

İMMUN MƏNŞƏLİ SONSUZLUQ ZAMANI MAKROFAQ KULTİVASİYASININ TƏTBİQİNİN EFFEKTİVLİYİ

G.R. Sultanova¹, V. Baltacı², T.Ə. Sultanova³

¹Gen Art klinik, Bakı

²Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı, Türkiye

³Azərbaycan Tibb Universiteti, Sitologiya, embriologiya və histologiya kafedrası, Bakı, Azərbaycan

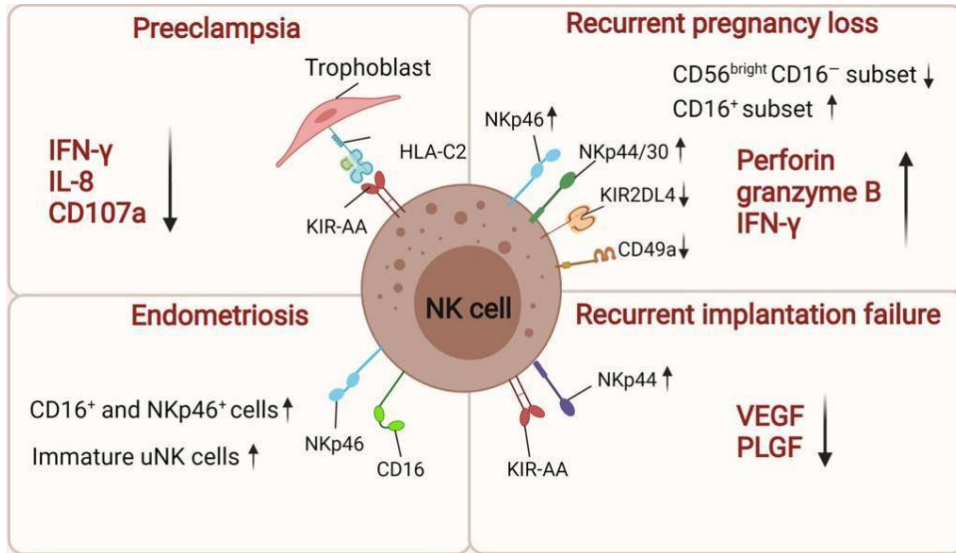
Açar sözlər: təkrarlanan uğursuz implantasiya, təbii killerlər (NK), NK-in immunqlobulinəbənzər reseptoru (KİRs), I sinif əsas histoloji uyğunluq kompleksi (MHC I tip -mayor histocompatibility complex class I)

Hazırda reproduktiv texnologiyaların müasir inkişaf səviyyəsi sonsuzluq probleminin həllində böyük nailiyyətlərin əldə edilməsinə səbəb olmuşdur. Müxtəlif istiqamətlərdə innovativ texnologiyaların tətbiqi geniş vüsət almaqda davam edir. Embrionun genetik daşıyıcısı olduğu xromosomun say və struktur defektlərindən tutmuş maternal-fetal (ana-döl) immunitetin implantasiyasının əleyhinə fəallıq göstərən komponentlərinin aşırı aktivliyinə qədər geniş olan bu mövzu həmişə maraq dairəmizdə öz aktuallığı ilə qalmaqdadır [1]. Transferdən əvvəl embrionların xromosom quruluşlarının incələnməsi, embrion biopsiyasının ən müasir metodlarla (PGT-A, PGT-SR, PGT, FISH) aparılması təkrarlanan düşüklərin və uğursuz Ekstrakorporal mayalanmanın (EKM) azaldılmasında aparıcı mövqə tutur. Lakin sağlam embrionların transferi də bəzən uğursuz olur [2, 3].

Maternal-fetal immunitetin öyrənilməsi təkrarlanan uğursuz implantasiya (repeated implantation fails - RIF) və adəti düşüklərin [3] bir proses kimi incələnilib qarşısının alınması məqsədini daşıyır. Anadangəlmə immunitetin əsas tərkib hissəsi olan selikli qişaları qoruyan makrofaq periferik qanda sirkulyasiya edən monositlərdən yetişir [4,5]. Müəyyən

olunmuşdur ki, hamiləliyin ilk dövrlərində (xüsusilə, birinci və ikinci trimestrdə ən yüksək miqdarı qeydə alınır) makrofaq bütün desidual leykositlərin 20-30%-ni təşkil edirlər [3]. Monositlər hamiləliyin ilkin həftələrindən trofoblastın əhatəsində olub, böyüdükcə-formalaşdıqca fetal tolerantlığı tarazlayır (bir sıra sitokinlərin iştirakı ilə məs: İL10). Natural killer hüceyrələrinin də mühüm funksiyası hamiləliyin ilk günlərindən spiral arteriaların remodelləşməsinin, normal plasentasiyanın, düzgün desedulizasiyasının gətməsinin tənzimlənməsidir.

