

ЛАПШТАЕВА АННА ВАСИЛЬЕВНА

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ
БЕСПЛОДИЕМ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2019

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Евсегнеева Ирина Валентиновна

доктор биологических наук, профессор

Новиков Виктор Владимирович

Официальные оппоненты:

Колесникова Наталья Владиславовна – доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, профессор кафедры;

Лавров Вячеслав Федорович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». лаборатория диагностики вирусных инфекций, заведующий лабораторией

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2019 г. в ____ на заседании Диссертационного Совета Д.208.040.08 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность научного исследования

Бесплодный брак – одна из наиболее значимых медико-социальных, социальных и экономических проблем современности. По данным ВОЗ, в экономически развитых странах мира за последние 20–30 лет регистрируется увеличение доли бесплодных супружеских пар до 25–30 % (Бюллетень ВОЗ, 2010; Попович Л. и др., 2011; Harlow D., Campbell M.R., 2014). В Российской Федерации бесплодием страдают 7–8 млн женщин детородного возраста, состоящих в браке, что существенно снижает репродуктивный потенциал нации (Абашидзе А.А., Аракелян В.Ф., 2016). Низкая эффективность методов восстановления естественной фертильности женщин стимулировала развитие методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В настоящее время для многих супружеских пар, ранее обреченных на бездетность, методы ВРТ – единственное решение проблемы бесплодия, что подтверждается регистрируемым ежегодным ростом их использования во всем мире. Одним из наиболее популярных и достаточно эффективных методов лечения бесплодия является экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) (Русанова Н.Е., 2013). Однако, оценивая терапевтическую эффективность ЭКО, приходится констатировать, что более половины начатых циклов все еще являются нерезультативными: лишь в 31,5 % случаев цикл ЭКО приводит к наступлению беременности, а в 22,8 % завершается родами (Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В., 2016).

Учитывая высокую стоимость и относительно низкую эффективность процедуры ЭКО, в последние годы уделяется все большее внимание уделяется поиску новых современных прогностических критериев, использование которых на прекоцептивном этапе позволит прогнозировать исход процедуры с целью решения проблемы неэффективного лечения бесплодия. Выявление молекулярно-генетических маркеров, указывающих как на благоприятный исход ЭКО, так и на его неудачу, несомненно, повысит результативность использования данного

метода, оптимизирует процесс лечения бесплодия и, вероятно, снизит экономическую нагрузку на систему здравоохранения в целом.

Механизм наступления беременности во многом обусловлен согласованным взаимодействием двух факторов – функционально полноценного эмбриона и рецептивного эндометрия, что является определяющим в создании оптимальных условий для имплантации. Реализация этого процесса осуществляется за счет генетических и молекулярных преобразований, регулируемых экспрессией ряда иммунных факторов, в том числе интерлейкинов, факторов роста, молекул адгезии, хемокинов, простагландинов и их рецепторов. Все это, в итоге определяет эффективность процессов дифференцировки, адгезии и инвазии трофобласта.

Степень разработанности темы

Несмотря на достаточное количество работ по изучению цитокиновой регуляции плацентации, родовой деятельности и некоторых осложнений беременности (Кадырова Л. В., 2014; Крылова Ю. С., 2015; Сеидова Л. А., 2010; Мотовилова Н. О., 2010; Сельков С. А., 2010; Соколов Д. И., 2012; Сотникова Н. Ю., 2014), данные о роли иммуногенетических факторов в наступлении ЭКО-индуцированной беременности единичные, а их результаты часто противоречат друг другу (Мотовилова Н.О. и др., 2012; N.-Z. Ma и др., 2017). Это можно объяснить как особенностями дизайна исследований, так и полифункциональностью изучаемых показателей. В связи с этим не достигнуто единой точки зрения о ценности выявления цитокинов, являющихся оптимальными маркерами прогнозирования исхода процедуры ЭКО. В данном направлении поиски активно продолжаются. Следует также отметить, что, вероятнее всего, использование какого-то одного маркера для прогнозирования эффективности процедуры ЭКО недостаточно как ввиду сложного механизма имплантации эмбриона, так и индивидуальных особенностей гомеостаза, участвующих в программе ЭКО пациенток. Таким образом, исследования по изучению иммуногенетических факторов и связанных с ними молекулярных механизмов регуляции являются весьма актуальными.

Цель исследования

Определить роль цитокинов и их генов в качестве предикторов наступления беременности в программах ЭКО у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием с целью разработки персонализированного подхода к лечению и для повышения эффективности процедуры.

