающих степень экспансии и уровень хетчинга бластоцисты, а также букв (A, B, C), отражающих состояние внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы бластоцисты. После оценки перспективности бластоцисты проводился перенос эмбриона в полость матки женщины. Выбор количества переносимых эмбрионов опирался на анамнез женщины, желания пациентов и отсутствие противопоказаний к переносу двух эмбрионов. Оставшиеся эмбрионы подвергались криоконсервации.

#### *Диагностика беременности*

По уровню хорионического гонадотропина определялась успешность лечения. Биохимическая беременность регистрировалась при значениях хорионического гонадотропина  $>5$  Ед/мл; клиническая – при визуализации плодного яйца в полости матки методом УЗИ на пятой неделе гестации.

## **2.2. Иммунологические методы исследования фолликулярной жидкости**

Сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов проводили во время трансвагинальной пункции яичников. В случае видимого загрязнения кровью образцов ФЖ, образцы не включались в исследование. Проводили центрифугирование ФЖ в центрифужной пробирке (ТРР, Швейцария) с

относительным ускорением 800g в течение 10 мин для осаждения клеток и крупного клеточного дебриса, затем отбирали 1500 мкл для исследования микровезикул, а остальные образцы замораживали при  $t = -80^{\circ}\text{C}$ .

*Исследование содержания регуляторных клеток в фолликулярной жидкости*

Относительное содержание субпопуляций ( $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ ,  $\text{CD4}^-\text{Foxp3}^+$ ,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  и  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{Foxp3}^+$ ) 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 пермеабелизацию 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/пермеабелизации 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», «CellQuest Software», США) (рисунок 3).

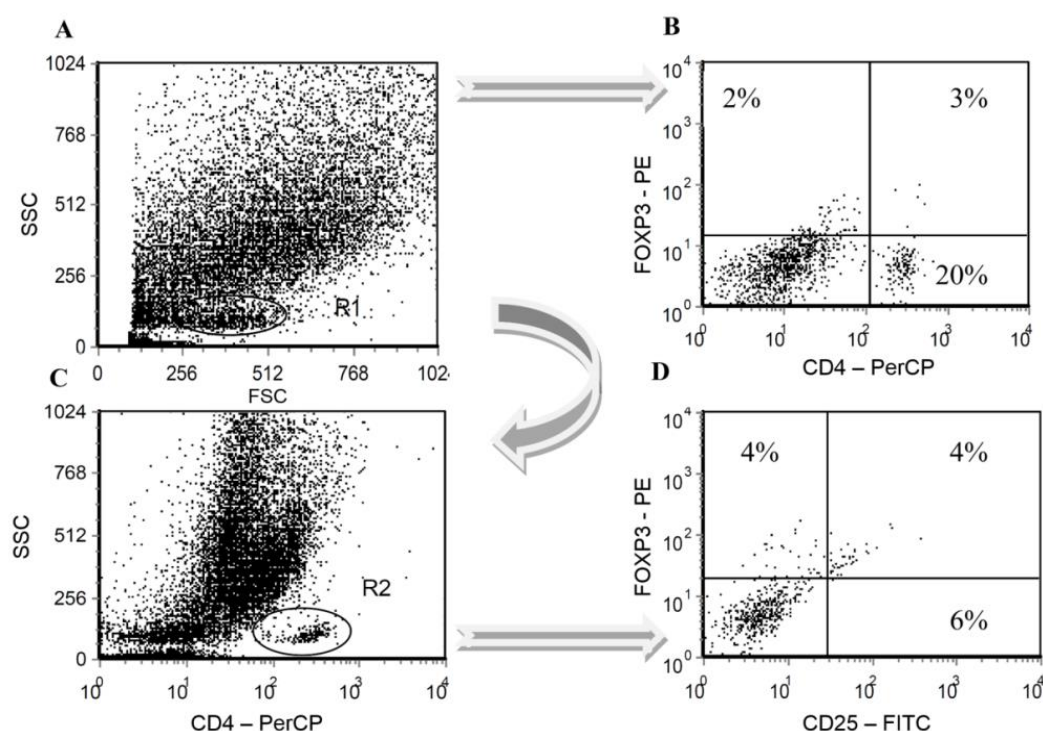


Рисунок 3 - Цитометрическая характеристика популяций  $\text{FoxP3}^+$  - клеток в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО. На рисунке А представлено общее лимфоцитарное облако из которого выделены: (В)  $\text{CD4}^{+/-}\text{FoxP3}^{+/-}$  - клетки, (С) популяция  $\text{CD4}^+$  Т-клеток, и (D) популяции  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{+/-}\text{FoxP3}^{+/-}$  Т-клеток. Представлены данные репрезентативной пациентки.

Алгоритм определения экспрессии  $\text{FOXP3}^+$  в ФЖ отражен на рисунке 3. На рисунке А представлено общее лимфоцитарное облако, в котором определяли экспрессию  $\text{CD4}^{+/-}\text{FoxP3}^{+/-}$  - клетки (В). Затем фракцию  $\text{CD4}^+$  - лимфоцитов (С), и (D) популяции  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{+/-}\text{FoxP3}^{+/-}$  Т-клеток. В исследовании относительное содержание  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ ,  $\text{CD4}^-\text{Foxp3}^+$  -клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  и  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{Foxp3}^+$  – в виде процента от  $\text{CD4}^+$  -клеток.

### *Исследование уровня свДНК в фолликулярной жидкости*

Количественную оценку производили с помощью набора «BioSilica», производства г.Новосибирск К 100-200 мкл образца добавляли два объема

раствора для сорбции, перемешивали на Vortex, затем на заранее подготовленную колонку с фильтром и 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 секунд 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 минуту 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  $\lambda$  ДНК

#### *Исследование уровня цитокинов в фолликулярной жидкости*

Содержание цитокинов в фолликулярной жидкости оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем Legend 8-Plex, (Biologend) (определяемый динамический диапазон 2-32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Производили оценку 8 цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). Данный метод основан на специфическом связывании исследуемых цитокинов с твердой фазой, которая представляет собой суспензию полистироловых гранул размером 5,5 мкм. Одновременно в анализе используется 8 типов гранул, каждый из которых различается собственной флуоресцентной меткой и конъюгирован с соответствующими моноклональными антицитокиновыми антителами. После специфического связывания гранул с цитокинами, содержащимися в исследуемых образцах

сыворотки и в калибровочных пробах с известным их количеством, в реакционную смесь добавляют антицитокиновые антитела, конъюгированные с биотином. Для детекции образовавшейся «сэндвич-структуры» используют взаимодействие биотина со стрептавидином, меченным «репортерной» флюоресцентной меткой (фикоэритрином). Постановка всех реакций происходит в 96-луночном планшетном формате. Оценка результатов проводилась на проточном флюориметре (BioPlex Protein Assay System, Bio-Rad, США), где гранулы автоматически разделялись по типам с использованием их размера и интенсивности флуоресценции собственных FITC-меток, а количество связавшихся с ними цитокинов оценивалось по суммарной интенсивности флуоресценции фикоэритрина. Концентрация исследуемых цитокинов в тестируемых образцах фолликулярной жидкости высчитывалась с помощью стандартных калибровочных разведений автоматически на персональном компьютере с использованием программы «Bio-Plex Manager».

#### *Исследование уровня микровезикул в фолликулярной жидкости*

Для выделения МВ из ФЖ использовали 1500 мкл из верхней трети надосадочной жидкости. Не тревожа осадок, супернатант переносили в микроцентрифужную пробирку (Axygen Scientific Inc., США), которую центрифугировали с относительным ускорением 13000g в течение 10 мин (ультрацентрифуга Centrifuge 5810R, Eppendorf, Германия) для удаления тромбоцитов и частиц размером до 1 мкм. Затем аккуратно собирали верхние 1400 мкл надосадочной жидкости в микроцентрифужную пробирку, не тревожа осадок, и 100 мкл жидкости непосредственно над осадком. Полученные образцы хранили для дальнейшего исследования при -80°C.

Фенотипическую характеристику продуцируемых МВ проводили методом проточной цитометрии. Незамедлительно после размораживания

микроцентрифужные пробирки с образцами ультрацентрифугировали с относительным ускорением 20800g в течение 30 мин при температуре +4°C. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, осадок ресуспендировали в 100 мкл аннексин V-связывающего буфера (BD Biosciences, США), приготовленного в соответствии с инструкцией производителя, переносили в цитометрические пробирки и инкубировали в присутствии аннексина V (APC, BD Biosciences), анти-CD206 (FITC), анти-CD14 (PE), анти-CD45 (PE), анти-CD107a (PerCP-Cy 5.5) моноклональных антител (все – BD Biosciences), в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли в каждую пробу по 400 мкл аннексин V-связывающего буфера, ресуспендировали и переносили в пробирки для подсчета абсолютного количества событий (TruCount™ Tubes, BD Biosciences). Исследование проводили на проточном цитометре BD FACSCalibur. 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 MB определяли с помощью латексных бус размером 1,1 мкм (LB-11, Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля использованы аннексин V-связывающий буфер и немеченные моноклональными антителами MB. Определяли относительное содержание CD45<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD107a<sup>+</sup> аннексин V-позитивных MB. Абсолютное количество MB оценивали с использованием технологии TruCount (BD Biosciences) в соответствии с инструкцией производителя.

### **2.3. Статистическая обработка полученных результатов**

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде медианных значений и интерквартильных диапазонов, а также в отдельных случаях представлены



значения средних арифметических величин (M) и стандартных ошибок средних (SE), максимальных и минимальных значений. Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни. Для статистического изучения связи между различными показателями проводили 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 биомаркеров с построением ROC-кривых и вычислением площади под ними (AUC). Визуализацию показателей получали с помощью программы «GraphPad Prism5».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин и их связь с клиническими и эмбриологическими параметрами

Важную роль в репродуктивном процессе играют регуляторные клетки. Данных о вовлечении В-регуляторных клеток в репродуктивный процесс практически нет, тогда как Т-регуляторные клетки присутствуют во всех органах репродуктивной системы, включая яичники и эндометриальную ткань. Стоит отметить, что их количество в периферической крови меняется в динамике менструального цикла [Arruvitoetal., 2007], свидетельствуя о возможной вовлеченности Т-рег в регуляцию функций яичников. Показано, что регуляторные Foxp3<sup>+</sup> Т-клетки (Т-рег) участвуют в осуществлении толерантности к аллоантигенам плода и формировании физиологической иммуносупрессии при беременности [Baoetal., 2011]. Отмечено, что при физиологической беременности количество Т-рег повышено, а их снижение ассоциировано с угрозой невынашивания беременности и самопроизвольного прерывания [Baoetal., 2011; Woidackietal., 2015], а также развитием преэклампсии [Yuetal., 2017]. Регуляторные Т-клетки регулируют инвазию трофобласта [Duetal., 2014], участвуют в ремоделировании сосудов плаценты [Morietal., 2016]. Поэтому представляется важным оценить их вовлечение в процесс фолликулогенеза. Одним из самых доступных источников для исследований иммунных клеток в яичниках является ФЖ, содержащая различные субпопуляции лимфоцитов и моноцитов [Boymanetal., 2012]. Однако данные о содержании Т-рег в ФЖ немногочисленны.

Проведенное исследование ФЖ у женщин после стимуляции суперовуляции позволило выявить наличие в ней FoxP3<sup>+</sup> клеток как в популяции CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), так и CD4<sup>-</sup> (CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) -клеток. В данном исследовании было показано что FoxP3<sup>+</sup> Т-клетки были обнаружены среди CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> лимфоцитов. Относительный уровень CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>

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.

Также на данном этапе было проведено сравнительное исследование содержания регуляторных клеток в ФЖ женщин после стимуляции овуляции и женщин в естественном цикле. Анализ показал, что содержание популяции регуляторных клеток в ФЖ женщин, участвующих в цикле стимуляции, значимо не отличалось от их содержания в ФЖ женщин, участвующих в естественном цикле (без введения гонадотропинов). Также в циклах стимуляции (с введением гонадотропных препаратов) женщины с бесплодием не отличались по содержанию в ФЖ от женщин, участвующих в программе донации ооцитов, на основании чего в дальнейшем группы были объединены при последующем анализе.

Было проведено исследование относительного количества  $CD4^+FoxP3^+$ ,  $CD4^-FoxP3^+$ ,  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  и  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  клеток в группах женщин, отличающихся по форме (первичное/вторичное) и причине бесплодия. Показано, что в группах женщин с трубно-перитонеальным, эндокринным, мужским и сочетанным факторами а также формой бесплодия были сопоставимы и между исследуемыми группами не различались (таблица 4).

Таблица 4 - Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости при разных факторах бесплодия

Параметры	Фактор бесплодия			
	Группа 1 МФ (n=8)	Группа 2 ТП (n=19)	Группа 3 Эндокринны й (n=7)	Группа 4 Сочетанный (n=19)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	2,5±0,4 3,0 (1,1-3,2)	2,8±0,5 2,0 (1,0-4,0)	2,0±0,5 1,5 (1,0-4,0)	2,5±0,4 2,0 (1,0-1,4)
CD4 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	3,8±0,7 4,0 (3,0-6,0)	4,5±1,0 3,0 (1,2-7,0)	2,0±1,0 1,0 (1,0-4,0)	4,8±1,5 2,1 (1,1-4,5)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	3,8±1,1 3,0 (1,5-5,5)	5,5±0,7 5,9 (3,0-7,0)	4,1±0,7 5,0 (3,0-6,0)	4,9±0,9 4,0 (2,0-8,0)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	6,6±1,7 6,0 (3,3-9,0)	5,8±0,7 5,0 (3,5-7,0)	5,7±0,8 6,0 (4,0-7,0)	8,0±1,6 6,0 (3,4-10,0)

Примечание: данные представлены в виде М± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ). Используемые сокращения: МФ – мужской фактор бесплодия; ТП- трубно-перитонеальный; Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Анализ уровня CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток в группах женщин, различающихся по репродуктивному возрасту (ранний <35 лет и поздний ≥35 лет), длительности бесплодия (≤5 лет, и >5 лет) и овариальному резерву: уровень АМГ (<1,0; 1-6 и >6 нг/мл) и количество АФ (<5; 5-14; >14), не выявил значимых различий в содержании исследуемых субпопуляций между исследуемыми группами. Вследствие чего, в дальнейшем исследование взаимосвязи между количеством регуляторных клеток и эмбриологическими параметрами, характеризующими созревание ооцитов, индекс оплодотворения, качество эмбрионов и исходы ЭКО, проводилось в общей группе женщин.

Учитывая выраженные вариации в количестве созревающих фолликулов при стимуляции суперовуляции, все пациентки были разделены на 3 группы:

с количеством фолликулов <6, n=12 (группа 1), 6-12, n=25 (группа 2) и >12, n=16 (группа 3). Анализ данных о содержании субпопуляций регуляторных клеток в выделенных группах показал, что образцы ФЖ женщин в группе 1 отличались более высоким содержанием  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ -клеток, доля которых в группе 1 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 (рисунок 4А).

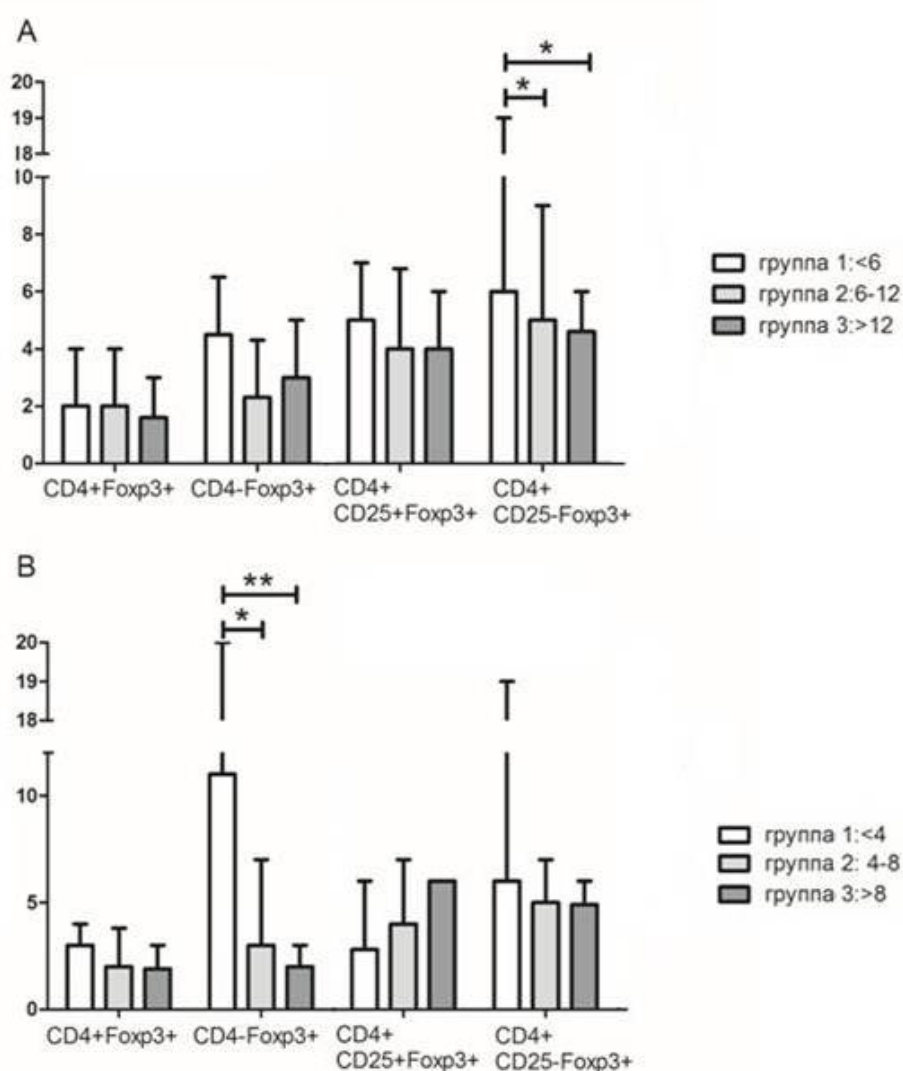


Рисунок 4 - Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в зависимости от параметров фолликулогенеза.

Примечание: Дана характеристика 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. Статистическая значимость различий: \*- $p_u < 0,05$ , \*\* -  $p_u < 0,01$  по U-критерию Манна-Уитни.

Для исследования возможной связи регуляторных клеток с количеством получаемых ооцитов, все женщины также были поделены на 3 группы - с числом ооцитов  $< 4$ ,  $n=6$  (группа 1),  $4 - 8$ ,  $n=26$  (группа 2) и  $> 8$ ,  $n=21$  (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 (рисунок 4B). 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):  $0,75-1,0$  ( $n=33$ ) и  $< 0,75$  ( $n=20$ ), соответственно. Как следует из рисунка 5A, 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  $3,0\%$  ( $1,0-4,0$ ),  $p_u=0,04$  (рисунок 5A). Количество клеток в других исследуемых субпопуляциях было сопоставимо.

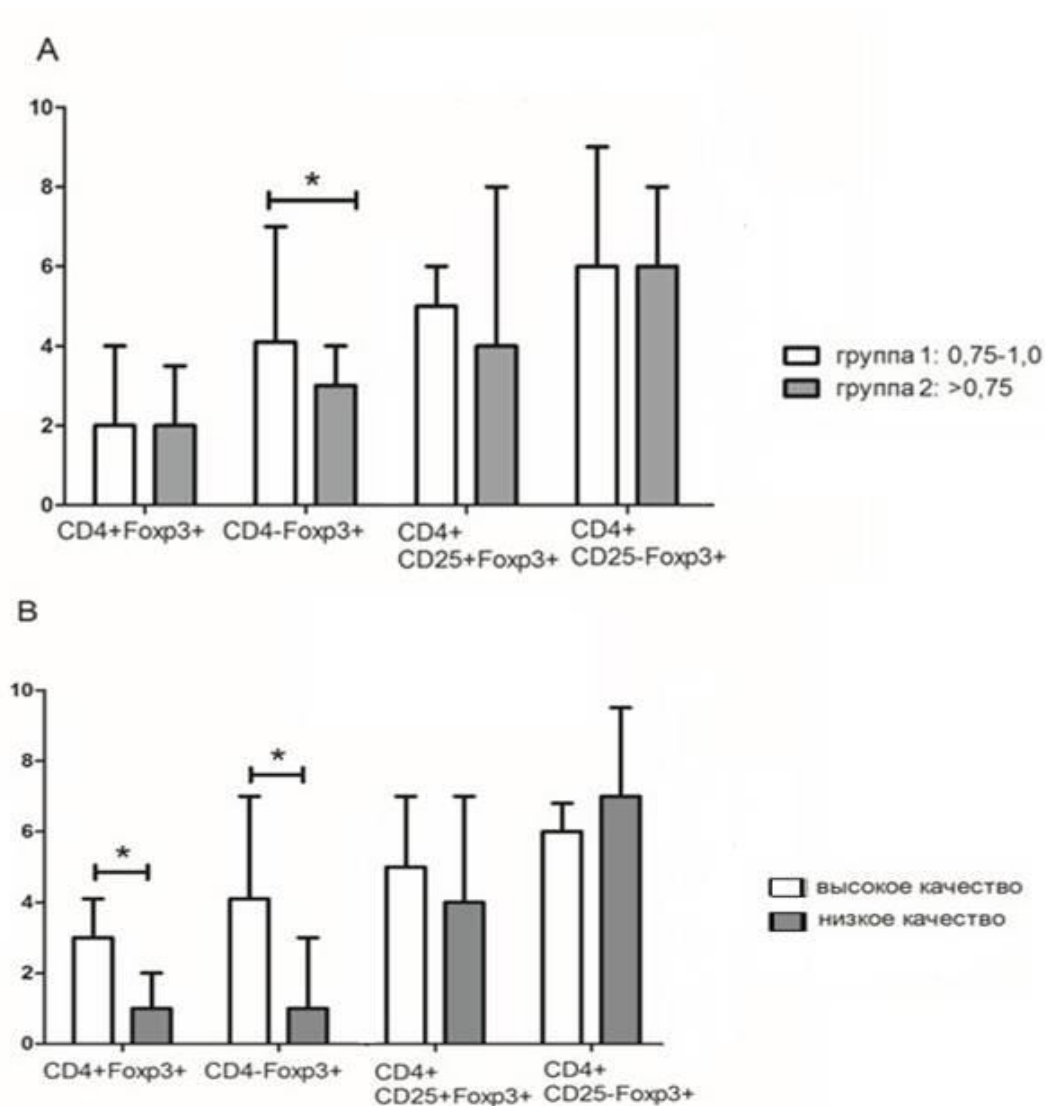


Рисунок 5 - Регуляторные клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в зависимости от качественных показателей.

