

И. И. КУЦЕНКО, Е. И. КРАВЦОВА, В. А. АВАКИМЯН, О. В. ТОМИНА, П. Г. СТОРОЖУК

## ГОРМОНООПОСРЕДОВАННАЯ ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИМПЛАНТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С АДЕНОМИОЗОМ И НЕУДАЧНЫМИ ПОПЫТКАМИ ЭКО

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Россия, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4; тел.: 8-918-411-39-40; e-mail: luzum69@mail.ru

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Оценить влияние цитокиновых дисфункций на имплантационный потенциал эндометрия у пациенток с аденомиозом и неудачными попытками ЭКО и возможность гормоноопосредованной регуляции цитокинового баланса на предгравидарном этапе.

**Материалы и методы.** В исследование включены 90 пациенток с бесплодием, неудачной попыткой ЭКО в анамнезе и диффузным аденомиозом 1 или 2 степени. Пациентов рандомизировали на две группы: 1-ю группу составили 44 пациентки (1 группа) – предгравидарная подготовка не проводилась. Вторая группа – 46 пациенток – предгравидарная подготовка диеногестом (2 мг ежедневно в течение 3 месяцев до проведения цикла ЭКО). Контрольная группа (3 группа) – 30 здоровых фертильных женщин. Для оценки имплантационного потенциала эндометрия исходно и после проведения предгравидарной подготовки определяли концентрацию LIF, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-10, RAIL в цервикальной слизи.

**Результаты.** Анализ показателей у больных с аденомиозом свидетельствовал о снижении у них имплантационного потенциала эндометрия. Выявлено, что гормономодулирующая терапия диеногестом, частично нивелирует дефекты цитокиновой регуляции и приводит к некоторому повышению эффективности программ ВРТ.

**Заключение.** Показана целесообразность включения диеногеста в план предгравидарной подготовки у пациенток с аденомиозом, но для полноценной иммунокоррекции в комплекс предгравидарной подготовки у женщин с аденомиозом 1 и 2 степени вероятно необходим подбор дополнительной направленной иммуностропной терапии.

**Ключевые слова:** имплантация, бесплодие, аденомиоз, цитокиновая регуляция, овуляция

**Для цитирования:** Куценко И.И., Кравцова Е.И., Авакимян В.А., Томина О.В. Гормоноопосредованная цитокиновая регуляция имплантационного потенциала эндометрия у пациенток с аденомиозом и неудачными попытками ЭКО. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2017; 24(4): 91-95. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-4-91-95.

**For citation:** Kucenko I.I., Kravtsova E.I., Avakimyan V.A., Tomina O.V. Hormonemediated regulation of cytokines in patients with adenomyosis and unsuccessful IVF attempts. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2017; 24(4); 91-95. (In Russian). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-4-91-95.

I. I. KUCENKO, E. I. KRAVTSOVA, V. A. AVAKIMYAN, O. V. TOMINA, P. G. STOROZHUK

### HORMONEMEDIATED REGULATION OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH ADENOMYOSIS AND UNSUCCESSFUL IVF ATTEMPTS

FSBEI HE Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia, 350063, Krasnodar, Sedin street, 4; tel.: 8-918-411-39-40; e-mail: luzum69@mail.ru

### SUMMARY

**Aim.** The study was to evaluate the effect of cytokine dysfunctions on the endometrial implantation potential in patients with adenomyosis and unsuccessful IVF attempts and the possibility of hormone-mediated regulation of the cytokine balance at the pre-gravidational stage.

**Materials and methods.** The study included 90 patients with infertility, an unsuccessful attempt of IVF in the history and diffuse adenomyosis of 1 or 2 degrees. Patients were randomized into two groups: the 1st group consisted of 44 patients (group 1) – no pre-education training was conducted. The second group – 46 patients – pregravid preparation of dienogest (2 mg daily for 3 months before the IVF cycle). Control group (group 3) – 30 healthy fertile women. To assess the implantation potential of the endometrium, initially, and after pre-gravidity training, the concentration of LIF, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-10, RAIL in cervical mucus was determined.

**Results.** Analysis of the indices in patients with adenomyosis showed a decrease in their implantation potential of

the endometrium. It has been revealed that hormone-modulating therapy with dienogest partially neutralizes cytokine regulation defects and leads to a certain increase in the effectiveness of IVF programs.

