

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Хикматова Н.И.¹, Гариб В.Ф.^{2,3}, Пахомова Ж.Е.⁴, Гариб Ф.Ю.⁵

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ IgE АНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

¹ Бухарский государственный медицинский институт; 200118, г. Бухара, Узбекистан;

² Медицинский университет Вены; 1090, г. Вена, Австрия;

³ Министерство инновационного развития; 100060, г. Ташкент, Узбекистан;

⁴ Ташкентская медицинская академия, 100109, г. Ташкент, Узбекистан;

⁵ Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования Минздрава РФ, 125445, Москва, Россия

Персонализированная терапия женского бесплодия подразумевает определение участия иммунных механизмов, в том числе, аллергической сенсибилизации к антигенам спермы. В целях определения антиспермальных сывороточных IgE антител у женщин с бесплодием, страдающих воспалительными заболеваниями органов малого таза, использовался модифицированный протокол Anti-Spermatozoa Antibody – ASA Serum ELISA, Demeditec Diagnostisc, Германия. Модификация предназначена для выявления только сывороточных антиспермальных IgE антител, несущих Fab- фрагменты к антигенам сперматозоидов. Аллерген специфические IgE к общей панели 176 респираторных и пищевых аллергических молекул определялись при помощи научного чипа MeDALL, разработанного в рамках Европейского проекта (MeDALL, Механизмы развития аллергии). Обследовано 40 пациенток, страдающих бесплодием воспалительной этиологии и 16 практически здоровых женщин репродуктивного возраста. Специфические IgE антитела к антигенам сперматозоидов выявлены в сыворотке крови у 7/40 (17.5%) пациенток с бесплодием. Максимальный уровень IgE в 4 раза превышал пороговое значение показателя фертильных женщин. Корреляции с общим IgE не выявлено. Все женщины с ASA IgE жаловались на чувство жжения и зуда сразу после коитуса. Системных и отдаленных аллергических реакций не отмечено. Женщины с позитивными значениями IgE в 2 раза чаще имели хронический рецидивирующий дисбиоз влагалища. Наличие специфических антиспермальных IgE антител, вероятно, имеет патогенетическое значение при женском бесплодии, и их следует учитывать для формирования персонализированных подходов к выбору методов терапии.

Ключевые слова: бесплодие; IgE антитела к сперматозоидам; воспалительные заболевания органов малого таза.

Для цитирования: Хикматова Н.И., Гариб В.Ф., Пахомова Ж.Е., Гариб Ф.Ю. Определение антиспермальных IgE антител у женщин с бесплодием, страдающих хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (7): 435-438. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-435-438>

Khikmatova N.I.¹, Garib V.F.^{2,3}, Pakhomova J.E.⁴, Garib F.Yu.⁵

DETERMINATION OF ANTISPERMAL IGE ANTIBODIES IN WOMEN WITH INFERTILITY AND CHRONIC INFLAMMATORY PELVIC DISEASES

¹Bukhara State Medical Institute. 200118, Bukhara Uzbekistan;

²Medical University of Vienna. 1090, Vienna, Austria;

³Ministry of Innovative Development. 100060 Tashkent, Uzbekistan;

⁴Tashkent Medical Academy. 100109, Tashkent, Uzbekistan;

⁵Russian Medical Academy of Continuing Postgraduate Education. 125445, Moscow, Russia

Personalized therapy for female infertility means determining of immune mechanisms, including allergic sensitization towards sperm antigens. In order to determine antisperm serum IgE antibodies in women with infertility suffering from pelvic inflammatory diseases, the modified Anti-Spermatozoa Antibody protocol was used (ASA Serum ELISA, Demeditec Diagnostisc, Germany). The modification of the protocol is designed to detect only serum antisperm IgE antibodies carrying Fab fragments to sperm antigens. Allergen-specific IgEs to a common panel of 176 respiratory and food allergenic molecules were determined using the MeDALL scientific chip developed as a part of the European project. Forty patients suffering from infertility of inflammatory etiology and 16 practically healthy women of reproductive age were examined. Specific IgE antibodies towards sperm antigens were detected in blood serum in 7/40 (17.5%) patients with infertility. The maximum level of sIgE was 4 times higher than the maximal value of fertile women. No correlation with total IgE was detected. Women with sIgE-ASA complained of burning and itching immediately after coition. Systemic and long-term allergic reactions were not noted. Women with positive sIgE-ASA values were 2 times more likely to suffer from chronic recurrent vaginal dysbiosis. The presence of specific anti-sperm IgE antibodies is likely to have pathogenetic significance in female infertility, and they should be taken into consideration for creating personalized therapy approaches.