Примечание: Дана 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 (Ме) и интеринтерквартильного диапазона (LQ-UQ). Статистическая значимость различий: \*- $p_u < 0,05$  по U-критерию Манна-Уитни.

Следующим шагом явился ретроспективный анализ содержания регуляторных клеток в ФЖ в зависимости от качества 3-х и 5-суточного эмбрионов. На основании показателей качества бластоцист женщины были разделены 2 группы – с высоким качеством,  $n=28$  (классы А и В) и низким,

n=18 (класс C). Значимых различий в содержании регуляторных клеток при разном качестве эмбрионов на 3 сутки обнаружено не было. Обнаруживалось более высокое содержание CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> популяции регуляторных клеток в ФЖ у женщины с высоким качеством 5-ти суточных эмбрионов, по сравнению с группой женщин с низким качеством, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 1,0% (1,0-3,0),  $p_u=0,04$ . Аналогично, содержание CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> составило 3,0% (1,0-4,1) vs 1,0% (1,0-2,0),  $p_u=0,04$  (рисунок 5B).

Качество бластоцисты является основополагающим фактором, влияющим на имплантацию эмбриона и наступление беременности. На заключительном этапе был проведен ретроспективный анализ взаимосвязи между содержанием регуляторных клеток в ФЖ и исходами ЭКО в группах женщин с клинической беременностью, биохимической беременностью и отрицательными исходами (таблица 5).

Таблица 5 - 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 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	2,4±0,4 2,0 (1,0-3,7)	2,8±0,4 3,0 (1,0-4,0)	2,4±0,5 1,6 (1,0-3,0)	$P_{1-2}=0,46$ $P_{1-3}=0,98$ $P_{2-3}=0,52$
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>-</sup>	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 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	4,5±0,8 4,0 (2,0-6,0)	4,9±0,7 4,5 (2,0-7,0)	4,8±0,7 4,5 (2,5-6,0)	$P_{1-2}=0,66$ $P_{1-3}=0,74$ $P_{2-3}=0,23$
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	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: данные представлены в виде  $M \pm S.E.$ , медианы (Me), интеринтерквартильного диапазона (LQ-UQ).



Относительное содержание  $CD4^+FoxP3^+$  клеток в ФЖ женщин с наступившей и прогрессирующей беременностью было значимо выше, чем в ФЖ женщин с отрицательными исходами ЭКО. Отсутствие беременности было ассоциировано с более высоким уровнем в ФЖ  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  клеток, хотя различия в содержании этих клеток в ФЖ женщин с клинической беременностью проявлялись только в виде тренда.

В настоящей работе исследовано содержание различных популяций  $FoxP3$ -позитивных клеток и выявили присутствие в ФЖ не только  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ , но и  $CD4^+FoxP3^+$ , не экспрессирующих молекулу  $CD25$ , а также  $CD4^+FoxP3^+$  клеток. Популяция  $CD4^+FoxP3^+$  регуляторных клеток, может представлять собой популяцию  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток или популяцию В регуляторных клеток. Наибольшие отличия были обнаружены в отношении  $CD4^+FoxP3^+$  -клеток, максимальное содержание которых, наряду с  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  Т-клетками, регистрировалось в группе женщин с наименьшим числом фолликулов и ооцитов, что, возможно, связано с участием данных субпопуляций регуляторных клеток в процессе созревания ооцитов. Это предположение подтверждается при анализе взаимосвязи между содержанием регуляторных клеток и индексом оплодотворения ооцитов. Так, 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, а наступление клинической беременности с низким содержанием  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  Т-клеток в виде тренда. Таким образом, рост и развитие фолликулов сопровождается активацией одних и гибелью других ИКК и клеток гранулезы, в результате чего в фолликулярную жидкость высвобождаются апоптотические тельца и свободная ДНК (свДНК), которая может обладать иммунорегуляторной активностью.

### **3.2 Свободная ДНК в фолликулярной жидкости женщин и ее связь с клиническими и эмбриологическими параметрами**

Несвязанная с клетками свободная ДНК выявляется в различных биологических жидкостях организма [Boissière et al., 2017; Lietal. 2009; Tzimagiorgis et al., 2011], в том числе и в ФЖ. Наличие свДНК в ФЖ связано с апоптозом и некрозом клеток, окружающих растущий ооцит по мере интенсивного роста фолликула [Guan et al., 2017]. В этом аспекте концентрация свДНК в ФЖ может являться дополнительным маркером качества получаемых ооцитов и наступление беременности в программе ЭКО.

На данном этапе было проведено исследование уровня свДНК в ФЖ, что позволило выявить у женщин со стимуляцией овуляции наличие свДНК, 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 (n=4) (без введения гонадотропных препаратов), имели достоверно меньшие концентрации свДНК, чем ФЖ женщин со стимулированной овуляцией (n=64) (26,8 vs 40,3 нг/мл;  $p_u=0,03$ ) (рисунок 6А). То есть стимуляция овуляции ассоциировалась с более высоким содержанием в ФЖ свДНК. При этом в циклах с введением гонадотропинсодержащих препаратов женщины с бесплодием (n=54) не отличались по уровню свДНК в ФЖ от женщин, донирующих ооциты (n=10) (40,3 vs 43,8 нг/мл;  $p_u=0,44$ ), на основании чего в дальнейшем группы были объединены при последующем анализе.

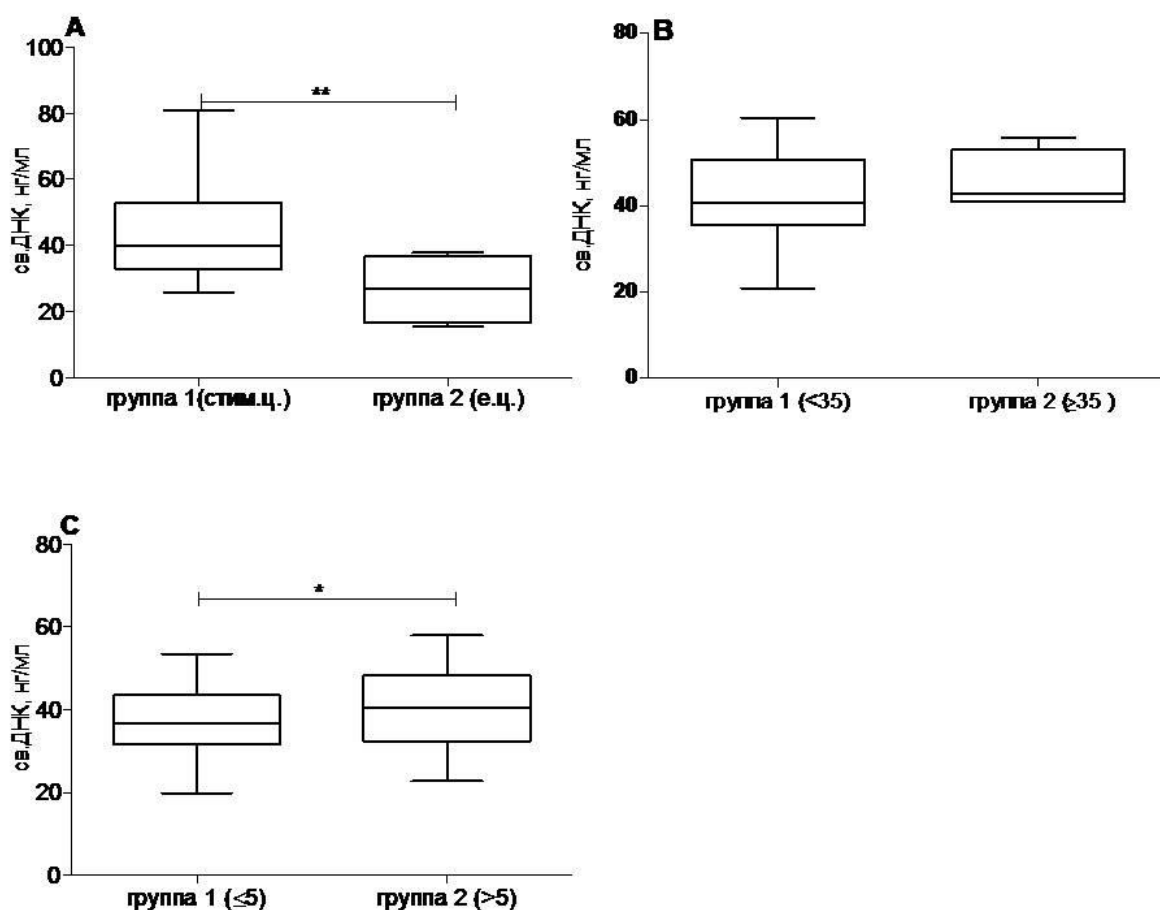


Рисунок 6 - Уровень свДНК в фолликулярной жидкости женщин с различными клиническими параметрами.

Примечание: Представлены данные, характеризующие содержание свДНК у женщин с бесплодием: А — в стимулированном (группа 1) и естественном (группа 2) циклах; В – в возрастных группах <35 лет (группа 1) и ≥35 лет (группа 2); С – в группах с продолжительностью бесплодия ≤5 лет (группа 1) и >5 лет (группа 2).

Данные представлены в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ), Статистическая значимость различий: \* -  $p_u < 0,05$ , \*\* -  $p_u < 0,01$  -U-критерий Манна-Уитни.

Учитывая исходную клиническую гетерогенность исследуемой группы, на первом этапе исследования было проанализировано, влияют ли такие факторы как возраст, длительность бесплодия, а также форма и причина бесплодия на уровень свДНК. Анализ образцов ФЖ женщин раннего (<35 лет) и позднего (≥35 лет) репродуктивного возраста не выявил достоверных

различий в содержании свДНК (рисунок 6В). Однако умеренно выраженные, но статистически достоверные различия в концентрации свДНК были выявлены в группах с разной продолжительностью бесплодия. Так в ФЖ женщин с бесплодием  $\leq 5$  лет ( $n=49$ ) уровень свДНК был ниже, чем в группе с длительностью бесплодия  $>5$  лет ( $n=19$ ) (36,6 vs 40,9 нг/мл;  $p_u=0,03$ ) (рисунок 6С).

Уровни свДНК в группах женщин в зависимости от формы бесплодия (первичным и вторичным бесплодием: 40,0 vs 41,1 нг/мл), фактора бесплодия (мужским и женским - 40,9 vs 39,2 нг/мл), а также с различными факторами женского бесплодия (трубно-перитонеальным, эндокринным, сочетанным) значимо не различались (таблица 6). Учитывая отсутствие сопряженности свДНК с большинством клинических параметров, изучение взаимосвязи между количеством свДНК и параметрами, характеризующими фолликуло-/оогенез, проводилось в общей группе пациенток.

Таблица 6 - Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными клиническими параметрами

Параметры	%	СвДНК (нг/мл)			
		М	LQ -UQ	Min-max	Значимость ( $p_u$ )
Бесплодие (%)					
а- мужское	13	40,9	29,3- 45,2	20,9- 47,6	$p_{ab}=0,6$
женское:	87	39,2	31,1 – 52,2	19,8 - 65,9	$p_{ac}=0,6$
б-ТП	45	39,7	31,6 -50,7	19,9 -	$p_{ad}=0,8$
с- эндокринное	5	35,5	31,1- 40,0	65,931,0-	$p_{ae}=0,8$
д- сочетанное	50	36,7	26,9 – 53,1	40,219,8 – 60,9	
Форма бесплодия (%)					
-первичное	52	40,0	19,8 - 60,9	29,3 - 52,2	0,95
- вторичное	48	41,1	19,9 - 65,9	33,8 - 50,9	
Женщины с бесплодием ( $n=44$ )	90	40,3	$30,7 \pm 50,8$	19,8 – 65,9	0,44
Доноры ооцитов ( $n=5$ )	10	43,8	33,9 – 53,6	32,8 – 57,9	

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me), интеринтерквартильного диапазона (LQ-UQ), min-max. Используемые сокращения: ТП- трубно-перитонеальный фактор; p\*- достоверность различий по U-критерию Манна-Уитни.

Одним из важных параметров при планировании программы ЭКО и подборе протокола стимуляции является овариальный резерв женщин, включающий оценку уровня АМГ и числа антральных фолликулов (АФ). Поэтому на первой ступени исследовали взаимосвязь между данными показателями и содержанием свДНК в ФЖ. В зависимости от количества АФ, способных отвечать на стимуляцию суперовуляции, женщин разделили на 3 группы: АФ <5, n=10 (группа 1); АФ 5-14, n=29 (группа 2); и АФ >14, n=10 (группа 3). Из данных рисунка 7А видно, что уровень свДНК в группе 3 был в 1,3 раза выше, чем в группе 1 (47,8 vs 37,8;  $p_u=0,04$ ). Тем не менее, достоверной корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ( $r_s=0,22$ ;  $p_u=0,1$ ). В зависимости от уровня АМГ все женщины также были разделены на три группы - с низким, n=12 (<1,0 нг/мл; группа 1), средним, n=29 (1,0 - 6,0 нг/мл; группа 2) и высоким, n=8 (> 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 (53,7 vs 38,5;  $p_u=0,01$ ) и в виде выраженного тренда превышало аналогичный показатель в 1-ой группе 1 (53,7 vs 41,0;  $p_u=0,059$ ) (рисунок 7В). При этом между уровнем АМГ и концентрацией свДНК отмечалась умеренная прямая корреляционная взаимосвязь ( $r_s=0,31$ ;  $p_u=0,03$ ).

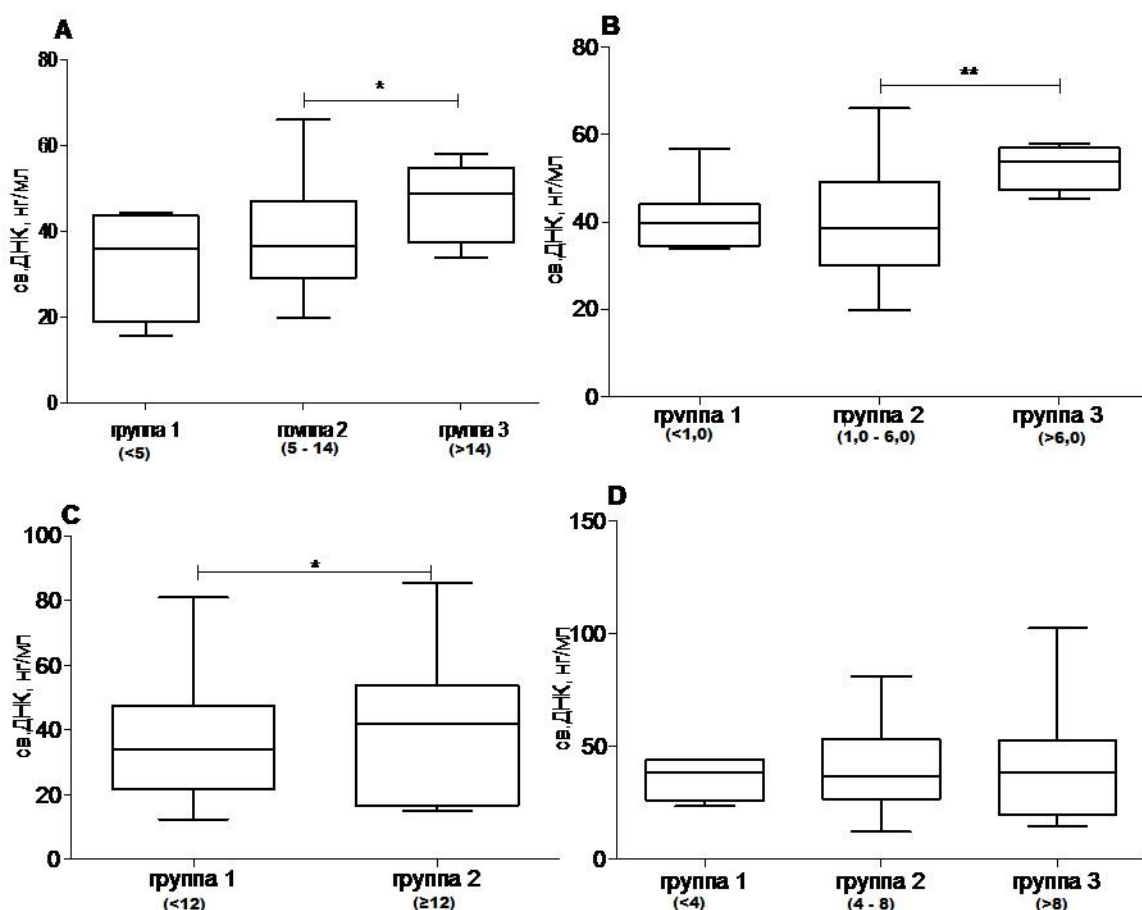


Рисунок 7 - Уровень свДНК в фолликулярной жидкости женщин в стимулированных циклах овуляции в зависимости от показателей овариального резерва, количества фолликулов и ооцитов. Представлены данные, характеризующие содержание свДНК у женщин с бесплодием: А - количество антральных фолликулов; В – уровень АМГ; С - количество овуляторных фолликулов; D - количество ооцитов.

Данные представлены в виде медианы (Me), интеринтерквартильного диапазона (LQ-UQ), min-max. Статистическая значимость различий: \* -  $p_a < 0,05$ , \*\* -  $p_a < 0,01$  - U-критерий Манна-Уитни.

Важно отметить, 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 ( $\geq 12$ ,

n=19) составляла 44,2 (40,0 - 53,6) нг/мл и была достоверно выше, чем у женщин с меньшим (<12, n=30) количеством фолликулов - 36,6 (29,8-47,5) нг/мл;  $p_u=0,04$  (рисунок 7С). Однако значимой корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ( $r_s=0,25$ ;  $p_u=0,1$ ). Для анализа взаимосвязи свДНК с количеством ооцитов, получаемых при трансвагинальной пункции яичников, женщин разделили на 3 группы - с низким (<4, n=6; группа 1), средним (4-8, n=24; группа 2) и высоким (>8, n=19; группа 3) содержанием ооцитов. Уровень свДНК в ФЖ женщин в сформированных группах значимо не различался (рисунок 7D).

Сопоставление уровня свДНК у женщин с высоким и низким качеством 3-суточных эмбрионов, развивающихся за счет собственных органелл ооцита, не выявило различий (рисунок 8А). Уровень свДНК в группе женщин с высоким (классы А и В) качеством blastocист (n=27) на 5 сутки развития был достоверно ниже, чем у женщин с низким (класс С) качеством (n=12) (39,3 vs 49,5 нг/мл;  $p_u=0,04$ ; рисунок 8В).

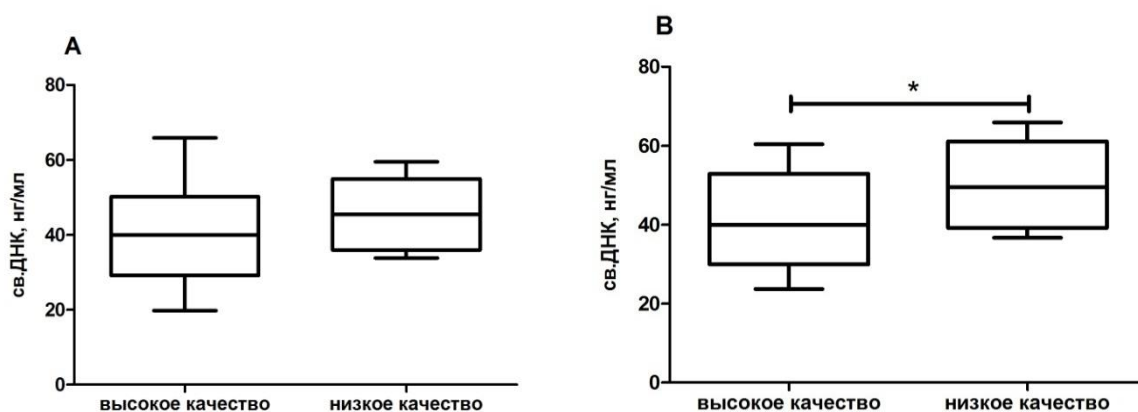


Рисунок 8 - Уровень свДНК в фолликулярной жидкости женщин в стимулированных циклах овуляции в зависимости от качества получаемых эмбрионов: А- 3сутки развития эмбрионов; В- 5сутки развития. Данные представлены в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ), min-max. Статистическая значимость различий: \*- $p_u < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни.

Поскольку качество бластоцисты оказывает непосредственное влияние на имплантацию эмбриона и наступление беременности, 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 наступившей и прогрессирующей беременностью (клиническая беременность); с отсутствием беременности и с биохимической беременностью (прервавшейся на ранних сроках) (таблица 7).

Таблица 7 - Содержание свободной ДНК у женщин с различными исходами ЭКО

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

Примечание: данные представлены в виде M ± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).