**Conclusion.** Shows expediency of including dienogest in the pregravid preparation plan for patients with adenomyosis, but for full immunocorrection in pregravid training in women with adenomyosis 1 and 2 The degree of additional directional immunotropic therapy is probably necessary.

**Keywords:** implantation, infertility, adenomyosis, cytokine regulation, ovulation

### Введение

Уменьшение рождаемости и распространение малодетности привели к устойчивой депопуляции населения России на современном этапе. По данным Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ) частота бесплодия в нашей стране составляет 15%, а в некоторых регионах этот показатель достигает 20%, что считается критическим уровнем для демографической ситуации [1, 2]. Около 50% бесплодных пар нуждаются в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). При этом частота наступления беременности в циклах ЭКО за последние 5 лет практически не изменилась и составляет по данным отчета РАРЧ в расчете на цикл – 31,5%, на пункцию – 32,4%, на перенос эмбрионов – 38,4%.

Особую категорию пациентов программ ВРТ представляют женщины с повторными неэффективными циклами ЭКО, составляющие около 30% от всех пациентов, проходящих лечение с использованием данных методов [3]. Поиск путей повышения эффективности ВРТ представляет широкое поле для научно-практических исследований, что подтверждают материалы 32-й ежегодной конференции Европейского общества репродукции и эмбриологии человека (Хельсинки, 2016). Большое число исследований посвящено выяснению причин неудач имплантации [4, 5]. Для успешной имплантации, адекватного формирования экстраэмбриональных структур и благополучного течения гестационного процесса необходимо наличие двух составляющих – хорошее качество эмбрионов и удовлетворительная рецептивность эндометрия. Поскольку при подсадке используются только качественные эмбрионы, то поиск морфологических, иммуногистохимических, молекулярных и генетических маркеров рецептивности эндометрия, а также путей её повышения [6, 7] является одним из приоритетных направлений в репродуктологии. Активность рецептивного аппарата эндометрия во многом зависит от наличия той или иной гинекологической патологии [8]. Одной из причин, наиболее часто нарушающих репродуктивную функцию у молодых женщин, является аденомиоз, который выявляется у 40-45% женщин, страдающих первичным бесплодием, и у 50-58% – вторичным [9]. В настоящее время частота наступления беременности после программы ЭКО у этих пациенток составляет около 25,6% [10] в расчете на перенос эмбрионов, что существенно ниже, чем средний статистический показатель. Ряд работ свидетельствуют об изменении иммунореактивности и нарушении

цитокинового баланса у больных аденомиозом на системном и местном уровне с избыточной активацией продукции провоспалительных цитокинов даже при ранних стадиях заболевания, при этом открытым остается вопрос гормонопосредованной цитокиновой регуляции на начальных этапах репродуктивного процесса у данных пациентов, что и определило актуальность данного исследования. Интерес к нюансам гормонопосредованной цитокиновой регуляции и возможностям коррекции цитокинового баланса путем проведения предгравидарной подготовки к циклу ЭКО пациенток с ранними стадиями аденомиоза напрямую связан с клиническими запросами практического здравоохранения, в том числе и с повышением эффективности методик ВРТ у данных пациенток.

**Цель исследования:** Оценить влияние цитокиновых дисфункций на имплантационный потенциал эндометрия у пациенток с аденомиозом и неудачными попытками ЭКО и возможности гормонопосредованной регуляции цитокинового баланса на предгравидарном этапе.

### Материалы и методы

Первично, на этапе ретроспективного исследования, в клиническую разработку было включено 112 пациенток с бесплодием, неудачной попыткой ЭКО в анамнезе и подозрением на аденомиоз. Этим пациенткам было проведено общеклиническое лабораторное обследование, исследование гормонального профиля, УЗИ в динамике цикла, офисная гистероскопия с проведением пайпель-биопсии и гистологическим анализом биоптата, произведено взятие аспирата из полости матки на специфическую и условно-патогенную флору. В результате у 101 (90,2%) пациенток был выявлен диффузный аденомиоз 1 или 2 степени.

