

DOI: <https://doi.org/10.30841/2708-8731.1.2023.276255>

Імуномодулювальна дія гранулоцит-колонієстимулювального фактора при повторних невдачах імплантації у програмах перенесення ембріонів

I. O. Судома^{1,2}, Я. O. Гончарова², Б. В. Донської³

¹ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ

² Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ

³ ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О. М. Лук'янової НАМН України», м. Київ

Мета дослідження: визначення ефективності застосування внутрішньоматкового введення гранулоцит-колонієстимулювального фактора залежно від імунного фенотипу ендометрія у пацієток із повторними невдачами імплантації у програмах перенесення ембріонів.

Матеріали та методи. У 42 пацієток із повторними невдачами імплантації та допоміжних матерів (20 жінок) як групи контролю проводили біопсію ендометрія у період імплантаційного вікна у штучному циклі до та (у частини пацієток) після внутрішньоматкового введення гранулоцит-колонієстимулювального фактора (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF). Для підрахунку класів та підкласів ендометріальних лімфоцитів у зразках тканини ендометрія використовували метод проточної цитометрії.

Результати. Проведено порівняння популяції імунних клітин ендометрія у пацієток із повторними невдачами імплантації та фертильних жінок. Визначено частоту настання вагітності та частоту живонароджуваності залежно від імунного фенотипу ендометрія у пацієток із повторними невдачами імплантації після внутрішньоматкового введення гранулоцит-колонієстимулювального фактора у програмі перенесення ембріонів та оцінено вплив внутрішньоматкового введення гранулоцит-колонієстимулювального фактора на імунний фенотип ендометрія.

Висока експресія HLA-DR та CD16 на маткових природних кілерах достовірно асоціюється із успішною імплантацією після застосування внутрішньоматкового введення гранулоцит-колонієстимулювального фактора у програмі перенесення ембріонів. Установлено, що у групі із незрілим імунним ендометріальним фенотипом частота настання вагітності (53,8 %) та частота народження живих дітей (53,8 %) були вдвічі вищими порівняно із рештою пацієток з іншими варіантами або відсутністю змін імунного профілю (частота вагітності та частота живонароджуваності – 26,9 %).

Висновки. У третини пацієток із повторними невдачами імплантації у програмах перенесення генетично тестованих ембріонів спостерігається особливий імунний статус ендометрія, що характеризується високою експресією HLA-DR та CD16 на маткових природних кілерах. Уведення внутрішньоматково гранулоцит-колонієстимулювального фактора зумовлює зменшення експресії HLA-DR та CD16 на маткових природних кілерах та сприяє успішній імплантації у програмі перенесення ембріонів у цій групі пацієток.

Ключові слова: запліднення *in vitro*, невдачі імплантації, імунний статус ендометрія, гранулоцит-колонієстимулювальний фактор.

Immunomodulatory effect of granulocyte colony-stimulating factor in repeated implantation failures in embryo transfer programs

I. O. Sudoma, Ya. O. Goncharova, B. V. Dons'koy

The objective: to determine the effectiveness of intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor depending on endometrium immune phenotype in patients with repeated implantation failures in embryo transfer programs.

Material and methods. Endometrial biopsy during the implantation window in an artificial cycle before and (in some patients) after intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was performed in 42 patients with repeated implantation failures and gestational carriers (20 women) as a control group. Flow cytometry was used to count classes and subclasses of endometrial lymphocytes in endometrial tissue samples.

Results. The population of endometrial immune cells in patients with repeated implantation failures and fertile women was compared. Pregnancy and live birth rates depending on endometrium immune phenotype in patients with repeated implantation failures after intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor in embryo transfer program were determined and the effect of intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor on endometrial immune phenotype was evaluated.

High expression of HLA-DR and CD16 on uterine natural killers is reliably associated with successful implantation after intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor in an embryo transfer program. It was established that in the group with an immature immune endometrial phenotype the frequency of pregnancy (53.8 %) and the frequency of live births (53.8 %) were twice higher compared to the rest of the patients with other variants or the absence of changes in the immune profile (pregnancy rate and frequency live birth rate – 26.9 %).

© The Author(s) 2023 This is an open access article under the Creative Commons CC BY license

Conclusions. One-third of patients with repeated implantation failures in genetically tested embryos transfer programs have a unique immune status of endometrium characterized by high expression of HLA-DR and CD16 on uterine natural killers. Intrauterine administration of granulocyte colony-stimulating factor leads to decrease of HLA-DR and CD16 expression on uterine natural killers and promotes successful implantation in embryo transfer program in this group of patients.

Keywords: *in vitro fertilization, implantation failure, immune status of endometrium, granulocyte colony-stimulating factor.*

Повторні невдачі імплантації у програмах запліднення *ін вітро* залишаються однією з найскладніших проблем репродуктології. Діагноз «Повторні невдачі імплантації» встановлюють, як правило, після щонайменше 2–4 перенесень зародків хорошої якості [4, 6, 19, 21, 30, 33].

У клінічній практиці використовується чимало методів впливу на рецептивність ендометрія, але переконливих доказів їхньої ефективності бракує. Серед запропонованих засобів покращення імплантації одним із перспективних вважається системне – підшкірне або місцеве (у порожнину матки) – уведення гранулоцит-колонієстимулювального фактора (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF) [27].