Задачи исследования

1. Сравнить содержание IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, M-CSF в сыворотке крови пациенток с различными исходами процедуры ЭКО.
2. Выявить концентрации IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, M-CSF в сыворотке крови женщин, ассоциируемые с благоприятным исходом программы ЭКО.
3. Изучить распределение частот генотипов полиморфных маркеров rs1800587 (C/T) гена IL-1 α , rs2234663 (2/4) гена IL-1Ra, rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, участвующих в программе ЭКО.
4. Выявить ассоциацию полиморфных вариантов генов IL-1 α , IL-1Ra и CSF1R с эффективностью процедуры ЭКО.
5. Провести анализ содержания IL-1 α , IL-1Ra, M-CSF в сыворотке крови в зависимости от носительства полиморфных вариантов rs1800587 (C/T) гена IL-1 α , rs2234663 (2/4) гена IL-1Ra, rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R соответственно у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, участвующих в программе ЭКО.
6. Установить оптимальное сочетание изучаемых маркеров, обладающее максимальной прогностической ценностью исхода ЭКО у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Определение в сыворотке крови женщин IL-1 α в концентрациях от 28,7 до 85,1 пг/мл и M-CSF от 265,8 до 322,1 пг/мл на 3-й день менструального цикла, предшествующего протоколу ЭКО указывает на возможность успешного проведения процедуры ЭКО.

2. Распределение частот генотипов полиморфных маркеров rs386693509 (CA/TC) гена CSF1R, rs3216780 (del/G) гена CSF1R, rs1800587 (C/T) гена IL-1 α отличается у женщин с различными исходами программы ЭКО.

3. Генетическими маркерами благоприятного исхода процедуры ЭКО являются генотип T/T rs1800587 гена IL-1 α , генотип TC/CA rs3693509 и генотип del/G rs3216780 гена CSF1R.

4. Полиморфизм rs1800587 (C/T) гена IL-1 α носит функциональный характер и оказывает свое влияние на исход ЭКО через детерминированность уровня синтеза белковых продуктов.

5. Предикторная роль M-CSF связана, как правило, с полиморфизмом гена его рецептора, определяющего чувствительность CSF1R.

Научная новизна

Установлены основные различия концентраций IL-1 α в сыворотке крови на 3-й день менструального цикла, предшествующего протоколу ЭКО, у женщин с различными исходами процедуры. Впервые в сыворотке крови пациенток выявлены концентрации IL-1 α и M-CSF, которые на прекоцептивном этапе ассоциированы с наступлением беременности в циклах ЭКО. Впервые установлено распределение носительства генотипов полиморфных маркеров rs1800587 (C/T) гена IL-1 α , rs2234663 (2/4) гена IL-1Ra, rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, участвующих в программе ЭКО. Впервые показано, что для женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия прогностически значимыми в плане наступления беременности в циклах ЭКО являются полиморфные варианты T/T rs1800587 гена IL-1 α , TC/CA rs3693509 и del/G rs3216780 гена CSF1R. Впервые установлена ассоциация генотипа TC/TC полиморфного маркера rs3693509 гена CSF1R с повышенным содержанием M-CSF в сыворотке крови. Изучены корреляционные связи между цитокинами IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, M-CSF между собой, а также с гипофизарными и яичниковыми гормонами.

Теоретическая и практическая значимость

Расширены и дополнены представления о роли цитокинов в реализации репродуктивных функций. Впервые определены иммуногенетические показатели, обладающие наибольшей информативностью для прогнозирования наступления беременности в результате процедуры ЭКО.

Материалы диссертации вошли в учебные рабочие программы и используются в лекционных курсах и на практических занятиях ряда кафедр ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского», ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва».

Генотипирование женщин на носительство полиморфных вариантов T/T rs1800587 гена IL-1 α , TC/CA rs3693509 и del/G rs3216780 гена CSF1R, а также определение концентрации IL-1 α и M-CSF в сыворотке могут быть использованы для прогнозирования эффективности программ ЭКО на прекоцептивном этапе, что позволит обоснованно планировать индивидуальную тактику ведения пациенток в предстоящем цикле лечения методом ЭКО и снизить затраты государства и частных лиц на проведение процедуры.

Методология и методы исследования

В проведенном исследовании использовался комплексный подход к оценке клиничко-anamnestических, инструментальных и лабораторных данных 120 женщин в возрасте 32,8 \pm 4,1 года с верифицированным диагнозом трубно-перитонеального бесплодия, обратившихся для проведения программы ЭКО в отделение вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр». Дизайн исследования был составлен в соответствии с этическими нормами, на основании подписания информированного добровольного согласия пациента на включение в исследование. Работа выполнена с участием необходимого количества пациентов, современного оборудования, методов исследования иммунного статуса и

молекулярно-генетических методов и методов статистической обработки в соответствии с поставленными задачами, позволяющие получить репрезентативные и достоверные результаты.