Anadangəlmə immunitetin bir parçası olan natural killerlər adaptiv immunitetə təsir etməklə immun reguləni canlandırır ki, bu MHC birinci tip və qeyri MHC liqandlarının ekspresiyası sayəsində mümkün olur. Böyümə faktorlarının təsiri altında differensasiya edən natural killerlər müxtəlif istiqamətli təsirə malik olan, çox sayda reseptorların ekspresiyasına sahiblənilirlər (KİR, CD 16, CD 56, CD 57, CD 1, CD-S, İL-2RB). Bunlar arasında CD16 və CD56 ən əsaslarından olub, 2 yarım sinifə ayrılır: CD56 dim CD16 bringt və CD 56 bringt C16 dim [5].



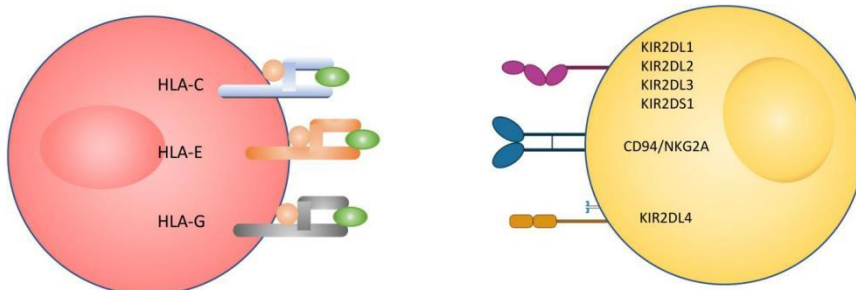
Şək.1. Uşaqlıq təbii killerlərinin hamiləlik ağırlaşmalarında rolu. Uşaqlıq NK-hüceyrələri KIR AA reseptorlarını daşıyırsa, preeklampsiya riski yüksək olur. Təkrarlanan düşükləri və uğursuz implantasiyası olan qadınlarda angiogen faktorları (VEGF və PLGF) aşağı səviyyədə ekspressiyası müşahidə olunur, uşaqlıq KIR AA hallotipinə (DNT variasiyaları və ya polimorfizmi) malik qadınlarda təkrarlanan uğursuz EKM tezliyi yüksək olur [3]

Periferik qanda dövr edən natural killerlərin 90%-i CD 56 dim16 bringt olub xemokinlərə qarşı iltihab ocağına nəql olunmaqla, periferin və qranzimler vasitəsi ilə sitotoksik funksiyaları yerinə yetirirlər, periferik toxumalarda üstünlük təşkil edir.

CD56 bringt16 dim natural killerlər isə uşaqlıq toxumalarda üstünlük təşkil edib, zəif sitotoksik aktivliyə malikdir. Bu tip NK hüceyrələr endometriyuma olan leykositlərin əsas populyasiyasını təşkil etməklə aktivləşdirici və ingibədici siqnalların sayəsində immun balansını tənzimləyirlər. Natural killerlərin reseptorları əsas 5 qrupa bölünür: KİR, NCR, 1-ci LT, CD94/NKG2, NKC2D [6].

1. KİR 2DS, KİR3DS – qısa quyruqlu aktivləşdirən.
2. KİR3DL, KİR2DL – uzun quyruqlu inhibinləşdirən.

Hamiləlik dövründə döl-yarıllogen kimi qəbul olduğundan anaya məxsus HLA-1 liqandlar aktivləşmiş NK hüceyrələri ilə əlaqə yaradırlar [7-14]. Bütün yetişmiş natural killerlərin membranlarında olan dominant ingibə edən reseptorlar (KİR, CD94/NG) immun cavabın reaktivləşməsinə maneəçilik törədir. KİR reseptorları [14] transmembran glikoproteinlərindən olub, natural killer hüceyrələrinin və T-limfositlərinin membranları üzərində ekspressiya olunur. Bu reseptorların 2 növünə rast gəlinir:



Şək. 2. NK-hüceyrə ilə hədəf-hüceyrənin qarşılıqlı təsiri. İki hüceyrə arasında qarşılıqlı təsir NK-hüceyrə səthində ekspressiyaya olunan reseptorlar və hədəf-hüceyrə səthində yeləşən liqandalar vasitəsilə həyata keçirir.