В дальнейшем из них была сформирована проспективная основная группа исследования, включающая 90 человек из этих 101 пациенток, обратившихся на очередную попытку ЭКО, которые путем простой рандомизации были разделены на две клинические группы. Из них 44 пациентки (1 клиническая группа) вступили в протокол ЭКО без проведения непосредственной предгравидарной подготовки. Пациенткам 2 клинической группы (n=46) была проведена попытка коррекции цитокинового статуса диеногестом (препарат первой линии терапии аденомиоза), в связи с его доказанными проапоптотическим, противовоспалительными, антиангиогенным и иммуномодуляторными эффектами. Диеногест назначался по 2 мг еже-

дневно в течение 3 месяцев до проведения цикла ЭКО. Контрольную группу (3 группа) составили 30 здоровых фертильных женщин, имеющих благополучную беременность и роды здоровым плодом в анамнезе и в данный момент наблюдавшихся по программе суррогатного материнства. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, все пациентки дали информированное согласие на участие в исследовании.

Анализ исходного состояния цитокинового статуса проводился во всех клинических группах и в группе контроля, для этого на этапе предгравидарного обследования в естественном овуляторном цикле у отобранных пациенток для оценки рецептивности эндометрия определяли концентрацию LIF и интерлейкинов провоспалительного (IL1 $\beta$  и IL-6) и противовоспалительного звена (IL-10, RAIL) в цервикальной слизи методом иммуноферментного анализа (ASCENT, Финляндия) с использованием соответствующей панели моноклональных антител (ЗАО ВЕКТОР-БЕСТ, г. Ростов-на-Дону) в дни менструального цикла, определенные по мочевому тесту на овуляцию и подтверждением овуляции по УЗИ (ЛГ+3, ЛГ+7). Рассчитывался провоспалительный индекс (ПВИ), отражающий баланс цитокинов в семействе ИЛ-1 как отношение ИЛ1 $\beta$ /РАИЛ. Достоверность неинвазивного метода диагностики имплантационных свойств эндометрия путем определения LIF и интерлейкинов провоспалительного (IL1 $\beta$  и IL-6) и противовоспалительного звена (IL-10, RAIL) в цервикальной слизи доказана ранее [9]. Повторно концентрацию цитокинов LIF, IL1 $\beta$ , RAIL цервикальной слизи определяли в дни менструального цикла, определенные по мочевому тесту на овуляцию на ЛГ+7, так как на предыдущем этапе эти иммуногистохимические и временные параметры оказались наиболее показательными.

Для индукции суперовуляции использовались стандартный «короткий» протокол. Подсчет количества полученных ооцитов и оценка их качества проводились по общепринятой шкале. Математическую обработку результатов проводили методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере.

Эффективность ЭКО определялась по следующим критериям:

- Качество эмбрионов оценивали по морфологическим параметрам: количеству бластомеров, степени фрагментации, равномерности дробления, наличию вакуолей и других включений в цитоплазму, отсутствию многоядерных бластомеров. Высоким качеством эмбрионов считали случай, когда проведен перенос хотя бы одного эмбриона с числом бластомеров не менее восьми одинакового размера и отсутствием фрагментации. Пациентки с неудовлетворительным качеством эмбрионов были исключены из данного исследования.
- Диагностика беременности осуществлялась путем проведения исследования уровня хо-

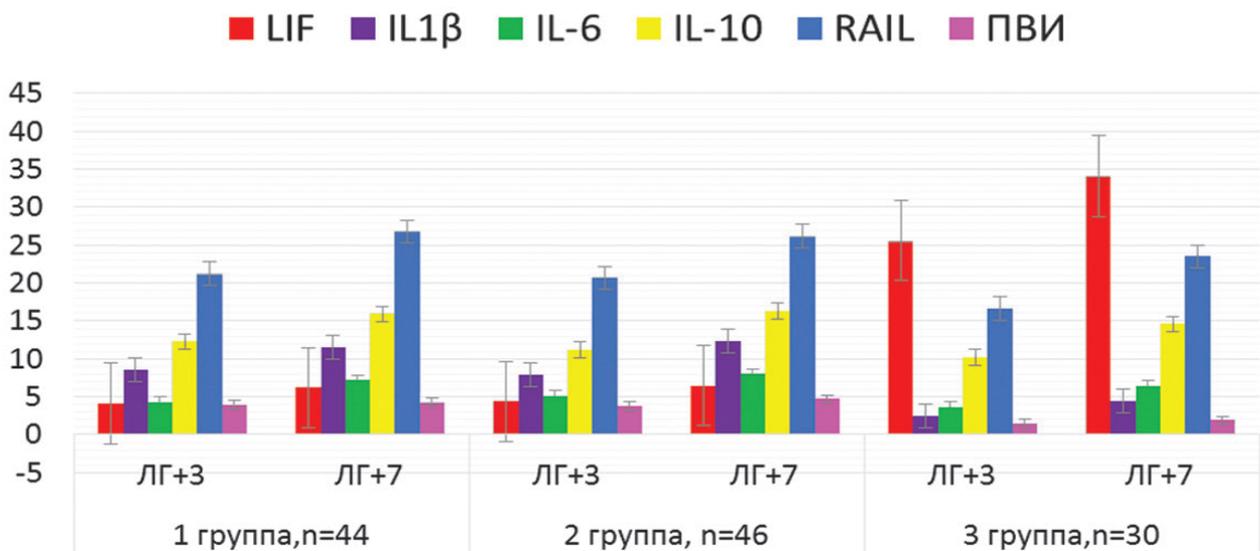
рионического гонадотропина в крови через 12-14 дней от момента переноса эмбрионов (биохимическая беременность) и ультразвуковым подтверждением маточной беременности на 21- 23 день после переноса эмбрионов.