Key words: infertility; IgE antibodies to sperm; inflammatory pelvic diseases.

For citation: Khikmatova N.I., Garib V., Pakhomova J.E., Garib F.Yu. Determination of antisperm IgE antibodies in women with infertility and chronic inflammatory pelvic diseases. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65(7): 435-438 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-435-438>

For correspondence: Garib F.Y., professor of Russian Medical Academy of Continuing Postgraduate Education; e-mail: fgarib@yandex.ru

Information about authors:

Khikmatova N.I., <https://orcid.org/0000-0001-5986-1102>

Garib V.F., <http://orcid.org/0000-0003-3855-217X>

Pakhomova J.E., <https://orcid.org/0000-0003-0458-2610>

Garib F.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-3749-1950>

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 31.03.2020

Accepted 03.04.2020

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) бесплодием считается отсутствие беременности у женщины в течение 12 мес регулярной половой жизни и без использования контрацептивов [1]. Женское бесплодие отмечается до 60% случаев, 20% из которых отводится на совместную причину в паре, как со стороны женщины, так и мужчины [2]. Этиологическими факторами развития женского бесплодия являются гормональные диспропорции, заболевания органов малого таза, иммунные нарушения и др. [3]. Особую группу пациенток с бесплодием составляют женщины с неустановленными причинами. Следует также отметить, что иммунологическая форма бесплодия является одной из самых сложных форм, как в диагностическом, так и в лечебном плане. В ее основе лежит наличие антител, препятствующих оплодотворению.

Циркулирующие антитела, реагирующие со спермой, были обнаружены 90 лет назад. В настоящее время антиспермальные антитела (АСА) определяют как на системном уровне в лимфе и крови, так и в местных секретах, например, в цервикальной и вагинальной слизи. В зависимости от изотипа АСА обладают цитотоксическими, иммобилизующими и агглютинирующими функциями и играют важную роль в формировании иммунологического бесплодия у мужчин и у женщин [1]. Так, на долю участия антиспермальных антител отводится 20% бесплодных супружеских пар, поэтому выявление АСА классов IgG, IgA, IgM входит в часть лабораторного обследования для диагностики иммунологически опосредованного бесплодия женщин и мужчин.

Известно, что сперма представляет собой ассамблею антигенов, потенциально обладающих аллергенным потенциалом. Ранее обсуждалось, что семенная жидкость может быть связана с развитием IgE сенсibilизации к сперме, а так называемая аллергия к семенной жидкости может быть ответственной за локальные или системные реакции у женщин после контакта [4]. Клиническая картина такой аллергии возникает как через несколько минут после контакта с семенной жидкостью, так и в отдаленный часовой период. Чаще всего имеет место первый (IgE-опосредованный) тип аллергических реакций. Местные симптомы аллергии к сперме не отличаются специфичностью, и выражаются в зуде вульвы или влагалища, покраснении, чувстве жжения и отеке, что может быть расценено клиницистами как дисбиоз влагалища различного генеза. Системные проявления включают генерализованную уртикарию, ангиотек, свистящие хрипы, диспноэ, чувство сжатия за грудиной, ринит, тошноту, рвоту и даже диарею [5]. В результате системной реакции к антиспермальным антителам может развиваться анафилактический шок. Однако, связь аллергической сенсibilизации к сперматозоидам и бесплодием у этого контингента женщин не обсуждалось.

Целью настоящего исследования явилось определение антиспермальных сывороточных IgE антител у женщин с бесплодием, страдающих воспалительными заболеваниями органов малого таза.

Материал и методы. Под нашим наблюдением находилось 40 женщин репродуктивного возраста (от 21 года до 44 лет), страдающих бесплодием воспалительной этиологии. Средний возраст составил $29 \pm 0,6$ лет. Все женщины до обследования подписывали этическое согласие для участия в данном исследовании. Контрольную группу составили 16 практически здоровых фертильных женщин аналогичного возраста. Микроскопическое исследование мазка из влагалища и бактериологическое исследование отделяемого из цервикального канала проводили общепринятым методом, используя Gram Stains-kit и Mueller Hinton Agar («Himedia», Индия).

