

Б. В. ДОНСЬКОЇ¹, В. П. ЧЕРНИШОВ¹, К. С. СТЕПАНЮК², К. Ю. КРЮЧКОВ³ (Київ)

ПОРУШЕННЯ АНТИМІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ У ПАЦІЄНТОК З МНОЖИННИМИ РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ

¹ДУ «ІПАГ НАМН України»; ²Київський Національний університет ім. Т. Шевченка,
³«Ісїда» <boris_donskoy@ukr.net>

Мітохондрії – напівавтономні органели, які мають часткову структурну схожість з бактеріальним еволюційним симбіотичним попередником, що і є потенційним джерелом ризику виникнення імунного конфлікту. Виявлено асоціацію репродуктивних ускладнень з антимітохондріальною відповіддю до фосфоліпиду кардіоліпіну та білка теплового шоку HSP60. Вироблення організмом антитіл до кардіоліпіну часто асоціюється з порушеннями репродуктивної функції і є найпоширенішим фактором неуспішності ІВФ. Гуморальна відповідь на HSP60 потенціюється внаслідок хламідійної інфекції. Ми виявили, що антитіла до кардіоліпіну та HSP60 достовірно частіше зустрічаються у поєднанні. Така асоціація анти-HSP60 та антифосфоліпідні антитіла (АФА), імовірно, формує протоаутоімунний фенотип з продукуванням аутоантитіл до мітохондріальних компонентів. Цей фенотип несприятливий для імплантації. Він, імовірно, спричинений генетичною схильністю до Т-незалежного продукування аутоантитіл. АФА асоціюються з репродуктивними порушеннями, проте досить часто зустрічаються у нормальній популяції, на відміну від анти-HSP60 антитіл, які не виявляють у пацієнтів без множинних неуспішних імплантацій. Це дає можливість визначити АФА як «гіпердіагностичний», а антитіла до HSP60 – «гіподіагностичний» маркери репродуктивних порушень. Їх поєднання відкриває можливість для створення нових діагностичних підходів до прогнозування репродуктивних порушень.

Ключові слова: антифосфоліпідні антитіла; антикардіоліпінові антитіла; антитіла до білків теплового шоку; in vitro фертилізація; хламідія; множинні імплантаційні втрати.

Вступ. Еволюційно мітохондрії є напівавтономними органелами, що походять від симбіотичного попередника. Ця автономність (власне продукування протеїнів, бактеріальна схожість білоксинтезуючого апарата та мембранних структур) створює певні передумови для розвитку імунного конфлікту. Мембрани мітохондрій містять невласливий плазмолемі ліпід – кардіоліпін, здатний викликати гуморальну імунну відповідь. Таке продукування антикардіоліпінових антитіл асоціюється з порушеннями репродуктивної функції і є найпоширенішим фактором неуспішності ІВФ [6, 7]. У попередньому дослідженні ми виявили, що кофакторнезалежні антикардіоліпінові антитіла призводять до погіршення імплантації під час ІВФ [5].

HSP (heat shock proteins) – група білків теплового шоку, що становлять окрему родину висококонсервативних мультифункціональних поліпептидів, які можна зустріти в усіх живих клітинах. Синтез HSP відбувається як відповідь на клітинний стрес, викликаний змінами в навколишньому середовищі (гіпертермія, запалення, інфекції, вплив вільних радикалів кисню, важких металів, етанолу тощо). Крім того, HSP втягнені в процес апоптозу і є біомаркерами пошкодження клітин [10]. Вони беруть участь у діяльності репродуктивної системи ссавців. Представників родини виявлено в яєчнику, трофобласті, плаценті та міометрії. Є підтвердження, що HSP25 і HSP70 експресуються в ендометрії та фалопієвих трубах, запобігають імплантації в трубах й підвищують рецептивність ендометрію до бластоцисти [11].