Bu reseptorların HLA1-ligandları ilə birləşimi natural killer hüceyrələrinin funksional idarəçiliyini həyata keçirmiş olur (Şək.2).

Hamiləliyin yaranıb qorunmasında natural killer hüceyrələrinin KİR reseptorları, trofoblastın səthinə ekspressiya edən HLA-C ilə yaratdığı liqand reseptor əlaqələri mühüm rol oynayır və bununla da HLA-C33-ə həssaslığından asılı olaraq, dölün bir allotransplantat olduğunu vurğulayır. Hamiləliyin ilk günlərindən natural killerlərin CD3CD56 bringt CD16-dominant populyasiyası olaraq qalmagdadır [15]. NK hüceyrələri uşaqlıq boşluğunda yayılaraq desidual qatı trofoblastla təmas hazırlayır. Desidual qatda olan killer hüceyrələri ilə trofoblast hüceyrələrinin uyğun reseptorları əlaqəyə girərək lokal immun tolerantlığı yaradır. NK hüceyrələr trofoblastın invazivliyini təmin etməklə sağlam hamiləliyin yaranmasına təkan verir, ekspressiya olunan sitokinlər (gamma İFN, İL8, VEGF-endotelin böyümə faktoru) angiogen faktorların aktivləşməsinə, desidual arteriaların – Fetoplasentar vahidin formalaşmasına gətirib çıxarır.

İmmun sisteminin əsas hüceyrələrindən olan makrofaqlar orqanizmdə bütün toxumalarda rast gəlinib, ölü hüceyrələri, toxumaların parçalanma məhsullarını, yad zülalları faqositə edir. İmmun iltihab reaksiyalarının iştirakına görə makrofaqlar 2 qrupa ayrılırlar:

M1-klassik aktivləşmiş makrofaqlar,

M2-alternativ aktivləşmiş makrofaqlar.

İmmun tolerantlığa modullaşdırıcı təsir göstərən məhz M2 makrofaqlarıdır.

Hormonal təsir nəticəsində uşaqlığın endometriyumunda makrofaqların miqdarı artır. Bu istiqamətdə aparılan tədqiqatlar onların spiralvari arteriaların rekonstruksiyasında və trofoblast invaziyasında rol oynadığını təsdiqləyir. Bununla yanaşı makrofaqların blastosistin bətdaxili infeksiyalaşmasına qarşı olan mühüm əhəmiyyəti də sübut olunmuşdur. Desidualizasiya ilə paralel gedən trofoblast invaziyası sayə əzələ hüceyrələrinin, endotel hüceyrələrinin düzülüşünün pozulması və dağılması ilə müşahidə olunur, makrofaqlar spiral arteriyaların gözlənilən rekonstruksiya prosesinə hazırlığını təmin edirlər [6,13]. Desidual qişada olan M2 makrofaqlar CD206, CD163 ekspressiya etməklə məhz immun modulyator təsir göstərir, M-CSF və İL-10 ilə in vitro induksiya olunurlar. Mayalanmadan sonra makrofaqların miqdarı yüksəlir, erkən dövrdə desidual leykositlərin 20-30%-ni makrofaqlar təşkil edir [8,16]. Onların miqdarı hamiləlik müddətindən asılı olaraq dəyişir, I və II trimestrdə ən yüksək səviyyəyə çatır.

Tədqiqatın məqsədi təkrarlanan uğursuz EKM aparılmış qadınlara makrofaj üsulunun tətbiq edilməsi və sonrakı uğurlu hamiləlik faktının öyrənilməsi.

Tədqiqatın material və metodları. Makrofaj prosedurunun uğursuz EKM-də effektivliyinin tədqiq edilməsi üçün "GenArt Sonsuzluq" Mərkəzində 51 qadın üzərində apardığımız müşahidələrin nəticələri qənaətbəxş olmuşdur. Bu qadınlarda EKM-in uğursuz nəticələri qeydə alınmış və onlara embrion transferindən əvvəl uşaqlıq daxili makrofaq kulturası istifadə etməklə hamiləliyin yaranmasında müsbət təsiri öyrənilmişdir. Bütün qadınlara EKM zamanı həm dondurulmuş, həm də dondurulmamış embrion transferi edilmişdir. Qadınlardan yaş faktoru 35 və daha yuxarı olmuşdur. Tədqiqata endometrioz, xroniki endometrit, kiçik çanaq orqanlarının xronik iltihabi xəstəlikləri, uşaqlığın inkişaf anomaliyaları, Aşerman sindromu diaqnozu olan qadınlardan daxil edilməmişdir.