Выявление сывороточных IgE к сперматозоидам. Для выявления сывороточных IgE к сперматозоидам использовался модифицированный протокол Anti-Spermatozoa Antibody – ASA Serum ELISA на коммерческом наборе твердофазного сэндвич-метода иммуноферментного анализа ELISA, предназначенного для выявления сывороточных суммарных антиспермальных антител всех классов, несущих Fab фрагменты к антигенам сперматозоидов (Anti-Spermatozoa Antibody – ASA Serum ELISA, «Demeditec Diagnostisc», Германия). Исследование выполнено на клинической базе международного центра молекулярной аллергологии, в лаборатории De Factum Laboratories, Ташкент, Узбекистан. Для этого 50 мкл сыворотки каждой пациентки и женщин контрольной группы вносились в индивидуальную лунку ELISA микропланшета с предварительно иммобилизованными на ней протеинами сперматозоидов. Принцип метода заключается в специфическом связывании сывороточных антител с данными протеинами и образовании комплекса антиген/аллерген-антитело. После отмывки в систему обычно вносится конъюгат, состоящий из антител против человеческих глобулинов, ковалентно связанных с пероксидазой хрена, изменяющего окраску в присутствии субстрата ТМВ (тетрометилбензидина), а реакция останавливается 0,25 молярным раствором серной кислоты H_2SO_4 . В отличие от протокола производителя, для выявления только антител класса IgE к протеинам сперматозоидов, в качестве вторичных антител использовались козы антитела к человеческим иммуноглобулинам класса E (goat anti-human IgE, «Sigma», Germany), также ковалентно связанных с пероксидазой хрена, а сыворотки пациентов были разведены буферным раствором в соотношении 1:1. Измерение производилось спектрофотометрически на ELISA ридере при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски при этом пропорциональна количеству фермента, следовательно, количеству связавшегося исследуемого антитела. Уро-

вень IgE антител выражался в единицах истинной оптической плотности каждой лунки после вычета данных оптической плотности контрольной лунки. Позитивным IgE результатом считалась интенсивность, превышающая двойное среднее значение оптической плотности фертильных женщин. В нашем эксперименте средний уровень IgE фертильных женщин составил 0,24 ед., а стандартное отклонение в данной группе было равным 0,11 ед. Таким образом, позитивная реакция расценивалась, когда значения оптической плотности превышали 0,48 ед.

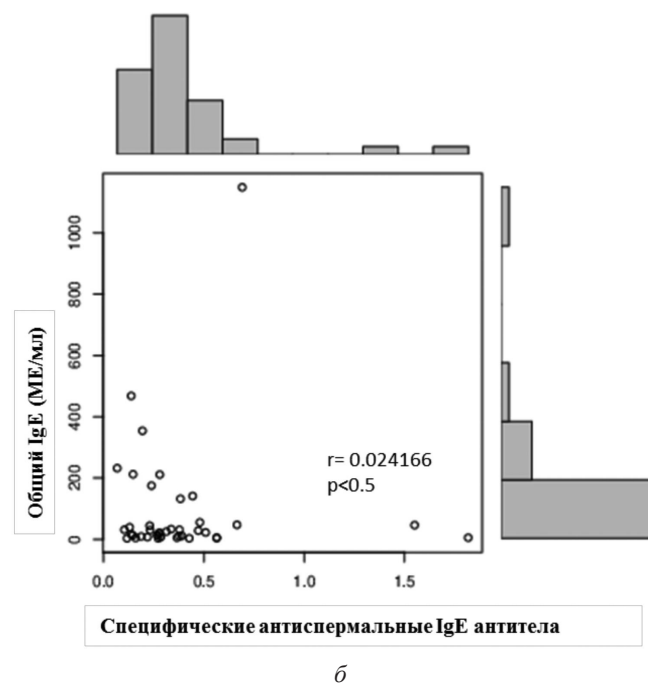
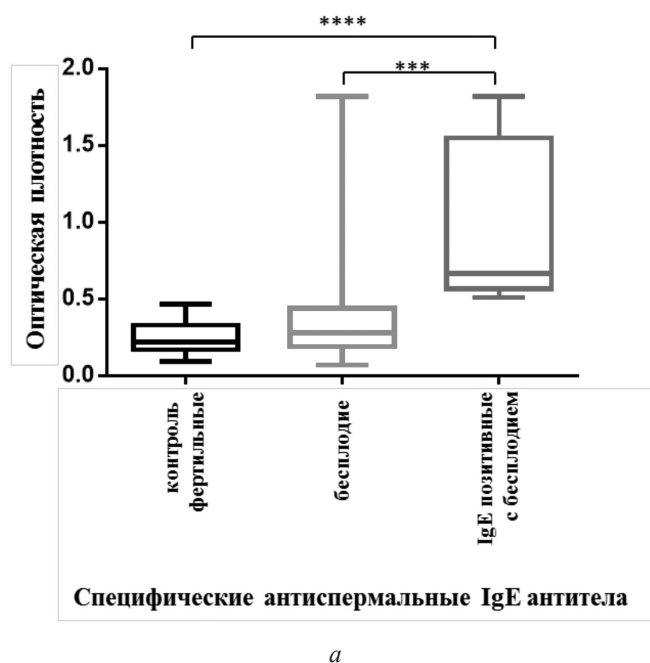
Определение профилей сенсibilизации. Аллерген специфические IgE к общей панели 176 респираторных и пищевых аллергенных молекул определялись в отделе патофизиологии и исследований аллергии Медицинского университета г. Вена при помощи научного чипа MeDALL, разработанного в рамках Европейского проекта (MeDALL, Механизмы развития аллергии), согласно методике, описанной ранее [6]. Уровень s-IgE не менее 0,3 ISU считался положительным. Анализ профилей IgE-сенсibilизации к аллергенным молекулам был проведен с использованием IBM SPSS 20 и Microsoft Excel.