Степень достоверности и апробация результатов

Положения и выводы диссертационного исследования основаны на анализе лабораторного материала, который получили при проведении клинических наблюдений, с использованием современных иммунологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Статистическая обработка проводилась с применением комплекса учетно-оценочных и аналитических показателей, адекватных математических методов, что определяет высокую достоверность результатов.

Основные положения диссертации представлены на XVIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке: «Глобальная интеграция современных исследований и технологий в медицину и образовательное пространство» (Москва, 2016), ежегодных научных конференциях Мордовского государственного университета «Огаревские чтения» (Саранск, 2015-2016), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017), XVI Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017), Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д. К. Беляева «Беляевские чтения» (Новосибирск, 2017), III Всероссийской конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2017), Международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждать... болезнь» (Донецк, 2017), XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), 76-й Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2018).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ключевая роль в выборе тематики исследования, аналитическом обзоре литературы, в клинических наблюдениях, сборе материала, проведении ИФА, статистической обработке результатов и их анализе, а также формулировании выводов и практических рекомендаций. В совместных с другими исследователями работах, автор разрабатывал программы исследований, участвовал в мониторинге уровня цитокинов сыворотки крови, проводил статистическую обработку полученных данных. Таким образом, вклад автора в работу над диссертацией является основным на всех этапах исследования: от определения задач, их теоретического обоснования и организации клинико-лабораторных исследований до представления полученных результатов в научных публикациях, докладах на научных форумах. Доля автора в совместных публикациях составила 70–80%.

Внедрение результатов в практику

Данные, полученные в результате проведенного исследования, внедрены в работу ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр» и на кафедру клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), кафедру молекулярной биологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского», кафедру иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют Паспорту специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, области исследований «Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы и механизмов иммунной защиты. Изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии).

Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в 3 статьях в журналах, индексируемых в Scopus, получен 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 183 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 37 таблицами и 2 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (4 параграфа), описания материалов и методов исследования (2 параграфа), изложения результатов исследования (6 параграфов), обсуждения, выводов, списка использованной литературы, включающего 91 отечественный и 272 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В соответствии с целью исследования и поставленными задачами, в отделении вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр» было обследовано 120 пациенток репродуктивного возраста с трубно-перитонеальной формой бесплодия, обратившихся для проведения программы ЭКО. Все пациентки подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения в исследование были: возраст женщин 25-39 лет; трубно-перитонеальный фактор бесплодия; регулярный менструальный цикл; нормальный овариальный резерв (по данным гормонального исследования и УЗИ органов малого таза); наличие в анамнезе не более 3-х неудачных попыток ЭКО; отсутствие патологии эндометрия по данным УЗИ; перенос только эмбрионов хорошего качества; отсутствие противопоказаний к проведению ЭКО; фертильная сперма супруга/партнера; нормальный кариотип обоих супругов.

Критериями исключения были: бесплодие, обусловленное отсутствием овуляции; бесплодие, обусловленное иммунологическим фактором; экстрагенитальная патология, при которой проведение базовой программы ЭКО противопоказано; гинекологические заболевания: эндометриоз, миома матки; острые воспалительные заболевания органов малого таза; хронические заболевания в стадии обострения; ожирение 2-3 степени; олигоастенотератозооспермия у супруга/партнера (нормативы ВОЗ, 2010 г.); синдром поликистозных яичников и наружный генитальный эндометриоз 3-4 степени; гиперандрогенемия; гипо- и гипергонадотропная недостаточность функция яичников; аномалии развития женской половой системы.

Все женщины были обследованы согласно приказу Минздрава России от 30.08.2012 №107Н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Всем пациенткам был проведен короткий протокол стимуляции суперовуляции, завершившийся переносом эмбрионов (не более 2-х). Диагностика беременности проводилась на основании определения в сыворотке концентрации β -субъединицы хорионического гонадотропина через 14 дней после переноса эмбрионов в полость матки и ультразвуковой диагностики клинической беременности с целью оценки наличия одного или двух плодных яиц в полости матки через 21 день после переноса эмбрионов.

В зависимости от исхода проведенного ЭКО ретроспективно были сформированы 2 группы. В первую группу были включены 40 женщин, программа ЭКО у которых завершилась наступлением беременности, подтвержденная УЗИ (I группа). Вторую группу составили 80 женщин с ненаступившей беременностью после проведенной программы ЭКО.

Образцы цельной крови забирали у пациенток на 3 день менструального цикла, предшествующего процедуре ЭКО.

Содержание гипофизарных и яичниковых гормонов определяли радиоиммунным и иммуноферментным методами с использованием стандартных наборов.