Крім того, експресія HSP має фундаментальне значення в процесі гаметогенезу у ссавців та людини. Різні HSP необхідні для кожного етапу спермато- і овогенезу, щоб забезпечити нормальний хід процесів трансформації й диференці-

ації. HSP розглядають як модулятори сигналу для імунної системи: або для імносупресії, або імностимуляції [12].

Мітохондрії містять HSP60 – молекулярний шаперон, який відіграє важливу роль в транспорті через мембрану мітохондрій. Він каталізує холдинг та збирання білків в матриксі, а його гідрофобна частина відповідає за підтримання розгорнутої конформації трансмембранного білка-транспортера [13]. HSP60 має здатність розрізняти білки, що містять в альфа-спіралі специфічний 15–20 амінокислотний залишок. Така послідовність свідчить про необхідність вивільнення білка з мітохондрій. Крім того, HSP60 полегшує протеолітичну деградацію неправильно згорнутих і денатурованих білків. Він суворо залежить від свого ко-шаперона – HSP10, який зв’язується з ним та регулює його субстратв’язувальну й АТФ-азну активність. Hsp60 швидко активується при окисному стресі, вірусних інфекціях, впливі хімічних речовин, підвищенні температури тіла та опроміненні. Він кодується ядерною ДНК і синтезується у вигляді великого попередника, що містить N-кінцеву послідовність, необхідну для переносу в мітохондрії, після чого відбувається розщеплення білка до зрілої форми в мітохондріальному матриксі [1].

Деякі HSP є імунодомінантними антигенами для ряду патогенних мікроорганізмів, серед яких і *Chlamydia trachomatis* [12]. Це найбільш поширений у світі патоген бактеріальної інфекції, що передається статевим шляхом. Інфекція зазвичай перебігає безсимптомно. Діагноз можна встановити методом ампліфікації нуклеїнових кислот найчастіше після скринінгу хламідій або у разі виникнення ускладнень [15]. Зазвичай інфекція від шийки матки потрапляє до маткових труб, в яких стає хронічною [15]. Імунна відповідь на цю інфекцію – продукування інтерферону-гамма і прозапальних цитокінів – призводить до переривання хламідійної внутрішньоклітинної реплікації. Проте часто патоген залишається життєздатним і переходить в стійку форму [14].

Стійка форма хламідії виробляє високий рівень HSP60 (с-HSP60). Хронічне вивільнення хламідійного с-HSP60 індукує локальну прозапальну імунну відповідь в епітелії фалопієвих труб і призводить до утворення рубців та оклюзії маткових труб [14].

HSP60 (h-HSP60) людини на 50 % гомологічний до хламідійного. Отже, хламідійна інфекція фалопієвих труб може потенційно викликати розвиток аутоантитіл до h-HSP60 [15]. Є підтвердження, що імунна сенсibiлізація до HSP пов’язана з порушеннями імплантації після ІВФ [9]. Саме тому дослідження імунної відповіді на HSP як фактор неплідності можуть бути важливими в репродуктивній медицині.

Мета дослідження – оцінити значення антитіл до білків теплового шоку при розвитку порушень ембріоімплантації та взаємозв’язок між білками теплового шоку й антитілами до кардіоліпіну (АКА), фосфатидилсерину (АФСА) і фосфатидилетаноламіну (АФЕА).

Матеріали і методи. Визначення АКА, АФСА та АФЕА антитіл класу IgG проводили прямим твердофазним імуноферментним методом ELISA [2, 8] з певними модифікаціями. Позитивними вважали значення АКА та АФСА вище 10 GLP [3]. Дана модифікація методу дозволяла визначати як кофакторзалежні, так і кофакторнезалежні АФА [4]. Антитіла IgG до хламідій та анти HSP60 визначали за імуноферментними тест-системами «Vitrotest Україна». Визначення та аналіз результатів проводили згідно з інструкцією до тест системи.

Групи пацієнток. Вагітні в першому триместрі, у яких не було обтяженого акушерського анамнезу, становили групу фізіологічної вагітності ($n = 127$).

Пацієнтки з діагнозом неплідності, переважно трубно-перитоніальної форми, становили групу неплідних ($n = 58$).

До групи множинних неуспіхів імплантації – МНІ ($n = 149$) увійшли пацієнтки, у яких мали місце два і більше неуспішних цикли ІВФ (в середньому 2,2) з переносом нормальних здорових ембріонів.

Статистичну обробку й аналіз даних проводили з використанням програми In Stat Graph.

Пацієнтки поінформовані про дослідження і дали на нього згоду. Дослідження проведено у рамках запланованої НДР та затверджено біотичним комітетом ДУ «ІПАГ» НАМНУ.

Результати та їх обговорення. Відсоток серопозитивності на IgG до хламідій у групах фізіологічної вагітності, неплідності та у пацієнок з МНІ становив 18,8 (24/127), 22,8 (13/58) та 31,5 % (47/149) відповідно, проте різниця недостовірна.

Антитіла до HSP60 виявляли переважно у пацієнок з множинними неуспішними процедурами ІВФ. Частота серопозитивності у таких пацієнок становила 7,4 % (11/149), тоді як у пацієнок групи фізіологічної вагітності їх не виявлено (0/127), а у групі неплідності – у 1 (1,7 %) (1/58).

АФА, зокрема АКА (CL), достовірно частіше відмічали у пацієнок з МНІ – 23,9 % (34/142) порівняно з групою фізіологічної вагітності, в якій частота АКА становила лише 7 % (9/127). У жінок з діагнозом неплідності, проте без МНІ, частота АКА становила 13,7 % (8/58). Рівень антитіл до фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну достовірно за групами не різнився (рис. 1).

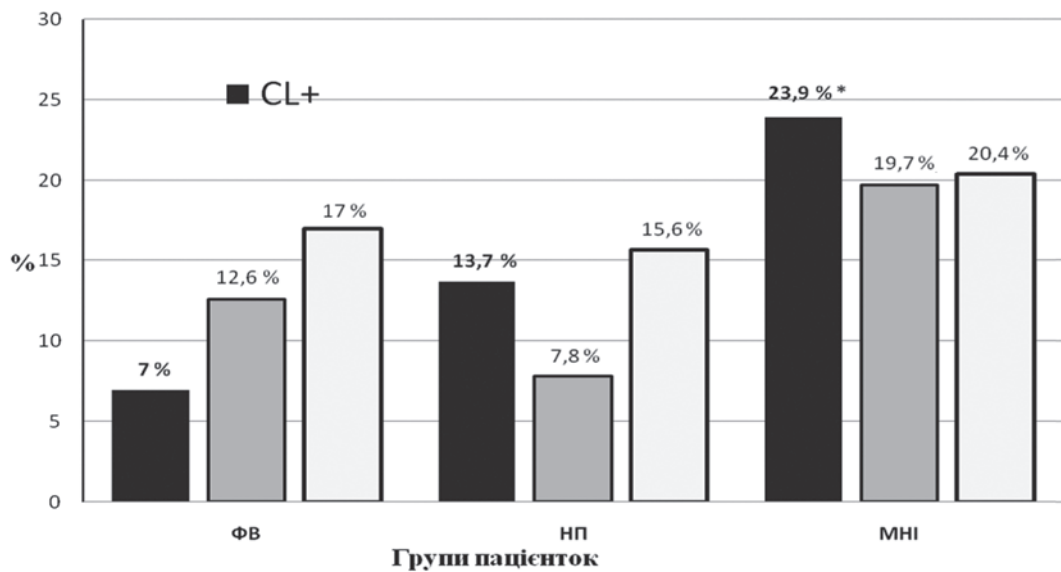


Рис. 1. Частота виявлення антифосфоліпідних антитіл (CL, PS, PE) у пацієнок з фізіологічною вагітністю (ФВ) ($n = 127$), з неплідністю (НП) ($n = 58$) та у пацієнок з множинними неуспішними імплантаціями (МНІ) ($n = 142$).

* Достовірна різниця з групою фізіологічної вагітності ($P < 0,05$) Odds ratio = 4.128

У пацієнок з антитілами до хламідій відмічено вищу частоту виявлення АКА – 18,4 % (16/87) порівняно із серонегативними пацієнтками на антитіла до хламідій – 10,9 % (33/302). Отримана різниця відповідає межі достовірності ($P = 0,006$).

Нами показано, що ця різниця викликана високою частотою антитіл до кардіоліпіну (КЛ) саме у пацієнок з антитілами до HSP60. У пацієнок з антитілами до HSP60 була достовірно вища частота антитіл до КЛ – 36,4 % (4/11) порівняно з пацієнтками, у яких виявлено лише IgG до хламідій – 16,7 % (12/72), та пацієнтками, у яких не було IgG хламідій, – 10,9 % (33/302) (рис. 2).

Додатково перевірено 4 пацієнтки на хламідійну інфекцію методом ПЛР, які були позитивними на HSP60 і негативними на наявність хламідійної ДНК. Тобто продукування антитіл до HSP60 не пов’язане з актуальною присутністю патогену.

Також у пацієнок з аутоантитілами до HSP60 частіше мав місце чоловічий фактор неплідності, проте група недостатня для однозначного висновку.

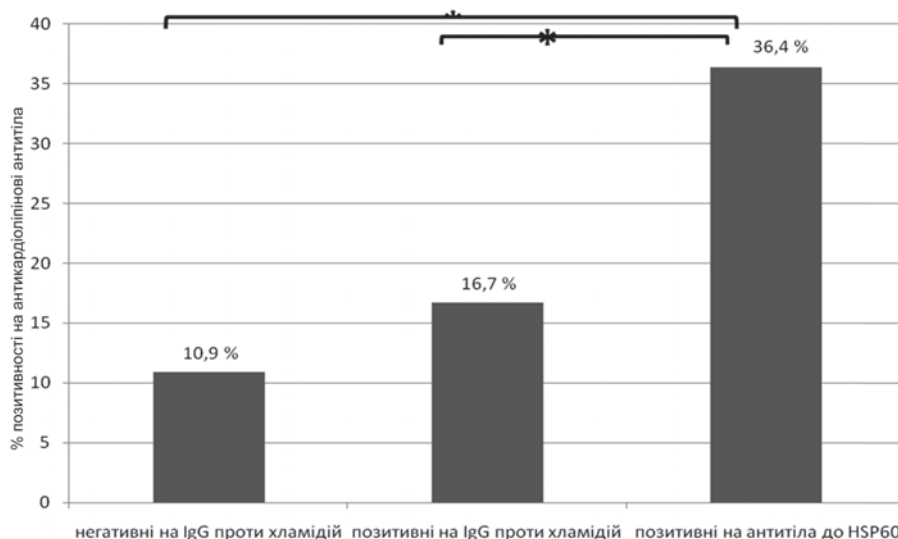


Рис. 2. Частота виявлення антитіл до кардіоліпіну залежно від серопозитивності на антитіла до HSP та IgG Chlam. HSPpos – пацієнтки з антитілами до хламідії та HSP60, Chlam pos HSP neg – пацієнтки, у яких позитивні антитіла до хламідій та негативні антитіла до HSP, Chlam neg – пацієнтки, у яких немає антитіл до хламідій (*Достовірна різниця $P < 0,05$)

Таким чином, у пацієнок з антитілами до хламідій, але без антитіл до HSP60 не було високого рівня антитіл до КЛ, а у пацієнок з антитілами до HSP60 виявлено високу асоціацію цих антитіл з продукуванням АФА. Обидві групи антитіл (HSP і АФА) частіше зустрічаються у пацієнок з множинними неуспіхами ІВФ, тобто при порушенні імплантації.