Статистический анализ был проведен с использованием параметра Манна-Уитни в программе GraphPad Prism и автоматическим формированием графического изображения, а также с использованием статистической платформы Office for Research Development and Education с формированием Skewness-Kurtosis Plot (v.1.0.2) [7].

Результаты и обсуждение. Первичное бесплодие выявлено у 21 (52,5%) из 40 обследованных женщин,

страдающих бесплодием воспалительной этиологии. У 19 (47,5%) пациенток отмечалось вторичное бесплодие. Клиническо-диагностическое обследование показало, что у 25 (62,5%) пациенток наряду с различными видами условно-патогенной влагалищной микрофлоры были обнаружены хламидии, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус простого герпеса (ВПГ), микоплазма, а также их ассоциации. При исследовании уровня IgE антител к сперме контрольной группы фертильных женщин средняя оптическая интенсивность составила $0,24 \pm 0,11$ ед. Позитивной реакцией считались значения оптической плотности, превышающие 0,48 ед. Несмотря на то, что в среднем на группу женщин с бесплодием уровень IgE был равен $0,38 \pm 0,34$ ед. и достоверно не отличался от аналогичного показателя группы здоровых женщин ($0,24 \pm 0,11$), минимальное значение уже превышало среднее значение IgE группы контроля (0,27 vs 0,24). Максимальное значение IgE группы с бесплодием, составившее 1,8 ед., в 4 раза превышало аналогичный параметр группы контроля и в 7,5 раз среднее значение контрольной группы. В сыворотках женщин с бесплодием позитивная реакция, превышающая значения 0,48 ед, отмечена у 7 пациенток, что составило 17,5% (см. рисунок, а, б).

При создании отдельной подгруппы IgE-позитивных женщин с бесплодием, достоверные статистические различия отмечались по всем анализируемым параметрам. Так, среднее значение антиспермальных IgE антител составило уже 0,91 ед vs 0,24 ед контроля, минимальные показатели в 5,6 раз превышали аналогичный показатель контрольной группы и в 1,9 раз минимальный



Специфические антиспермальные антитела IgE.

а - уровень антиспермальных IgE антител в сыворотке фертильных женщин (контроль), женщин с бесплодием и IgE - позитивных женщин с бесплодием. Показаны данные истинной оптической плотности после вычета оптической плотности контрольной лунки, содержащей вместо сыворотки буферный раствор, где * - достоверное статистическое различие между группами ($p < 0,0001$) согласно тесту Манна Уитни (программа GraphPad Prism); б - корреляция между уровнями общего IgE (по оси ординат) и специфическими антиспермальными IgE антителами (по оси абсцисс) у пациенток с бесплодием. Коэффициент корреляции r и уровень достоверности (p) показан в нижнем правом углу графика.

показатель IgE негативных женщин с бесплодием. То есть, для 17,5% женщин с бесплодием протеины спермы явились аллергенами. Наши исследования согласуются с данными ряда авторов [1,8], подтверждающих роль антиспермальных IgE антител в развитии аллергии на сперматозоиды. Вероятно, в совокупности с другими факторами развития бесплодия у женщин, появление ASA IgE, еще более усугубляет воспалительный процесс и приводит к стойкому и плохо поддающемуся лечению бесплодию.