G-CSF належить до сімейства колонієстимулювальних факторів, він синтезується багатьма типами клітин (ендотеліальні клітини, фібробласти, макрофаги, лімфоцити), у тому числі і клітинами репродуктивних органів (яєчники, ендометрій). Існують докази того, що G-CSF регулює в ендометрії важливі для імплантації процеси: судинну перебудову, локальні імунні зміни та клітинну адгезію [25].

Уперше G-CSF було використано у пацієнок із повторними невдачами імплантації у програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) у 2000 р. W. Würfel (2000 р.) встановив, що системне призначення G-CSF суттєво покращує частоту імплантації ембріонів [34]. Через 11 років було опубліковано роботу N. Gleicher та співавторів, у якій було продемонстровано, що уведення G-CSF внутрішньоматково у 4 пацієнок із тонким, резистентним до гормонотерапії ендометрієм сприяло його росту [10].

З того часу було оприлюднено цілу низку досліджень, присвячених системному або місцевому уведенню G-CSF у пацієнок із повторними невдачами імплантації [1, 3, 7, 29, 31]. Результати цих досліджень є неоднозначними: у деяких відзначається покращення рівнів імплантації, настання вагітності, живонароджуваності, в інших такого ефекту не спостерігається.

Ймовірно, це пояснюється тим, що причини невдач імплантації можуть бути різними, отже, універсальних засобів впливу бути не може. Серед факторів, які негативно впливають на імплантацію, порушення імунної структури ендометрія можуть посілати одне із чільних місць.

Відомо, що в ендометрії у період імплантаційного вікна відбувається зсув від прозапального до регуляторного фенотипу, змінюється склад і функціонування багатьох клітин, у тому числі й імунних. У лютеїнову фазу циклу зменшується кількість Т-хелперів першого типу (Tx1), натомість зростає частка Т-хелперів другого типу (Tx2) [26] – відбувається так званий зсув до Tx2 типу імунної відповіді.

Важливу роль в імплантації та перебігу ранньої вагітності відіграють також інші підвиди Т-клітин, вірніше, правильний баланс Tx1, Tx2, Т-регуляторних (Treg.)

та Tx17 лімфоцитів [11, 28]. Окрім Т-лімфоцитів, рауючі зміни у період так званого імплантаційного вікна відбуваються з матковими природними кілерами (ПК), які недаремно вважають ключовими клітинами імплантації. У першій половині циклу (фолікулінова фаза) ПК становлять близько 10–20 % всіх імунних клітин ендометрія, після овуляції їхня кількість зростає щонайменше вдвічі і становить вже 40–50 % [15].

Маткові ПК (мПК) (CD56bright CD16dim) є найбільш чисельною популяцією лейкоцитів в ендометрії. Децидуальні ПК мають на поверхні KIR-рецептори, що розпізнають HLA-C-молекули трофобласта, активуються, запускаючи таким чином каскад подальших подій, вкрай важливих для імплантації та перебігу вагітності [20]. Унаслідок взаємодії із мПК та стромальними клітинами відросткові клітини строми (дендритні клітини) набувають стану толерантності до плодових антигенів. Окрім цього, мПК регулюють і сприяють деградації м'язового шару та заміщенню ендотелія спіральних судин децидуальної оболонки на клітини трофобласта, таким чином зумовлюючи перебудову, потрібну для ефективного функціонування плаценти [2, 23].

У змінах ендометріального середовища у період імплантаційного вікна задіяні чисельні молекули, які продукуються місцевими клітинами. Наслідком цих процесів є розпізнавання клітин трофобласта, встановлення толерантності до плодових антигенів, сприяння просуванню клітин трофобласта, модифікація судинного русла, формування повноцінних децидуальної оболонки і плаценти.

Останні десять років імунні клітини ендометрія людини були об'єктом низки досліджень, метою яких було визначення їхніх рівнів у різні фази циклу, включно з періодом рецептивності, відмінностей у популяціях цих клітин у здорових жінок та пацієнок із повторними невдачами імплантації та іншими розладами фертильності [5, 11, 17, 18, 35]. Але поки що бракує розуміння причинно-наслідкових зв'язків виявлених імунних особливостей ендометрія з феноменом повторних невдач імплантації та способами їхньої корекції.

У клініці «Надія» у межах мультицентрової науково-дослідної роботи було заплановано дослідження імунного фенотипу ендометрія, а саме – класів і підкласів імунних клітин ендометрія методом проточної цитометрії. Також було вирішено у тій самій групі жінок із повторними невдачами імплантації проаналізувати ефективність застосування внутрішньоматкового уведення G-CSF для покращення імплантації ембріонів залежно від імунного фенотипу ендометрія. Водночас здавалося важливим вивчити, чи змінюються класи та підкласи імунних клітин ендометрія під впливом внутрішньоматкового уведення G-CSF і, якщо змінюються, чи впливає це на подальше настання вагітності.

Мета дослідження: визначення ефективності застосування внутрішньоматкового уведення G-CSF за-

лежно від імунного фенотипу ендометрія у пацієнок із повторними невдачами імплантації у програмах перенесення ембріонів.