Висновки. Антитіла до HSP60 та антифосфоліпідні антитіла частіше зустрічаються у пацієнок з порушеннями імплантації, тоді як антитіла (IgG) до хламідій не мають такого зв'язку. Отримані дані підтверджують дані про антитіла до хламідійного HSP60 й аутоантитіла до людського HSP60 та їхню роль в порушенні імплантації при ІВФ [9]. Існують дослідження, що свідчать про зв'язок антитіл до HSP60 та порушення запліднення, імплантації і вагітності, що погіршує репродуктивну функцію та знижує ефективність допоміжних репродуктивних технологій [12]. Нами не виявлено підвищення рівнів АФА та антитіл до HSP60 у пацієнок з неплідністю, проте без імплантаційних втрат в анамнезі. Це вказує на переважно неімунну (не аутоімунну) причину порушень репродуктивності в цій групі.

Антитіла до кардіоліпіну та HSP60 достовірно частіше зустрічаються у поєднанні. Така асоціація анти-HSP60 та АФА, імовірно, формує протоаутоімунний фенотип з продукуванням аутоантитіл до мітохондріальних компонентів. Цей фенотип несприятливий для імплантації. Він, імовірно, спричинений генетичною схильністю до Т-незалежного продукування аутоантитіл [4]. Раніше ми вказували на переважну кофактор-незалежність антифосфоліпідних антитіл у пацієнок з репродуктивними порушеннями. Тобто продукування цих антитіл не є прямою ознакою аутоімунного процесу і контролюється системою ідіотип–антиідіотип [4, 8]. Таким чином, цей стан може бути наслідком імунорегуляторного дисбалансу антитілопродукування. Продукування антифосфоліпідних антитіл, як і антитіл до HSP60, не є прямим наслідком порушення відповіді проти власних антигенів, а швидше спричинене недостатньою регуляцією імунної відповіді проти екзогенних

структур. Ця відповідь призводить до вторинної появи антитіл та В-клонів з про-тоаутоімунним потенціалом. Обидві відповіді ґрунтуються на недостатній антимитохондріальній толерантності або надмірній експозиції мітохондріальних компонентів у прозапальному контексті. Слід зазначити, що АФА були вперше виявлені у реакції Васермана і класифіковані як хибнопозитивний тест на сифіліс. Таким чином, інфекційний компонент є спільною ознакою у порушеннях антимитохондріальної резистентності і за АФА, і за продукуванням антитіл проти HSP.

АФА асоціюються з репродуктивними порушеннями, проте досить часто зустрічаються у нормальній популяції, на відміну від анти-HSP60 антитіл, яких не виявлено у пацієнок без множинних неуспішних імплантацій. Це дає можливість визначити АФА як «гіпердіагностичний», а антитіла до HSP60 – «гіподіагностичний» маркери репродуктивних порушень. Їх поєднання дає можливість для розробки нових діагностичних підходів до прогнозування репродуктивних порушень.

Висловлюємо вдячність фірмі Vitrotest та особисто Галині Раєвській за люб'язно надані реактиви для проведення досліджень.

Список літератури

1. Белки теплового шока. [Электронный ресурс]. URL: <https://biochemmack.ru/upload/uf/696/6965f31d7bc426a19818ac0c8f940486.pdf>.
2. Донської Б. В., Чернишов В. П. Визначення специфічностей антифосфоліпідних антитіл, використовуючи моноклональні антитіла проти фосфоліпідів // Укр. біохім журн. – 2005. – Вип. 77, № 6. – С. 109–115.
3. Донської Б. В., Чернишов В. П. Кофакторзалежність антифосфоліпідних антитіл у хворих на системний червоний вовчак та у жінок з неплідністю // Лік. справа=Врачеб. дело. – 2005. – № 8. – С. 43–44.
4. Донської Б. В., Чернишов В. П. Система антиідиотипових антитіл як фізіологічний механізм супресії продукції кофакторнезалежних антифосфоліпідних антитіл // Фізіол. журн. – 2006. – Вип. 52, № 1. – С. 71–77.
5. Чернишов В. П., Дахно Ф. В., Донской Б. В. и др. Антифосфолипидные антитела и результаты оплодотворения in vitro // Здоровье женщины. – 2004. – Вип. 18, № 2. – С. 137–139.
6. Chernyshov V., Dons'koi B., Vodyanik M. Clinical immunology Anti-idiotypic regulation of cofactor-independent antiphospholipid antibodies // Central Eur. J. of Immunol. – 2011. – Vol. 36, N 4. – P. 220–225.
7. Coulam C. B., Kaider B. D., Kaider A. S. et al. Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET // J. Assist. Reprod. Genet. – 1997. – Vol. 14, N 10. – P. 603–608.
8. Grigore M., Indrei A. The role of heat shock proteins in reproduction // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. – 2001. – Vol. 105, N 4. – P. 674–676.
9. Harris E. N., Pierangeli S., Branch D. 5th international symposium of antiphospholipid antibodies // Am. J. Clin. Path. – 1994. – Vol. 101. – P. 616–624.
10. Hristova I. Role of heat shock proteins (Hsp) in human and mammalian fertilization and pregnancy. Part I // Akush. Ginekol. – 2012. – Vol. 51, N 5. – P. 45–49.
11. Hristova I. Role of heat shock proteins (Hsp) in human and mammalian fertilization and pregnancy. Part II // Akush. Ginekol. – 2012. – Vol. 51, N 6. – P. 37–40.
12. Koll H., Guiard B., Rassow J., Ostermann J. et al. Antifolding Activity of HSP60 Couples Protein Import into the Mitochondrial Matrix with Export to the Intermembrane Space // Cell. – 1992. – Vol. 68. – P. 1163–1175.
1. Belki teplovogo shoka. [Elektronnyj resurs]. URL: <https://biochemmack.ru/upload/uf/696/6965f31d7bc426a19818ac0c8f940486.pdf>.
2. Dons'koi B. V., Chernishov V. P. Vznachennya specifichnostej antifosfolipidnih antitil, vikoristovuyuchi monoklonal'ni antitila proti fosfolipidiv // Ukr. biohim zhurn. – 2005. – Vip. 77, № 6. – P. 109–115.
3. Dons'koi B. V., Chernishov V. P. Kofaktor-zalezhnist' antifosfolipidnih antitil u hvorih na sistemnij chervonij vovchak ta u zhinok z neplidnistyu // Lik. справа=Vracheb. дело. – 2005. – № 8. – P. 43–44.
4. Dons'koi B. V., Chernishov V. P. Sistema antiidiotipovih antitil yak fiziologichnij mekhanizm supresii produkcii kofaktornezalezhnih antifosfolipidnih antitil // Fiziol. zhurn. – 2006. – Vip. 52, № 1. – P. 71–77.
5. Chernishov V. P., Dahno F. V., Donskoi B. V. i dr. Antifosfolipidnye antitela i rezul'taty oplodotvorennya in vitro // Zdorov'e zhenshchiny. – 2004. – Vyp. 18, № 2. – P. 137–139.

13. *Linhares I. M., Witkin S. S.* Immunopathogenic consequences of Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract // *Cell. Stress. Chaperones.* – 2010. – Vol. 15, N 5. – P. 467–473.
14. *Nenoff P., Manos A., Ehrhard I.* et al. Non-viral sexually transmitted infections – Epidemiology, clinical manifestations, diagnostics and therapy : Part 2: Chlamydia and mycoplasma // *Hautarzt.* – 2017. – Vol. 68, N 1. – P. 50–58.
15. *Witkin S. S.* Immunological aspects of genital chlamydia infection // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2002. – Vol. 16, N 6. – P. 865–874.