Сравнительный анализ выявил значительно более низкий уровень свДНК у женщин с клинической беременностью по сравнению с женщинами с биохимической беременностью (31,9 против 52,2 нг/мл, p<sub>u</sub> = 0,017). Для женщин с клинической беременностью уровень свДНК в ФЖ составил 31,9 нг/мл, что значительно ниже, чем для женщин в группе с отрицательным исходом ЭКО - 41,2 нг/мл, p<sub>u</sub> = 0,02. Таким образом, у женщин с успешной имплантацией эмбрионов (клиническая беременность) прогрессирование беременности ассоциировано с более низким уровнем свДНК в ФЖ.



В целом, в настоящем исследовании продемонстрировано, что содержание свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией значительно выше, чем в естественных циклах. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые выявили наличие свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией [Traveretal.,2015; Dimopoulouetal., 2014; Scalicietal., 2014] и продемонстрировали прямую взаимосвязь между концентрацией свДНК и дозой гонадотропина [TraverS.,2015]. Данные о наличии свДНК в ФЖ женщин в естественных циклах ранее в литературе не освещались и, учитывая иммуномодулирующие свойства ДНК [Fúrietal., 2015], могут послужить основой для исследования новых аспектов иммунно-эндокринных взаимодействий в регуляции фолликулогенеза и созревания ооцитов.

### 3.3. Цитокины в фолликулярной жидкости женщин и их связь с клиническими и эмбриологическими показателями

В предыдущей главе данного раздела было описано, что уровень свДНК сопряжен с нарушениями овариального резерва, низким качеством эмбрионов и отрицательным исходом программы ЭКО. На продукцию свДНК могут оказывать опосредованное влияние цитокины, в связи с чем важно исследовать взаимосвязь уровня цитокинов (IL-6, IL-8) с клиническими и эмбриологическими параметрами в ФЖ у женщин, проходивших программу ЭКО.

В ходе исследования ФЖ у 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 (рисунок 9).

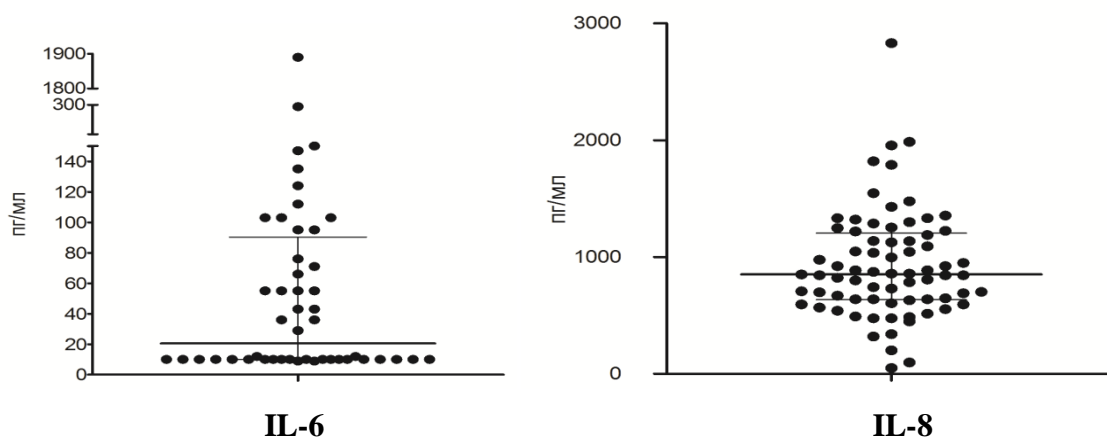


Рисунок 9 - Уровень IL-6 и IL-8 (пг/мл) в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО.

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ-UQ) индивидуальных значений

Затем провели анализ содержания данных цитокинов в ФЖ в зависимости от клинических параметров. Анализ уровня IL-6, IL-8 в ФЖ женщин,

участвующих в цикле стимуляции значимо не отличалось от концентрации данных цитокинов в ФЖ женщин в естественном цикле. Также в циклах стимуляции (с введением гонадотропных препаратов) женщины с бесплодием не отличались по содержанию в ФЖ от женщин в программе донации ооцитов, на основании чего в дальнейшем группы были объединены при последующем анализе.

При сравнении клинических показателей (возраст, длительность, форма и причина бесплодия) в группе пациенток значимые отличия не обнаружены. На следующем этапе провели анализ содержания цитокинов ФЖ в зависимости от овариального резерва. Исследование содержания IL-6 и IL-8 в зависимости от количества антральных фолликулов не выявило значимых различий. По уровню АМГ все женщины были поделены 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 IL-8 в ФЖ у женщин 3-ей группы было ниже в виде выраженного тренда, чем у женщин 1-ой ( $617,2$  vs  $845,7$ ) и 2-ой ( $617,2$  vs  $887,1,7$ ) группах (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание цитокинов (IL-6, IL-8) в фолликулярной жидкости у женщин с разным уровнем антимюллерового гормона

Уровень АМГ (нг/мл)				
Параметры (нг/мл)	Группа 1 $<1,0$ (n=12)	Группа 2 $1,0 - 6,0$ (n=48)	Группа 3 $>6,0$ (n=11)	Значимость ( $p_u$ )
	1	2	3	
IL-6	$71,2 \pm 24,0$	$85,4 \pm 39,9$	$95,0 \pm 32,7$	$P_{1-2} = 0,9$
	45,6	10,0	75,5	$P_{1-3} = 0,54$
	(10,0-107,5)	(10,0-54,8)	(10,0-157,5)	$P_{2-3} = 0,9$
IL-8	$940,4 \pm 115,4$	$979,2 \pm 71,4$	$677,1 \pm 83,9$	$P_{1-2} = 0,8$
	845,7	887,1	617,2	$P_{1-3} = 0,09$
	(612,8-1218,6)	(699,8-1270,5)	(475,3-799,6)	$P_{2-3} = 0,06$

Примечание: данные представлены в виде  $M \pm S.E.$ , медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).;  $p_u$ - U-критерий Манна-Уитни. по уровню АМГ: менее 1,0 (группа 1); от 1,0 до 6,0 (группа 2 ); более 6,0 нг/мл (группа 3).

В дальнейшем провели сравнительный анализ уровня цитокинов в ФЖ женщин в зависимости от эмбриологических показателей (таблица 9). 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 достоверно выше в группе с минимальным количеством фолликулов ( $<6$ ). Поскольку полученные при пункции яичников ооциты обладали различной способностью к оплодотворению, мы также проанализировали содержание IL-6 и IL-8 в группах женщин с различными индексами оплодотворения (ИО). Обнаружено, что низкие концентрации IL-6 ассоциировались на уровне тенденции с высоким ИО ( $>0,75$ ), ( $p_u=0,14$ ); эмбрионами лучшего качества на 3 сутки ( $p_u=0,01$ ) и на 5 сутки ( $p_u=0,004$ ) развития. При наступлении беременности уровень IL-6 в ФЖ также был ниже, чем при ее отсутствии, хотя различия проявлялись на уровне тенденции ( $p_u=0,2$ ). По данным литературы высокий уровень IL-6 в ФЖ женщин негативно ассоциируется с процессом роста фолликулов, качеством ооцитов и эмбрионов, а также с исходами программы ЭКО [Altunetal., 2010], что также подтверждается нашими данными. Уровень IL-8 в зависимости от данных параметров достоверно не отличался.

Таким образом, выявлено, что высокая концентрация IL-6 в ФЖ может являться негативным прогностическим маркером качества эмбрионов и вероятности наступления беременности в циклах ЭКО, в то время как высокий уровень IL-8 ассоциировался только с минимальным количеством фолликулов ( $<6$ ) и низким уровнем АМГ.

Таблица 9 – Уровень цитокинов (IL-6, IL-8) в фолликулярной жидкости в зависимости от эмбриологических показателей

Параметры	IL-6 (пг/мл)					IL-8 (пг/мл)				
	M± S.E.	Me	(LQ - UQ)	p <sub>u</sub>		M± S.E.	Me	(LQ - UQ)	p <sub>u</sub>	
<b>Количество фолликулов:</b>										
<6	n 17	23,8±7,3	10,0	10,0-36,4	1- 2=0,13	n 17	1049,8±79,2	1092,8	784,5-1253,5	1- 2=0,05
6-12	24	117,3±47,7	39,6	10,0-103,2	2- 3=0,4	26	830,6±70,9	705,9	595,2-1218,8	2- 3=0,3
>12	25	75,6±15,2	60,3	10,0-103,2	1- 3=0,02	28	978,9±116,6	833,0	639,2-1126,2	1- 3=0,6
<b>Количество ооцитов:</b>										
<8	n 35	70,1±13,7	11,6	10,0-54,8	0,6	n 37	974,4±67,0	996,2	639,2-1298,9	0,3
>8	31	85,8±23,5	54,8	10,0-123,8		34	868,1±90,0	814,6	612,8-922,0	
<b>Индекс оплодотворения:</b>										
>0,75	n 36	53,4±11,3	11,6	10,0-60,4	0,14	n 38	909,7±80,1	825,6	581,5-1236,2	0,7
<0,75	30	109,4±39,7	54,8	10,0-103,2		33	950,7±77,6	887,1	639,2-1126,2	
<b>Качество эмбрионов на 3-и сутки:</b>										
Высокого качества	n 50	58,5±12,3	11,6	10,0-75,8	6.	n 52	936,4±61,8	851,3	647,7-1189,4	0,7
Низкого качества	16	189,1±92,71	94,5	54,8-146,6		18	896,1±125,3	726,7	480,4-1233,8	

Примечание: данные представлены в виде M± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 9 (продолжение)– Уровень цитокинов (IL-6, IL-8) в фолликулярной жидкости в зависимости от эмбриологических показателей

Параметр ы	IL-6 (пг/мл)					IL-8 (пг/мл)				
	M± S.E.		Me	(LQ - UQ)	p <sub>u</sub>	M± S.E.		Me	(LQ - UQ)	p <sub>u</sub>
	Качество эмбрионов на 5 сутки развития:									
	n					n				
Высокого качества	33	64,2±15, 95	29,2	10,0- 85,4	0,00 4	35	882,8±63 ,3	844,0	647,7- 996,2	0,8
Низкого качества	9	270,3±13 9,2	135,4	103,2 - 278,2		13	857,6±17 2,6	649,7	449,1- 1247, 7	
	Исход цикла:									
	n					n				
Беременно сть	44	66,1±13, 4	32,8	10,0- 94,5	0,2	48	905,1±68 ,1	844,0	630,5- 1138, 4	0,8
Отрицател ьный исход	20	121,4±62 ,9	42,9	10,0- 94,5		20	939,0±98 ,0	872,9	668,9- 1218, 7	

Примечание: данные представлены в виде M± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Негативный эффект повышенных концентраций IL-6 в ФЖ может опосредоваться через подавление генерации CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> регуляторных клеток. Чтобы проверить это предположение в настоящей работе была исследована взаимосвязь между концентрацией IL-6 и FoxP3<sup>+</sup> клеток в ФЖ женщин с различными параметрами фолликуло/оогенеза, бластуляции и исходами ЭКО.

### Исследование взаимосвязи уровня IL-6 и регуляторных клеток в фолликулярной жидкости женщин

Созревание овуляторных фолликулов и последующая овуляция сопровождаются воспалительной реакцией, которая контролируется

иммунокомпетентными клетками (ИКК), в том числе Th17 и FoxP3<sup>+</sup> Т-рег. В этом аспекте особенно интересна роль IL-6, который регулирует баланс Th17/FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток, подавляя генерацию Т-рег. Поэтому было решено провести сравнительный анализ содержания FoxP3<sup>+</sup> клеток и IL-6. Учитывая выявленную сопряженность между высокой концентрацией IL-6 и низким количеством CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток в ФЖ в группах женщин с большим количеством фолликулов/ооцитов, низким ИО и качеством бластоцист, а также отрицательным исходом ЭКО, а у женщин с низким качеством бластоцист – дополнительно с низким количеством CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток было проанализировано наличие корреляционной взаимосвязи между указанными показателями (рисунок 10).

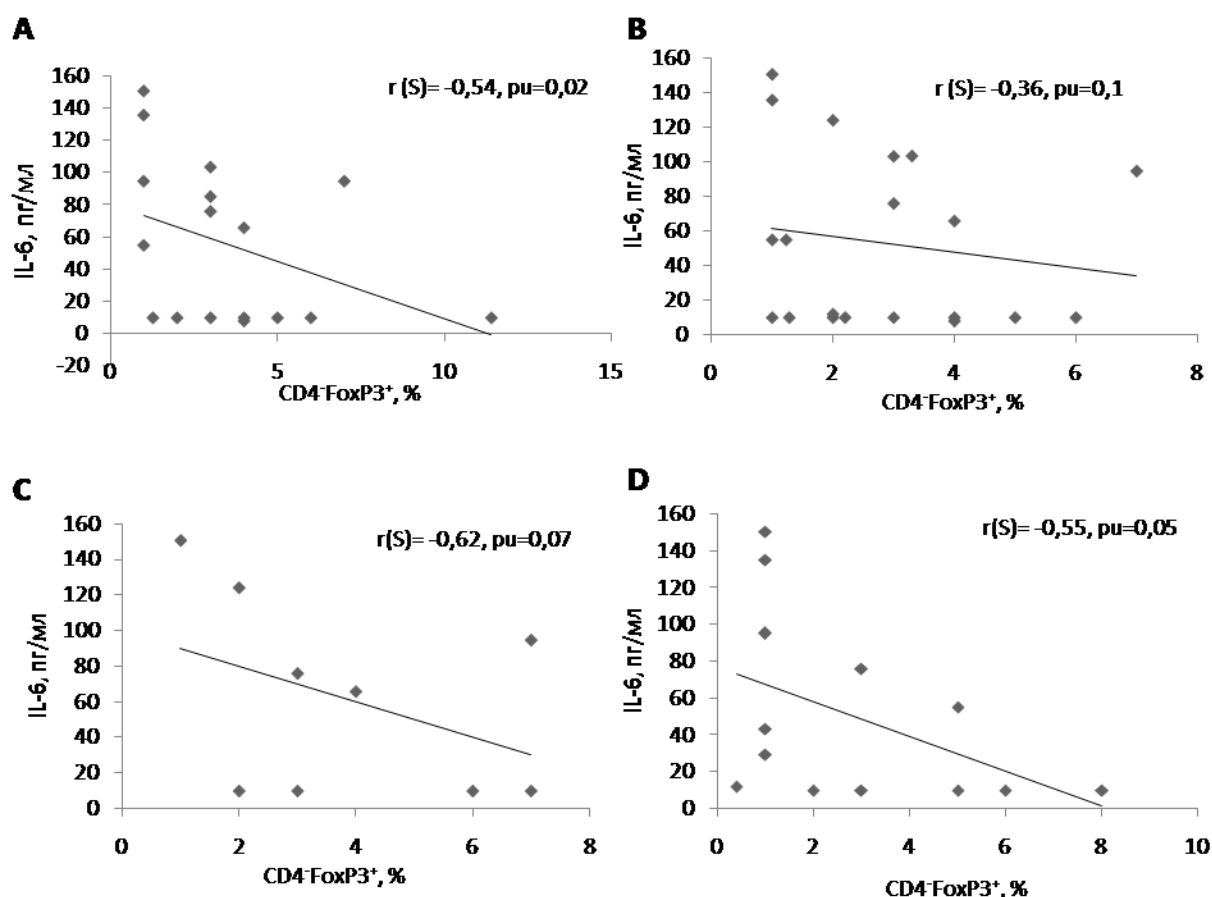


Рисунок 10 - Корреляционная взаимосвязь уровней IL-6 и CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-клеток в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом экстракорпорального оплодотворения. На рисунке А представлена взаимосвязь показателей у женщин с

большим количеством фолликулов, В – с максимальным количеством ооцитов; С – высоким качеством бластоцист; D – при отрицательном исходе программы ЭКО.

Исследование содержания популяций регуляторных клеток и IL-6 в зависимости от индекса оплодотворения не выявило значимых отличий, в связи с чем последующий анализ взаимосвязи между данными параметрами проводили в общей группе женщин. Как можно видеть из рисунка 10, между концентрацией IL-6 и количеством CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток выявлялась обратная корреляционная зависимость, которая была наиболее выраженной у женщин с большим количеством фолликулов ( $r=-0,54$ ;  $p_u=0,02$ ) (рисунок 10А). Тенденция к корреляционной зависимости выявлялась при низком качестве бластоцист ( $r=-0,62$ ;  $p_u=0,07$ ) (рисунок 10 С), при отрицательном исходе ЭКО ( $r=-0,55$ ;  $p_u=0,05$ ) (рисунок 10 D) и у женщин с максимальным числом ооцитов ( $r=-0,36$ ;  $p_u=0,1$ ) (рисунок 10 В). При этом уровень IL-6 не коррелировал с количеством CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток. Так, даже в группе с низким качеством бластоцист, в которой выявлялось одновременно высокое содержание IL-6 и низкое количество CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клеток, коэффициент корреляции между указанными параметрами составил  $r=0,22$ ;  $p_u=0,76$ .

Полученные данные демонстрируют, что в программе ЭКО женщины с наличием прогностически неблагоприятных факторов: большое количество фолликулов и ооцитов, низкое качество бластоцист и отсутствием беременности характеризуются более высоким содержанием IL-6, что сопряжено с низким количеством CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> в ФЖ.

### **Исследование взаимосвязи уровня IL-6 и свободной ДНК в фолликулярной жидкости женщин**

Известно, что IL-6 является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления, в связи с чем важно проанализировать возможное влияние IL-6 на высвобождение внеклеточной свДНК. Проведенное исследование взаимосвязи между концентрацией IL-6 и свДНК в ФЖ женщин в



зависимости от возраста женщины, формы и причины бесплодия не выявило значимых отличий. Далее было проанализировано наличие взаимосвязи между уровнем свДНК, IL-6 и параметрами, характеризующими фолликуло-/оогенез, эмбриогенез и исходы программы ЭКО. В результате данного анализа значимые отличия получены не были.

### **Исследование взаимосвязи уровня IL-8 и регуляторных клеток в фолликулярной жидкости женщин**

Показано, что IL-8 рекрутирует нейтрофилы из циркулирующей крови в локальное микроокружение. Интересно проанализировать оказывает ли влияние IL-8 на активность регуляторных клеток. Проведенное исследование взаимосвязи между концентрацией IL-8 и популяций FoxP3<sup>+</sup> клеток в ФЖ женщин в зависимости от возраста женщины, формы и причины бесплодия не выявило значимых отличий. Затем была проанализирована взаимосвязь между концентрацией регуляторных клеток, IL-8 и параметрами, характеризующими фолликуло-/оогенез, эмбриогенез и исходы программы ЭКО. В результате данного анализа значимые отличия получены не были.

### **Исследование взаимосвязи уровня IL-8 и свободной ДНК в фолликулярной жидкости женщин**

Известно, что активация экспрессии IL-8 в большинстве типов клеток контролируется транскрипционным фактором NF-kB [Hoeseletal., 2013]. За последние годы было показано, что активация ядерного NF-kB возможна через опосредованное влияние участков свободной ДНК (свДНК) [Mozzinietal., 2018]. Свободная ДНК в большом количестве может появляться в кровотоке в процессе апоптоза, некроза, а также нетоза (через механизм образования нейтрофильных ловушек (НВЛ)), что чаще всего происходит при наличии длительного воспаления и возрастных изменений [Брызгунова и др., 2015].

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. Чтобы проверить это предположение была исследована взаимосвязь между концентрацией IL-8 и свДНК в ФЖ женщин с различными параметрами фолликуло/оогенеза, раннего эмбриогенеза и исходами ЭКО. При этом между уровнем IL-8 и свДНК не выявлялось значимой корреляционной взаимосвязи ( $r_s = -0,5$ ;  $p > 0,05$ ). Исследование содержания свДНК и IL-8 в зависимости от возраста женщины, формы и причины бесплодия а также в зависимости от количества фолликулов/ооцитов и индекса оплодотворения не выявило значимых отличий, в связи с чем изучение взаимосвязи между уровнем свДНК, IL-8 и параметрами, характеризующими фолликуло-/оогенез, проводилось в общей группе пациенток.

На следующем этапе был проведен анализ взаимосвязи IL-8 с качеством эмбрионов на третьи сутки развития. Как описано выше, уровень IL-8 в группе с лучшим качеством 3-х суточных эмбрионов был в 1,6 раз выше, чем в оппозитной группе ( $p_u = 0,03$ ). Значимых различий в содержании свДНК в зависимости от качества эмбрионов на 3 сутки не отмечалось. При этом у женщин 1-ой группы между концентрацией IL-8 и уровнем свДНК выявлялась тенденция к обратной корреляционной зависимости ( $r_s = -0,26$ ;  $p_u = 0,06$ ) (рисунок 11А)

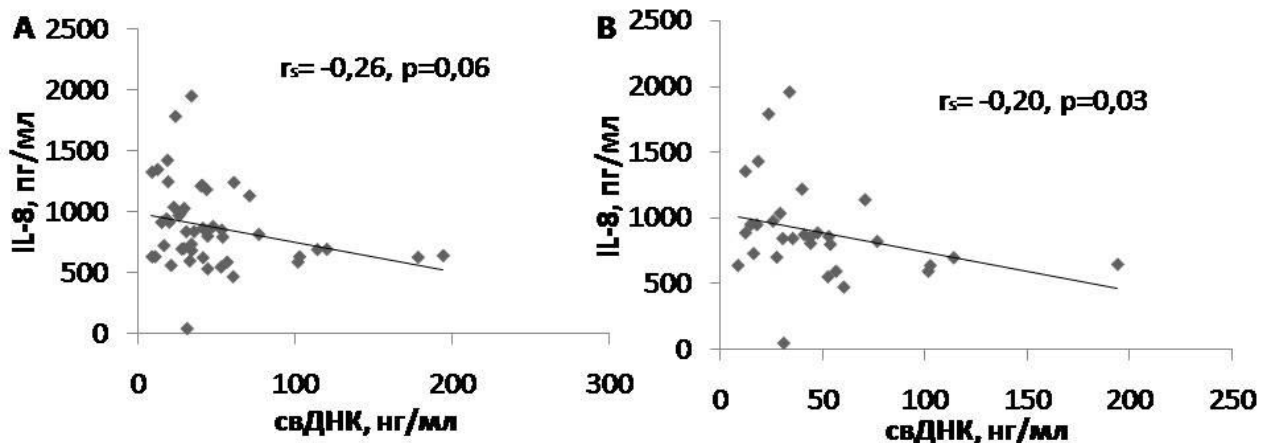


Рисунок 11 - Корреляционные взаимосвязи IL-8 и свДНК в фолликулярной жидкости женщин в цикле ЭКО. На рисунке представлена взаимосвязь А – с лучшим качеством эмбрионов на 3 сутки развития, В – с лучшим качеством бластоцист.