## Результаты и обсуждение

Возрастной диапазон всех обследованных женщин с диффузным аденомиозом 1 и 2 степени и неудачными попытками ЭКО (n=90) был от 25 до 35 лет. У 62 (71,2%) больных аденомиоз был диагностирован впервые, 25 (28,7%) пациенток на протяжении различного времени (от 1 года до 8 лет) наблюдались с данным диагнозом: из них 12 – не получали лечения, 9 – принимали жанин по схеме от 6 месяцев до 2 лет, 4 – регулон, ярину или джес по схеме контрацепции от 3 месяцев до 5 лет. У 35 (34,6%) – первичное бесплодие. Вторичное бесплодие – у 52 (59,7%), причем у 12 (11,9%) больных аденомиозом имели место только искусственные аборты, 13 (12,8%) – самопроизвольные выкидыши малых сроков, 43 (42,5%) пациентки имели в анамнезе одни роды. С целью контрацепции 12 (11,8%) пациенток использовали внутриматочные спирали длительностью от 6 месяцев до 5 лет.

Среди перенесенных гинекологических заболеваний у больных аденомиозом наиболее часто – у 63 (62,4%) пациенток, имели место воспалительные заболевания женских половых органов и неоднократно получали курсы противовоспалительной и рассасывающей терапии, которые оказывались неэффективными или с кратковременным эффектом. На момент исследования результаты ПЦР исследования на урогенитальную флору и посева аспирата из полости матки на специфическую и условно-патогенную флору были отрицательными. По результатам УЗИ, офисной гистероскопии и стандартного гистологического исследования результатов пайпель-биопсии патологии эндометрия и морфологических признаков хронического эндометрита выявлено не было, эндометрий находился в соответствующей дню цикла фазе (ранняя пролиферативная фаза).

На основании иммуногистохимического анализа выявлено, что в цервикальной слизи у женщин с аденомиозом (1 и 2 группа) и неудачными попытками ЭКО в анамнезе концентрация LIF была достоверно ниже, чем в группе контроля (3 группа). Так в 1 группе на 3-й и 7-й дни после пика ЛГ LIF составил соответственно 4,1 $\pm$ 2,7 пг/мл и 6,9 $\pm$ 2,8 пг/мл, во 2 группе – 4,5 $\pm$ 3,5 пг/мл и 6,5 $\pm$ 2,8 пг/мл, а в группе контроля – 25,6 $\pm$ 7,1 и 34,1 $\pm$ 6,9 пг/мл, (p<0,05). При этом у пациенток с аденомиозом наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  8,4 $\pm$ 1,24 пг/мл и 11,7 $\pm$ 3,21 пг/мл – 1 группа, 7,95 $\pm$ 0,9 пг/мл и 12,35 $\pm$ 2,2 пг/мл – 2 группа, против 2,43 $\pm$ 0,76 пг/мл и 6,56 $\pm$ 0,92 пг/мл – в 3 группе, p<0,05, соответственно), и статистически значимо был увеличен уровень IL-6 (p<0,05) (рис. 1).