НАРУШЕНИЕ АНТИМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОК С МНОЖЕСТВЕННЫМИ РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ

Б. В. Донской, В. П. Чернышов, К. С. Степанюк, К. Ю. Крючков (Киев)

Митохондрии – полуавтономные симбиотические органеллы, которые генерируют энергию АТФ для организма человека. С точки зрения репродуктивных проблем и осложнений особого внимания заслуживает фосфолипид кардиолипин и белок теплового шока HSP60. Выработка организмом антител к кардиолипину часто ассоциируется с нарушениями репродуктивных функций и является одним из распространённых факторов неудач *in vitro* фертилизация. Антитела к кардиолипину и HSP60 достоверно чаще встречаются в сочетании. Такая ассоциация анти-HSP60 и АФА предположительно формирует протоаутоиммунный фенотип с продуцированием аутоантител к митохондриальным компонентам. Этот фенотип является неблагоприятным для имплантации. Он, вероятно, вызван генетической предрасположенностью к Т-независимой продукции аутоантител. Антифосфолипидные антитела (АФА) ассоциируются с репродуктивными нарушениями, однако довольно часто встречаются в нормальной популяции, в отличие от анти-HSP60 антител, которых не обнаружено у пациенток без множественных неудачных имплантаций. Это даёт возможность определить АФА как «гипердиагностический», а антитела к HSP60 – «гиподиагностический» маркёры репродуктивных нарушений. Их сочетание открывает возможность для создания новых диагностических подходов к прогнозированию репродуктивных нарушений.

Ключевые слова: антифосфолипидные антитела; антикардиолипидные антитела; антитела к белкам теплового шока; *in vitro* фертилизация; множественные неудачи имплантации.

VIOLATION OF ANTIMITOCHONDRIAL TOLERANCE IN PATIENTS WITH MULTIPLE REPRODUCTION FAILURE

B. V. Dons'koi¹, V. P. Chernyshov¹, K. S. Stepaniuk², K. J. Krychkov³ (Kiev, Ukraine)

¹Laboratory of Immunology, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, biology department; ³“Isida-IVF”

Mitochondria are semi-autonomic organelle that consist specific lipid and protein antigen structure. Evolutionary this structure is close to bacterial antigens (cardiolipin and heat shock proteins HSP). Immune response to pathogens can result to cross-reaction and development of proto-autoimmune and true autoimmune response in individuals with affected anti-mitochondrial tolerance. Serum from 127 healthy pregnant women (HPW), 58 women with infertility (IF) and 149 patients with repeated implantation failure (RIF) (> 2) after IVF, was analyzed by ELISA for anti-Chlamydia IgG anti-HSP60 and cofactor-independent anti cardiolipin IgG (aCL). We show that in RIF patients aCL presence was significantly higher 23.9 % (34/142) than in HP women 7 % (9/127) and IF group 13.7 % (8/58). Anti-HSP60 ab was registered generally in RIF 8.6 % (11/98) while only one patient from IF group was anti-HSP60 positive 1.7 % (1/58) and any in HP group (0/127). We find the association between Anti-HSP60 and aCL ab. Patients with Anti-HSP60 ab was positive for aCL in 36.4 % (4/11) that was more frequently compared to both Anti-HSP60-negative: Chlamydia IgG positive 16.7 % (12/72) or Chlamydia IgG negative patients 10.9 % (33/302). We showed that aCL and Anti-HSP60 associated with repeated implantation failure and both reflect anti-mitochondrial tolerance dysfunction as hyper and hypo diagnostic markers.

Key words: antiphospholipid ab; anticardiolipin ab; anti HSP ab; infertility; *in vitro* fertilization; Chlamydia; multiple implantation failures.