По качеству бластоцист женщины были разделены на 2 группы – с высоким качеством и низким качеством бластоцист. Анализ взаимосвязи между уровнем IL-8 и свДНК у женщин с лучшим качеством бластоцист выявил тенденцию к обратной корреляции ( $r_s = -0,2$ ;  $p_u = 0,03$ ) (рисунок 11В).

Учитывая отсутствие прямой корреляционной связи между IL-8 и свДНК, можно предположить, что данные факторы являются независимыми, имеют различную направленность и влияют на различные этапы репродуктивного процесса (более ранние для IL-8 и более поздние для свДНК). Однако при ретроспективном анализе взаимосвязи свДНК с уровнем IL-8, в том числе в группах, различающихся по количеству ооцитов, качеству эмбрионов и бластоцист и исходам беременности, прямой зависимости между концентрацией свДНК и IL-8 не выявлялось. Более того, в группах женщин с отличным качеством эмбриона и высоким качеством бластоцист, которые характеризовались более высоким содержанием IL-8, между концентрацией свДНК и уровнем IL-8 выявлялась слабая отрицательная корреляционная связь.

Результаты исследований, приведенные в этой главе, свидетельствуют о включенности цитокинов в процесс фолликулогенеза и раннего эмбриогенеза. Уровень IL-6 ассоциировался с наибольшим количеством фолликулов, низким индексом оплодотворения (на уровне тенденции), а также эмбрионами низкого качества и отсутствием беременности (на уровне тенденции) в программе ЭКО. В то время как высокий уровень IL-8 достоверно отличался при минимальном количестве фолликулов. Анализ связи уровня IL-6 и регуляторных клеток косвенно свидетельствуют в пользу того, что одной из возможных причин недостаточности CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток может являться повышенный уровень IL-6 в ФЖ, что подтверждают результаты корреляционного анализа.

### **3.4. Микровезикулы в фолликулярной жидкости женщин и их связь с клиническими и эмбриологическими параметрами**

Ранее показано, что микровезикулы выявляются во всех биологических жидкостях [Tkach et al., 2016; Lawson et al., 2016] и имеют высокую диагностическую значимость при ряде заболеваний, в том числе при патологии репродукции [Diez-Fraile et al., 2014; Sang et al., 2013]. В исследовании Saginiet.al было обнаружено, что МВ, выделенные из ФЖ, участвуют в процессе созревания фолликулов, мейозе ооцитов, стероидогенезе и профилактике полиспермии после оплодотворения [Saginiet.al, 2018]. А также показано участие МВ, происходящих от эмбриональных клеток, в формировании трофобласта во время имплантации [Göhner et al., 2017]. Однако исследования содержания МВ и их взаимосвязь с клиническими характеристиками и показателями оо- и эмбриогенеза в ФЖ женщин в программе ЭКО немногочисленны.

Анализ содержания МВ в ФЖ проводили по аналогии с описанными в предыдущих главах исследованиями уровня иммуноактивных факторов. Значимых отличий по содержанию МВ в ФЖ в группах пациенток и доноров, а также пациенток с разной причиной бесплодия, не выявлено. На основании этого данные группы были объединены при последующем анализе. Анализ образцов ФЖ женщин раннего (<35 лет) и позднего ( $\geq 35$  лет) репродуктивного возраста выявил статистически значимые различия в уровне популяций AnnV<sup>+</sup>МВ. Было выявлено, что в ФЖ женщин позднего репродуктивного возраста уровень AnnV<sup>+</sup>МВ был в 1,7, а AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>МВ в 1,3 раза выше, чем у женщин моложе 35 лет (таблица 10). Между возрастом женщин и содержанием AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> выявлялась тенденция к корреляции  $r(S)=0,34$ ,  $p_u=0,05$ . Полученные данные могут свидетельствовать о повышенном цитолитическом потенциале МВ у женщин в старшей возрастной группе

Таблица 10- Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин разных возрастных групп

Параметры MB (мкл)	Возраст женщины (лет)		p <sub>u</sub>
	<35 (n=26)	≥35 (n=11)	
AnnV <sup>+</sup>	24,6±3,4 20,6(11,8-30,7)	41,6±8,5 34,9 (22,8-51,4)	0,03
AnnV <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	12,1±1,7 9,3 (6,4-15,3)	16,8±3,8 14,7 (8,0-23,3)	0,19
AnnV <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	13,7±1,7 11,7 (6,9-18,6)	23,6±6,2 15,6 (12,5-28,7)	0,04
AnnV <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>	11,7±1,7 9,5 (6,2-11,7)	18,0±4,4 14,3 (9,1-21,7)	0,10
AnnV <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	19,6±2,9 15,7 (9,3-25,6)	29,9±7,3 24,2 (14,1-32,2)	0,12

Примечание: данные представлены в виде M± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Затем исследовали содержание MB у женщин в зависимости от формы и продолжительности бесплодия, значимых отличий выявлено не было, однако выявлялась прямая корреляция концентрации MB с длительностью бесплодия, а именно популяций: AnnV<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> r(S)=0,35, p=0,04; AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>, r(S)=0,34, p=0,05 (рисунок 12).

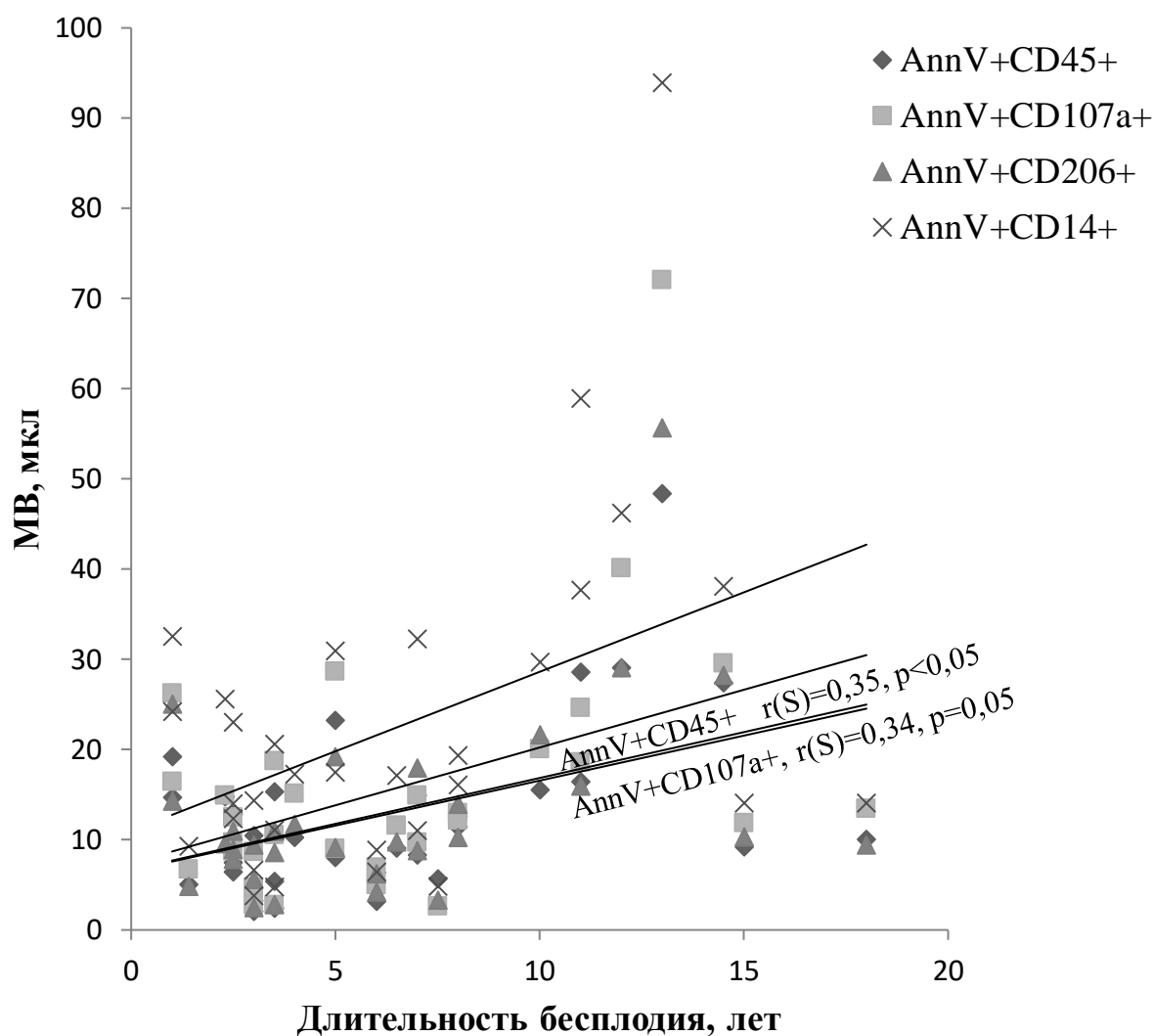


Рисунок 12 – Корреляция уровня популяций микровезикул в фолликулярной жидкости женщин и длительности бесплодия.

Данная связь, вероятно, обусловлена усилением апоптотических процессов на фоне длительного воспаления и гормональных дисфункций. Далее, учитывая факт снижения фолликулярного резерва с возрастом, исследовали содержание МВ в группах женщин с различным уровнем антимюллерового гормона (АМГ): 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) (таблица 11).

Таблица 11 - Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин с разным уровнем антимюллерового гормона

Параметры МВ (мкл)	Уровень АМГ (нг/мл)			
	< 1,0 (n=6)	1-6 (n=24)	>6,0 (n=7)	p <sub>u</sub>
	1	2	3	
AnnV <sup>+</sup>	34,0±6,8 38,5 (17,9-39,4)	28,5±5,1 21,9 (11,8-31,8)	24,6±3,9 21,0 (18,6-34,6)	1-2=0,62 1-3 = 0,24 2-3=0,69
AnnV <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	16,9±3,5 17,3 (8,3-23,3)	12,6±2,2 10,1 (6,0-14,7)	13,6±3,3 9,4 (7,3-23,3)	1-2=0,37 1-3=0,50 2-3=0,82
AnnV <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	22,3±4,9 23,2 (9,7-28,7)	14,5±2,9 12,0 (5,9-15,0)	16,4±3,2 13,3 (9,6-25,6)	1-2=0,24 1-3=0,32 2-3=0,74
AnnV <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>	18,6±3,5 20,4 (8,8-25,1)	12,5±2,5 9,5 (5,6-13,9)	13,2±2,9 10,9 (8,9-18,3)	1-2=0,25 1-3=0,25 2-3=0,88
AnnV <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	27,1±5,5 30,3 (12,3-32,5)	22,3±4,4 16,6 (7,7-24,9)	20,4±3,7 17,7 (13,9-27,8)	1-2=0,60 1-3=0,32 2-3=0,82

Примечание: данные представлены в виде М± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Анализ данных показал, что содержание МВ не зависел от уровня АМГ.

Известно, что данный гормон является одним из критериев оценки фолликулярного резерва женщины, но, тем не менее, важно проанализировать содержание МВ в зависимости от количества фолликулов, ответивших на стимуляцию и количестваполучаемых ооцитов при пункции яичников. Уровень МВ в зависимости от количества фолликулов и ооцитов достоверно не отличался. Большое количество полученных ооцитов не всегда обладает лучшим качеством, в связи с этим было проанализировано влияние уровня МВ на вероятность оплодотворения (таблица 12).



Таблица 12 - Абсолютное содержание МВ в ФЖ в зависимости от вероятности оплодотворения

Исследуемые популяции МВ (МВ/мкл)	>0,75 (n=17)	<0,75 (n=19)	p <sub>u</sub>
AnnV <sup>+</sup>	33,8±6,5 22,9 (17,8-42,8)	23,7±3,7 21,0 (11,8-30,7)	0,17
AnnV <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	15,9±2,9 14,7 (7,4-19,2)	10,8±1,6 9,0 (5,7-12,8)	0,12
AnnV <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	19,6±4,0 14,9 (9,6-26,2)	12,5±1,9 11,1 (6,7-14,9)	0,11
AnnV <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>	17,1±3,3 13,9 (8,9-19,2)	10,0±1,4 9,3 (5,6-10,3)	0,05
AnnV <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	27,3±5,4 20,6 (13,9-32,5)	18,4±3,2 15,4 (9,3-23,0)	0,15

Примечание: данные представлены в виде М± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Выявлено 1,5-кратное повышение содержания популяции AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> в ФЖ женщин, относящихся к группе с лучшим ИО, чем в группе с низким ИО, что проявлялось в виде тренда. При успешном оплодотворении наступает процесс раннего эмбриогенеза, зависящий от множества факторов, а в первую очередь от качества ооцита. Известно, что ооцит омывает окружающая ФЖ, совершая взаимообмен ооцита с окружающими клетками. Было проведено ретроспективное исследование влияния уровня МВ в ФЖ на качество получаемых бластоцист (таблица 13). Как следует из данных таблицы 13, уровень МВ в ФЖ женщин не зависел от качества бластоцист.

Таблица 13 - Абсолютное содержание МВ в ФЖ в зависимости от качества бластоцист

Исследуемые популяции МВ (МВ/мкл)	Отличного кач-ва (n=17)	Низкого кач-ва (n=8)	p <sub>u</sub>
AnnV <sup>+</sup>	31,7±4,9 30,7 (14,7-42,8)	36,1±11,9 23,0 (14,2-48,6)	0,6

Таблица 13 (продолжение) - Абсолютное содержание МВ в ФЖ в зависимости от качества бластоцист

Исследуемые популяции (МВ/мкл)	МВ	Отличного кач-ва (n=17)	Низкого кач-ва (n=8)	p <sub>u</sub>
AnnV <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>		14,4±2,4 12,8 (7,1-23,3)	17,4±5,3 12,4 (7,4-24,1)	0,5
AnnV <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>		15,5±2,5 12,5 (8,6-24,6)	23,7±8,1 16,0 (8,2-33,2)	0,2
AnnV <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>		13,2±2,4 9,5 (7,1-18,1)	18,7±6,2 11,3 (6,9-27,1)	0,3
AnnV <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>		24,3±4,1 23,0 (11,1-32,2)	29,9±10,3 19,1 (11,8-39,4)	0,5

Примечание: данные представлены в виде  $M \pm S.E.$ , медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Затем был проведен ретроспективный анализ уровня МВ у женщин с различными исходами ЭКО - с наступившей и прогрессирующей беременностью (клиническая беременность); с наступившей, но не развивающейся беременностью (биохимическая беременность) и с отрицательным исходом ЭКО (отсутствием беременности). Как следует из данных таблицы 14, женщины с наступившей беременностью характеризовались достоверно более высоким содержанием AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> и AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> в ФЖ по сравнению с женщинами с отрицательным исходом программы (таблица 14).

Таблица 14 - Абсолютное 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 <sub>u</sub>
	1	2	3	
AnnV <sup>+</sup>	32,3±9,5 27,8 (12,8-42,8)	34,9±6,7 30,7 (20,2-51,4)	20,5±4,8 15,7 (10,2-24,6)	<sub>1-2</sub> =0,8 <sub>1-3</sub> =0,2 <sub>2-3</sub> =0,11
AnnV <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	17,5±5,4 14,8 (6,4-27,4)	15,7±2,9 14,7 (8,3-19,2)	9,5±2,1 8,6 (4,1-11,7)	<sub>1-2</sub> =0,7 <sub>1-3</sub> =0,11 <sub>2-3</sub> =0,11
AnnV <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	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)	<sub>1-2</sub> =0,9 <sub>1-3</sub> =0,04 <sub>2-3</sub> =0,08
AnnV <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>	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)	<sub>1-2</sub> =0,7 <sub>1-3</sub> =0,02 <sub>2-3</sub> =0,03
AnnV <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	26,6±7,9 21,6 (11,1-38,1)	27,5±5,6 24,2 (15,4-32,5)	15,9±4,3 14,1 (5,7-19,0)	<sub>1-2</sub> =0,13 <sub>1-3</sub> =0,2 <sub>2-3</sub> =0,1

Примечание: данные представлены в виде М± S.E., медианы (Me), интерквартильного диапазона (LQ-UQ).; p<sub>u</sub>- U-критерий Манна-Уитни.

Таким образом, обнаружено повышение уровня AnnV<sup>+</sup> и AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> у женщин старшей возрастной группы. Большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем МВ: AnnV<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>, AnnV<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>. В то время как высокий уровень AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> отмечался в ФЖ женщин с высоким индексом оплодотворения и наступлением клинической беременности, что свидетельствует, о вовлечении иммуноактивных факторов ФЖ женщин в регуляции фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза.

### 3.5 Прогностические маркеры эффективности циклов ЭКО

В предыдущих разделах работы исследовано содержание Т-рег и иммуноактивных факторов в ФЖ и их связь с параметрами оо-/эмбриогенеза и наступлением беременности. Для выявления значимых параметров, которые можно рассматривать как прогностические маркеры эффективности циклов ЭКО, был проведен ROC- анализ (receiver operating characteristic). В основе данного статистического метода лежит построение ROC- кривой, как графического представления зависимости двух величин: чувствительности и специфичности.

Чувствительность (Se – sensitivity) отражает долю (%) правильно классифицированных положительных наблюдений. Соответственно, чем выше чувствительность, тем более надёжно классификатор распознаёт положительные примеры.

Специфичность (Sp – specify) модели отражает долю (%) истинно-отрицательных классификаций в общем числе отрицательных наблюдений. Следовательно, чем выше специфичность, тем более надёжно классификатор распознаёт отрицательные наблюдения.

Качество проведенного ROC- анализа оценивают как площадь под ROC- кривой - AUC (area under the curve). Значения AUC выше 0,7 свидетельствуют о хорошем качестве прогноза.

Проведенный анализ 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  $>34,7$  нг/мл позволяет прогнозировать отсутствие беременности со специфичностью 74,3% и чувствительностью 70,6%. (рисунок 13)

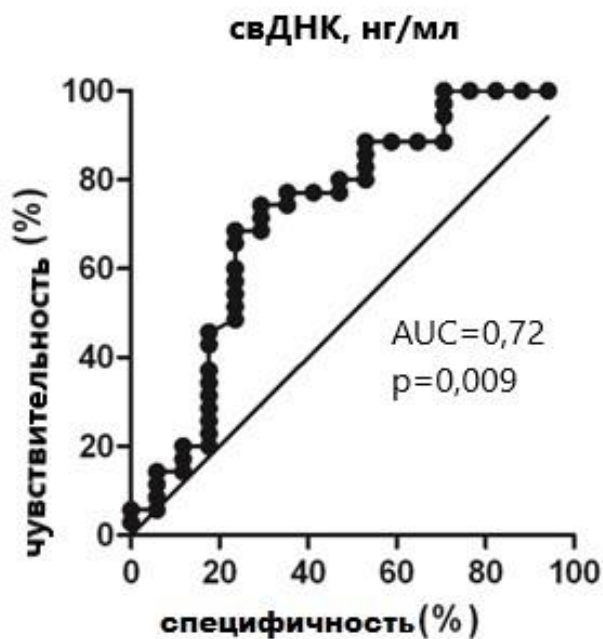


Рисунок 13 - ROC – анализ (receiver operating characteristic): свободной ДНК

Другими прогностическими маркерами могут являться показатели содержания в ФЖ микровезикул с фенотипом цитотоксических клеток (AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>) и M2 макрофагов (AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>).

Так, концентрация AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>>12,75 МВ/мкл в ФЖ позволяет прогнозировать наступление клинической беременности со специфичностью 75,0% и чувствительностью 61,9%. При этом площадь под кривой составила 0,73, что соответствует хорошему качеству прогноза (рисунок 14).

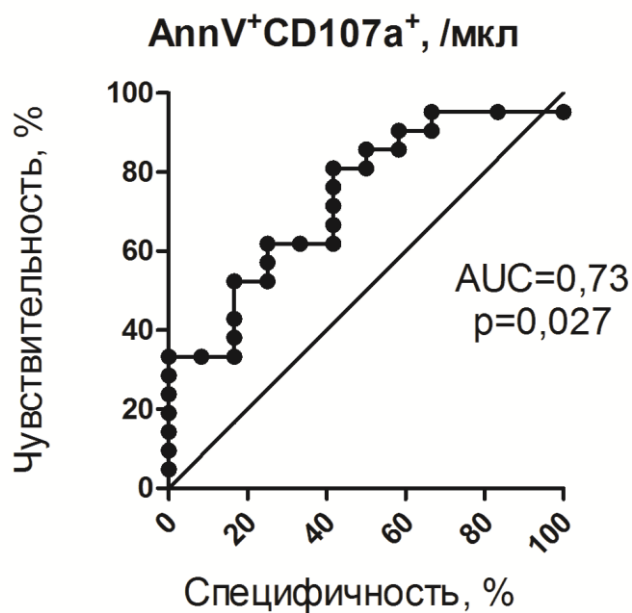


Рисунок 14 - ROC – анализ (receiver operating characteristic): AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>MB.

У женщин чаще регистрируется беременность при концентрации в ФЖ AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>>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 (рисунок15).