Alınan nəticələr. Təkrarlanan uğursuz implantasiyalar, çox faktorlu bir proses olub ananın yaşı və embrionun genetik sağlamlığından asılıdır. Faktorların içərisində zərərli vərdişlər, BMI, stress, xroniki endometritlə nəticələnən infeksiya xəstəlikləri, uşaqlığın anadangəlmə və qazanılmış patologiyalarının xüsusi yeri vardır.

Tədqiqata daxil edilən qadınlarda immunoloji faktor, təkrarlanan uğursuz İVF olan qadınlarda periferik qanda NK hüceyrələrinin aktivliyi təyin edilmiş, artması qeydə alınmışdır. Məlum olduğu kimi immun mənşəli sonsuzluqda təkcə periferik qanda natural killerlərin miqdarının artması deyil, həm də CD8 pozitiv T hüceyrələrin artması, CD158a reseptorlarının ekspressiyası da önəmli yer almaktadır [8]. Əldə edilmiş nəticələr əsasında pasientlərə immunsupresiyanın müvafiq müalicəvi protokolları üzrə müalicə təyin edilmişdir.

Periferik qanda artan natural killer hüceyrələri sitotoksimetriya, NK hüceyrələrində CD158a ekspressiyası və aktiv T-limfositlərin miqdarı Flow Sitometriya – üsulları ilə təyin edilmişdir.

Bütün qadınlara NK aktivliyi təyin edilmiş, KİR reseptor ekspressiyası yoxlanılmış, endometriyumun qalınlıq dərəcəsi müəyyənləşdirilmişdir. Monosit kultivasiyasından istifadənin təməl prinsipləri yerli immuniteti zəiflətməkdən ibarətdir.

Bu məqsədlə müalicə əsasında laborator şəraitdə spesifik böyümə faktorları ilə zənginləşdirilmiş xüsusi mühitlərdə inkubasiya edilən monosit hüceyrələr zəruri hüceyrə konsentrasiyasına çatdıqdan sonra flositometrik kontrol altında suspenziya şəklində embrion transferdən 24 saat əvvəl uşaqlıqdaxili yeridilir.

Tədqiqata daxil edilən bütün qadınların makro-fajdan sonra yaxın dövrdə müşahidəsi aparılmışdır. Bütün qadınlarda EKM-dən sonrakı 12 gün ərzində xorionik qonadotropinin səviyyəsinin kəskin artması məlum olsa da, biz 14-cü gündə laborator testləri apararaq hamiləliyi daha etibarlı şəkildə dəyərləndirdik. Tədqiqata daxil edilən 51 qadında EKM-dən

sonra bütün hallarda uğurlu hamiləlik faktı öz təsdiqini tapmışdır. Bu istiqamətlə tədqiqatların davam etməsi mütləqdir.

Beləliklə, monositlərin uşaqlıqdaxili embrion transferindən əvvəl istifadə edildikdə hamiləlik nəticələrinin yüksəlməsi qeydə alınmışdır.

РЕЗЮМЕ

Эффективность культивирования макрофагов при иммуноопосредованном бесплодии

Г.Р. Султанова¹, В. Балтаджи²,
Т.А. Султанова³

¹Gen Art клиника, Баку

²Университет «Юксек Ихтисас», медицинский факультет, заведующий кафедрой медицинской генетики, Турция

³АМУ, кафедра Цитологии, эмбриологии и гистологии, Баку, Азербайджан

Ключевые слова: рецидивирующая неудачная имплантация (RIF), естественные киллеры (NK), NK-иммуноглобулиноподобные рецепторы (Killer Cell immunoglobulin-like receptor (KIRs)), главный комплекс гистосовместимости I класса (MHC I tip - major histocompatibility complex class I)

В статье авторы исследовали причины неудач при ЭКО и описали использование современных технологий в устранении причин иммунообусловленных выкидышей. Авторы дали краткую характеристику процессам, происходящим при нарушениях беременности иммунного происхождения, и прокомментировали суть предлагаемого нового метода. В исследование были включены 51 женщин с повторными неудачами при ЭКО иммунного генеза. В статье описаны обследования, проведенные для подтверждения причин неудач при ЭКО. Для улучшения результатов ЭКО был применен современный прогрессивный метод – макрофаж, с использованием которого успешный результат ЭКО достигнут у всех женщин. Факт наступления беременности был подтвержден обнаружением макрофагов и ХГ на 14-е сутки после процедуры макрофаж и ЭКО. Процедура макрофаж была предложена авторами как наиболее эффективный метод при повторных неудачах ЭКО иммунного происхождения.