Иммунологические методы исследования

Методом ИФА в сыворотке крови определяли содержание М-CSF с использованием коммерческих тест-систем («RnD Systems», США) и уровень IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA с использованием коммерческих тест-систем (ООО «Цитокин», Россия) согласно инструкциям производителей.

Молекулярно-генетические исследования

Нами были изучены частоты полиморфных маркеров rs1800587 (C/T) гена IL-1 α , rs2234663 (2/4) гена IL-1Ra, rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R. Для полиморфного минисателлитного маркера IL1RN-VNTR была использована стандартная пара праймеров из работы Tarlow et al., 1993. Для исследуемых образцов генотипы по маркеру IL1RN-VNTR определяли согласно инструкции производителя наборов «Тапотили» (г.Москва). Полиморфные маркеры rs1800587 (C/T) гена IL-1 α , rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R были исследованы методом ПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру. Для локусов IL1a-889 и CSF1R_64032 были использованы оригинальные пары праймеров. Для подбора праймеров использовали Primer-BLAST (Ye et al., 2012) и референтные нуклеотидные последовательности NG_008850.1 и NG_012303.1 из Базы данных NCBI: Nucleotide data base.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью стандартного пакета прикладных программ Stat Soft Statistica 10.0 (США). Для оценки нормальности распределения количественных данных применялись: графические (частотная гистограмма) и расчётные (критерий Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка) методы.

В качестве меры центральной тенденции количественных признаков была выбрана медиана (Me), а для интервальной оценки 25 и 75 квартиль, поскольку в большинстве случаев распределение данных было отличным от нормального. Для анализа межгрупповых различий количественных признаков использовалась описательная статистика с использованием t-критерия Стьюдента и рангового U-критерия Манна-Уитни. Качественные значения отражены в виде абсолютных

величин (n) и процентных долей. Распределение частот генотипов всех исследованных полиморфных маркеров соответствовало уравнению Харди-Вайнберга.

Для выявления различий частот значений качественных показателей между группами и оценки их статистической значимости применялся критерий χ^2 , при небольшом количестве наблюдений рассчитывался точный критерий Фишера. Для оценки взаимосвязи между изучаемыми показателями проводился линейный корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции (r) и определением его значимости по критерию t . Для оценки ассоциаций генотипов с наступлением беременности использовался критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Значимость выявленных различий и взаимосвязей во всех видах анализа была принята при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Для решения поставленных задач, на первом этапе исследования был проведен анализ анамнестических данных, показавший, что пациентки как из основной группы, так и из группы сравнения были сопоставимы по возрасту, данным акушерско-гинекологического анамнеза, частоте сопутствующей генитальной и экстрагенитальной патологии.

На втором этапе исследования был проведен анализ гормонального статуса в менструальном цикле, предшествовавшем процедуре ЭКО. Нами не было выявлено отклонений от нормальных значений, однако в содержании прогестерона и пролактина были выявлены достоверные различия между группами. Так, у женщин из группы с наступившей беременностью содержание пролактина было достоверно ниже, а прогестерона достоверно выше, чем у женщин из группы сравнения ($p=0,000070$ и $0,000013$ соответственно).

Успешная имплантация во многом обусловлена качеством эмбриона и готовностью эндометрия, необходимыми для адгезии и инвазии бластоцисты в эндометрий. На следующем этапе исследования был проведен анализ толщины эндометрия на 2 день м.ц., предшествующего ЭКО и количества ооцитов,

полученных при трансвагинальной пункции (TVР) в протоколе ЭКО. У женщин из основной группы толщина составила $3,8 \pm 1,3$ мм и была достоверно ниже, чем у женщин из группы сравнения $4,5 \pm 1,8$ мм ($p=0,024121$). Количество ооцитов, полученных при TVР у женщин с неблагоприятным исходом составило $11,0 \pm 4,8$ шт. и было достоверно выше, чем в группе с благоприятным исходом процедуры $8,4 \pm 3,6$ шт. ($p=0,002342$).

Для оценки прогностической роли изучаемых цитокинов в наступлении ЭКО-индуцированной беременности, был проведен анализ их содержания на 3-й день менструального цикла, предшествующего процедуре ЭКО. У женщин с различными исходами процедуры ЭКО были выявлены различия в содержании IL-1 α : у женщин с эффективной процедурой ЭКО уровень IL-1 α составил 26,6 (3,9–40,2) пг/мл и был достоверно выше, чем у женщин с неэффективной процедурой – 17,4 (4,2–18,0) пг/мл ($p=0,038178$) (табл.1). На основе расчета отношения шансов было установлено, что женщины с концентрацией IL-1 α в сыворотке от 28,7 до 85,1 пг/мл имеют шанс забеременеть в программе ЭКО в 3,8 раза выше, чем женщины с другими концентрациями данного цитокина ($p=0,001745$).

