

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН В ЦИКЛЕ ЭКО

© 2019 г. Е. А. Андреева¹, Н. А. Хонина^{1,2*}, Н. М. Пасман²

*E-mail: nkhonina@mail.ru

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Образование микровезикул является физиологическим процессом, однако, их повышенное содержание ассоциировано с рядом заболеваний и имеет высокую диагностическую значимость, в том числе и при патологии репродукции. В данной работе показано, что в фолликулярной жидкости женщин определяются AnnV⁺ микровезикулы. При этом повышенный уровень AnnV⁺CD107⁺ микровезикул ассоциирован с возрастом, а увеличение AnnV⁺CD45⁺, AnnV⁺CD206⁺, AnnV⁺CD14⁺ микровезикул — с большей продолжительностью бесплодия. Ретроспективный анализ показал, что наступление клинической беременности ассоциировано с более высоким уровнем AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ микровезикул.

Ключевые слова: микровезикулы, фолликулярная жидкость, бесплодие, ЭКО

DOI: 10.31857/S102872210006428-5

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточной иммуноотерапии. Тел. (383) 236-03-29, (383) 228-21-01.

E-mail: nkhonina@mail.ru

Авторы:

Андреева Е. А., аспирант лаборатории клеточной иммуноотерапии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Хонина Н. А., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноотерапии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Пасман Н. М., д.м.н., профессор зав. кафедрой акушерства и гинекологии «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Новосибирск, Россия.

Микровезикулы (МВ), представляют собой структуры размером 0,05–1 мкм, содержащие компоненты цитоплазмы (ферменты, факторы транскрипции, нуклеиновые кислоты и др.) [1]. Повышенный уровень МВ регистрируется при воспалении, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваниях [2]. Согласно единичным данным, представленным в обзоре литературы, МВ, присутствующие в ФЖ, участвуют в фол-

ликулогенезе, мейозе ооцитов, стероидогенезе и профилактике полиспермии после оплодотворения [3]. Так же показано, что МВ, высвобождаемые эмбриональными клетками, влияют на формирование трофобласта во время имплантации и наступления беременности [4].

Цель исследования. Исследовать уровень и фенотип МВ в ФЖ, и их потенциальную связь с клиническими и эмбриологическими показателями у женщин в цикле ЭКО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 32 женщины с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО и 5 фертильных женщин — доноров ооцитов. Исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия. Возраст женщин с бесплодием варьировал от 20 до 42 лет (медиана 33 года), длительность бесплодия — от 1 года до 18 лет (медиана 5,5 года). Первичное бесплодие было диагностировано у 59,4%, вторичное — у 40,6% женщин. Сбор образцов ФЖ осуществляли при трансвагинальной пункции яичников. Для выделения

МВ ФЖ центрифугировали (800 g/10 мин), затем 1500 мкл образца переносили в пробирку, центрифугировали (13000 g/10 мин) (ультрацентрифуга Centrifuge 5810R, Eppendorf, Германия). Далее собирали 1400 мкл надосадочной жидкости и 100 мкл жидкости непосредственно над осадком и хранили для дальнейшего исследования при -80°C . Фенотипическую характеристику МВ проводили методом проточной цитометрии. После размораживания образцы ультрацентрифугировали (20800 g/ 30 мин при 4°C). Осадок ресуспендировали в 100 мкл AnnV-связывающего буфера (BD Biosciences, США) и инкубировали в присутствии AnnV (APC, BD Biosciences), анти-CD206 (FITC), анти-CD14 (PE), анти-CD45 (PE), анти-CD107a (PerCP-Cy 5.5) моноклональных антител (BD Biosciences). Абсолютное количество МВ оценивали с использованием технологии TruCount (BD Biosciences) в соответствии с инструкцией производителя. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ образцов ФЖ женщин раннего репродуктивного возраста (<35 лет) и позднего (≥ 35 лет) выявил статистически значимые различия в уровне популяций AnnV⁺ МВ. В ФЖ женщин позднего репродуктивного возраста уровень AnnV⁺ был в 1,7 (34,9/мкл vs 20,6/мкл, $p=0,03$), а AnnV⁺CD107a⁺ в 1,3 (15,6/мкл vs 11,7/мкл, $p=0,04$) раза выше, чем у женщин <35 лет. Между возрастом женщин и содержанием AnnV⁺CD107a⁺ выявлялась прямая корреляционная связь — $r(S)=0,34$, $p=0,05$. Полученные данные могут свидетельствовать о повышенном цитолитическом потенциале МВ у женщин в старшей возрастной группе.

В зависимости от длительности бесплодия, все пациентки были поделены на группы: <3 лет (группа 1), 3–6 лет (группа 2) и >6 лет (группа 3). У женщин из группы 3 по сравнению с группой 2 регистрировалось более высокое содержание AnnV⁺CD45⁺ — в 2,2 раза (13,7/мкл vs 6,3/мкл;

$p=0,02$); AnnV⁺CD206⁺ — в 1,6 раза (3,9/мкл vs 8,6/мкл; $p=0,03$), AnnV⁺CD14⁺ — в 2,2 раза (24,6/мкл vs 11,1/мкл; $p=0,02$). Увеличение доли AnnV⁺ МВ, вероятно, обусловлено усилением апоптотических процессов на фоне длительного бесплодия, ассоциированного с хроническими воспалительными процессами и гормональными дисфункциями. В завершении был проведен ретроспективный анализ уровня МВ у женщин с различными исходами ЭКО — с клинической беременностью (группа 1); с биохимической беременностью (группа 2) и с отсутствием беременности (группа 3). Из полученных данных следует, что женщины из группы 1 характеризовались значимо более высоким содержанием в ФЖ AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ по сравнению с группой 3: (13,9/мкл vs 9,1/мкл, $p=0,02$ и 19,6/мкл vs 8,8/мкл, $p=0,04$, соответственно).

ВЫВОДЫ

Обнаружено повышение уровня AnnV⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ у женщин старшей возрастной группы. В то же время большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем AnnV⁺CD45⁺, AnnV⁺CD206⁺, AnnV⁺CD14⁺ МВ. Наступление клинической беременности было ассоциировано с более высоким уровнем AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Reviews*. 2013, 27, 31–39.
2. Lawson C., Vicencio J., Yellon D. M., Davidson S. M. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol*. 2016, 228, 2, R57–71.
3. Machtinger R., Laurent L. C., Baccarelli A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2016; 22(2), 182–193.
4. Tannetta D., Dragovic R., Alyahyaei Z., Southcombe J. Cellular and Extracellular vesicles and reproduction—promotion of successful pregnancy. *Molecular Immunology*. 2014, 11, 548–563.

MICROVESICLES IN FOLLICULAR FLUID WITH WOMEN IN IVF PROGRAM

© 2019 E. A. Andreeva¹, N. A. Khonina^{1,2*}, N. M. Pasman²

**E-mail: nkhonina@mail.ru*

¹*Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 27.03.2019

Microvesicles has a significant potential as a new diagnostic and prognostic biomarker including reproductive pathologies. In this paper shown that an elevated level of microvesicles in women's follicular fluid is associated with the age, the duration of infertility and clinical pregnancy.

Key words: microvesicles, follicular fluid, infertility, IVF

Authors:

Andreeva E. A., postgraduate student of the laboratory cell immunotherapy Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Khonina N. A., ☒ MD., Leading Researcher of the laboratory cell immunotherapy Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** nkhonina@mail.ru;

Pasman N. M., PhD, MD, Professor (Medicine), Head of Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia.