

© Н. О. Мотовилова, И. Ю. Коган,
Арег А. Тотолян

СЕКРЕЦИЯ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ В ЯИЧНИКАХ У БОЛЬНЫХ С БЕСПЛОДИЕМ В ЦИКЛЕ ЭКО

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН

УДК: 618.177-089.888.11-07

■ В статье представлены данные о содержании G-CSF и GM-CSF в фолликулярной жидкости яичников у больных с бесплодием в цикле ЭКО и влиянии данных факторов на его эффективность.

■ **Ключевые слова:** экстракорпоральное оплодотворение; колониестимулирующие факторы.

Применение экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является одним из перспективных современных способов преодоления бесплодия. Средняя частота наступления беременности и родов после ЭКО составляет соответственно 29,1% и 21,5% (данные Европейского общества репродукции человека, 2006). Разработка методологических подходов к прогнозированию исходов ЭКО представляет собой важную научно-практическую задачу. В качестве предиктора эффективности ЭКО и риска развития его осложнений может быть использована оценка содержания в крови, фолликулярной жидкости яичников и эндометрии цитокинов, хемокинов и факторов роста. Однако результаты исследований, посвященных этой проблеме, часто противоречат друг другу. Это обусловлено организационно-методическими особенностями разных исследований, многообразием и полифункциональностью действия цитокинов [1, 2, 3].

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между эффективностью цикла ЭКО и секрецией гранулоцитарного (G-CSF) и макрофагально-гранулоцитарного (GM-CSF) колониестимулирующих факторов в яичниках у больных с сочетанными формами бесплодия.

Материалы и методы исследования

Обследовано 79 женщин, которые составили основную группу (n = 36) и группу сравнения (n = 36). В основную группу вошли больные с сочетанными формами бесплодия 25–38 лет, у которых настоящий цикл ЭКО завершился наступлением беременности (визуализация плодного яйца при ультразвуковом исследовании через 3 недели после переноса эмбрионов). В группу сравнения вошли больные такого же возраста, у которых беременность после цикла ЭКО не наступила. Из исследования были исключены пациентки с отсутствием одного или обоих яичников, с гипо-, гипергонадотропными вариантами недостаточности яичников. При анализе цикла ЭКО использовали следующие его характеристики: длительность стимуляции яичников гонадотропинами, курсовая доза гонадотропинов, количество растущих фолликулов и полученных во время пункции яйцеклеток, частота оплодотворения (визуализация 2 пронуклеусов в течение суток от начала оплодотворения).

Содержание в фолликулярной жидкости цитокинов оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем 17-Plex (определяемый динамический диапазон 2–32000 пкг/мл). Фолликулярную жидкость получали во время пункции фолликулов. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программной систе-

мы STATISTICA for Windows 10.0. Исследованы методы анализа средних тенденций и линейного корреляционного анализа. Во всех случаях статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Содержание G-CSF и GM-CSF в фолликулярной жидкости больных основной группы и группы сравнения достоверно не отличалось (табл. 1).

Выявлена корреляционная взаимосвязь между концентрацией в фолликулярной жидкости GM-CSF и количеством растущих при гонадотропной стимуляции фолликулов ($R_s = 0,29$; $p < 0,05$) (рис. 1). Обнаружено также, что между концентрацией GM-CSF в фолликулярной жидкости и количеством яйцеклеток, полученных при пункции яичников, также имеется достоверная позитивная взаимосвязь ($R_s = 0,27$; $p < 0,05$) (рис. 2). Достоверных изменений с увеличением возраста больных GM-CSF не выявлено.

Не выявлено взаимосвязи между секрецией в яичниках G-CSF и показателями их гонадотропной стимуляции. Обнаружено, что секреция этого цитокина возрастает с увеличением возраста больных ($R_s = 0,33$; $p < 0,05$) (рис. 3).

При анализе качества оплодотворения было определено, что частота оплодотворения обратно коррелировала с содержанием в фолликулярной жидкости яичников GM-CSF ($R_s = -0,29$; $p < 0,05$) (рис. 4).

Обсуждение результатов исследования

Представление о том, что иммунокомпетентные клетки яичника (ИКК) (макрофаги, лимфоциты) имеют важное функциональное значение в фолликулогенезе и овуляции сформулировано уже несколько десятилетий тому назад. Прежде всего это связывается с их способностью к продукции цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, которые участвуют в регуляции созревания фолликулов, овуляции, развитии и регрессии желтого тела, в синтезе стероидных гормонов. К таким факторам относят G-CSF и GM-CSF. Полученная в нашем исследовании корреляция между коли-

чеством растущих фолликулов и содержанием в фолликулярной жидкости яичников GM-CSF, вероятно, обеспечивается высоким количеством ИКК в тканях яичников при гонадотропной стимуляции. Кроме этого, секреция GM-CSF может осуществляться также гранулезными клетками, количество которых закономерно увеличивается во время роста нескольких фолликулов при стимуляции яичников в циклах ЭКО. Известно, что GM-CSF обеспечивает пролиферацию, дифференциацию и активацию клеток миелоидной линии (моноцитов, макрофагов, гранулоцитов). Считается, что основная роль данного фактора в яичниках заключается в рекрутировании и активации макрофагов, гранулоцитов и дендритных клеток. Кроме этого, GM-CSF осуществляет сигнальное взаимодействие между ооцитом и окружающими его соматическими (гранулезными) клетками, обеспечивая рост фолликула, а при формировании желтого тела — синтез прогестерона [4, 15, 16]. Существуют данные о влиянии GM-CSF на развитие эмбриона до имплантации. Дефицит фактора приводил к замедлению пролиферации клеток бластоцисты. При этом культивирование эмбриона в присутствии GM-CSF восстанавливало темп клеточной дифференцировки эмбриона [12]. Данный цитокин играет также важную роль в обеспечении толерантности материнского организма к антигенным структурами плода, обеспечивая нормальный ход раннего развития эмбриона [7, 17].

В настоящей работе впервые выявлена отрицательная взаимосвязь между уровнем продукции GM-CSF в яичниках во время стимуляции гонадотропинами и качеством оплодотворения эмбриона. В последние годы получены сведения о том, что стимуляция яичников, ее режимы влияют на «качество» ооцита, потенции его к оплодотворению и темпы раннего развития эмбриона. Известно, что морфофункциональная зрелость ооцита является основой успешного оплодотворения и ранних стадий эмбриогенеза. Уже в 90-е годы прошлого века было выявлено, что развитие в яичнике большого количества ооцитов (более 10) в результате стимуляции коррелирует с нарушением оплодот-

Таблица 1

Содержание G-CSF и GM-CSF в фолликулярной жидкости яичников у больных основной группы и группы сравнения

Фактор	Группы обследованных больных	
	сравнения	основная
	M±m	M±m
G-CSF, пкг/мл	40,32±5,8	34,73±8,05
GM-CSF, пкг/мл	1,36±0,23	1,13±0,21