Завданнями даного дослідження було:

- 1) порівняння популяції імунних клітин у пацієнок із повторними невдачами імплантації та фертильних жінок (допоміжні матері);
- 2) дослідження частоти настання вагітності (ЧВ) та частоти живонароджуваності (ЧЖН) залежно від імунного фенотипу ендометрія у пацієнок із повторними невдачами імплантації після внутрішньоматкового уведення G-CSF у програмі перенесення ембріонів;
- 3) визначення впливу внутрішньоматкового уведення G-CSF на імунний фенотип ендометрія.

Етичний комітет клініки «Надія» розглянув запропонований протокол дослідження, погодив та затвердив його. Усі жінки були поінформовані про всі етапи дослідження, вони дали письмову інформовану згоду на його проведення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У жінок, що брали участь у дослідженні, а саме – пацієнок з повторними невдачами імплантації та допоміжних матерів, було заплановано дослідження біопсійного матеріалу ендометрія у період імплантаційного вікна у штучному циклі, аналогічному тому, що використовується для перенесення ембріонів. Отриманий матеріал ділили на декілька частин: для проточної цитометрії з підрахунком класів та підкласів ендометріальних лімфоцитів; для інших досліджень, включаючи гістологічне. У даній роботі буде висвітлено лише результати проточної цитометрії.

У частини пацієнок (дали згоду 7 жінок) планували повторне ідентичне дослідження ендометрія у подібному циклі, але з додатковим уведенням G-CSF.

Наступним етапом було проведення кріоперенесення ембріона/ембріонів у штучному циклі із уведенням G-CSF.

До групи дослідження (невдачі імплантації – НІ) увійшли 42 жінки віком від 27 до 45 років із повторними (не менше 3) невдачами перенесення щонайменше 2 генетично тестованих зародків, 9 пацієнкам віком понад 39 років переносили ембріони, отримані з донорських яйцеклітин. PGT-A (preimplantation genetic testing for aneuploidies – передімплантаційне генетичне тестування анеуплоїдії) здійснювали методом NGS (next-generation sequencing – секвенування «нового» покоління).

Тривалість безплідності у групі НІ становила $9,4 \pm 4,8$ року, первинна безплідність була у 23 пацієнок, у 19 – вторинна. У 5 пацієнок із групи відбулися 9 пологів, з них 3 – після застосування ДРТ, 6 позаматкових вагітностей було у 5 пацієнок, 13 завмерлих вагітностей або викиднів у ранньому терміні – у 9 жінок. Усього в групі НІ до включення у дослідження було проведено 149 перенесень 251 зародка, у середньому – $4,6 \pm 2,5$ перенесень на 1 пацієнку; $6,5 \pm 3,1$ ембріона на 1 пацієнку, з них $2,2 \pm 0,3$ генетично тестованих ембріона на 1 пацієнку.

Усім пацієнкам з групи НІ на попередніх етапах проводили двовимірну та тривимірну ультразвукову

діагностику, гістероскопію, імуногістохімічне дослідження ендометрія на CD138. На момент початку даного дослідження жодна пацієнтка не мала ознак внутрішньоматкової патології або хронічного ендометриу. У жодної пацієнтки не виявляли антифосфоліпідні антитіла та пов'язані білки (антикардіоліпінові антитіла, анти- β -2-глікопротеїн, вовчаковий антикоагулянт). Показники таких гормонів, як пролактин, загальний та вільний тестостерон, тиреотропний гормон, були у межах нормальних значень.

До групи контролю увійшли 20 допоміжних матерів (ДМ) у віці 27–36 років. У всіх жінок були щонайменше одні пологи, у цілому у цій групі відбулися 49 пологів. У 5 жінок було 9 медичних абортів, 6 завмерлих вагітностей – у 4 жінок. Дев'ятнадцять допоміжним матерям проводили 40 перенесень у програмах ДРТ, було перенесено 50 ембріонів, з них отриманих за допомогою донації ооцитів – 13, генетично тестованих – 30.

У групі ДМ було 18 невдач імплантації (у жодному випадку не було послідовних 2 невдач імплантації, в усіх випадках невдач переносили не тестовані генетично ембріони). Усім жінкам групи ДМ проводили двовимірну та тривимірну ультразвукову діагностику. У жодної жінки не було виявлено міоми матки, аденоміозу, ендометріозу, аномалії матки.

Протокол підготовки ендометрія перед взяттям біопсії: з 3-го дня циклу призначали естрогени – естрадіолу валерат (2 мг) у дозі 6 мг на добу. На 8–11-й день вживання естрогенів проводили ультразвукові дослідження з метою оцінювання товщини ендометрія. Коли товщина ендометрія досягла щонайменше 7 мм, призначали додатково дидрогестерон (10 мг) у добовій дозі 60 мг. Біопсію ендометрія проводили на 7–8-й день вживання гестагенів.

Щонайменше через один менструальний цикл виконували перенесення кріоконсервованих розморожених зародків. В усіх програмах перенесення ембріонів підготовка ендометрія була подібною до тієї, яку використовували для біопсії ендометрія. З 3-го дня циклу призначали естрогени: естрадіолу валерат (2 мг) у дозі 6 мг на добу. На 8–11-й день вживання естрогенів проводили ультразвукові дослідження з метою оцінювання товщини ендометрія. Коли товщина ендометрія досягала щонайменше 7 мм, призначали додатково дидрогестерон (10 мг) у добовій дозі 60 мг.

На початку вживання гестагенів (перший-другий дні застосування дидрогестерону) вводили G-CSF (0,48 мг) у матку катетером для перенесення. Перенесення ембріона/ембріонів виконували на 7-й день вживання дидрогестерону. Медикаментозна підтримка дидрогестероном та естрадіолу валеріатом у тих самих дозах тривала ще 14 днів після перенесення. Після цього пацієнтка здавала тест на хоріонічний гонадотропін, і у випадку позитивного результату гормональна підтримка тривала ще 14 днів. Після цього проводили ультразвукове дослідження для виявлення наявності, кількості та розташування плідного яйця.

У подальшому пацієнок спрямовували на спостереження до жіночих консультацій. Дані щодо перебігу вагітності та результатів пологів відслідковували і фіксували.

Перенесення ембріонів було виконано у 39 жінок, 3 пацієнтки з особистих мотивів вибули з дослідження на цьому етапі. Усі ембріони за результатами попередньо проведеного PGT-A, були еуплоїдними. У більшості випадків перенесли один ембріон, у 5 жінок – 2, усього перенесено 44 ембріона.

Сім пацієнток погодились зробити повторну біопсію ендометрія у штучному циклі з додатковим введенням G-CSF у матку катетером для перенесення ембріонів на 1–2-й день вживання дидрогестерону. Цю процедуру здійснювали щонайменше через один менструальний цикл після попередньої біопсії, а кріоперенесення ембріонів проводили ще щонайменше через один менструальний цикл.

Дослідження лімфоцитів ендометрія

Зразки тканини ендометрія тричі обережно промивали фосфатно-сольовим буфером (phosphate-buffered saline – PBS) для звільнення від забруднення крові (у деяких зразках). Наконечник піпетки об'ємом 1 мл розрізали по краю так, щоб діаметр отвору становив 4 мм, і тканину ендометрія промивали 10–15 разів піпетуванням у PBS для отримання вільних клітин ендометрія у розчині PBS. Наступний наконечник піпетки мав діаметр отвору 2–3 мм, і шматочки тканини знову піпетували. На останньому етапі піпетування отвір наконечника становив 1–2 мм, і шматки піпетували без опору, тобто кожен наступний крок робили з меншим діаметром отвору наконечника.

Тканину ендометрія дезагрегували і надавали вигляду пластівців. Додавали 7 мл PBS (+4°C), змішували з отриманою суспензією і залишали на 3–5 хв для осідання великих агрегатів. Клітинний супернатант обережно наносили на 3 мл Histopaque-1077 у 15 мл конічну центрифужну пробірку та центрифугували при 400 g протягом 30 хв за кімнатної температури. Після центрифугування верхній шар обережно відсмоктували і цю непрозору поверхню обережно перенесли у чисту конічну центрифужну пробірку.

Клітини двічі промивали 10 мл PBS. Осадок клітин ресуспендували у 0,5 мл PBS з 10 % фетальної бичачої сироватки. Кінцеву суспензію клітин аналізували за допомогою триколірної проточної цитометрії після фарбування моноклональними антитілами, кон'югованими з флуорохромами FITC, PE, PE-Cy 5 (BD Biosciences, США) у таких комбінаціях: CD158aFITC/CD56PE/CD3PECy5, CD8FITC/CD56/CD3PECy5, HLA-DR FITC/CD56PE/CD3PECy5, HLA-DRFITC/CD8PE/CD3PECy5, CD69FITC/CD56PE/CD3PECy5, CD3FITC/CD335/PECD3PECy5, CD16FITC/CD56PE/CD3PECy5. Зразки аналізували за допомогою проточного цитометра FACScan (BD Biosciences, США). Крім того, зразки інкубували з контролем SimulTEST (IgG1-FITC + IgG2-PE) як фоновим контролем.

Статистичний аналіз проводили за допомогою InStat for Windows (версія 3.0, Graph Pad Software Inc., Сан-Дієго, США). Достовірність відмінностей розраховували за критерієм Манна–Уїтні (непарний, непараметричний, двосторонній) з 95 % довірчим інтервалом (confidence interval – CI) та визначенням

відношення шансів (odds ratio – OR). Також були використані кореляції Пірсона та Спірмена. Відмінності з $p < 0,05$ вважали статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кріоперенесення ембріона/ембріонів було виконано у 39 жінок. Клінічна маткова вагітність настала у 12 випадках (ЧВ – 30,7 %), частота імплантації – 29,5 %. Переривання вагітності у I триместрі відбулося у 2 жінок. Ще у 2 жінок імплантація відбулася у матковій трубі, з приводу чого вони були прооперовані. Усього народилися 11 живих дітей, серед них – одна двійня, ЧЖН – 28,2 %.

Субпопуляції лімфоцитів в ендометрії у групі ДМ, пацієнток із групи НІ у цілому та у групах жінок, які завагітніли (В), та тих, що не завагітніли (НВ), внаслідок перенесення ембріонів після зрошення порожнини матки G-CSF представлені у табл. 1.