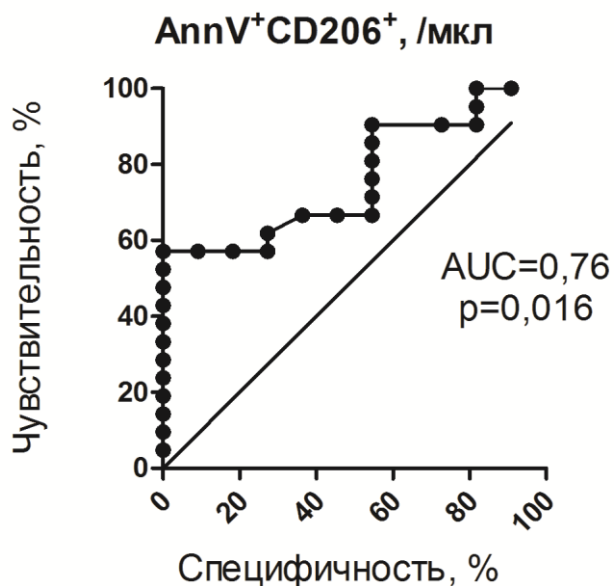


Рисунок15- ROC – анализ (receiver operating characteristic): AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>MB.

Концентрация  $\text{AnnV}^+\text{CD14}^+ > 14,85$  МВ/мкл в ФЖ также позволяет прогнозировать эффективность стимуляции суперовуляции и наступление клинической беременности со специфичностью 66,7% и чувствительностью 71,4%. Площадь под кривой составила 0,72, что свидетельствует о хорошем качестве прогноза (рисунок 16)

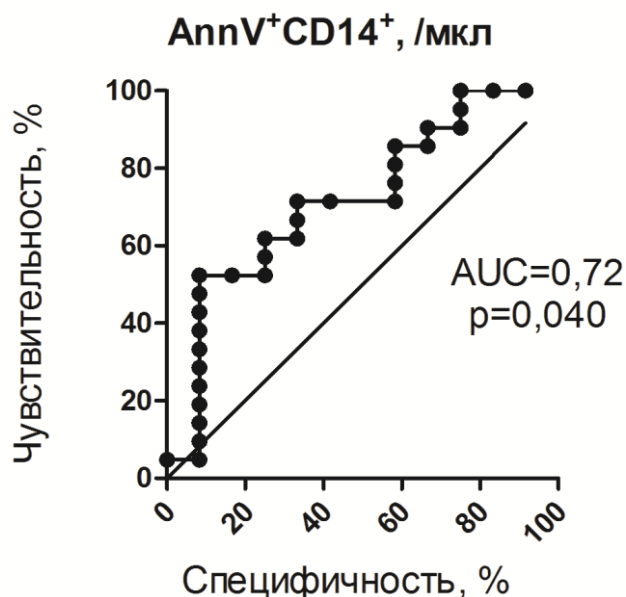


Рисунок16- ROC – анализ (receiver operating characteristic) -  $\text{AnnV}^+\text{CD14}^+$ .

Следовательно, уровни свДНК,  $\text{AnnV}^+\text{CD14}^+$ ,  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$ ,  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  МВмогут рассматриваться как возможные предикторы наступления беременности в программе ЭКО с хорошей прогностической значимостью.

Обнаруженные ранние прогностические маркеры наступления беременности расширяют представления о роли иммунной системы на этапе оогенеза и раннего эмбриогенеза, полученные данные имеют прогностическую ценность, что в будущем поможет скорректировать тактику лечения женщин с бесплодием в программах ЭКО.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день успех протоколов ВРТ по разным данным не превышают 50%, причем потери беременности в первом триместре достигают порядка 35% [Zhangetal.,2017]. Причины неудачных циклов ЭКО связывают, прежде всего, с низким качеством ооцитов и эмбрионов и последующим нарушением имплантации. Ранее было показано, что в ФЖ присутствуют различные популяции ИКК и цитокины, что предполагает их непосредственное участие в процессах оогенеза [Arruvitoetal.,2007;Yeetal., 2016;Kollmannetal., 2017]. Однако, данные о взаимосвязи ИКК, цитокинов и иммуноактивных факторов с параметрами оо/эмбриогенеза немногочисленны и противоречивы. В настоящей работе исследовано содержание регуляторных клеток, свДНК, МВ, цитокинов (IL-6, IL-8) в ФЖ у женщин с различными показателями овариальной функции, эмбриогенеза и исходами ЭКО.

В настоящее время представлены отрывочные исследования о влиянии FoxP3<sup>+</sup> клеток на репродуктивную систему. Помимо известных Т регуляторных клеток, выделяют В- клетки с экспрессией FoxP3<sup>+</sup>. В-регуляторные клетки представляют собой субпопуляцию лимфоцитов с регуляторными / супрессорными функциями, которые осуществляют периферическую толерантность. По данным Esteve-Solé., 2018 В-регуляторные клетки составляют менее 10% от популяции В-клеток [Esteve-Solé et al., 2018]. Данные об их роли в репродуктивном процессе отсутствуют. Тогда как исследования Т-регуляторных клеток связаны с изучением роли регуляторных Т клеток при физиологической беременности и/или ее осложнениях [Yang et al., 2009; Schlossberger et al., 2013; Zenclussen et al., 2015; Rahimzadeh et al., 2016; Jiang et al., 2017; Wangetal., 2017]. Представленные работы Zhouetal. и Schlossbergeretal. о взаимосвязи



циркулирующих  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-клеток с исходами ЭКО, противоречивы. По данным Zhouetal. повышенное содержание  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-клеток у женщин при проведении ЭКО ассоциировалось с наступлением беременности [Zhouetal.,2012], тогда как в работе Schlossbergeretal. данной взаимосвязи не обнаружено [Schlossberger et al., 2013]. Исследования, касающиеся содержания регуляторных клеток в ФЖи их сопряженности с созреванием ооцитов и формированием бластоцист отсутствуют. В данной работе впервые продемонстрировано наличие  $FoxP3^+$  клеток в ФЖ женщин, проходящих лечение методом ЭКО. Более того, показано, что в ФЖ содержатся как  $CD4^+FoxP3^+$ , так и  $CD4^-FoxP3^+$  -клетки, уровень которых был выше у женщин с высоким индексом оплодотворения, лучшим качеством 5-суточных эмбрионов и с клинической беременностью. Вероятно,  $CD4^-FoxP3^+$  -клетки представляют субпопуляцию В-регуляторных клеток или  $CD8^+FoxP3^+$  -рег, которые способны супрессировать эффекторные Т-клетки [Churlaudetal., 2015]. Процесс овуляции рассматривается как воспалительная реакция, при которой возрастает продукция провоспалительных цитокинов, в том числе IL-2 [Oakleyetal., 2010]. Поскольку  $CD8^+FoxP3^+$  Т-клетки в отличие от  $CD4^+FoxP3^+$  Т-клеток способны отвечать на низкие дозы IL-2 [Boymanetal., 2012], они могут иметь пролиферативное преимущество и первыми накапливаться в ФЖ к моменту овуляции.

В ФЖ у женщин с меньшим количеством овуляторных фолликулов выявлено детектируемое содержание  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  Т-клеток. Высокое содержание данной субпопуляции клеток у человека выявляется при аутоиммунных заболеваниях, и мнения исследователей в отношении природы этих клеток расходятся [Horwitz, 2010; Zóka et al., 2015]. Так, Yangetal. полагает, что  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  не являются Т-рег, и представляют недавно активированные Т-лимфоциты, транзиторно экспрессирующие FoxP3 [Yangetal., 2009]. Bonellietal., напротив, считает, что  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  клетки

представляют Т-рег с низкой супрессорной активностью, которые способны ингибировать только пролиферацию Т-клеток, но не продукцию IFN- $\gamma$  [Bonelli et al., 2009]. Однако, учитывая, что активированные Т-клетки и Т-рег экспрессируют CD25, остается непонятным, чем объясняется отсутствие данной молекулы. Miyara et al. при анализе ко-экспрессии CD45RA и CD25 молекул предположил, что CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -клетки включают две субпопуляции Т-рег, одни из которых (CD25-негативные) являются наивными клетками, а другие (CD25-позитивные) – относятся к Т-клеткам памяти [Miyara et al., 2009]. Возможно, что присутствующие в ФЖ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клетки представлены наивными Т-рег, обладающими меньшей супрессорной активностью [Bedke et al., 2010]. При таком рассмотрении можно полагать, что возрастание их численности в ФЖ компенсирует недостаточность супрессорной активности на этапе фолликулогенеза и оогенеза, однако является недостаточной для обеспечения полноценной толерантности при прогрессировании беременности.

Известно, что имплантация эмбриона является критической точкой при проведении ЭКО. Данный процесс во многом зависит от качества эмбрионов и индукции толерантности к аллоантигенам плода, в формировании которой непосредственное участие принимают регуляторные клетки. Учитывая при этом выявленную нами связь между качеством бластоцист и численностью FoxP3<sup>+</sup> -клеток, мы предположили, что содержание регуляторных клеток в ФЖ может в определенной степени отражать и эффективность ЭКО. Действительно, анализ между содержанием FoxP3<sup>+</sup> клеток в ФЖ и исходами ЭКО выявил взаимосвязь наступления клинической беременности с более высоким содержанием CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток. В свою очередь, отсутствие беременности было сопряжено с более высоким содержанием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток в ФЖ.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли различных субпопуляций FoxP3<sup>+</sup> клеток в контроле ранних этапов репродукции.

При этом сосредоточенные в популяции  $CD4^+FoxP3^+$  клетки, по-видимому, регулируют созревание ооцитов, и, наряду с  $CD4^+FoxP3^+$ , детерминируют эффективную бластуляцию и участвуют в поддержании беременности. В свою очередь, возрастание в ФЖ  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  -клеток, возможно, связано с блоком их дифференцировки в супрессорные Т-рег, что ассоциировано отрицательными исходами ЭКО.

Активация регуляторных клеток может контролироваться различными ИКК и цитокинами, в том числе IL-6, который обладает различными иммунорегуляторными свойствами [Korn et al., 2008; Fujimoto et al., 2011; Lin et al., 2012; Zhu et al., 2017]. По данным литературы IL-6 является ключевым фактором в переключении баланса Th17/FoxP3<sup>+</sup> -клеток, подавляя генерацию последних [Drescher et al., 2020]. Полученные нами данные, действительно, свидетельствуют об обратной взаимосвязи между числом  $CD4^+FoxP3^+$  -клеток и уровнем IL-6 в ФЖ. При этом сопряженность уровня IL-6 с количеством FoxP3<sup>+</sup> -клеток проявляется исключительно в отношении субпопуляции  $CD4^+$ , но не  $CD4^+$  -клеток. Аналогичные результаты получены Zhu et al. о снижении соотношения Т-рег/Th17 при одновременном повышении уровня IL-6 в крови у женщин с привычным невынашиванием [Zhu et al., 2017]. С. Более высокое содержание IL-6 в ФЖ, согласно нашим данным, регистрируется у женщин с очень большим количеством фолликулов, что сопровождается низким качеством ооцитов и бластоцист. Отсутствие беременности ассоциировано с высоким содержанием в ФЖ IL-6, что сопряжено с низким количеством интрафолликулярных  $CD4^+FoxP3^+$  -клеток. В исследовании Altun et al. отмечена связь высокой концентрации в ФЖ IL-6 с низким качеством ооцитов, эмбрионов и отрицательным исходом ЭКО, что согласуется с нашими данными [Altun et al., 2010].

Таким образом,  $CD4^+FoxP3^+$  -клетки оказывают позитивное влияние на этапы раннего репродуктивного процесса, и, возможно, одной из причин их неэффективности является повышенная концентрация в ФЖ IL-6.

Следующим важным разделом явился анализ сопряженности уровня свДНК в ФЖ с различными клиническими параметрами (овариальный резерв, причина и длительность бесплодия). Показано, что большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем свДНК, что может быть обусловлено усилением апоптотических процессов на фоне длительно протекающих воспалительных процессов и гормональных дисфункций [Czamanski-Cohen et al., 2014; Lynch et al., 2014]. В клинической практике одной из важнейших задач при подборе протокола стимуляции суперовуляции у женщин, находящихся в цикле ЭКО, является оценка овариального резерва. Выбор оптимального протокола позволяет получить достаточное количество ооцитов и, в последующем, эмбрионов лучшего качества. У пациенток с нарушениями овариального резерва подобная задача становится фактически неразрешимой. Известно, что овариальный резерв определяется по двум параметрам: уровню сывороточного АМГ и количеству АФ [Iwase et al., 2018]. Полученные нами данные выявили сопряженность овариального резерва женщин с уровнем свДНК. В частности, у женщин с повышенным уровнем АМГ ( $>6$  нг/мл) регистрировалась наиболее высокая концентрация свДНК, при этом между указанными параметрами обнаруживалась прямая корреляционная взаимосвязь. Это, по-видимому, связано со способностью АМГ (в высоких концентрациях) вызывать в клетках гранулёзы оксидативный стресс и индукцию Fas/FasL-опосредованного апоптоза, что сопровождается высвобождением свДНК [Guan et al., 2016]. Высокий уровень АМГ наиболее часто выявляется при большом количестве АФ у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) и мультифолликулярными яичниками (МФЯ). В настоящем исследовании продемонстрировано, что наличие большого числа АФ ( $>14$ ) у женщин ассоциируется с высокой концентрацией свДНК. Аналогичные результаты о повышении свДНК в ФЖ у женщин с большим количеством АФ при СПКЯ были получены в работе TraverS. [Traver et al., 2015]. В данном

исследовании также отмечено, что повышенный уровень свДНК может регистрироваться у женщин со сниженным овариальным резервом. В нашей работе такой взаимосвязи не обнаружено.

Одним из новых фактов, полученных в нашем исследовании, стали данные о сопряженности высоких концентраций свДНК с большим количеством овуляторных фолликулов. Это можно объясняется тем, что созревание большого количества фолликулов при стимуляции гонадотропинами сопровождается выраженными процессами апоптоза клеток гранулезы [Liu et al., 2011]. С другой стороны, по данным литературы крупные фолликулы с ооцитами высокого качества содержат меньше свДНК, чем мелкие фолликулы с незрелыми ооцитами [Scalici et al., 2014]. В наших исследованиях мы не выявили различий в концентрации свДНК в зависимости от количества ооцитов. Возможно, это связано с тем, что для исследований отбирали образцы ФЖ только из крупных фолликулов.

Проведенный анализ взаимосвязи свДНК с качеством эмбрионов показал, что низкое содержание свДНК выявляется у женщин с высоким качеством бластоцист, что, вероятно, связано с меньшим количеством фрагментированных бластомеров. Аналогичная взаимосвязь между высоким качеством эмбриона и низким содержанием свДНК в ФЖ, а также плазме крови выявлена и другими авторами [Czamanski-Cohen et al., 2013].

Эмбрионы хорошего качества с нормальной скоростью развития дают наиболее высокий процент успешной имплантации с последующей беременностью [Fűri et al., 2000]. Поэтому на следующем этапе мы провели ретроспективный анализ в группах женщин с клинической (прогрессирующей) и биохимической (замершей) беременностями. Полученные данные убедительно показали, что женщины с клинической беременностью характеризовались достоверно меньшим содержанием свДНК в ФЖ по сравнению с женщинами, у которых наступившая беременность прерывалась на ранних сроках (биохимическая беременность). Аналогичные

данные получены в работах Al-Salehetal. и Traveretal., которые отметили взаимосвязь между низким уровнем свДНК в ФЖ [Al-Salehetal., 2010; Traveretal., 2015], плазме крови [Czamanski-Cohenetal.,2013] и наступлением клинической беременности. Однако, авторы не представили данных о концентрациях свДНК у женщин с клинической и биохимической беременностями. В нашем исследовании было показано, что биохимическая беременность связана со значительно более высокими уровнями свДНК в ФЖ ( $>34,7/\text{мкл}$ ) по сравнению с клинической беременностью, что позволяет прогнозировать прогрессирование беременности. Проведенный ROC-анализ доказывает прогностическую значимость концентрации свДНК в ФЖ как прогностического биомаркера исхода беременности. В программах ЭКО присутствие эмбрионов отличного качества не всегда связано с успешной имплантацией и беременностью. Следовательно, определение уровня свДНК в ФЖ может служить дополнительным биомаркером для прогнозирования исхода ЭКО.

Известно, что свДНК в большом количестве может появляться в кровотоке в процессе апоптоза, некроза [Брызгунова и др., 2015], а также нетоза нейтрофилов [Konečná etal., 2018]. Было показано, что активированные нейтрофилы через механизм активации дыхательного взрыва и высвобождения активных форм кислорода выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры - «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (НВЛ), в составе которых присутствует свДНК [Hahnetal., 2012]. По данным литературы значительное количество НВЛ обнаруживается у женщин при бесплодии, внутриутробной гибели плода [Hahnetal., 2012] и при поздних осложнениях беременности (преэклампсии) [Guptaetal., 2010;Konečná etal., 2018;Huetaal., 2018]. Процесс образования НВЛ может регулироваться различными хемокинами, в том числе IL-8 [Palomino etal., 2015]. Поэтому была исследована взаимосвязь между содержанием IL-8 и уровнем свДНК на всех этапах оо/эмбриогенеза, но значимой

корреляционной зависимости выявлено не было. Следовательно, IL-8 не оказывает значимого влияния на выброс свДНК в процессе созревания ооцитов. Вероятно, свДНК в ФЖ образуется не столько вследствие нетоза нейтрофилов, сколько за счет апоптоза других клеток.

Известно, что IL-8 действуют не только как хемотаксический фактор, но и обладает выраженным ангиогенным и провоспалительным действием, что имеет важное значение в оо/эмбриогенезе. В нашем исследовании более высокий уровень IL-8 в ФЖ регистрировался у женщин с лучшим качеством эмбрионов на 3 и 5-сутки развития. Полученные результаты согласуются с исследованием Singhetal., в котором выявлена прямая взаимосвязь высокого уровня IL-8 в ФЖ у женщин с лучшим качеством эмбрионов и позитивным исходом ЭКО [Singhetal., 2016]. Однако, в нашем исследовании связи с наступлением клинической беременности не выявлено.

Фолликулогенез - сложный процесс, в ходе которого ИКК способны выбрасывать не только свДНК, но и другие иммуноактивные факторы, в том числе микровезикулы, экспрессирующие молекулы той клетки, из которой образовались. Однако, информация о секреции МВ во время фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбрионального развития представлена единичными работами [Ferreira etal., 2013]. В настоящем исследовании у всех женщин в ФЖ был выявлен детектируемый уровень  $AnnV^+CD107a^+$ ,  $AnnV^+CD45^+$ ,  $AnnV^+CD14^+$ ,  $AnnV^+CD206^+$  МВ. Уровень  $AnnV^+CD107a^+$  был выше у женщин старшего репродуктивного возраста, причем отмечалась прямая корреляционная зависимость возраста женщины и уровня  $AnnV^+CD107a^+$ . У женщин с длительным бесплодием регистрировался более высокий уровень  $AnnV^+CD107a^+$  и  $AnnV^+CD45^+$ , при этом продолжительность бесплодия прямо коррелировала с данными показателями. Вероятно, длительность бесплодного периода может быть связана с наличием вялотекущих хронических воспалительных процессов, что сопровождается активацией цитотоксических клеток.

Большее количество получаемых ооцитов во время пункции яичников женщины не всегда дает преимущество в наступлении беременности, вследствие того, что качество и способность к оплодотворению у ооцитов различаются. У женщин с более высоким индексом оплодотворения (ИО>0,75) отмечалось 1,5-кратное увеличение уровня AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> по сравнению с оппозитной группой с низким ИО. При ретроспективной оценке содержания МВ в ФЖ в группах женщин в зависимости от исходов ЭКО, был отмечен достоверно более высокий уровень AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> и AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> при наступлении клинической беременности. При этом были получены данные ROC анализа, позволяющие рассматривать содержание AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> и AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> в ФЖ как прогностические критерии наступления или отсутствия беременности. Так, уровни AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> >12,7МВ/мкл и AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> >9,6 МВ/мкл свидетельствуют о высокой вероятности наступления беременности в программе ЭКО.

В целом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о влиянии интрафолликулярных регуляторных клеток, свДНК и МВ на наиболее ранние этапы оо/эмбриогенеза, формирование эмбрионов высокого качества, и, в последующем, здоровую беременность. Выявление ранних прогностических биомаркеров качества получаемых эмбрионов и наступления беременности в будущем может дать платформу 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 свидетельствует 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, коррелирует с параметрами раннего эмбриогенеза. Более высокое содержание свДНК в ФЖ регистрируется у женщин с низким качеством бластоцист и отрицательным

исходом программы ЭКО. Проведенный ROC-анализ показал, что уровень ДНК в ФЖ  $<34,7$  нг/мл можно рассматривать как прогностический маркер наступления и прогрессирования беременности в программе ЭКО.

Важным результатом работы является обнаружение в ФЖ различных типов МВ:  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$ ,  $\text{AnnV}^+\text{CD45}^+$ ,  $\text{AnnV}^+\text{CD14}^+$ ,  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$ . При этом более высокий уровень  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  был выявлен у женщин старшего репродуктивного возраста и при длительном бесплодии. Получены новые данные о сопряженности уровней  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  и  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$  в ФЖ и клинической беременности. Проведенный ROC анализ позволил рассматривать содержание  $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$  ( $>12,7$  МВ/мкл) и  $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$  ( $>9,6$  МВ/мкл) в ФЖ как прогностические критерии наступления беременности в программе ЭКО.

Полученные данные расширили представления об участии регуляторных клеток, цитокинов (IL-6, IL-8) и иммуноактивных факторов (свДНК, МВ) на ранних этапах репродуктивного процесса и выявили новые прогностические биомаркеры, которые позволят оценить эффективность стимуляции суперовуляции и последующее наступление беременности.