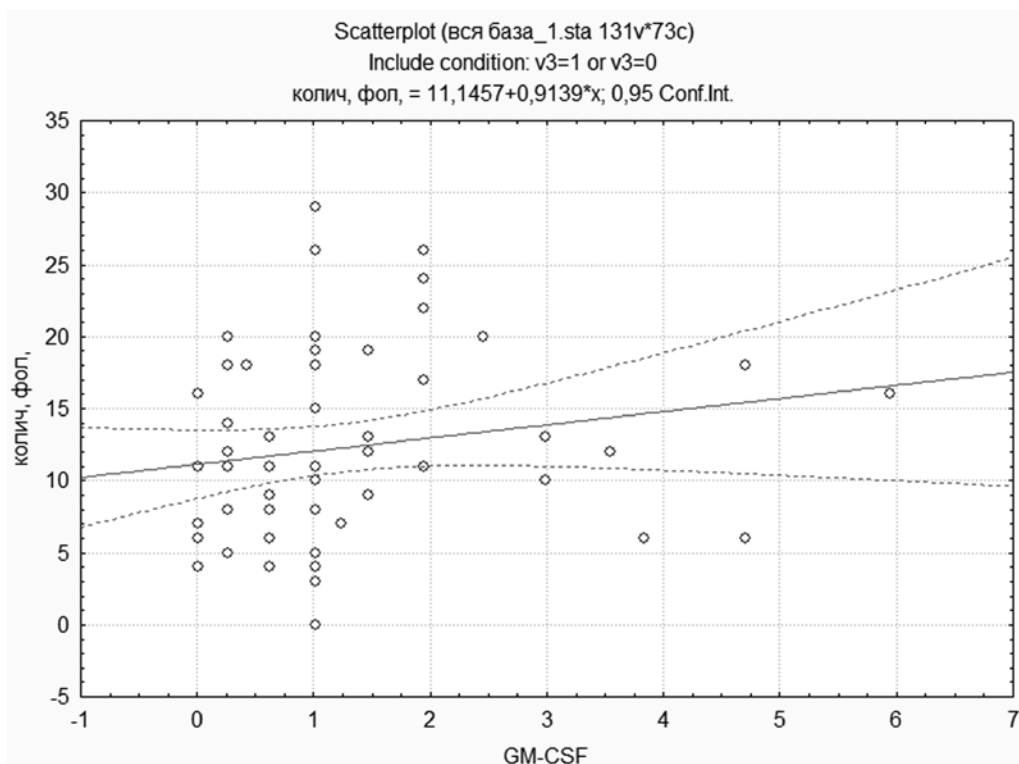


Рис. 1. Зависимость содержания в фолликулярной жидкости GM-CSF (пг/мл) и количества фолликулов в яичниках

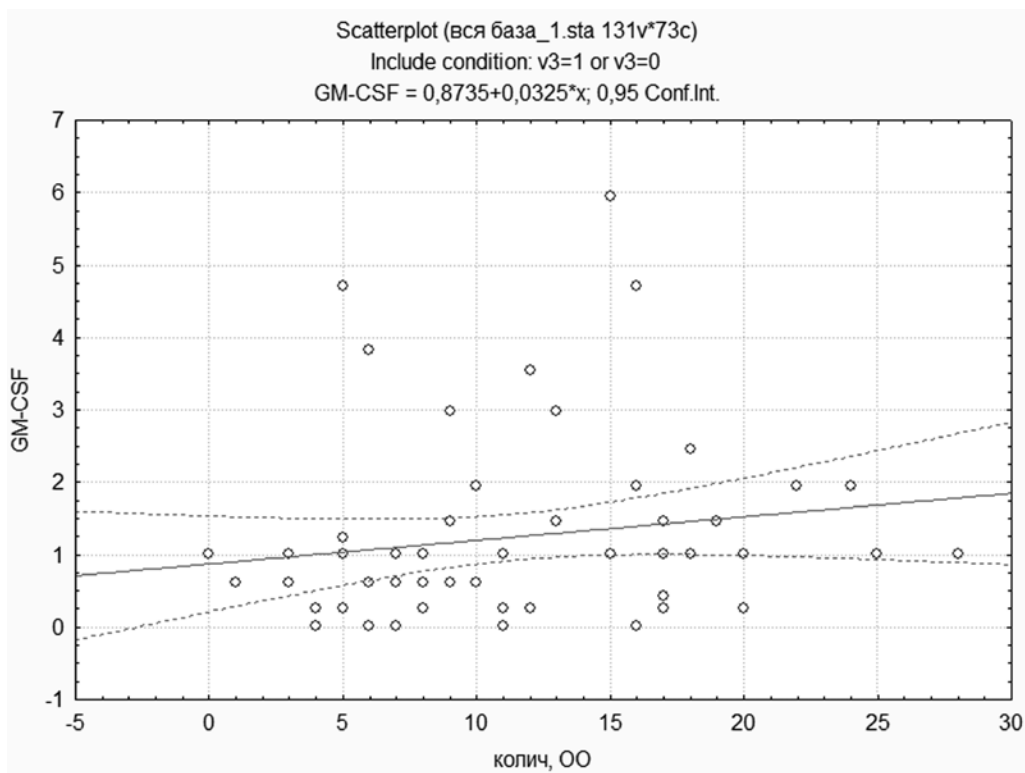


Рис. 2. Зависимость содержания в фолликулярной жидкости GM-CSF (пг/мл) и количества ооцитов, полученных во время пункции