Ендометріальний імунний фенотип у фертильних жінок і пацієнток із повторними НІ суттєво різнився. Імунні особливості ендометрія (суттєві відмінності хоча б за одним параметром порівняно із ДМ) були виявлені у 28 (66,7 %) пацієнток.

У пацієнток із НІ виявляли меншу середню кількість Т-клітин за рахунок Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD3+CD8+), що призводило до достовірного зсуву співвідношення Т-хелперів/Т-супресорів (Тх/Тс) у бік Тх. Окрім того, експресія HLA-DR на Тх була вищою у пацієнток з НІ (рис. 1А). У групі пацієнток із НІ визначали більш високі рівні НКТ-подібних популяцій (CD3+CD158a+) та різні нетипові форми НКТ-лімфоцитів: CD3+CD16+, CD3+CD335+, CD3-CD56++CD16+.

Суттєво відрізнялася популяція ПК у групі пацієнток із НІ. На ПК-клітинах у пацієнток із НІ часто експресувався CD16, типовий для кров'яних і не типовий для ендометріальних ПК. Збільшення експресії CD16 відбувалося за рахунок обох субпопуляцій клітин ПК: як CD56dim, так і CD56++. Більше 90 % ендометріальних ПК були CD335+.

У достовірно більшій частці пацієнток з НІ популяція ПК мала аномально високу експресію HLA-DR, CD16 та CD158, чого практично не спостерігалось у ДМ (рис. 1В, С, D).

Привертає увагу те, що в ендометрії пацієнток, що завагітніли внаслідок перенесення ембріонів після зрошення порожнини матки G-CSF, визначали суттєво більшу експресію HLA-DR на Тх, HLA-DR, CD16 на мПК (див. табл. 1; табл. 2).

Як правило, високі рівні HLA-DR та CD16 на мПК виявляли у тих самих пацієнток (15 жінок). Між цими показниками була достовірна кореляція: коефіцієнт кореляції (r) = 0,9408; r squared = 0,8852; $p < 0,0001$ (рис. 2).

Важливо відзначити, що з цих жінок перенесення було проведено у 13, з яких 7 завагітніли (ЧВ – 53,8 %), 6 – доносили вагітність, у тому числі двійнею, та народили живих дітей (ЧЖН – 53,8 %), а ще в одній жінки діагностували позаматкову вагітність. Серед решти пацієнток (26) вагітність настала лише у 7 випадках,

Таблиця 1

T-лімфоцити та ПК в ендометрії допоміжних матерів, пацієнок загальної групи НІ, груп, що завагітніли (В) та не завагітніли (НВ), внаслідок ембріотрансферу зі зрошенням порожнини матки G-CSF, %

Групи та підгрупи T- та ПК лімфоцитів	ДМ, n=17	Стандартне відхилення (standard deviation – SD)	НІ, n=42	SD	В, n=12	SD	НВ, n=27	SD
CD3+ (T cells), %	48,81	10,7	40,02	13,4	38,15	14,53	39,84	9,9
% HLA DR+ in T cells	48,04	15,7	55,82	20,6	64,98	17,3	51,75	18,3
% CD158a+ in T cells	6,0	11,9	24,69	25,9	40,62	15,8	25,63	21,1
CD3+CD4+ (T helper cells), %	14,29	5,65	15,48	7,8	16,26	8,8	15,48	5,5
% HLA DR+ in T helper cells	28,7	11,7	41,68	18,25	54,75	16,8	40,69	14,9
CD3+CD8+ (T cytotoxic cells), %	31,60	8,7	22,80	8,53	23,62	11,3	24,64	8,9
% HLA DR+ in T cytotoxic cells	55,26	13,9	54,2	20,9	67,7	15,7	56,42	18,6
% CD56+ in T cytotoxic cells	18,41	14,8	27,37	22,68	24,6	18,4	20,9	14,3
CD56+CD3- (NK cells), %	34,70	12,0	50,66	15,30	50,53	15,40	50,71	11,7
% CD158a+ in NK cells	19,32	14,3	37,72	21,6	53,1	18,4	40,30	17,9
% HLA DR+ in NK cells	10,62	6,3	21,4	19,9	41,90	21,1	25,7	20,2
% CD8+ in NK cells	32,4	15,8	36,78	18,46	52,64	18,34	40,84	15,4
% CD56++ bright in NK cells	66,48	18,82	68,49	16,38	69,53	19,92	68,01	13,55
CD16+ on NK	9,54	9,98	22,75	19,33	44,14	20,41	25,61	18,8
CD16+ on NK CD56++	5,24	5,28	17,78	17,56	40,19	22,51	22,26	17,9
CD16+ on NK CD56+	20,27	17,5	34,59	22,4	52,1	17,2	33,8	20,04
CD16 on CD3+	1,87	2,29	12,30	19,8	2,7	1,5	1,4	0,8
NK CD335+	94,0	3,59	92,51	10,2	95,12	2,13	90,05	8,63
T CD335+	1,17	1,07	8,03	20,9	13,99	12,8	7,26	9,66