## ВЫВОДЫ

1. В фолликулярной жидкости женщин выявляются различные субпопуляции FoxP3<sup>+</sup> регуляторных клеток (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), при этом более высокий уровень CD4<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> 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 бластоцист 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<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> и AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> MB сопряжено с наступлением беременности, что свидетельствует об участии MB в реализации эффектов иммунных клеток на ранних этапах репродуктивного процесса.
5. Относительное количество свДНК, AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>MB и AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> MB в фолликулярной жидкости женщин являются диагностически значимыми биомаркерами качества эмбриона и наступления беременности. При этом уровень свДНК <34,7 нг/мл, AnnV<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> - >9,6 MB/мкл и AnnV<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>

>12,7 МВ/мкл позволяет прогнозировать наступление беременности в циклах ЭКО.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ	Антимюллеров гормон
АФ	Антральные фолликулы
АПК	Антиген-презентирующие клетки
ВРТ	Вспомогательные репродуктивные технологии
ГнРГ	Гонадотропин-рилизинг-гормон
E <sub>2</sub>	Эстрадиол
ИКК	Иммунокомпетентные клетки
ИКСИ	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
ИО	Индекс оплодотворения
ЛГ	Лютеинизирующий гормон
МВ	Микровезикулы
НК–клетки	Клетки натуральные киллеры
НВЛ	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
свДНК	Свободная ДНК
СГЯ	Синдром гиперстимуляции яичников
Т-рег	Т-регуляторные клетки
ТТГ	Тиреотропный гормон
УЗИ	Ультразвуковое исследование
ФЖ	Фолликулярная жидкость
ФСГ	Фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	Человеческий хорионический гонадотропин
ЭКО	Экстракорпоральное оплодотворение
Ann	Аннексины (II, V)
ВМР	Костный морфогенетический белок-(4,5,7)
ССЛ	С-С хемокин (3, 7)
CD	Кластер дифференцировки

EGF	Эпидермальный фактор роста
FGF-2	Фактор роста фибробластов-2
FoxP3	Forkhead helix protein 3
GDF-9	Фактор роста и дифференциации - 9
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GV	Стадия герминативного пузырька
IFN-	Интерферон- ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
IGF	Инсулиноподобный фактор роста (I, II)
IL-	Интерлейкин (1, 2, 4, 6 и др.)
iT-reg	Индукцибельные Т-регуляторные клетки
LIF	Лейкемия-ингибирующий фактор
MCP-1	Моноцитарный хемотаксический протеин-1
M-CSF	Макрофагальный колониестимулирующий фактор
MHC I, II	Молекулы главного комплекса гистосовместимости (I и II класса)
MII	Метафаза второго мейоза
nT-reg	Наивные Т-регуляторные клетки
RANTES	<i>Фактор</i> , регулирующий активацию нормальной Т-клеточной экспрессии
SCF	Фактор роста стволовых клеток
STING	Молекулярный стимулятор интерфероновых генов
TGF	Фактор некроза опухоли ( $\alpha$ , $\beta$ )
Th1, Th2, Th17	Субпопуляции Т-хелперных клеток 1,2, 17 типов
TLR	Толл-подобные рецепторы
VEGF	Сосудистого эндотелиального фактора роста

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзикович, Б.И. Иммунологические аспекты регуляции ранних этапов репродуктивного процесса (обзор литературы) / Б.И. Айзикович, И.В. Айзикович, Н.А. Хонина // Проблемы репродукции. - 2005. – 11(6). – С. 7-13.
2. Баисова, Б.И Гинекология / Б.И. Баисова, В.Г. Бреусенко // под ред. Г.М. Савельевой . - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 37-46.
3. Баркалина Н.В. Фолликулярная жидкость и прогноз исходов программ ВРТ / Н.В. Бараклина // Проблемы репродукции. - 2006. – Н. 6. - С. 57-64.
4. Брызгунова, О.Е., Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике / О.Е. Брызгунова, П.П. Лактионов П.П. // Acta Naturae (русскаяязычная версия). - 2015. Н.3 (26). – С. 54-59.
5. Вартанян, Э.В. Влияние цитокинов фолликулярной жидкости на качество ооцитов у женщин с длительным бесплодием / Э.В. Вартанян, К.А. Цатурова, И.В. Айзикович // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2011. – Н. 6 - С. 45-48.
6. Есина, Е.В. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия (обзор литературы) / Е.В. Есина, О.С. Логина, О.С. Аляутдина // Русский медицинский журнал. – 2013. - Н. 1 - С. 44-48.
7. Козлов, В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии / В.А. Козлов // Медицинская иммунология. - 2013. - 1(5). – С. 399-412.
8. Кореньков, Д.А. Роль микрочастиц в межклеточной коммуникации / Д.А. Кореньков, О.М. Овчинникова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Цитология. – 2014. – 56(7). - С.480-488.

9. Корсак, В.С. Руководство по клинической эмбриологии / В.С. Корсак. - Москва.: МК, 2011. – С. 62-66.
10. Крылова, Ю.С. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации / Ю.С. Крылова, И.М. Кветной, Э.К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – 62(2). - С. 63-74.
11. Мотовилова, Н.О. Роль некоторых цитокинов в эффективности лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения / Н.О. Мотивилова, И.Ю. Коган, К.А. Сысоев, А.Н. Буйнова, А.Ю. Грязнов, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2012. – 14(4-5). - С. 373-382.
12. Пупышев, А.Б. Внеклеточные везикулы: межклеточный информационный поток и возможности его медицинского применения / А.Б. Пупышев // Цитология. – 2015.- 57(8). - С. 551-562.
13. Свиридова, С.В. Иммунорегуляторные субпопуляции Т-клеток при опухолевом росте и аллергических заболеваниях / С.В. Свиридова, В.В. Климов, А.А. Денисов, М.Н. Стахеев, М.В. Васильева, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. - 2010. - 3(39). - С. 38-47.
14. Сорочан, П.П. Регуляторные Т-клетки и новые стратегии противоопухолевой иммунотерапии / П.П. Сорочан, И.А. Громакова // Международный медицинский журнал. – 2009. – 2. - С. 85-90.
15. Токарева А.Г. Внеклеточные нуклеиновые кислоты плода в крови матери: характеристика, происхождение, значение для пренатальной диагностики. / А.Г. Токарева, И.Н. Лебедев, С.А. Назаренко, П.П. Лактионов // Медицинская генетика - 2006. - т.5. - 8(50). - С. 11-20.
16. Adashi, E. Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts (Serono Symposia USA) Springer book. 2013. – P. 67-75.



17. Aghajanova, L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation / L. Aghajanova // Ann N Y Acad Sci. - 2004. - Vol. 1034. - P. 176-183.
18. Agudelo, J-S.H. Cell-Derived Microvesicles Regulate an Internal Pro-Inflammatory Program in Activated Macrophages. / J-S.H Agudelo, T.T Braga, M.T. Amano., M.A. Cenedeze, R.A. Cavinato, A.R. Peixoto-Santos, M.N. Muscará, S.A. Teixeira, M.C. Cruz, A. Castoldi, A. Sinigaglia-Coimbra, A. Pacheco-Silva, D.C. Almeida, N-O.S. Camara // Mesenchymal Stromal Front Immunol. – 2017. - Vol. 8(881). Published online. doi: 10.3389/fimmu.2017.00881.
19. Ahmadi M. Sirolimus as a new drug to treat RIF patients with elevated Th17/Treg ratio: A double-blind, phase II randomized clinical trial / M. Ahmadi, S. Abdolmohamadi-vahid, M. Ghaebi, S. Dolati, S. Abbaspour-Aghdam, S. Danaii, K. Berjis, R. Madadi-Javid, Z. Nour, H. Siahmansour, Z. Babaloo, M. Nouri, M.Yousefi // International Immunopharmacology. – 2019. - Vol. 74. – art. 105730
20. Akyurekli, C. Richardson R.B. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles / C. Akyurekli, Y. Le, R.B. Richardson, D. Fergusson, J. Tay, D.S. Allan // Stem Cell Rev. – 2015. – Vol. 11. – P. 150–60.
21. Alghamdi A.S. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis / A.S. Alghamdi, D.N. Foster, C.S. Carlson, et al. // Am J Reprod Immunol. – 2005. – Vol. 53(5). – P. 230-7.
22. Almeida, E.A., Matrix survival signaling from fibronectin via focal adhesion kinase to C-Jun N-terminal kinase / E.A. Almeida, D. Ilić, Q. Han, C.R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D.D. Schlaepfer, C.H. Damsky // J. Cell Biol. – 2000. - Vol. 149(3). - P. 741–754.
23. Al-Saleh, I., Levels of DNA adducts in the blood and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization treatment and its correlation with the

- pregnancy outcome / I. Al-Saleh, I. El-Doush, J. Arif, S. Coskun, K. Jaroudi, A. Al-Shahrani, G. El-Din Mohamed / Bull Environ Contam Toxicol. - 2010. –Vol. 84(1). - P. 23-28.
- 24.Alter, G. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity / G. Alter, J.M. Malenfant, M. Altfeld // J. Immunol. Methods. – 2004. – Vol. 294(1-2). - P. 15-22.
  - 25.Altun, T. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. / T. Altun, S. Jindal, K. Greenheid, J. Shu, L. Pal L. // J. Assist. Reprod. Genet. - 2010. – Vol. 28(3). – P. 245-51.
  26. Aluvihare V.R. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus / V.R. Aluvihare, M. Kallikourdis, A.G. Betz // Nat Immunol. – 2004. – Vol. 5(3). – P. 266-71.
  - 27.Andronico F. Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation / F. Andronico, R. Battaglia, M. Ragusa, D. Barbagallo, M. Purrello, C.Pietro // Int J Mol Sci. - 2019. - Vol. 20. - art. 2162.
  - 28.Arispe, N. Similarity in Calcium Channel Activity of Annexin V and Matrix Vesicles in Planar Lipid Bilayers / N. Arispe, E. Rojas, B.R. Genge, L.N. Wu, R.E. Wuthier // Biophysical Journal. - 1996. - Vol. 71(4). - P. 1764-1775.
  - 29.Arruvito, L. Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction / L. Arruvito, M. Sanz, A.H. Banham, L.Fainboim // The Journal of Immunology. – 2007. -Vol. 178(4). - P. 2572 – 2578.
  - 30.Bacchetta, R. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation / R. Bacchetta, F. Barzaghi, M.G. Roncarolo // Ann. N Y Acad Sci. - 2018. – Vol. 1417(1). - P. 5-22.

31. Baig, S. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia / S. Baig, N. Kothandaraman, J. Manikandan, et al., // Clin Proteomics. – 2014. – Vol. 11(1). – P. 40.
32. Bao S.H., Decidual CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. // S.H. Bao, X.P. Wang, Q. De Lin, et al. // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2011. – Vol. 155(1). – P. 94-8.
33. Barber, G. STING: infection, inflammation and cancer / G. Barber // Nat Rev Immunol. – 2015. – Vol. 15(12). – P. 760–770.
34. Battaglia R., Palini S., Vento M.E., La Ferlita A., Lo Faro M.J., Caroppo E., Borzì P., Falzone L., Barbagallo D., Ragusa M., et al. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. Sci. Rep. 2019. – Vol. 9(84). doi: 10.1038/s41598-018-36452-7.
35. Bedke, T. Endothelial cells augment the suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: involvement of programmed death-1 and IL-10. / T. Bedke, L. Pretsch, S. Karakhanova, et al. // J Immunol. – 2010. – Vol. 184(10). – P. 5562-70.
36. Boeckel, S.R. Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth / S.R. Boeckel, D.J. Davidson, J.E. Norman, S. Stock // Reproduction. – 2017. – Vol. 155(3). – P. R137–R145.
37. Boissière, A. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility / A. Boissière, A. Gala, A. Ferrières-Hoa, et al. // S.. Basic Clin Androl. – 2017. – Vol. 27. – P.7.
38. Bonelli, M. Phenotypic and functional analysis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells in patients with systemic lupus erythematosus / M. Bonelli, A. Savitskaya, C.W. Steiner, et al. // J Immunol. – 2009. – Vol. 182(3). – P. 1689-95.

- 39.Boots, C.E., Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics / C.E. Boots, E.S. Jungheim / Semin Reprod Med. - 2015. – Vol. 33(4). - P. 270-275.
- 40.Bouter, A. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. / A. Bouter, R. Carmeille, C. Gounou, F. Bouvet, S.A. Degrelle, D. Evain-Brion, A.R. Brisson // Placenta. – 2015. 36 Suppl 1. - S43–49.
- 41.Boyman, O. Homeostatic maintenance of T cells and natural killer cells /O. Boyman, C. Krieg, D. Homann, // J. Cell Mol Life Sci. – 2012. – Vol. 69(10). – P. 1597-608.
- 42.Buculmez, O. Leukocytes in ovarian function / O. Buculmez, A. Arici // Hum.Reprod.. – 2000. –Vol. 6(1). - P. 1-15.
- 43.Bukovsky, A. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial / A. Bukovsky, M.R. Caudle // Reprod Biol Endocrinol. - 2012. –Vol. 10. – P. 97.
- 44.Cai, X. Regulatory B cells in inflammatory diseases and tumor / X. Cai, L. Zhang, W. Wei // Int Immunopharmacol. – 2019. – Vol. 67. – P. 281-286.
- 45.Carmeille, R. Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts / R. Carmeille, S.A. Degrelle, L.Plawinski, F. Bouvet, C. Gounou, D. Evain-Brion, A.R. Brisson, A. Bouter // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1853(9). – P. 2033-44.
- 46.Castro, F.C. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility/ F.C. Castro, M.H. Cruz., C.L. Leal //Asian-Australas J.Anim. Sci. – 2016. - Vol. 29(8). - P.1065–74.
- 47.Chakraborty, S. Transcriptional regulation of FOXP3 requires integrated activation of both promoter and CNS regions in tumor-induced CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Treg cells / S. Chakraborty, A.K. Panda, S. Bose, D. Roy, K. Kajal., D. Guha, G. Sa // Sci Rep. - 2017. - Scientific Reports 7, Article number: 1628 (2017).

48. Chaput, N. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites / N. Chaput, G. Darrasse-Jèze, A.S. Bergot, C. Cordier, S. Ngo-Abdalla, D. Klatzmann, O. Azogui // J Immunol. – 2007. - Vol. 179(8). - P. 4969-78.
49. Chaveeva, P. New screening method for aneuploidies based on analysis of cell-free DNA in the maternal blood / P. Chaveeva, M. Yankova, T. Milachich, T. Timeva, V. Stratieva, A. Shterev // Akush Ginekol. - 2015. - Vol. 54(2). - P. 3-7.
50. Chaves, R.N. The fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis / R.N. Chaves, M.H. Matos, J.J. Buratini, J.R. Figueiredo // Reprod Fertil Dev. – 2012. – Vol. 24(7). – P. 905–15.
51. Chen, S.U. Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: Dopamine targets their common pathways / S.U. Chen, C.H. Chou, C.W. Lin, H. Lee, J.C. Wu, H.F. Lu, C.D. Chen, Y.S. Yang // Hum Reprod. – 2010. – Vol. 25(3). – P. 757–67.
52. Churlaud, G. Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy / G. Churlaud, F. Pitoiset, F. Jebbawi, et al. // Front Immunol. – 2015. – Vol. 6. – P.171.
53. Czamanski-Cohen J. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment / J. Czamanski-Cohen, O. Sarid, J. Cwikel et al. // Arch Womens Ment Health. – 2014. - 17(3). – P. 251-3.
54. Dabagh-Gorjani, F. Differences in the expression of TLRs and inflammatory cytokines in pre-eclamptic compared with healthy pregnant women / F. Dabagh-Gorjani, F. Anvari, J. Zolghadri, E. Kamali-Sarvestani, B. Gharesi-Fard // Iran J Immunol. – 2014. – Vol. 11(4). - P. 233–45.
55. Desrochers, L.M. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation / L.M.

- Desrochers, F. Bordeleau, C.A. Reinhart-King, R.A. Cerione, M.A. Antonyak // *Nat Commun.* - 2016. – Vol. 7. – P. 11958.
- 56.Devjak R., Embryo quality predictive models based on cumulus cells gene expression / R. Devjak, T.B. Papler, I. Verdenik, K.F. Tacer, E.V. Bokal // *Balkan J Med Genet.* – 2016. – Vol. 19(1). – P. 5–12.
- 57.Dewailly, D., Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary / D. Dewailly, G. Robin, M. Peigne, C. Decanter., P. Pigny, S. Catteau-Jonard // *Hum Reprod Update.*- 2016. –Vol. 22(6). – P. 709-24.
- 58.Diez-Fraile, A. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization / A. Diez-Fraile, T. Lammens, K. Tilleman., W. Witkowski, B. Verhasselt, P. De Sutter, Y. Benoit, M. Espeel, K. D'Herde // *Hum Fertil.* -2014. – Vol.17(2). – P. 90-8.
- 59.Dignat-George, F. The many faces of endothelial microparticles / F. Dignat-George, C.M. Boulanger / *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2011. – Vol. 31(1). – P. 27-33.
- 60.Dimopoulou, M. Follicular Fluid Oocyte / Cumulus-Free DNA Concentrations as a Potential Biomolecular Marker of Embryo Quality and IVF Outcome / M. Dimopoulou, G. Anifandis, C.I. Messini, K. Dafopoulos, S. Kouris, S. Sotiriou, M. Satra, N. Vamvakopoulos, I.E. Messinis / *BioMed Research International.* –2014. – Vol. 2014. – article ID. – P. 5 page
- 61.Dimova, T. Maternal Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples / T. Dimova, O. Nagaeva, A.C. Stenqvist, M. Hedlund, L. Kjellberg, L. Mincheva-Nilsson // *Am. J. Reprod. Immunol.* - 2011. – Vol. 66(1). – P. 44–56.

62. Distler, J.H. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages / J.H. Distler, L.C. Huber, A.J. Hueber, C.F. Reich, S. Gay, O. Distler, D.S. Pisetsky // *Apoptosis*. — 2005. — Vol. 10(4). — P. 731—41.
63. Drescher, H.K. Intrahepatic T<sub>H</sub>17/T<sub>Reg</sub> cells in homeostasis and disease-It's all about the balance. / H.K. Drescher, L.M. Bartsch, S. Weiskirchen, R. Weiskirchen. // *Front Pharmacol*. — 2020. — Vol.11. — P.588436.
64. Du, M.R. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal–fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells / M.R. Du, P.F. Guo, H.L. Piao, S.C. Wang, C. Sun, L.P. Jin, Y. Tao, Y.H. Li, D. Zhang, R. Zhu, Q. Fu // *J Immunol*. - 2014. - Vol. 192(4). - P. 1502–11.
65. Duncan, WC. The human corpus luteum: reduction in macrophages during simulated maternal recognition of pregnancy / W.C. Duncan, F.E. Rodger, P.J. Illingworth // *Hum Reprod*. — 1998. — Vol. 13(9). —P. 2435–42.
66. Ebner, T. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome / T. Ebner, C. Yaman, M. Moser, M. Sommergruber, W. Pölz, G. Tews // *Fertil Steril*. — 2001. — Vol. 76(2). — P. 281-5.
67. Enninga, E.A. Immune reactivation by cell-free fetal DNA in healthy pregnancies re-purposed to target tumors: novel checkpoint inhibition in cancer / E.A. Enninga, W.K. Nevala, S.G. Holtan, S.N. Markovic // *Therapeutics Front Immunol*. - 2015. —Vol. 6. — P. 424.
68. Espy, L. Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis / L. Espy // *Biol. Reprod*. - 1980. —Vol. 22(1). —P. 73-106.
69. Esteve-Solé, A. B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life / A. Esteve-Solé, Y. Luo, A. Vlagea, et al. // *Int. J. Mol. Sci*. — 2018. — Vol. 19(7). — P. 2099.
70. Farina, A. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks gestation: a preliminary approach to a new

- marker for genetic screening / A. Farina, E. Caramelli, M. Concu., / *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22(2). – P. 148-52.
71. Field, S. Cytokines in Ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation / S. Field, T. Dasgupta, M. Cummings, N.M. Orsi // *Molecular reproduction and development.* – 2014. – Vol. 81(4). – P. 284-314.
72. Fontenot, J.D. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FOXP3 / J.D. Fontenot, J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, A.Y. Rudensky // *Immunity.* – 2005. – Vol. 22(3). – P. 329–41.
73. Fu, B. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. / B. Fu, X. Li, R. Sun, X. Tong, B. Ling, Z. Tian // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110(3). – P. E231-40.
74. Fujimoto, M. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. / M. Fujimoto, M. Nakano, F. Terabe, H. Kawahata, T. Ohkawara, Y. Han, B. Ripley, S. Serada, T. Nishikawa, A. Kimura, S. Nomura, T. Kishimoto, T. Naka // *J Immunol.* – 2011. – Vol. 186(1). – P: 32-40.
75. Gaafar, T.M. Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome / T.M. Gaafar, M.O. Hanna, M.R. Hammady, H.M. Amr., O.M. Osman, A. Nasef, A.M. Osman // *Immunol Invest.* – 2014. – Vol. 43(6). – P. 572-84.
76. Gardiner C. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis / C. Gardiner, Y.J. Ferreira, R.A. Dragovic, et al. // *J Extracell Vesicles.* – 2013 eCollection. – Vol. 2.
77. Gardner D.K. Culture and transfer of human blastocysts / D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 1999. – Vol. 11(3). – P. 307-11.