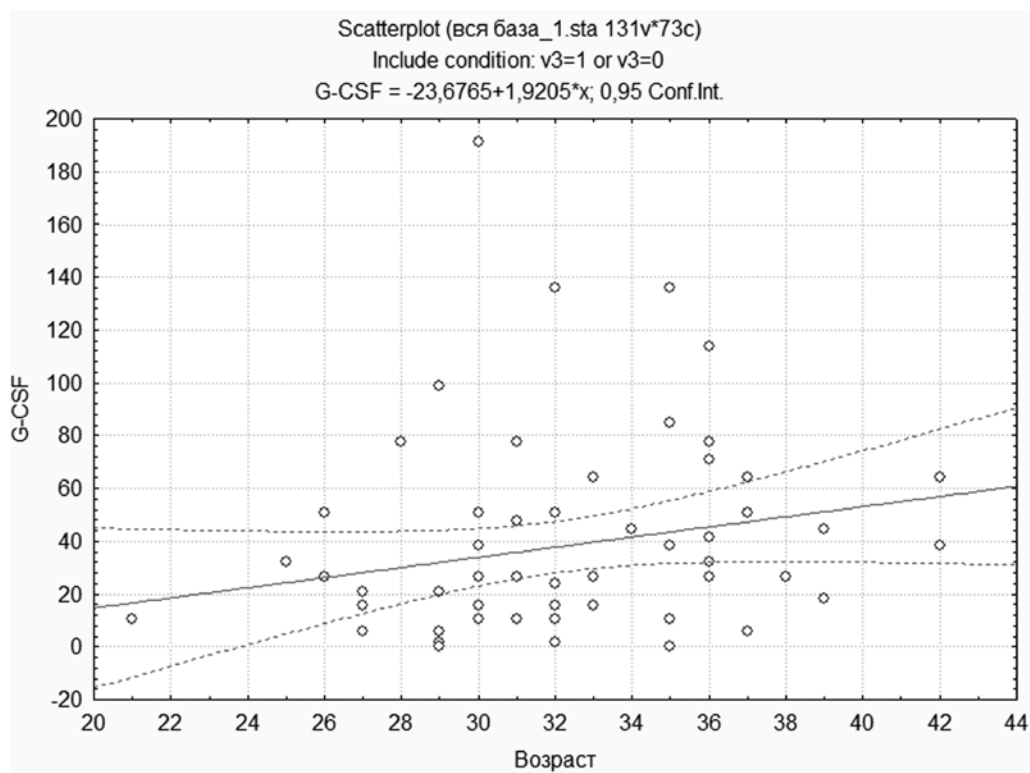


Рис. 3. Зависимость содержания G-CSF (пкг/мл) в фолликулярной жидкости от возраста больных