Таблица 1

Содержание изучаемых цитокинов в сыворотке крови у обследованных женщин

	IL-1 α , пг/мл	IL-1 β , пг/мл	IL-1Ra, пг/мл	M-CSF, пг/мл
Основная группа (n=40)	26,6 (3,9–40,2)	10,0 (8,2–11,6)	138,4 (90,6–200,5)	303,1 (260,3–379,9)
Группа сравнения (n=80)	17,4 (4,2–18,0)	9,7 (8,1–12,1)	122,5 (73,4–200,0)	355,9 (265,8–449,9)
Достоверность различий	$p = 0,038178$	$p = 0,708963$	$p = 0,687625$	$p = 0,161357$

Полученные в настоящем исследовании данные о предикторной роли IL-1 α были подтверждены результатами молекулярно-генетических исследований. Выявлено, что наибольшее количество женщин с ТПБ с благоприятным исходом

процедуры ЭКО являлись носителями генотипа T/T rs1800587 5`нетранслируемой области гена IL-1 α , в то время как у женщин с наступившей беременностью данный генотип встречался достоверно реже (табл. 2). Женщины-носители генотипа T/T имеют шанс забеременеть в результате ЭКО в 4,64 раза выше, чем женщины с другими генотипами (p=0,000 347) (табл. 3).

Следует отметить, что в группе женщин с наступившей беременностью на фоне процедуры ЭКО у женщин-носителей «благоприятного» генотипа T/T концентрация IL-1 α в сыворотке крови была достоверно выше, чем у пациенток с генотипами C/C и C/T (p=0,0001, p=0,0001 соответственно), а у женщин-носителей генотипа C/C – достоверно ниже, чем у женщин-носителей генотипа C/T и T/T (p=0,0113, p=0,0001 соответственно). Аналогичные результаты получены и в группе женщин с неблагоприятным исходом процедуры, что согласуется с данными других авторов об ассоциации генотипа T/T с повышенным уровнем продукции IL-1 α (Громова А.Ю., Симбирцев А.С., 2005).

Таблица 2

Распределение частот генотипов изучаемых генов в зависимости от исхода процедуры ЭКО у обследованных женщин

Показатель		Основная группа (n=40)	Группа сравнения (n=80)
Ген IL-1 α rs1800587 (C/T)	T/T	18 чел. (45 %)	12 чел. (15 %)
	C/T	10 чел. (25 %)	32 чел. (40 %)
	C/C	12 чел. (30 %)	36 чел. (45 %)
Ген IL-1Ra rs2234663 (2/4)	2,2	–	6 чел. (7,5 %)
	2,4	12 чел. (30 %)	24 чел. (30 %)
	4,4	28 чел. (70 %)	44 чел. (55 %)
	4,5	–	6 чел. (7,5 %)
Ген CSF1R rs386693509 (CA/TC)	CA/CA	1 чел. (2,5 %)	7 чел. (8,8 %)
	TC/CA	29 чел. (72,5 %)	12 чел. (15 %)
	TC/TC	10 чел. (25 %)	61 чел. (76,2%)
Ген CSF1R rs3216780 (del/G)	G/G	8 чел. (20 %)	18 чел. (25 %)
	del/G	30 чел. (75 %)	22 чел. (27,5 %)
	del/del	2 чел. (5 %)	38 чел. (47,5 %)

Прогностическая ценность генотипа T/T гена IL-1 α вероятно может заключаться в ассоциации с уровнем прогестерона. Выявлено, что у женщин-носителей генотипа T/T из основной группы содержание прогестерона было достоверно выше, чем у женщин-носителей генотипов C/T и C/C ($p=0,000001$, $p=0,040727$), более того, у женщин из группы сравнения наблюдалась такая же закономерность ($p=0,000001$, $p=0,000001$ соответственно). При сравнении содержания прогестерона у женщин-носителей генотипа T/T между группами в зависимости от исхода процедуры обнаружено, что у женщин с благоприятным исходом ЭКО содержание прогестерона было достоверно выше ($p=0,000122$).

Различий в сывороточном содержании IL-1 β , IL-1Ra между группами выявлено не было. Проводя анализ распределения генотипов IL1RN-VNTR установлено, что наибольший процент обследованных женщин из основной группы, так и из группы сравнения были носителями генотипа 4,4 – 70% (28 чел.) и 55% (44чел.). В ходе анализа содержания IL-1Ra в сыворотке крови в зависимости от носительства полиморфного минисателлита гена IL-1Ra не было выявлено достоверных различий как внутри групп, так и между исследуемыми группами.

В нашем исследовании была определена концентрация M-CSF – 265,8-322,1 пг/мл, позволяющая на прекоцептивном этапе прогнозировать максимальную вероятность наступления беременности в результате процедуры ЭКО у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием ($p=0,000347$) (табл. 3).