78. Gazvani, M.R. Follicular fluid concentrations of interleukin-12 and interleukin-8 in IVF cycles. / M.R. Gazvani, M. Bates, G. Vince, S. Christmas, D.I. Lewis-Jones, C. Kingsland. // *Fertil Steril.* – 2000. – Vol. 74(5). – P: 953-8.
79. Gekas, J. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosome abnormalities: review of clinical and ethical issues / J. Gekas, S. Langlois, V. Ravitsky, F. Audibert, D. Gradus, H. Haidar, F. Rousseau // *Appl Clin Genet.* – 2016. – Vol. 9. – P. 15–26.
80. Ghaffari, N. The relationship between transcript expression levels of nuclear encoded (TFAM, NRF1) and mitochondrial encoded (MT-CO1) genes in single human oocytes during oocyte maturation / N. Ghaffari, A. Allahveisi, M. Noruzinia, F. Farhadiar, E. Yousefian, A. Dehghani Fard, M. Salimi // *BJMG.* -2015. – Vol. 18(1). – P. 39 – 45.
81. Gil, M.M. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis / M.M Gil, M.S. Quezada, R. Revello, R. Akolekar, K.H. Nicolaides // *Ultrasound Obstet Gynecol.* - 2015. - Vol. 45(3). - P. 249-266.
82. Gilani, S.I. Preeclampsia and Extracellular Vesicles. / S.I Gilani, T.L. Weissgerber, V.D. Garovic, M. Jayachandran // *Curr Hypertens Rep.* -2016. – Vol. 18(9). – P. 68.
83. Gizzo, S. Serum Stem Cell Factor Assay in Elderly Poor Responder Patients Undergoing IVF: A New Biomarker to Customize Follicle Aspiration Cycle by Cycle / S. Gizzo, M. Quaranta, A. Andrisani, L. Bordin, A. Vitagliano, F. Esposito, R. Venturella, C. Zicchina, M. Gangemi, M. Noventa // *Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 23(1). – P.61-8.
84. Gleicher, N. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. / N. Gleicher, A. Vidali, D.H. Barad. // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95(6). – P. 13-7.

85. Gode, F. Influence of follicular fluid GDF-9 and BMP-15 on embryo quality / F. Gode, B. Gulekli, E. Dogan, P. Korhan, S. Dogan, O. Bige, D.A. Cimrin // *Fertil Steril.* - 2011. – Vol. 95. - P. 2274–8.
86. Göhner, C. Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia. / C. Göhner, T. Plösch, M.M. Faas // *Placenta.* - 2017. – Vol. 60. – Suppl.1 – P. S41-S51.
87. Gross, J.C. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. / J.C. Gross, V. Chaudhary, K. Bartscherer, M. Boutros // *Nat Cell Biol.* – 2012. – Vol. 14. – P. 1036–45.
88. Grossman, W. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death / W. Grossman, J.M. Verbsky, W. Barchet // *Immunity.* - 2004. - Vol. 21(4). - P. 589-601.
89. Guan, Y. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress / Y. Guan, W. Zhang, X. Wang, P. Cai, Q. Jia, W. Zhao / *Clin Chim Acta.* - 2017. – Vol. 473. – P. 213-7.
90. Günther, V. The role of interleukin-18 in serum and follicular fluid during in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection / V. Günther, I. Alkatout, C. Fuhs, A. Salmassi, L. Mettler, J. Hedderich, N. Maass, M. Ellessawy, A.G. Schmutzler, C. Eckmann-Scholz // *Biomed Res Int.* – 2016. – Vol. 2016. - Article ID 6379850. 8 pages
91. Gupta A.K. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. A.K. Gupta, M.B. Joshi, M. Philippova et al. // *FEBS Lett.* -2010. – Vol. 584(14). – P. 3193-7.
92. Gutman, G. Interleukin-18 is high in the serum of IVF pregnancies with ovarian hyperstimulation syndrome / G. Gutman, L. Soussan-Gutman, M. Malcov, J.B. Lessing, A. Amit, F. Azem // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2004. – Vol. 51(5). - P. 381-4.
93. Gyorgy, B. Detection and isolation of cell-derived microparticles and compromised by protein complexes resulting from shared biophysical

- parameters / B. Gyorgy, K. Modos, E. Pallinger, K. Paloczi, M. Paloczi, P. Misjak, M.A. Deli, A. Sipos, A. Szalai, I. Voszka, A. Polgar, K. Toth, M. Csete, G. Nagy, S. Gay, A. Falus, A. Kittel, E.I. Buzas // *Blood*. – 2011. – Vol. 117(4). – P. e39-48.
94. Hahn, S. Non-invasive prenatal diagnostics using next generation sequencing: technical, legal and social challenges / S. Hahn, I. Hösli, O. Lapaire // *Expert Opin Med Diagn*. – 2012. – Vol. 6(6). – P. 517-28.
  95. Hankins, H.M. Role of flippases, scramblases, and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution / H.M. Hankins, R.D. Baldrige, P. Xu, T.R. Graham // *Traffic*. – 2015. – Vol. 16(1). – P. 35–47.
  96. Henao, A.J.H. Mesenchymal stromal cell-derived microvesicles regulate an internal pro-inflammatory program in activated macrophages / A.J.H. Henao, T.T. Braga, M.T. Amano, M.A. Cenedeze, R.A. Cavinato, A.R. Peixoto-Santos, M.N. Muscará, S.A. Teixeira, M.C. Cruz, A. Castoldi, A. Sinigaglia-Coimbra, A. Pacheco-Silva, D. Almeida, N.O. Camara // *Front Immunol*. – 2017. – Vol. 8. - P. 881.
  97. Hennet, M.L. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation / M.L. Hennet, C.M. Combelles. // *Int. J. Dev. Biol*. – 2012. - Vol. 56 - P 819-31.
  98. Himmel, M.E. Human CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. / M.E. Himmel, S.Q. Crome, S. Ivison, C. Piccirillo, T.S. Steiner, M.K. Levings. // *Eur J Immunol*. – 2011. – Vol. 41(2). – P. 306-12.
  99. Ho, P. C. Lymphocytes subsets in patients with estrogen deficiency / P.C. Ho, G.W. Tang, J.W.M. Lawton // *J. Reprod. Immunol*. - 1991. -Vol. 20(1). - P. 85–91.
  100. Hoesel, B. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. / B. Hoesel, J.A. Schmid // *Mol Cancer*. – 2013. – Vol. 2(12). – P. 86.

101. Hoque, M.O. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection / M.O. Hoque, S.Begum, O. Topaloglu, A. Chatterjee, E. Rosenbaum, W. Van Criekinge // J Natl Cancer Inst. – 2006. – Vol. 98(14). – P. – 996-1004.
102. Horwitz, D.A. Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE. / D.A. Horwitz // Arthritis Res Ther. – 2010. – Vol. 12(1). – P. 101.
103. Hosseini, S. A shift in the balance of T17 and Treg cells in menstrual blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion / S. Hosseini, F. Shokri, A.S. Pour, M. Jeddi-Tehrani, S. Nikoo, M. Yousefi, A.H. Zarnani // J Reprod Immunol. - 2016. - Vol. 116. - P. 13-22.
104. Huang G., Evaluation of in vitro fertilization outcomes using interleukin-8 in culture medium of human preimplantation embryos / G. Huang, C. Zhou, C.J. Wei et al. // Fertil Steril. – 2017. – Vol. 107(3). – P. 649-56.
105. Hwang, I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. / I. Hwang. // Mol Cells. – 2013. – Vol. 36. – P. 105–11.
106. Irving-Rodgers, H.F. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. / H.F Irving-Rodgers, I.L. Wezel, M.L. Mussard., J.E. Kinder, R.J. Rodgers. // Reproduction. – 2001. – Vol. 122(5). – P. 761-75.
107. Iwase A. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies / A. Iwase, S. Osuka, M. Goto et al. // J Obstet Gynaecol Res. – 2018. Vol. 44(6). – P. 998-1006.
108. Jasper, M.J. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. / M.J. Jasper, K.P. Tremellen, S.A. Robertson. // Mol Hum Reprod. – 2006. – Vol. 12(5). - P:301-8.
109. Jiang, R. Abnormal ratio of CD57+ cells to CD56+ cells in women with recurrent implantation failure / R. Jiang, G. Yan, J. Xing, Z. Wang, Y.

- Liu, H. Wu, X. Fan, J. Zhou, L. Ding, H. Sun // *Am J Reprod Immunol.* – 2017. – Vol. 78(5). – P. e12777.
110. Jiang, S. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. / S. Jiang, C. Li, V. Olive, E. Lykken, F. Feng, J. Sevilla, Y. Wan, L. He, Q.J. Li. // *Blood.* – 2011. – Vol. 118(20). – P. 5487-97.
111. Kallikourdis, M. Alloantigen enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus / M. Kallikourdis, K.G. Andersen, K.A. Welch, A.G. Betz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104(2). – P. 594–9.
112. Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus / *Reprod Domest Anim.* – 2012. – Vol. 47. Suppl 5. – P. 31-41.
113. Kawano, Y. The effect of inflammatory cytokines on secretion of macrophage colony-stimulating factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human granulosa cells / Y. Kawano, J. Fukuda, H. Itoh, N. Takai, K. Nasu, I. Miyakawa // *Am J Reprod Immunol.* – 2004. - Vol. 52(2). - P.124-8.
114. Khan L. Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment / L. Khan, S. Bhatti, L. Khan, S. Abbas, Z. Munir, R.K. Sherwani, S. Suhail, Z. Hassan, H. Aydin // *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* – 2019. - Vol. 48(7). – P. 30064-9. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.08.007
115. Kiniwa, Y. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. / Y. Kiniwa, Y. Miyahara, H.Y. Wang, W. Peng, G. Peng, T.M. Wheeler, T.C. Thompson, L.J. Old, R.F. Wang. // *Clin Cancer Res.* – 2007. - Vol. 13(23). - P. 6947-58.
116. Knight, P.G. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development /P.G. Knight, C. Glister // *Anim Reprod Sci.* – 2003. – Vol. 78(3-4). – P. 165-83.

117. Knöfler, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion / M. Knöfler // *Int J Dev Biol.* – 2010. – Vol. 54. – P. 269–280.
118. Konečná B., Immune activation by nucleic acids: A role in pregnancy complications. B. Konečná, L. Lauková, B. Vlková // *Scand J Immunol.* – 2018. – Vol. 87(4). – P. e12651.
119. Korn, T. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. / T. Korn, M. Mitsdoerffer, A.L. Croxford, A. Awasthi, V.A. Dardalhon, G. Galileos, P. Vollmar, G.L. Stritesky, M.H. Kaplan, A. Waisman, V.K. Kuchroo, M. Oukka // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105(47). – P. 18460-5.
120. Kranc, W. Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells / W. Kranc, J. Budna, R. Kahan, A. Chachula, A. Bryja, S. Ciesiółka, S. Borys, M.P. Antosik, D. Bukowska, K.P. Brussow, M. Bruska, M. Nowicki, M. Zabel, B. Kempisty // *J Biol Regul Homeost Agents.* – 2017. – Vol. 31(1). – P. 1-8.
121. Kryczek, I. Inflammatory regulatory T cells in the microenvironments of ulcerative colitis and colon carcinoma / I. Kryczek, L. Wang, K. Wu, W. Li, E. Zhao, T. Cui, S. Wei, Y. Liu, Y. Wang, L. Vatan, W. Szeliga, J. Greenson, J. Roliński, W. Zgodzinski, E. Huang, K. Tao, G. Wang, W. Zoua // *Oncoimmunology.* – 2016. – Vol. 5(8). - P. e1105430.
122. Kudsy, M. Follicular fluid Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) could be a predictor for pregnancy outcome in normo-responders and polycystic ovary syndrome women undergoing IVF/ICSI treatment cycles / M. Kudsy, M. Alhalabi, F.A. Quobaili // *Middle East Fertility Society Journal.* – 2016. – Vol. 21(1). – P. 52–6.
123. Kurian N.K. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy / N.K. Kurian, D. Modi // *J.*

- Assist. Reprod. Genet. – 2018. – Vol. 36. – P. 189–98. doi: 10.1007/s10815-018-1343-x
124. Lam, N.Y. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients / N.Y. Lam, T.H. Rainer, L.Y. Chan, G.M. Joynt, Y.M. Lo. // Clin. Chem. - 2003. – Vol. 49. – P. 1286-91.
125. Lambert-Messerlian, G.M. Measuring maternal serum screening markers for Down's syndrome in plasma collected for cell-free DNA testing. / G.M. Lambert-Messerlian, E.E. Eklund, L.M. Neveux, G.E. Palomaki. // J Med Screen. – 2017. – Vol. 24(3). – P. 113-9.
126. Langhans, B. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. / B. Langhans, B. Krämer, M. Louis, H.D. Nischalke, R. Hüneburg, A. Staratschek-Jox, M. Odenthal, S. Manekeller, M. Schepke, J. Kalff, H.P. Fischer, J.L. Schultze, U. Spengler. // J Hepatol. -2013. – Vol. 59(2). – P. 229-35.
127. Lawson, C. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease / C. Lawson, J.M. Vicencio, D.M. Yellon, S.M. Davidson // J Endocrinol. - 2016. – Vol. 228(2). – P. R57-71
128. Lee, Immune cells in the female reproductive tract / S.K. Lee, C.J. Kim, D.-J. Kim, J.-H. Kang // Immune network. - 2015. – Vol. 15(1). – P. 16-26.
129. Leikina, E. Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion. / E.K. Leikina, Melikov, S. Sanyal, S.K. Verma, B. Eun, C. Gebert, K. Pfeifer, V.A. Lizunov, M.M. Kozlov, L.V. Chernomordik. // J Cell Biol. – 2013. – Vol. 200(1). – P. 109–23.
130. Levine, R.J. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia / R.J. Levine, C. Qian, E.S. Leshane, K.F. Yu, L.J. England, E.F. Schisterman, T. Wataganara, R. Romero, D.W. Bianchi // Am J Obstet Gynecol. - 2004. - Vol. 190(3). - P. 707-13.

131. Li, H.G. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities / H.G. Li, S-Y. Huang, H. Zhou, A.H. Liao, C.L. Xiong // *Asian J Androl.* – 2009. – Vol. 11(6). – P. - 703-9.
132. Lin, G. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. / G. Lin, J.Wang, X. Lao, J. Wang, L. Li, S. Li, J. Zhang, Y. Dong, A.E. Chang, Q. Li, S. Li. // *J. Immunother.* – 2012. – Vol. 35(4). – P. 337-43.
133. Lintern-Moore, S. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary / S. Lintern-Moore, G.P. Moore // *Biol Reprod.* – 1979. – Vol. 20(4). –P. 773–8.
134. Litton, C. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. / C. Litton, J. Stone, K. Eddleman, M.J. Lee // *Mt Sinai J Med.* – 2009. – Vol. 76. - №6 – P. 521-8. Lo, Y. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum / Y. Lo, N. Corbetta, P.E. Chamberlain. / *Lancet.* – 1997. – Vol. 350 (9076). – P. 485-7.
135. Liu K. Reproductive endocrinology and infertility committee. Advanced reproductive age and fertility / K. Liu, A. Case // *J Obstet Gynaecol Can.* – 2011. – Vol. 33(11). – P. 1165-75.
136. Macciò, A. Preovulatory human follicular fluid in vitro inhibits interleukin (IL)-1 alpha, IL-2, and production and expression of p55 chain IL-2 receptor of lymphomonocytes / A. Macciò, G. Mantovani, E. Turnu, et al. // *Fertil Steril.* – 1994. - Vol. 62(2). – P. 327-32.
137. Machtinger, R. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation / R. Machtinger, L.C. Laurent, A.A. Baccarelli // *Hum Reprod Update.* – 2016. – Vol. 22(2). – P. 182-93.
138. Malhotra, N. Comparative multiplex analysis of cytokines, chemokines and growth factors in follicular fluid of normoresponder women undergoing ovum donation with gonadotropin-releasing hormone agonist



- versus gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols / N. Malhotra, A. Srivastava, H. Rana, A. Bahadur, J. Sengupta, D. Ghosh // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2013. – Vol. 6(3). - P.205-12.
139. Malizia, B.A. The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age / B.A. Malizia, Y.S. Wook, A.S. Penzias, A. Usheva // *Fertility and Sterility.* - 2010. - Vol. 93(2). - P. 537 – 43.
  140. Mandel, P. Les acsides nucleiques du plasma sanguine ches l'homme / P. Mandel, P. Metais. // *C R Seanes Soc Biol Ses Fil.* - 1948. – Vol. 142. – P. 241-3.
  141. Mei, S. Changes of CD4+CD25high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / S. Mei, J. Tan, H. Chen, Y. Chen, J. Zhang // *Fertill.Steril.* – 2010. - Vol. 94(6). - P. 2244 – 7.
  142. Mendoza, C. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential / C. Mendoza, E. Ruiz-Requena, E. Ortega, N. Cremades, F. Martinez F., R. Bernabeu, E. Greco, J. Tesarik // *J Hum Reprod.* – 2002. - Vol. 17(4). – P. 1017-22.
  143. Mercier, S.K. The Microvesicle Component of HIV-1 Inocula Modulates Dendritic Cell Infection and Maturation and Enhances Adhesion to and Activation of T Lymphocytes / S.K. Mercier, H. Donaghy, R.A. Botting., S.G. Turville, A.N. Harman, N. Nasr, H. Ji, U. Kusebauch, L. Mendoza, D. Shteynberg, K. Sandgren, R.J. Simpson, R.L. Moritz, A.L. Cunningham // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9(10). – P. e1003700.
  144. Mincheva-Nilsson, L. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success / L. Mincheva-Nilsson, V. Baranov // *Am J Reprod Immunol.* - 2014. – Vol. 72(5). – P. 440-57.

145. Mishra, S.R. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family in buffalo ovarian follicle during different stages of development and modulatory role of FGF2 on steroidogenesis and survival of cultured buffalo granulosa cells / S.R. Mishra, N. Thakur, A. Somal, M.S. Parmar, R. Reshma, G. Rajesh, V.P. Yadav, M.K. Bharti, J. Bharati, A. Paul, V.S. Chouhan, G.T. Sharma, G. Singh, M. Sarkar. // *Res Vet Sci* – 2016. - Vol. 108. - P. 98 - 111.
146. Miyara, M. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor / M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30(6). – P. 899-911.
147. Modi, D.N. Endometrial biology during trophoblast invasion / D.N. Modi, G. Godbole, P. Suman, S.K. Gupta // *Front Biosci* . – 2012. - Vol. 4. – P. 1151–71.
148. Moldenhauer, L.M. GM-CSF is an essential regulator of T-cell activation competence interine dendritic cells during early pregnancy in mice / L.M Moldenhauer // *J. Immunology*. – 2010. – Vol. 185(11). – P. 7085-96.
149. Monteleone, P. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF / P. Monteleone, P. Giovanni, G. Simi, E. Casarova, V. Celo, A. Genazzani A. // *J Assist Reprod Genet*. – 2008. – Vol. 25(5). – P. 183-6.
150. Montigny, C. On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport / C. Montigny, J. Lyons, P. Champeil, P. Nissen, G. Lenoir // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1861. - № 8 Pt B. – P. 767-83.
151. Mori, M. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. M. Mori, A. Bogdan, T. Balassa, et al. // *J.Semin Immunopathol*. – 2016. – Vol. 38(6). – P. 635-49.

152. Mozzini, C. Nuclear factor kappa B in patients with a history of unstable angina: case re-opened / C. Mozzini, U. Garbin, C. Stranieri, et al. // Intern Emerg Med. – 2018. – Vol. 13(5). – P. 699-707.
153. Munakata Y., Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes / Y. Munakata, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata // J Reprod Dev. - 2019. - Vol.65(2). - P. 171–175.
154. Nakagawa, T. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. / T. Nakagawa, M. Tsuruoka, H. Ogura, Y. Okuyama, Y. Arima, T. Hirano, M. Murakami. // Int Immunol. – 2010. – Vol. 22(2). – P. 129-39.
155. Nilsson, E. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition / E. Nilsson, N. Rogers, M.K. Skinner. // Reproduction. – 2007. - Vol. 134. - P.209–221.
156. Nishizuka, Y. Thymus and reproduction: sex-link dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice / Y. Nishizuka, T. Sakakuta // Science. - 1969. – Vol. 166(3906). – P. 753-5.
157. Nóbrega, J. J. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro. / P.B. Gonçalves, R.N. Chaves, D. M. Magalhães, R. Rossetto, I.B. Lima-Verde, G.R. Pereira, C.C. Campello, J.R. Figueiredo, J.F. de Oliveira // Zygote. – 2012. - Vol. 20(1). - P.73-8.
158. Nomura S., Clinical significance of procoagulant microparticles. / S. Nomura, M. Shimizu // J. Intensive Care. – 2015. – Vol. 3(1). – P. 2.
159. O’Neil L.A., The history of toll-like receptors – redefining innate immunity / L.A . O’Neil, D.Golenbock, A.G. Bowie // Nat Rev Immunol. – 2013. –Vol. 13(6). – P. 453–460.
160. Oakley, O.R. Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary / O.R. Oakley, H. Kim, I. Amouri, P.C. Lin, J.Cho, M.K. Bani-Ahmad // Endocrinology. – 2010. - Vol. 151. - P. 4551 – 9.