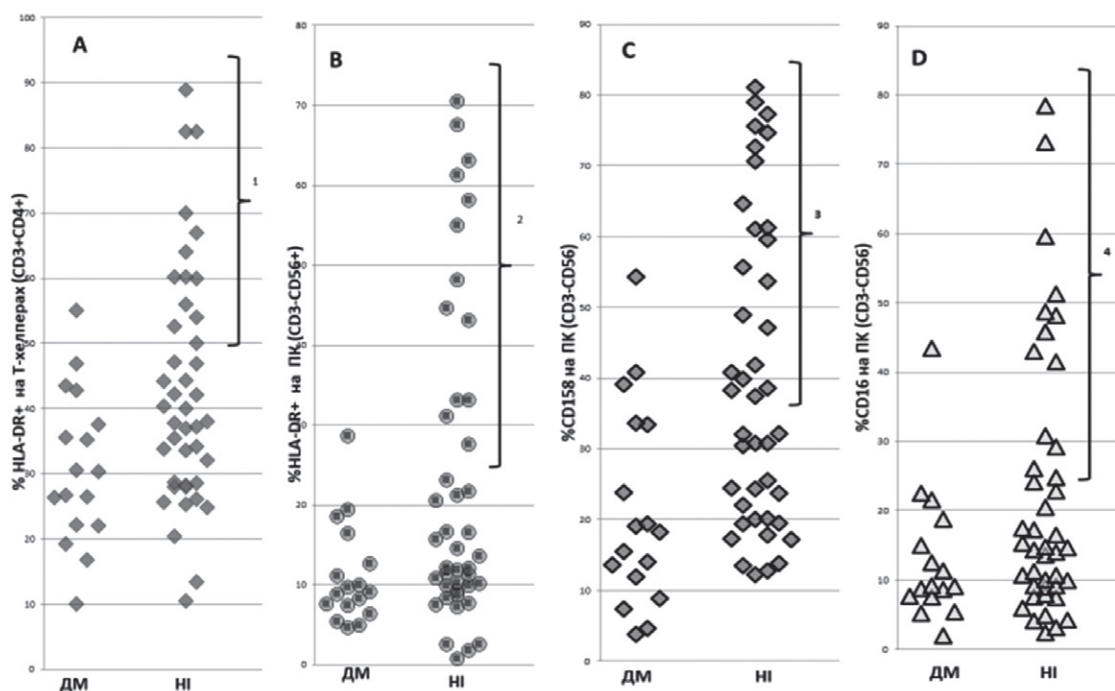


Рис. 1. Експресія HLA-DR на Т-хелперах (А) та HLA-DR, CD158a і CD16 на ендометріальних ПК (В, С, D) у пацієнок із НІ та ДМ. Достовірно асоціюється із НІ (1* OR – 5,1, p=0,0368; 2* OR – 10,88, p=0,0113; 3* OR – 4,66, p=0,0388; 4* OR – 8,04, p=0,0388)

Експресія HLA-DR на Т-хелперах, HLA-DR, CD16 на мПК в ендометрії пацієнток, що завагітніли (В) та не завагітніли (НВ) внаслідок перенесення ембріонів після зрошення порожнини матки G-CSF

Група	Результат ДРТ	%CD16+ на мNK bright (CD3-CD56++) (>15)	%CD16+ на мNK		%HLA-DR на мNK		%HLA-DR на Тх (CD3+CD8+) (>66%)
			(>20)	(>55)	(>16%)	(>50)	
G-CSF лікування	В (n=12)	(10/12) 83,3%	(9/12) 75%	(5/12) 41,6%	(9/12) 75%	(7/12) 58,3%	(8/11) 72,7%
	НВ (n=27)	(13/27) 48,1%	(12/27) 44,4%	(3/27) 11,1%	(12/26) 46,1%	(4/26) 15,3%	(7/27) 25,9%
Значення для успіху ДРТ		OR= 5,385 p=0,0410 95%CI: 0,9877–29,355	OR=3,750 p=0,0768 95%CI: 0,8272–17,001	OR=5,714 p=0,0433 95%CI: 1,085–30,084	OR=3,500 p=0,0939 95%CI: 0,7674–15,964	OR=7,350 p=0,0183 95%CI: 1,531–35,292	OR= 7,619 p=0,0117 95%CI: 1,566–37,065

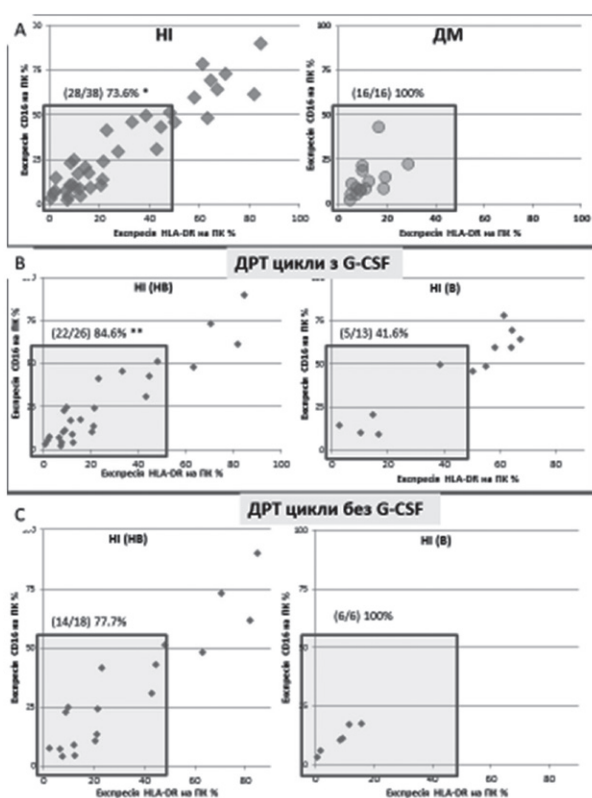


Рис. 2. Тандемне збільшення рівнів HLA-DR та CD16 на ПК достовірно частіше спостерігалось у пацієнток з НІ порівняно з ДМ (А) і пацієнтками з успішною імплантацією після застосування G-CSF (В, С)

усі жінки доносили вагітність і народили живих дітей (ЧВ, ЧЖН – 26,9 %).