При проведении корреляционного анализа уровня общих и специфических антиспермальных IgE антител коэффициент корреляции Пирсона составил 0,024166, что показывает отсутствие статистически достоверной корреляции между параметрами. Данный факт обусловлен тем, что общий IgE является совокупностью всех антител IgE, реагирующих с аллергенными эпитопами из разных аллергенных источников. Так, профиль сенсибилизации женщин показал, что помимо IgE к протеинам спермы, у 57,1% пациенток данной подгруппы обнаружены специфические IgE к респираторным и пищевым аллергенным молекулам. Стоит подчеркнуть, что специфические IgE несут большую информативность для диагностики аллергической сенсибилизации, поскольку позволяют выявить реакцию к конкретному аллергенному источнику.

Изучение анамнестических и клинических данных у пациенток с наличием антиспермальных IgE антител показало, что у 57,1% пациенток кроме условно-патогенной микрофлоры влагалища, были обнаружены хламидии, ВПГ, ЦМВ, микоплазма, в то время, как в целом на группу количество таких женщин не превышало 25%. Более того, среди всех клинических форм воспалительных заболеваний преобладающим явился хронический эндометрит, выявленный у 70% пациенток данной подгруппы. Соотношение первичного и вторичного бесплодия составило 4:3 с длительностью 5-10 и 3-7 лет соответственно. Повышение количества эозинофилов крови отмечено у 71,4% у женщин с бесплодием и наличием антиспермальных антител. Важным является факт, что все женщины с уровнем IgE к сперматозоидам, превышающим 0,48 ед., отмечали зуд, жжение и обильные жидкие выделения после коитуса. Системных и отдаленных аллергических реакций на сперму, со слов пациенток, не зарегистрировано. Интересным является факт, что до 50% женщин с IgE к протеинам сперматозоидов отмечают реакцию уже на первый контакт со спермой, что позволяет предполагать перекрестную аллергическую реакцию. Иными словами, не исключено, что часть женщин с сенсибилизацией к семенной жидкости и сперматозоидам были ранее сенсибилизированы к перекрест-

ным аллергенным эпитомам. Такие перекресты могут быть между молекулами простатного калликрина собаки Can f 5 и ПСА. Этот вопрос заслуживает отдельного научного исследования.

Таким образом, в группе женщин с бесплодием IgE антитела к протеинам сперматозоидов обнаружены в 17,5% случаев. Определение антиспермальных IgE антител следует учитывать для формирования персонализированных подходов к выбору методов лечения женщин, страдающих бесплодием воспалительного генеза.

Благодарности. Авторы выражают благодарность научному сотруднику стандартизации аллергенов Международного центра молекулярной аллергологии Магбуловой Н. за помощь в проведении исследования.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4–8 см. REFERENCES)

3. Попов А. А., Мананникова Т.Н., Колесник Н.А., Рамазанов М.Р., Федоров А.А., Барто Р.А. Применение противоспаечных препаратов в программе хирургического лечения трубно-перитонеального бесплодия. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2012; 4: 97-103.

REFERENCES

1. Brazdova A., Senechal H., Peltre G., Poncet P. Immune Aspects of Female Infertility. *Int. J. Fertil Steril.* 2016; 10: 1-10.
2. Deroux A., Dumestre-Perard C., Dunand-Faure C., Bouillet L., Hoffmann P. Female infertility and serum auto-antibodies: a systematic review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017; 53: 78-86.
3. Popov A. A., Manannikova T. N., Kolesnik N. A., Ramazanov M. R., Fedorov A. A., Barto R. A., Zemskov U. V. Antiadhesion barriers application in infertile patients with pelvic adhesions. *Zhurnal akushstva i zhenskikh bolezney.* 2012; 4: 97-103. (in Russian)
4. Sonnex C. Genital allergy. *Sex Transm Infect.* 2004; 80: 4-7.
5. Brázdová A., Vermachová M., Zídková J., Sénéchal H., Poncet P., Ulčová-Gallová Z., Peltre G. Immunodominant semen proteins II: contribution of seminal proteins to female immune infertility. *Folia Biol (Praha).* 2013; 59: 198-203.
6. Lupinek C., Wollmann E., Baar A., Banerjee S., Breiteneder H., Broecker B.M., et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods.* 2014; 66: 106-19.
7. Wessa P. Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, 2020; version 1.2.1, URL <https://www.wessa.net/>.
8. Brazdova A., Zídková J., Senechal H., Peltre G., Cibulka J., Ulčová-Gallová Z. Female serum immunoglobulins G, A, E and their immunological reactions to seminal fluid antigens. *Folia Biol (Praha).* 2012; 58: 251-5.

Поступила 31.03.20
Принята к печати 03.04.20