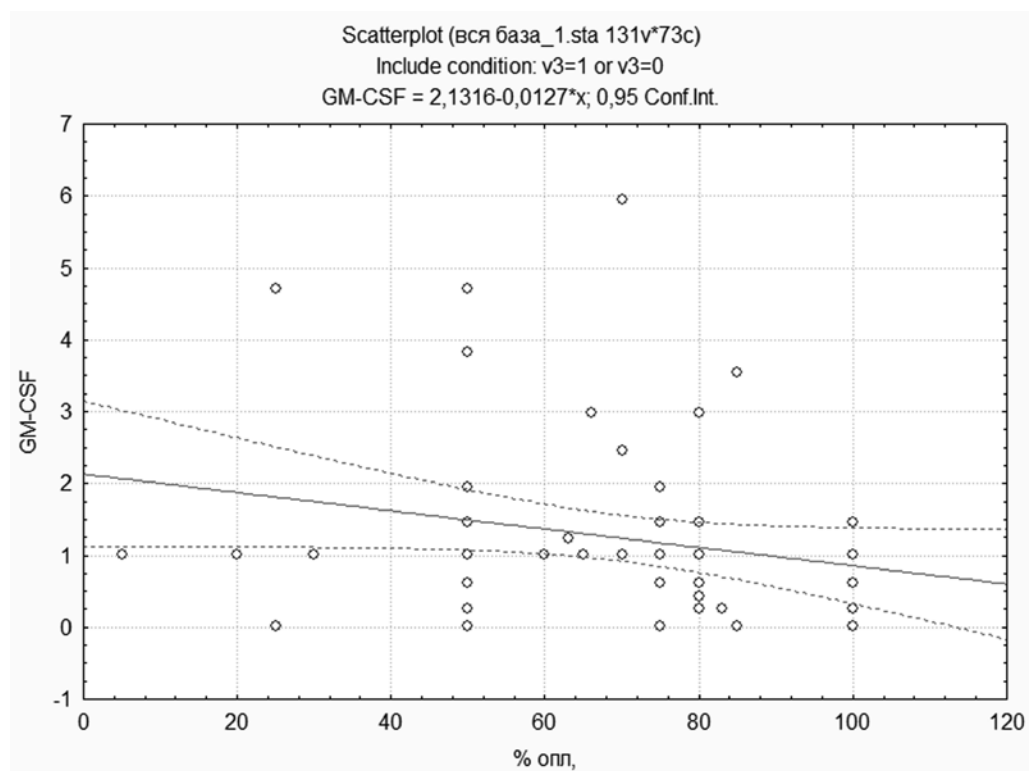


Рис. 4. Зависимость частоты оплодотворения (% опл.) от содержания в фолликулярной жидкости GM-CSF (пкг/мл)

ворения, снижением частоты наступления беременности после цикла ЭКО. Предполагается, что негативное влияние на зрелость ооцита, процесс оплодотворения и дробления могут оказывать высокие концентрации эстрадиола в крови больных во время стимуляции яичников. Предметом дискуссий является также влияние на яйцеклетку, в том числе на частоту хромосомных аномалий, фармакологических препаратов, используемых во время стимуляции яичников (гонадотропинов, агонистов и антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона). Полученные данные свидетельствуют о том, что усиление секреции в яичнике провоспалительных цитокинов, может являться одним из возможных механизмов неблагоприятного влияния стимуляции яичников гонадотропинами на ооцит. Полученные нами результаты подтвердили имеющиеся фундаментальные представления о том, что взаимодействие между ооцитом и соматическими клетками фолликула является критическим для нормального течения фолликуло- и оогенеза [18].

В литературе нет данных о зависимости содержания G-CSF и GM-CSF в яичниках у больных разного возраста. В результате проведения настоящего исследования обнаружено, что секреция G-CSF цитокина возрастает с увеличением возраста больных. В настоящее время сложно объяснить полученную взаимосвязь. G-CSF также принадлежит к семейству гемопоэтических факторов роста и продуцируется, прежде всего, клетками гемопоэза. В некоторых исследованиях была выявлена способность к синтезу этого фактора остеобластами, гладкомышечными клетками, эндотелиоцитами, эпителиальными клетками, клетками яичника и эндометрия [8, 10, 20]. Экспрессия G-CSF и его рецептора выявлена в гранулезных клетках [9]. G-CSF синтезируется тека-клетками и клетками стромы яичника [9, 6]. Содержание в крови G-CSF увеличивается в течение первой фазы менструального цикла, что, возможно, свидетельствует о влиянии этого фактора на рост фолликула и овуляцию [19]. Возрастание уровня G-CSF в крови больных наблюдается также во время стимуляции яичников [13]. В некоторых исследованиях было выявлено, что G-CSF и его рецепторы могут иметь важное значение в имплантации и плацентации. Так, показано, что он продуцируется в децидуальной оболочке и трофобласте, стимулируя пролиферацию его клеток [11]. A. Salmassi и соавт. (2005), выявили, что содержание в крови G-CSF во время пункции фолликулов положительно коррелирует с частотой наступления беременности, а наиболее низкий уровень фактора был отмечен у больных

с «бедным» ответом на стимуляцию яичников [14]. Аналогичные результаты были получены в исследованиях Nishimura K. [et al.] [5]. Авторы предполагают, что уровень G-CSF в крови больных может отражать эффективность стимуляции яичников и исход цикла ЭКО, а их локальный низкий уровень в яичниках может явиться одним из факторов «бедного» ответа яичников на гонадотропную стимуляцию. Возрастание содержания этого фактора в фолликулярной жидкости, ассоциированное с увеличением возраста больных, возможно, является проявлением возрастных изменений функциональных свойств ИКК яичника, а также комплекса ооцит-кумулюс, в том числе их адаптации к гонадотропной стимуляции.

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать определение локального уровня колониестимулирующих факторов (G-CSF и GM-CSF) в качестве перспективного предиктора результата стимуляции яичников в циклах ЭКО и их эффективности.