161. Ohkura, N. Development and maintenance of regulatory T cells / N. Ohkura, Y. Kitagawa, S. Sakaguchi // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38(3). – P. 414-23.
162. Oyer, J.L. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particlebased approach. / J.L. Oyer, R.Y. Igarashi, A.R. Kulikowski, D.A. Colosimo, M.M. Solh, A. Zakari, Y.A. Khaled, D.A. Altomare, A.J. Copik // *Biol Blood Marrow Transplant* . – 2015. – Vol. 21(4). – P. 632–9.
163. Palomino, D.C., Chemokines and immunity / D.C. Palomino, L.C. Marti // *Einstein (Sao Paulo)*. – 2015. – Vol. 13(3). – P. 469-73.
164. Pang, A. Shear-induced integrin signaling in platelet phosphatidylserine exposure, microvesicle release and coagulation / A. Pang, Y. Cui, Y. Chen, N. Cheng., M.K. Delaney, M. Gu, A. Stojanovic-Terpo, C. Zhu, X. Du. // *Blood*. - 2018. – Vol. 132(5). – P. 533-43.
165. Pasquale, E.D. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. / E.D. Pasquale, P. Beck-Peccoz, L. Persani, / *Am J Hum Genet*. – 2004. - Vol. 75(1). - P.106-11.
166. Pastor, L.M. Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia / L.M. Pastor, X. Lucas, J. Pallares, C.M. Bernal-Mañas, E.A. Martinez, J. Roca, J.M. Vazquez, E. Morales, E. Beltran, A. Zuasti, C. Ferrer. // *Mol Reprod Dev*. -2008. – Vol. 75(9). – P 1473-83.
167. Patterson, S.J. T regulatory cell chemokine production mediates pathogenic T cell attraction and suppression. / S.J. Patterson, A.M. Pesenacker, A.Y. Wang, J. Gillies, M. Mojibian, K. Morishita, R.Tan, T.J. Kieffer, C.B. Verchere, C. Panagiotopoulos, M.K. Levings. // *J Clin Invest*. – 2016. – Vol. 126(3). – P. 1039-51.

168. Pertl, B. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications / B. Pertl, D.W. Bianchi // *Obstet Gynecol.* – 2001. – Vol. 98(3). – P. 483–90.
169. Phillippe, M. Cell-free fetal DNA – a trigger for parturition / M. Phillippe // *New Engl J Med.* – 2014. – Vol. 370(26). – P. 2534-6.
170. Pihusch, V. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. / V. Pihusch, A. Rank, R. Steber, M. Pihusch, R. Pihusch, B. Toth, E. Hiller, H.-J. Kolb // *Transplantation.* – 2006. – Vol. 81 – P. 1405–9.
171. Pomatto, M.A. Noncoding RNAs Carried by Extracellular Vesicles in Endocrine Diseases / M.A. Pomatto, C. Gai, M.C. Deregibus, C. Tetta, G. Camussi // *Int J Endocrinol.* – 2018. – Vol. 2018. – article ID 4302096. – P. 18.
172. Raffin, C. T<sub>reg</sub> cell-based therapies: challenges and perspectives. / C. Raffin, L.T. Vo, J.A. Bluestone // *Nat Rev Immunol.* – 2020. – Vol. 20(3). – P. 158-172.
173. Rahimzadeh, M. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of Literature / M. Rahimzadeh, M. Norouzian, F. Arabpour, N. Naderi // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 12(2). – P. 209-27.
174. Raposo, G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles / G. Raposo, H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, H.J. Geuze // *J Exp Med.* – 1996. – Vol. 183(3). – P. 1161-72.
175. Red-Horse, K. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface / K. Red-Horse, Y. Zhou, O. Genbacev, A. Prakobphol, R. Foulk, M. McMaster, S.J. Fisher // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 114(6). – P. 744-54.
176. Revelli, A. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics / A. Revelli, L.D. Piane, S. Casano, E.

- Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo \ Reproductive Biology and Endocrinology. – 2009. – Vol. 7. – P. 40.
177. Rimon-Dahari, N. Ovarian Folliculogenesis / N. Rimon-Dahari, L. Yerushalmi-Heinemann, L. Alyagor, N. Dekel // Results Probl Cell Differ. – 2016. – Vol. 58. – P. 167-90.
  178. Robertson, S.A. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid / S.A. Robertson, L.R. Guerin, L.M. Moldenhauer, J.D. Hayball // J Reprod Immunol. – 2009. – Vol. 83(1-2). – P. 109-16.
  179. Robertson, S.A. Moldenhauer L.M. Immunological determinants of implantation success / S.A. Robertson // Int. J. Dev. Biol. - 2014. – Vol. 58(2-4). – P. 205-17.
  180. Rosing, J. Calcium-independent activation of prothrombin on membranes with positively charged lipids / J. Rosing, G. Tans, H. Speijer, R.F. Zwaal // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27(25). – P. 9048-55.
  181. Rubin, O. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? / O. Rubin, D. Crettaz, J-D. Tissot, et al. // Blood Transfus. — 2010. — Vol. 8 Suppl 3. – P. s31-s38.
  182. Rudensky, A.Y. Regulatory T cells and Foxp3 / A.Y. Rudensky. // Immunol Rev. – 2011. - Vol. 241(1). - P. 260-8.
  183. Rukoyatkina, N. Phosphatidylserine surface expression and integrin alpha IIb beta 3 activity on thrombin/convulxin stimulated platelets/particles of different sizes / N. Rukoyatkina, A.J. Begonja, J. Geiger, M. Eigenthaler, U. Walter, S. Gambaryan // Br.J.Haematol. — 2009. — Vol. 144(4). — P. 591—602.
  184. Rule K. Relationship between blastocoel cell-free DNA and day-5 blastocyst morphology / K. Rule, R.J. Chosed, A.T. Chang, D.J. Wininger, W.E. Roudebush // J Assist Reprod Genet. - 2018. - Vol. 35(8). - P. 1497-501.
  - Runesson, E. The human preovulatory follicle is a source of the

- chemotactic cytokine interleukin-8 / E. Runesson, E.K. Bostrom, P.O. Janson, M. Brannstrom // *Molecular Human Reproduction*. - 1996. - Vol. 2(4). - P. 245-50
185. Sabbaghi, M. IL-17A concentration of seminal plasma and follicular fluid in infertile men and women with various clinical diagnoses. / M. Sabbaghi, R. Aram, H. Roustaei, I.M. Fadavi, M. Daneshvar, A.R. Castaño, A. Haghparast // *Immunol Invest*. – 2014. – Vol. 43(7). – P. 617-26.
  186. Sagini, K. Extracellular Vesicles as Conveyors of Membrane-Derived Bioactive Lipids in Immune System. / K. Sagini, E. Costanzi, C. Emiliani, S. Buratta, L. Urbanelli // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19(4). – P. E1227.
  187. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses / S. Sakaguchi. // *Annu Rev Immunol*. – 2004. - Vol. 22. - P. 531-62.
  188. Sakkas, L.I. Regulatory B cells in autoimmune rheumatic diseases / L.I. Sakkas // *Mediterr J Rheumatol*. – 2017. – Vol. 28(2). – P. 75-79.
  189. Salleh, N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception / N. Salleh, N. Giribabu N. // *Scientific World Journal*. – 2014. – Vol. 2014. – P.10.
  190. Sang, Q. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo / Z. Yao, H. Wang, R. Feng, H. Wang, X. Zhao, Q. Xing, L. Jin, L. He, L. Wu, L. Wang. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2013. – Vol. 98(7). – P. 3068-79.
  191. Santonocito, M. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal micro RNA control pathways involved in follicular maturation / M. Santonocito, M. Vento, M.R. Guglielmino, R. Battaglia, J. Wahgren, M. Ragusa, D. Barbagallo, P. Borzi, S. Rixxari, M. Maugeri, P.

- Scollo, C. Tatone, H. Valadi, M. Purello, C.D. Pioto // Fertility and Sterility. - 2014. - Vol. 102(6). – P. 1751-61.
192. Sarapik, A. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as marker of IVF success / A. Sarapik, A. Velthut, K. Haller-Kikkatalo, G.C. Faure, M.C. Béné, M.C. Bittencourt, F. Massin, R. Uibo, A. Salumets // Clinical and Developmental Immunology. – 2012. – Vol. 2012. – P.10.
  193. Sato, E. Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals / E. Sato // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2015. – Vol. 91(3). – P. 76–91.
  194. Savchev, S.I. Follicular fluid-specific distribution of vascular endothelial growth factor isoforms and sFlt-1 in patients undergoing IVF and their correlation with treatment outcomes / S.I. Savchev, V.A. Moragianni, D. Senger, A.S. Penzias, K. Thornton, A. Usheva. // Reprod Sci. – 2010. – Vol. 17. P. 1036 – 42.
  195. Scalici, E. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality / S. Traver, N. Molinari, T. Mullet, M. Monforte, E. Vintejou, S. Hamamah // Hum Reprod. – 2014. – Vol. 29(1). – P. 2661-9.
  196. Scharfe-Nugent, A. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia / A. Scharfe-Nugent, S.C. Corr, S.B. Carpenter, L. Keogh, B. Doyle, C. Martin, K.A. Fitzgerald, S. Daly, J.J. O'Leary, L.A. O'Neill // J Immunol . – 2012. – Vol. 188(11). – P. 5706–12.
  197. Schlossberger, V. The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets / V. Schlossberger, L. Schober, J. Rehnitz, M. Schaier, M. Zeier, S. Meuer, E. Schmitt, B. Toth, T. Strowitzki, A. Steinborn // Hum Reprod. - 2013. - Vol. 28(11). - P. 3062-73.
  198. Schroit, A. J. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid



- asymmetry / A. J. Schroit, Y. Tanaka, J. Madsen, I.J. Fidler // *Biol.Cell.* — 1984. — Vol. 51(2). — P. 227—38.
199. Seigneuret, M. ATP-dependent asymmetric distribution of spinlabeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes / M. Seigneuret, P.F. Devaux // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* — 1984. — Vol. 81(12). — P. 3751—5.
200. Silveira, J.C. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle / J.C. Silveira, D.N. Veeramachaneni, Q.A. Winger, E.M. Carnevale, G.J. Bouma // *Biol Reprod.* — 2012. — Vol. 86(3). — P. 71.
201. Simak, J. From cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. / J. Simak, K. Holada, J.G. Vostal // *BMC Cell. Biol.* — 2002(3). - P. 11.
202. Singh A.K., Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis / A.K. Singh, M. Dutta, R. Chattopadhyay et al. // *J Assist Reprod Genet.* — 2016. — Vol. 33(10). — P. 1363-72.
203. Skinner, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development / M.K. Skinner. / *Human Reproduction Update.* - 2005. — Vol. 11(5). — P. 461—71.
204. Soares, M.J. Regulatory pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage / M.J. Soares, D. Chakraborty, S.J. Renaud, K. Kubota, P. Bu, T. Konno, M.A. Rumi // *J Reprod Dev.* — 2012. — Vol. 58(3). — P. 283—7.
205. Soto, P. Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle / P. Soto, R.P. Natzke, P.J. Hansen. // *Am J Reprod Immunol.* — 2003. — Vol. 50(5). — P. 380—8.

206. Southcombe, J.H. Detection of Soluble ST2 in Human Follicular Fluid and Luteinized Granulosa Cells / J.H. Southcombe, N. Lédée, S.P. d'Hauterive, K. Turner, T. Child, J.V. Snider, S.W. Redman, S.L. Sargent, I. Granne // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8(9). – P. e74385.
207. Stahl, P.D. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward / P.D. Stahl, G. Raposo. // Essays Biochem. – 2018. – Vol. 62(2). - P. 119-24.
208. Stouffer, R.L. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle / R.L. Stouffer, F. Xu, D.M. Duffy // Front Biosci. – 2007. - Vol. 12. – P. 297-307.
209. Stroun, M. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. / M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand, P. Anker. // Clin Chim Acta. – 2001. – Vol. 313(1-2). – P. 139-42.
210. Suman, P. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. / P. Suman, S.S. Malhotra, S.K. Gupta // JAKSTAT. – 2013. – Vol. 2(4). – P. e25155.
211. Tal, R. Ovarian reserve testing: a user's guide. / R. Tal, D.B. Seifer // Am J Obstet Gynecol.- 2017. – Vol. 217(2). – P. 129-140.
212. Tanaka, Y. Exacerbation of Endometriosis Due To Regulatory T-Cell Dysfunction. / Y. Tanaka, T. Mori, F. Ito, A. Koshiba, O. Takaoka, H. Kataoka, E. Maeda, H. Okimura, T. Mori, J. Kitawaki. // J Clin Endocrinol Metab. - 2017 . – Vol. 102(9). – P. 3206-17.
213. Tannetta, D. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. / D. Tannetta, R. Dragovi, Z. Alyahyaei, J. Southcombe. // Cell Mol Immunol. – 2014. – Vol. 11(6). – P. 548-63.
214. Tapping, R.I. Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide / R.I. Tapping, P.S. Tobias // Chem Immunol. – 2000. - Vol. 74. - P. 108-121.
215. Teles, A. Control of uterine microenvironment by FOXP3(+) cells facilitates embryo implantation / A. Teles, A. Schumacher, M.C. Kühnle, N.

- Linzke, C. Thuere, P. Reichardt, C.E. Tadokoro, G.J. Hämmerling, A.C. Zenclussen // *Front Immunol.* - 2013. –Vol. 4. – P. 158.
216. Tian, Y. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA / Y. Tian, M. Babor, J. Lane, V. Schulten, V.S. Patil, G. Seumois, S.L. Rosales, Z. Fu, G. Picarda, J. Burel, J. Zapardiel-Gonzalo, R.N. Tennekoon., A.D. De Silva, S. Premawansa, G. Premawansa, A. Wijewickrama, J.A. Greenbaum, P. Vijayanand, D. Weiskopf, A. Sette, B. Peters // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8(1). – P. 1473.
  217. Tkach, M. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. / M. Tkach, C. Théry. // *Cell.* – 2016. – Vol. 164(6). – P. 1226–32.
  218. Todorova, D. Extracellular Vesicles in Angiogenesis / D. Todorova, S. Simoncini, R. Lacroix, F. Sabatier, F. Dignat-George // *Circ Res.* – 2017. - Vol. 120(10). – P. 1658–73.
  219. Tong, M. Placental extracellular vesicles and feto-maternal communication. / M. Tong, L.W. Chamley. *Cold Spring Harb Perspect Med.* // 2015. – Vol. 5(3). – P. a023028.
  220. Traver, S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes / E. Scalici, T. Mullet, N. Molinari, C. Vincens, T. Anahory, S. Hamamah // *PLoS One.* – 2015. - Vol. 10(8). – P. e0136172.
  221. Tricarico, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles / C. Tricarico, J. Clancy, C. 'Souza-Schorey // *Small GTPases.* – 2017. – Vol. 8(4). – P. 220-32.
  222. Tsanq, J.C.H. Circulating nucleic acids in plasma/serum / J.C.H. Tsanq, Y.M. Lo // *Pathol.* – 2007. – Vol.39(2). – P. 197-207.
  223. Tzimagiorgis, G. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids / G. Tzimagiorgis, E.Z. Michailidou, A. Kritis, A.K.

- Markopoulos, S. Kouidou // *Cancer Epidemiol.* – 2011. –Vol. 35(6). – P. 580-9.
224. Ulrich, B.C. Cell-Free DNA in Oncology: Gearing up for Clinic / B.C. Ulrich, C.P. Paweletz // *Ann Lab Med.* – 2018(38). - № 1. –P. 1-8.
225. Vasilyeva, I.N. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of ionizing radiation. / I.N.Vasilyeva // *Ann N Y Acad Sci.* -2001. – Vol. 945. – P. 221-8.
226. Vera-Rodriguez M. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development / M. Vera-Rodriguez, A. Diez-Juan, J. Jimenez-Almazan, S Martinez, R. Navarro, V. Peinado, A Mercader, M. Meseguer, D. Blesa, I. Moreno, D. Valbuena, C. Rubio, C. Simon // *Human Reproduction.* – 2018. - Vol. 33(4). – P. 745–56.
227. Vieyra-Lobato, M. R. Description of CD8+ Regulatory T Lymphocytes and Their Specific Intervention in Graft-versus-Host and Infectious Diseases, Autoimmunity, and Cancer. / M.R. Vieyra-Lobato, J. Vela-Ojeda, L. Montiel-Cervantes, R. López-Santiago, M.C. Moreno-Lafont // *J Immunol Res.* – 2018. - Vol. 2018. - P. 3758713.
228. Vujisic, S. Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23 / S. Vujisic, S.Z. Lepej, I. Emedi, et al. // *Hum Reprod.* – 2006. – Vol. 21(10). – P. 2650-5.
229. Walusimbi, S.S. Physiology and endocrinology symposium: Role of immune cells in the corpus luteum / S.S. Walusimbi, J. L. Pate // *Journal of Animal Science* – 2013. – Vol. 91(4). – P. 1650–9.
230. Wang, T.H. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development / T.H. Wang, C.L. Chang, H.M. Wu, Y.M. Chiu, C.K. Chen, H.S. Wang // *Fertil Steril.* – 2006. – Vol. 86(5). – P. 1392-1401.

231. Wang, W-J. Periodic elevation of regulatory T cells on the day of embryo transfer is associated with better in vitro fertilization outcome / F-J. Fu-Jun Liu, X. Zhang, X-M. Liu, Q-L. Qu, F.H. Li, L-L. Zhuang, X-X Li, C-F. Hao // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2017. - Vol. 119. – P. 49-53.
232. Wei, F.Q. VEGF, bFGF and their Receptors at the fetal-maternal interface of the rhesus monkey. / F.Q. Wei // *Placenta*. – 2004. – Vol. 25(2-3). – P. 184-196
233. Winship, A. Blocking Endogenous Leukemia Inhibitory Factor During Placental Development in Mice Leads to Abnormal Placentation and Pregnancy Loss / A. Winship, J. Correia, T. Krishnan, E. Menkhorst, C. Cuman, J.G. Zhang, N.A. Nicola, E. Dimitriadis // *Sci Rep*. - 2015. Vol. 5. – P. 13237.
234. Woidacki, K. Transfer of regulatory T cells into abortion-prone mice promotes the expansion of uterine mast cells and normalizes early pregnancy angiogenesis / K. Woidacki, N. Meyer, A. Schumacher, et al. // *Sci Rep*. – 2015. – Vol. 10(5)/ - P.13938.
235. Wu, R. Macrophage contributions to ovarian function / R. Wu, K.H. Hoek, N.K. Ryan, R.J. Norman, R.L. Robker // *Hum Reprod Update*. – 2004. - Vol.10(2). - P.119-33.
236. Xie, J. Potential effect of inflammation on the failure risk of in vitro fertilization and embryo transfer among infertile women / J. Xie, L. Yan, Z. Cheng, L. Qiang, J. Yan, Y. Liu, R. Liang, J. Zhang, Z. Li, L. Zhuang, C. Hao, B. Wang, Q. Lu // *Hum Fertil (Camb)*. - 2018. - P. 1-9. doi: 10.1080/14647273.2018.1543898.
237. Yagi, H. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells / H. Yagi, T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T.

- Uchiyama, S. Fujii, S. Sakaguchi. // *Int. Immunol.* – 2004. - Vol. 16(11). - P. 1643–56.
238. Yang, H. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / H. Yang, L. Qiu, W. Di, et al. // *Fertil Steril.* – 2009. - Vol. 92(1). – C. 301-5.
239. Yougbaré, I. Activated NK cells cause placental dysfunction and miscarriages in fetal alloimmune thrombocytopenia / I. Yougbaré, W.S. Tai, D. Zdravic et al. // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8(1). – P. :224.
240. Young, J.M. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle / J.M. Young, A.S. McNeilly. // *Reproduction.* - 2010. - Vol. 140(4). - P.489–504.
241. Yu, J. Decreased frequency of peripheral blood CD8+CD25+FoxP3+regulatory T cells correlates with IL-33 levels in pre-eclampsia. // J. Yu, L. Qian, F. Wu, M. Li, W. Chen, H. Wang. // *Hypertens Pregnancy.* 2017. – Vol. 36(2). –P. 217-25.
242. Zackrisson, U. Alterations of follicular microcirculation and apex structure during ovulation in the rat / U. Zackrisson, C.O. Lofman, P.O. Janson, A. Wallin, M. Mikuni, M. Brannstrom // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2011. – Vol. 157(2). - P.169–74.
243. Zenclussen, A.C. Cellular regulation of the uterine microenvironment that enables embryo implantation / A.C. Zenclussen, G.J. Hammerling // *Frontiers in immynology.* – 2015. - Vol. 6. – P. 321.
244. Zenclussen, M.L. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy / M.L. Zenclussen, C. Thuere, N. Ahmad, P.O. Wafula, S. Fest, A. Teles, A. Leber, P.A. Casalis, I. Bechmann, J. Priller, H.D. Volk, A.C. Zenclussen // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 63(3). – P. 200–8.

245. Zhang, J. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function / J. Zhang, S. Li, L. Li, M. Li, C. Guo, J. Yao, S. Mi // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 13(1). – P. 17-24.
246. Zhang, J. Human dNK cell function is differentially regulated by extrinsic cellular engagement and intrinsic activating receptors in first and second trimester pregnancy. / J. Zhang, C.E. Dunk, M. Kwan, R.L. Jones, L.K. Harri, S. Keating, S.J. Lye. // *Cell Mol Immunol*. – 2017. – Vol. 14(2) – P. 203-13.
247. Zheng, J. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cell from naïve precursors by CD40-activated B cells / J. Zheng, Y. Liu, G. Qin. // *J Immunol*. - 2009. - V. 183(6). – P. 3742-50.
248. Zheng, Y.A. Rogue Foxp3 Mutant Undermines Treg Cell Function / Y.A. Zheng, // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47(2). – P. 211-4.
249. Zhou, J. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome. / J. Zhou, Z. Wang, X. Zhao, J. Wang, H. Sun, Y. Hu. // *Am J Reprod Immunol*. – 2012. – Vol. 68 (2). – P. 100-6.
250. Zhu, L. Treg/Th17 Cell Imbalance and IL-6 Profile in Patients With Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. / L. Zhu, H. Chen, M. Liu, Y. Yuan, Z. Wang, Y. Chen. // *Reprod Sci*. – 2017. – Vol. 24(6). – P. 882-90.
251. Zmigrodzka, M. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. / M. Zmigrodzka, M. Guzera, A. Miskiewicz, D. Jagielski, A. Winnicka // *Tumour Biol*. – 2016. – Vol. 37. – P. 14391–401.
252. Zóka, A. Extension of the CD4Foxp3 CD25(-/low) regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus / A. Zóka, G. Barna, A. Somogyi, et al. // *Autoimmunity*. -2015. - Vol. 48(5). – P. 289-97.