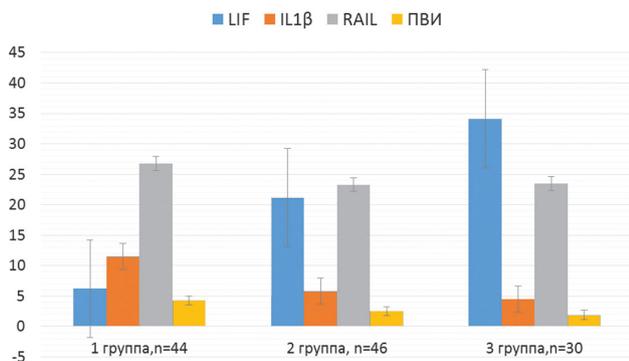


**Рис. 1.** Сравнительная характеристика концентрации цитокинов в цервикальной слизи у пациенток с аденомиозом и здоровых женщин.

Противовоспалительные цитокины IL-10 и RAIL в 1 и 2 группах также имели тенденцию к возрастанию, однако разница между контрольной группой и пациентками с аденомиозом была статистически не значимой, как на 3-й, так и на 7-й дни после пика ЛГ,  $p > 0,05$  (рис. 1).

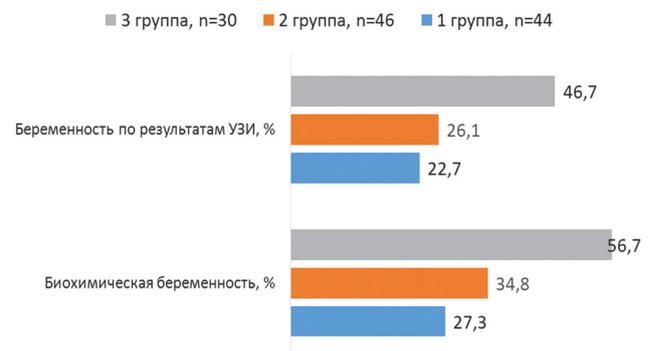
По данным нашего исследования после применения диеногеста в качестве предгравидарной подготовки концентрация LIF в цервикальной слизи у пациенток 2 клинической группы статистически достоверно возросла до  $21,2 \pm 3,23$  против  $6,2 \pm 2,8$  в 1 клинической группе, но все же оставалась статистически значимо более низкой, чем в группе контроля ( $p < 0,05$ ).

Уровень IL1β статистически достоверно снизился относительно 1 группы  $5,8 \pm 2,8$  против  $11,5 \pm 3,21$  ( $p < 0,05$ ), но также не достиг параметров группы контроля (рис. 2). Динамика RAIL была минимальной, однако при анализе ПВИ выявлено достоверное снижение его численного значения, относительно 1 клинической группы ( $2,45 \pm 0,67$  против  $4,43 \pm 1,05$ ,  $p < 0,05$ ), хотя этот индекс и был статистически значимо выше значений группы контроля,  $p < 0,05$  (рис. 2).



**Рис. 2.** Сравнительная характеристика концентрации цитокинов в цервикальной слизи у пациенток с аденомиозом на фоне предгравидарной подготовки диеногестом, без нее и у здоровых женщин.

В результате проведенного цикла ЭКО биохимическая беременность наступила у 27,3% пациенток в 1 группе, маточная по результатам УЗИ подтверждена лишь у 22,7%. Во 2 клинической группе биохимическая беременность выявлена у 34,8%, маточная – у 26,1%, что не составило достоверно значимой разницы, тогда как показатели пациенток контрольной (3 группы) были статистически достоверно выше ( $p < 0,05$ ) (рис.3).



**Рис. 3.** Результаты проведенных циклов ЭКО по результатам положительного анализа на ХГЧ и по данным УЗИ исследования в клинических и контрольной группах, %.

Таким образом, аденомиоз даже ранних степеней отрицательно влияет на эффективность программы ЭКО. Одним из ключевых факторов неудачных попыток ЭКО при аденомиозе является наличие дефектов имплантационного фактора эндометрия, выражающегося, в том числе в цитокиновом дисбалансе с приростом пула провоспалительных цитокинов. Известно, что пул провоспалительных цитокинов является потенцирующим для выработки LIF, однако избыточная продукция провоспалительных цитокинов, наблюдающаяся на локальном уровне при аденомиозе даже начальных степеней, подавляет продукцию LIF клетками эндометрия, существен-