В проведенном исследовании сравнительный анализ частоты встречаемости генотипов полиморфизмов rs3216780 и rs386693509 гена c-fms показал, что большинство обследованных женщин из основной группы были носителями генотипов del/G и TC/CA, в группе женщин с ненаступившей беременностью доминировали генотипы del/del и TC/TC (табл. 2). Расчет отношения шансов показал, что генотипы del/G и TC/CA выступают как условно прогностически благоприятными для наступления беременности в результате процедуры ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием: женщины носители данных

генотипов имеют шанс забеременеть в результате ЭКО в 7,9 и в 14,94 раза выше, чем носители других генотипов ($p=0,00005$, $p=0,0001$ соответственно).

Полиморфизм генов цитокинов и их рецепторов оказывает влияние на сывороточный уровень цитокинов, что в свою очередь оказывает эффект на реализацию их биологических функций. В работе впервые выявлена зависимость сывороточного содержания М-CSF в зависимости от носительства генотипа rs386693509 гена *c-fms*. Выявлено, что женщины – носители генотипа TC/TC имеют более высокую концентрацию М-CSF, чем носители генотипов CA/CA и TC/CA. Вероятно, это может быть обусловлено чувствительностью самого рецептора CSF1R. Взаимодействие лиганда и рецептора – сложный процесс, в основе которого лежит каскад последовательных реакций аутофосфорилирования, перекрестного фосфорилирования близлежащих к рецептору эффективных молекул. Стоит также отметить, что медиана концентрации М-CSF, выявленная для носителей условно благоприятного генотипа TC/CA rs386693509 гена *c-fms*, соответствует II квартилю уровня М-CSF, также ассоциированным с благоприятным исходом процедуры ЭКО.

Отсутствие различий в содержании гормонов в зависимости от носительства генотипов полиморфных маркеров rs386693509 и rs3216780 гена CSF1R, вероятно, могут указывать на независимость данного фактора в качестве маркера эффективности программ ЭКО.

На наш взгляд, предикторную роль М-CSF можно объяснить в первую очередь полиморфизмом гена его рецептора, обуславливающим чувствительность CSF1R, посредством которого он реализует свои биологические функции.

С целью оценки вклада всех изучаемых показателей в прогнозирование ЭКО-индуцированной беременности нами было рассчитано OR для каждого показателя (табл. 3). Наибольший вклад в прогнозирование благоприятного исхода процедуры ЭКО вносят: концентрация IL-1 α 28,7–85,1 пг/мл, концентрация пролактина 144–291,5 мЕд/дл, концентрация М-CSF 265,8–322,5 пг/мл, генотип T/T rs1800587 гена IL-1 α , концентрация прогестерона 74,2–98,0

нмоль/л, генотип TC/CA rs3693509 гена CSF1R, генотип del/G rs3216780 гена CSF1R.

Заслуживает внимание тот факт, что сочетание изучаемых показателей имеет большую прогностическую значимость, чем использование только одного маркера. Для поиска сочетаний, обладающих максимальной прогностической значимостью, были изучены комбинации. Сочетание сывороточных концентраций прогестерона (74,2–98 пг/мл), пролактина (144–291,5 мЕд/дл) и толщины эндометрия 3,1–4 мм дает отношение шансов 1,0 (OR=0,3–1,2, p=0,021 484). Сочетание генотипа T/T гена IL-1 α и сывороточной концентрации IL-1 α (28,7–85,1 пг/мл) дает отношение шансов 4,2 (OR=1,7–10,1, p=0,000 909). Сочетание генотипа T/T гена IL-1 α , генотипа TC/CA гена CSF1R, генотипа del/G гена CSF1R и сывороточной концентрации M-CSF (265,8–322,5 пг/мл), пролактина (144–291,5 мЕд/дл) и прогестерона (74,2–98 пг/мл) дает отношение шансов 4,8 (OR=1,1–17,2, p=0,001 893). Сочетание генотипа T/T гена IL-1 α , генотипа TC/CA гена CSF1R, генотипа del/G гена CSF1R и сывороточной концентрации M-CSF (265,8–322,5 пг/мл) и пролактина (144–291,5 мЕд/дл) дает отношение шансов 5,3 (OR=2,1–25,9, p=0,032 0018). Сочетание сывороточных концентраций IL-1 α (28,7–85,1 пг/мл) и M-CSF (265,8–322,5 пг/мл), а также генотипа T/T гена IL-1 α , генотипа TC/CA гена CSF1R, генотипа del/G гена CSF1R дает отношение шансов 8,8 (OR=0,95–81,4, p=0,023 747). Сочетание сывороточной концентрации M-CSF (265,8–322,5 пг/мл), генотипа T/T гена IL-1 α , генотипа TC/CA гена CSF1R, генотипа del/G гена CSF1R дает отношение шансов 11,3 (OR=1,3–100,2, p=0,007 686). Сочетание генотипа TC/CA гена CSF1R, генотипа del/G гена CSF1R и сывороточной концентрации M-CSF (265,8–322,5 пг/мл) дает отношение шансов 17,1 (OR=4,6–63,8, p=0,000 000).