Різниця не досягла достовірності (p=0,09) через невелику кількість пацієнток, але тенденція до кращих результатів у цій групі очевидна. Відзначали високу кореляцію підвищених рівнів HLA-DR та CD16 на мПК (>55 % HLA-DR+, >50 % CD16+), з одного боку, з НІ порівняно із ДМ (*OR = 12,158; p=0,0242), з іншого – з успішною імплантацією після застосування зрошення порожнини матки G-CSF (**OR = 7,700; p=0,0174) (рис. 2А, В).

У 7 жінок вдалося отримати біопсійний матеріал ендометрія для дослідження після уведення в матку G-CSF. Рівні більшості досліджуваних популяцій ендометріальних лімфоцитів після уведення у порожнину матки G-CSF суттєво не змінилися. Але у пацієнток із високою експресією HLA-DR та CD16 на мПК після уведення G-CSF спостерігалось зниження цих маркерів (6 пацієнток), а в одній жінки із більш низькою експресією цих маркерів вона практично не змінилася (рис. 3).

У всіх пацієнток також суттєво зменшилася експресія CD158a на мПК, причому як на CD3-CD56+, так і на CD3-CD56++. Такі показники, як загальна кількість мПК, кількість та види NKT-клітин та висока експресія HLA-DR на Т-лімфоцитах у частині випадків не зазнали змін, у частині змінилися у бік збільшення або зменшення.

У даному дослідженні у більшості пацієнток із НІ виявили цілу низку імунних особливостей ендометрія. Серед виявлених відхилень на особливу увагу заслуговують зміни популяції мПК. У чверті пацієнток з НІ популяція ПК мала аномально високу експресію HLA-DR, CD16, чого практично не спостерігалось у ДМ. Ці зміни корелювали між собою, їх спостерігали у тих самих пацієнток.

Водночас високі рівні HLA-DR та CD16 на мПК у групі жінок, які завагітніли при застосуванні внутрішньоматкового уведення G-CSF у циклі перенесення ембріонів, діагностували достовірно частіше. Саме у цій групі пацієнток спостерігалась тенденція до більш високої частоти настання вагітності і живонароджуваності при застосуванні внутрішньоматкового уведення G-CSF у циклі перенесення ембріонів.

Власне, феномен збільшення відсотка CD16-позитивних мПК – відносно відомий, і його пов'язують із несприятливим репродуктивним прогнозом. Ще у дослідженнях 90-х років минулого сторіччя зазначалося про збільшення частки CD16⁺CD56^{dim}-клітин та зменшення популяції CD16⁺CD56^{bright} у жінок зі звичним невиношуванням [16, 24], з перериванням вагітності після застосування ДРТ [9].

У роботі E. Giuliani та співавторів (2014) було встановлено, що у пацієнток зі звичним невиношуванням та безплідністю відсоток CD16-позитивних мПК суттєво вищий, ніж у здорових жінок [12]. У дослідженні

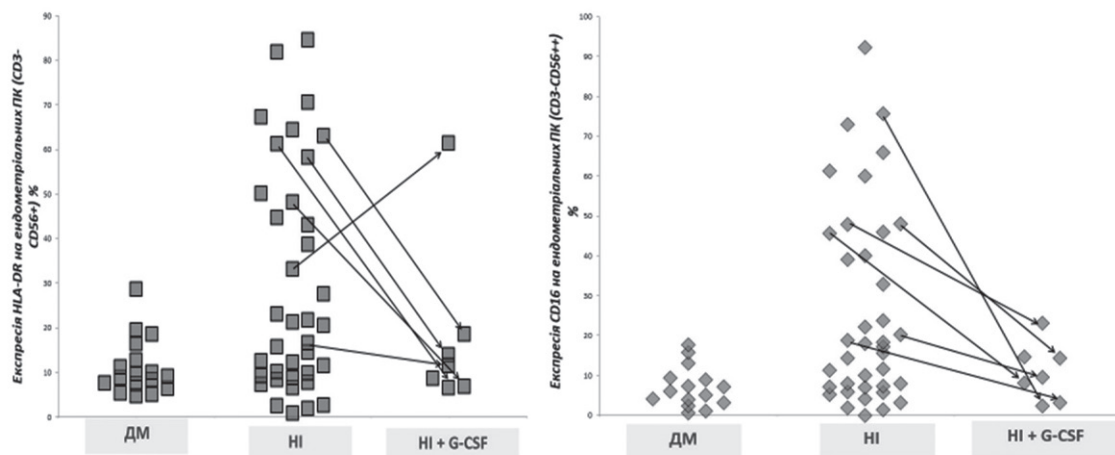


Рис. 3. Експресія HLA-DR та CD16 на мПК у циклах без та із застосуванням G-CSF

К. Maron та С. Harrity (2019) збільшення частки ПК «кров'яного» типу, тобто CD16+CD56+, спостерігалося саме у підгрупах пацієнок із повторними невдачами імплантації та іншими репродуктивними розладами [17]. У роботі G. Junovich та співавторів (2013) було продемонстровано збільшення частки CD16-позитивних мПК у жінок із безплідністю, яке корелювало із зниженням рівнів IL-6 та фактора росту ендотелію судин в ендометрії [14].