но снижая восприимчивость матки к имплантации бластоцисты. Наряду антипролиферативным эффектом и активирующим действием на прогестероновые рецепторы диеногест при аденомиозе, согласно литературным данным, обеспечивает и некоторые иммуностропные гормоноопосредованные эффекты. В связи с вышесказанным, нами была оценена эффективность коррекции цитокинового дисбаланса диеногестом с целью восстановления рецептивности эндометрия при ранних стадиях аденомиоза. В ходе исследования выявлено, что предгравидарная подготовка эндометрия диеногестом к программе ЭКО частично нивелирует дефекты цитокиновой регуляции и приводит к некоторому повышению эффективности программ ВРТ, что обосновывает целесообразность его включения в план предгравидарной подготовки у пациенток с аденомиозом. Однако иммуностропных эффектов диеногеста, по данным нашего исследования, недостаточно для полноценной коррекции иммунологического надзора над имплантацией, в связи с чем целесообразен подбор дополнительной направленной иммуностропной терапии для включения в комплекс предгравидарной подготовки к циклу ЭКО у женщин с аденомиозом 1 и 2 степени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурьгина О.В. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека // 19-й ежегодный ретроспективный отчет. – 2013.
2. Лебедев С.В. Статистика бесплодия в России: заблуждения и факты (часть 1). – 2012.
3. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению: руководство. / Под ред. Г.Т. Сухих, Т.А. Назаренко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, – 2010. – С. 784.
4. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация // Федеральные клинические рекомендации. – М., – 2013. – С. 65.
5. Coulam C.B., Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012; 67: 296-03.
6. Громенко Ю.Ю., Исхаков И.Р. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2012. – № 2. – С. 27-30.

7. Руководство по клинической эмбриологии. / Под ред. В.С. Корсака. – М.: МК, – 2011. – С. 224.
8. Эндометриоз и бесплодие. Рекомендации Практического Комитета Американского Общества Репродуктивной Медицины // *Fertility and Sterility*. – 2006. – Т.86, прил. 4. – P. 156-160.
9. Марченко Л.А. Современный взгляд на отдельные аспекты эндометриоза (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*. – 2011. – №17 (1). – С. 61-66.
10. Краснополянская К.В., Горская О.С., Кабанова Д.И. Роль гестагенов в лечении бесплодия и невынашивания беременности // *Акушерство и гинекология: научно-практический журнал*. – 2011. – № 2. – С. 56-58.

#### REFERENCES

1. Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygin O.V. VRT register of the Russian Federation. Association of Human Reproduction // 19th Annual Retrospective Report. – 2013.
2. Lebedev S.V. Statistics of infertility in Russia: misconceptions and facts (part 1). – 2012.
3. A infertile marriage. Modern approaches to diagnosis and treatment: a guide. Ed. G.T. Sukhikh, T.A. Nazarenko. – Moscow: GEOTAR-Media, – 2010. – P. 784.
4. Endometriosis: diagnosis, treatment and rehabilitation // *Federal Clinical Recommendations*. – M., – 2013. – P. 65.
5. Coulam C.B., Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012; 67: 296-03.
6. Gromenko Yu.Yu., Iskhakov I.R. Influence of quality factors of transferred embryos on predicting the frequency of pregnancy in programs of in vitro fertilization. *Medical Bulletin of Bashkortostan*. 2012; 2: 27-30.
7. Manual on Clinical Embryology / Ed. V.S. Korsak. – Moscow: МК, – 2011. – P. 224
8. Endometriosis and infertility. Recommendations of the Practical Committee of the American Society of Reproductive Medicine // *Fertility and Sterility*. 2006; 86, app. 4:156-160.
9. Marchenko L.A. Modern view on certain aspects of endometriosis (literature review). *Reproduction problems*. 2011; 17 (1): 61-66.
10. Krasnopolskaya K.V., Gorskaya O.S., Kabanova D.I. The role of gestagens in the treatment of infertility and miscarriages // *Obstetrics and Gynecology: Scientific and Practical Journal*. 2011; 2: 56-58.

Поступила / Received 26.03.2017  
Принята в печать / Accepted 14.05.2017

*Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest*

**Контактная информация:** Авакимян Вероника Артемовна; тел.: 8-918-411-39-40; e-mail: kes148@yandex.ru; Россия, 350078, г. Краснодар, ул. Тургенева 107, кв. 1.

**Corresponding author:** Veronica A. Avakimyan; tel.: 8-918-411-39-40; e-mail: kes148@yandex.ru; Russia, 350078, Krasnodar, Turgeneva Str. 107-1.