Литература

1. Сельков С. А., Павлов О. В. Плацентарные макрофаги. — М.: КМК, 2007.
2. Соколов Д. И., Сельков С. А. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты. — СПб.: Изд-во Н-Л., 2012.
3. Толоян А. А., Фрейдлин И. С. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 1999.
4. Bornstein S. R., Rutkowski H., Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis // Mol. Cell Endocrinol. — 2004. — Vol. 215. — P. 135–141.
5. Changes in macrophage colony-stimulating factor concentration in serum and follicular fluid in in-vitro fertilization and embryo transfer cycles / Nishimura K. [et al.] // Fertil. Steril. — 1998. — Vol. 69. — P. 53–57.
6. Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein / Yanagi K. [et al.] // Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17. — P. 3046–3052.
7. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor / Lédée N. [et al.] // Hum. Reprod. — 2008. — Vol. 23, N 9. — P. 2001–2009.
8. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation / Lombroso R. [et al.] // Hum. Reprod. Update. — 2005. — Vol. 11, N 6. — P. 613–630.
9. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells / Salmassi A. [et al.] // Fertil. Steril. — 2004. — Vol. 81. — P. 786–791.
10. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human

- endometrium / Giacomini G. [et al.] // Hum. Reprod. — 1995. — Vol. 10. — P. 3259–3263.
11. Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta / McCracken S. A. [et al.] // Biol. Reprod. — 1999. — Vol. 60. — P. 790–796.
 12. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos / Robertson S. A. [et al.] // Biol. Reprod. — 2001. — Vol. 64. — P. 1206–1215.
 13. *Hock D. L., Huhn R. D., Kemmann E.* Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation // Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 12. — P. 2143–2146.
 14. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? / Salmassi A. [et al.] // Hum. Reprod. — 2005. — Vol. 20, N 9. — P. 2434–2440.
 15. *Knight P. G., Glister C.* TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development // Reproduction. — 2006. — Vol. 132. — P. 191–206.
 16. Macrophage contributions to ovarian function / Wu R. [et al.] // Hum. Reprod. Update. — 2004. — Vol. 10. — P. 119–133.
 17. *Robertson S. A., Care A. S., Skinner R. J.* Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice // Biol. Reprod. — 2007. — Vol. 76. — P. 738–748.
 18. *Santos M. A., Kuijk E. W., Macklon N. S.* The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. // Reproduction. — 2010. — Vol. 139, N 1. — P. 23–34.
 19. Serum concentration of endogenous G-CSF in woman during the menstrual cycle and pregnancy / Makinoda S. [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. — 1995. — Vol. 25. — P. 877–879.
 20. *Zhao Y., Rong H., Chegini N.* Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue // Biol. Reprod. — 1995. — Vol. 53. — P. 923–930.

Статья представлена С. А. Сельковым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

OVARIES COLONY-STIMULATING FACTORS SECRETION IN PATIENTS WITH INFERTILITY IN IVF CYCLES

Motovilova N. O., Kogan I. Yu., Totolian Areg A.

■ **Summary:** This article arrange the data about G-CSF and GM-CSF content in oocytes follicular liquid infertility patients in IVF and these factors influence for IVF performance.

■ **Key words:** in vitro fertilization; colony stimulating factors; G-CSF; GM-CSF.

■ Адреса авторов для переписки

Мотовилова Наталья Олеговна — заведующая отделением, врач. Центр Планирования Семьи, Пушкинского района, г. Санкт-Петербург 196600, Россия, г. Санкт-Петербург, Пушкинский район, ул. Магазейная, д. 72.

E-mail: motovilova-natal@mail.ru.

Коган Игорь Юрьевич — д. м. н., ученый секретарь. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: iagmail@ott.ru.

Тотolian Арег Артемович — д. м. н., профессор. Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. ул. Мира, 14, Санкт-Петербург.

E-mail: totolian@pasteurorg.ru.

Motovilova Natalia O. — M.D Center family planning, SPb 196600, St. Petersburg,

Pushkin area, Magazeynaya St., 72.

E-mail: motovilova-natal@mail.ru.

Kogan Igor Yu. — MD, PhD, specialist, scientific secretary. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.

E-mail: iagmail@ott.ru.

Totolian Areg A. — M.D., Ph.D., professor St. Petersburg Pasteur Institute, Mira St., 14 St. Petersburg.

E-mail: totolian@pasteurorg.ru.