Так, максимальную прогностическую ценность имеет сочетание генетических маркеров: генотип T/T гена IL-1 α , генотип TC/CA гена CSF1R, генотип del/G гена CSF1R, при которых шанс благоприятного исхода ЭКО составляет 18,8 по отношению к основной группе (OR=4,0–88,6, p=0,000 003).

Прогностическая ценность изучаемых показателей в развитии ЭКО-индуцированной беременности у обследованных женщин

Показатель	Основная группа (n=40)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	P	OR	
					знач.	95% CI
1	2	3	4	5	6	7
IL-1Ra 122,6–200,0 пг/мл	11	19	0,3	0,960028	1,218	0,51–2,89
IL-1β 9,9–11,7 пг/мл	12	18	0,9	0,825428	1,476	0,63–3,47
Ооциты (TVР) 2–7 шт.	13	17	1,8	0,179713	1,784	0,76–4,18
IL-1RN-VNTR генотип 4,4	28	44	7,0	0,0718	1,9	0,85–4,28
IL-1RN-VNTR аллель 4	34	59	2,69	0,02618	2,02	0,74–5,49
Эндометрий 3,1–4,0 мм	14	16	3,2	0,073638	2,154	0,92–5,04
IL-1α 28,7–85,1 пг/мл	17	13	12,6	0,0035	3,8	1,61–9,04
Пролактин 144–291,5 мЕд/дл	18	12	12,8	0,000347	4,636	1,93–11,1
M-CSF 265,8–322,5 пг/мл	18	12	12,8	0,000347	4,636	1,93–11,1
Ген IL-1α генотип T/T	18	12	12,8	0,000347	4,64	1,93–11,1
Прогестерон 74,2–98,0 нмоль/л	19	11	16,2	0,000057	5,675	2,33–13,8
Ген CSF1R генотип del/G	30	22	28,6	0,0001	7,91	3,32–18,8
Ген CSF1R генотип TC/CA	29	12	39,2	0,00005	14,94	5,92–37,7

ВЫВОДЫ

1. У женщин, страдающих трубно-перитонеальным бесплодием с разными исходами процедуры ЭКО, концентрации IL-1 α в сыворотке крови также имели существенные различия, так у пациенток с эффективно выполненной процедурой ЭКО уровень IL-1 α был достоверно выше, чем у женщин с

неэффективной процедурой ($p=0,038178$). У этих же пациенток, различий в концентрациях IL-1 β , IL-1Ra и M-CSF не наблюдалось.

2. Установлено, что наличие в крови бесплодных женщин IL-1 α в концентрациях от 28,7 до 85,1 пг/мл и M-CSF в концентрациях от 265,8 до 322,1 пг/мл свидетельствует о возможности успешного проведения ЭКО. Эффективность данной процедуры не связана с уровнем в их крови IL-1 β и IL-1Ra.

3. У женщин с различными исходами ЭКО распределение частот генотипов полиморфных маркеров rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R, rs1800587 (C/T) гена IL-1 α существенно различалось, при этом различий в распределении генотипов полиморфного маркера rs2234663 (2/4) гена IL-1Ra, которые имели бы связь с исходом процедуры ЭКО, не установлено.

4. Гомозиготный вариант T/T rs1800587 гена IL-1 α , гетерозиготные варианты TC/CA rs3693509 и del/G rs3216780 гена CSF1R ассоциированы с эффективной процедурой ЭКО, для IL-1Ra полиморфных вариантов, ассоциированных с эффективностью проведения ЭКО, не выявлено.

5. Полиморфный вариант T/T rs1800587 гена IL-1 α ассоциирован с высоким, а полиморфный вариант C/C - с низким содержанием IL-1 α в крови женщин с трубно-перитонеальным бесплодием. Полиморфный вариант TC/TC rs386693509 гена CSF1R ассоциирован с высоким содержанием M-CSF в сыворотке крови этих больных.

6. Максимальная прогностическая ценность благоприятного исхода процедуры ЭКО связана с сочетанием генотипов T/T гена IL-1 α , TC/CA гена CSF1R и del/G гена CSF1R.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В комплексе проведения иммунодиагностики больным с трубно-перитонеальным бесплодием с целью отбора в программу ЭКО, наиболее целесообразным является определение в сыворотке крови содержания IL-1 α ,

M-CSF и полиморфизм генов rs386693509 (CA/TC) и rs3216780 (del/G) гена CSF1R, rs1800587 (C/T) гена IL-1 α .