SUMMARY

Efficiency of culturing macrophages in immune-mediated infertility

G.R. Sultanova¹, V. Baltaci²,
T.A. Sultanova³

¹Gen Art Clinic, Baku

²Higher Specialized University Faculty of Medicine, Head of the Department of Medical Genetics, Turkiye

³Azerbaijan Medical University, Department of Cytology, Embryology and Histology, Baku, Azerbaijan

Key words: recurrent implantation failure (RIF), natural killer (NK) cells, NK-immunoglobulin-like receptors (KIRs), major histocompatibility complex class I (MHC I tip)

In the article, the authors examined the causes of IVF recurrent fails and described the use of modern technologies in eliminating immune-related miscarriages. The authors gave a brief description of the processes occurring during pregnancy disorders of immune origin and commented on the essence of the proposed new method. The study included 51 women who had repeated unsuccessful IVF of immune origin. They describe the examinations carried out to confirm the failure of IVF. To eliminate the unsuccessful consequences of IVF, a modern progressive method was used - macrophage; successful IVF results were achieved in all women. The fact of pregnancy was confirmed by the detection of macrophages and hCG on the 14th day after the macrophage and IVF procedure. The macrophage procedure was proposed by the authors as the most effective method for recurrent failed IVF of immune origin at present. It is necessary to continue research works in this direction.

1. Zhang S., Lin H., Kong S. et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation // *Mol Aspects Med.*, 2013;34(5), p.939-980.
2. Desai S.K., Mangoli V.S. Chromosomal Analysis of Pre-implantation Embryos: Its Place in Current IVF Practice // *J Obstet Gynaecol India*, 2020;70(6), p.417-424.
3. Zhang D., Yu Y., Duan T. et al. The role of macrophages in reproductive-related diseases // *Heliyon*, 2022; 8(11), p.1-18.
4. Poli A., Michel T., Thérésine M. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset // *Immunology*. 2009;126(4), p.458-465.
5. Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L. et al. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? // *Front. Immunol.*, 2017; 8 (892), p.1-9.
6. Hong H., Tian X.Y. The Role of Macrophages in Vascular Repair and Regeneration after Ischemic Injury // *Int J Mol Sci.*, 2020;21(17), p.1-12.
7. Heldager Pedersen N., Bjerregaard Jeppesen H., Persson G. et al. TVF. An increase in regulatory T cells in peripheral blood correlates with an adverse prognosis for malignant melanoma patients - A study of T cells and natural killer cells // *Curr Res Immunol.*, 2023; 5, p.1-10.
8. Marijke M. Faas; Paul de Vos. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy // *Journal Placenta* 56 (2017), p 44-56.
9. Menon R, Taylor BD. Exploring Inflammatory Mediators in Fetal and Maternal Compartments During Human Parturition. *Obstet Gynecol* (2019) 134(4):p.765-73. doi: 10.1097/AOG.0000000000003470
10. Zitti B, Bryceson YT. Natural Killer Cells in Inflammation and Autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* (2018) p.42:37-46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.001
11. de Mendonca Vieira R, Meagher A, Crespo AC, Kshirsagar SK, Iyer V, Norwitz ER, et al. Human Term Pregnancy Decidual NK Cells Generate Distinct Cytotoxic Responses. *J Immunol* (2020) p.204(12):p.3149-59. doi: 10.4049/jimmunol.1901435
12. Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating Natural Cytotoxicity Receptors of Natural Killer Cells in Cancer and Infection. *Trends Immunol* (2013) 34(4):p.182-91. doi: 10.1016/j.it.2013.01.003
13. S.J. Renaud, C.H. Graham,. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy, *Immunol.invest.* 37 (5) 2008 p. 535-564.
14. A.Thielens, E. Vivier, F. Romange. NKcell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention, *Curr. Opin. Immunol.*24.(2) 2012. p.239-245.
15. Clark DA, Coulam CB, Stricker. (EK REF1). Is intravenous immunoglobulins (IVIG) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF). *RBJ Assist Reprod Genet.* 2006;23:1-13.
16. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. (EK REF2). Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56 (dim) CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad SciUSA.* 2011;108:728-739.