2. С целью расширения методологических подходов для отбора в программу ЭКО, предлагается использовать выявленные иммуногенетические маркеры.

3. Для повышения знаний о значимости программ ЭКО, предлагается использование в учебном процессе медицинских вузов занятий, в которых разъяснялась бы важная роль иммуногенетических факторов в прогнозе проведения ЭКО.

Дальнейшие перспективы разработки темы

На основании полученных данных, в рамках углублённого исследования, представляется необходимым проведение молекулярно-генетического анализа, целью которого был бы расширенный поиск предиктивных маркеров успешного проведения ЭКО. Помимо этого полученные результаты могут служить теоретической базой в вопросах фармакогеномики при разработке оптимизации средств фармакотерапии в «персонафицированной медицине». Совокупность полученных данных может быть использована в составлении диагностической панели прогнозирования эффективности программы ЭКО.

Публикации по теме диссертации

1. **Лапштаева А.В., Радаева О.А., Новикова Л.В., Ефремов И.А.** Полиморфные маркёры гена CSF1R rs386693509, rs3216780 (3'UTR области гена) и эффективность процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщин с бесплодием // **Российский иммунологический журнал.** – 2016. – Т. 10 (19). № 2(1). – С. 210-212.

2. **Лапштаева А.В., Радаева О.А., Новикова Л.В., Ефремов И.А.** Взаимосвязь сывороточных уровней и полиморфных вариантов генов IL-1 α и IL-1RA с эффективностью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) // **Российский иммунологический журнал.** – 2017. – Т. 11. № 3. – С. 402-404.

3. **Лапштаева А.В.**, Радаева О.А., Новикова Л.В. Прогностическое значение системы макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия // **Медицинская иммунология.** – 2017. – Т. 19. № 5. – С. 267.

4. **Лапштаева А.В.**, Сычев И.В. Исследование ассоциации полиморфизма С-889Т гена IL-1 α с риском развития трубно-перитонеального бесплодия / В книге: Беляевские чтения Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. – Новосибирск. – 2017. С. 144.

5. **Лапштаева А.В.**, Сычев И.В. Роль IL-1 α в эффективности экстракорпорального оплодотворения у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием / В книге: Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста. Материалы III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань. – 2017. С. 140-142.

6. **Лапштаева А.В.** Интерлейкин-1 альфа у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием / **Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX Международной медико- биологической конференции молодых исследователей.** – СПб. – 2017. – Т.20. С. 319-320.

7. Горлов Д.Ф., **Лапштаева А.В.** Значение IL-1 α в наступлении беременности у женщин, участвующих в программе экстракорпорального оплодотворения / **Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь»** – Донецк. – 2017. С.44

8. **Лапштаева А.В.** Исходы программы ЭКО в зависимости от полиморфизма генов цитокинов / **Материалы конгресса «XII Международного конгресса по репродуктивной медицине».** – М. – 2018. С. 467-468.

9. **Лапштаева А.В.**, Ерохина О.П. Оценка клинико-anamnestических данных и показателей системы интерлейкина-1 у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием // **Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.** – 2018. №1. – С. 87-94.

10. Лапштаева А.В., Евсегнеева И.В., Новиков В.В., Сычев И.В., Караулов А.В. Сывороточный уровень интерлейкина-1 α , полиморфизм его гена и результативность лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения // **Медицинская иммунология**. – 2018. – Т. 20. № 3. – С. 417-424.

11. Лапштаева А.В., Евсегнеева И.В., Новиков В.В., Караулов А.В. Serum levels of m-csf and c-fms gene polymorphism as predictors of the effectiveness of in vitro fertilization // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии**. – 2018. – Т. 17. № 2. – С. 43-48.

12. Лапштаева А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н. Ассоциация полиморфизма гена ин-терлейкина-1 α (rs1800587 5`UTR области гена) с эффективностью экстракорпорального оплодотворения // **Медицинская иммунология**. – 2018. – Т. 20. № 3. – С. 417-424.

4. Лапштаева А.В., Радаева О.А., Новикова Л.В., Герасеменко А.В. Способ прогнозирования результативности программы экстракорпорального оплодотворения / **патент на изобретение** RUS 2646822 от 11.01.2017.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ИФА – иммуноферментный анализ

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

CSF1R – рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора

IL – интерлейкин

IL-1RA – рецепторный антагонист IL-1

M-CSF – макрофагальный-колониестимулирующий фактор

TVP – трансвагинальная пункция