Вважається, що CD16-позитивні мПК продукують прозапальні цитокіни та цитотоксичні фактори і, при збільшенні їхньої популяції, створюють несприятливе для імплантації та розвитку вагітності середовище.

Натомість у доступній літературі не виявлено відомостей щодо ролі HLA-DR-позитивних ПК в ендометрії пацієнок із HI у програмах ДРТ, із безплідністю чи іншими гінекологічними хворобами. На відміну від протеїнів 1-го класу великого комплексу гістосумісності, які експресуються більшістю клітин людини, протеїни 2-го класу великого комплексу гістосумісності в основному експресуються антиген-презентуючими клітинами. Однак за певних умов ПК також експресують HLA-DR. Значення та вплив цього маркера на ПК досі залишаються недостатньо вивченими.

У крові здорових донорів крові відсоток HLA-DR-позитивних ПК коливається, за даними різних дослідників, від 0 до 37,7 % [8]. Вважається, що HLA-DR-позитивні ПК є функціонально активними, вони продукують прозапальні цитокіни, деградулюють, легко проліферують у відповідь на активуючі стимули. HLA-DR+ ПК виявляли також у різних тканинах, таких, як селезінка, печінка, мигдалики, лімфатичні вузли. Причому концентрація цих клітин серед усіх ПК у тканинах була значною – від 20 % до 70 % [8].

Численні дослідження довели, що HLA-DR-експресія ПК крові асоціюється з продукуванням IFN-γ, у декількох дослідженнях було виявлено пряму кореляцію між ними. Ця кореляція є, скоріш за все,

варіантом позитивного зворотного зв'язку: HLA-DR-позитивні ПК можуть виробляти більше IFN-γ, що своєю чергою запускає збільшення HLA-DR-експресії шляхом автостимуляції [36].

Підвищення концентрації HLA-DR-позитивних ПК у регіональних лімфатичних вузлах виявляли при запальних станах, таких, як хронічний тонзиліт, а HLA-DR-позитивних децидуальних ПК – в інфікованих цитомегаловірусом жінок [13]. Кількість HLA-DR-експресуючих ПК у місцях запалення корелює із тяжкістю імунного патологічного процесу (наприклад при IgA-нефропатії) [36].

Отже, можна припустити, що збільшення кількості HLA-DR+ мПК у жінок із повторними HI може свідчити на користь проліферативного, прозапального, готового до «боротьби із загрозою», фенотипу. Наші попередні дослідження ендометрія у донорів ооцитів у циклах контрольованої стимуляції, коли біопсія ендометрія у частині випадків проводили у день пункції, в іншій частині – на 7-й день дії прогестерону після забору яйцеклітин, засвідчили, що таку імунну структуру нерідко виявляли у здорових жінок у день пункції, але вона не спостерігалася у дні, що відповідають вікну імплантації [5].

Можна припустити, що ендометрій від моменту овуляції (забору яйцеклітин) до вікна імплантації повинен еволюціонувати, «дозріти», кількість ПК маткового типу (CD56++) має збільшитися, а відсоток CD16+ та HLA-DR+ зменшитися. Тому такий тип імунного фенотипу ендометрія – з високими рівнями HLA-DR+ та CD16+ ПК – був названий «незрілим».

Отже, ймовірно, що у частини пацієнок групи HI із комбінацією таких ознак, як збільшення частки CD16-позитивних, HLA-DR-позитивних мПК, і відповідно зі зменшеною часткою CD56 bright мПК, що складаються у картину «незрілого», прозапального, не готового до імплантації ембріона ендометрія, він під впливом внутрішньоматкового уведення G-CSF «виправляється». Це сприяє настанню імплантації при перенесенні ембріонів.

Конкретний механізм коригувального впливу G-CSF наразі невідомий. Хоча відомо чимало фактів, що доводять важливість цього цитокіну для репродукції, вдалося знайти лише невелику кількість робіт, які висвітлюють інші, ніж стимуляція нейтрофіл/гранулоцитарної лінії клітин, аспекти фізіології G-CSF. Рецептор G-CSF експресується на лейкоцитах та клітинах трофобласта, макрофагах та ПК децидуальної оболонки. Протягом вагітності G-CSF синтезуються децидуальними стромальними клітинами та клітинами трофобласта.

У дослідженні Т. Такака та співавторів (2000) було встановлено, що стромальні клітини ендометрія людини продукують незначну кількість G-CSF, а після стимуляції культури клітин похідним від циклічного аденозинмонофосфата (8-bromo-cyclic adenosine 3',5'-monophosphate – 8-Br-CAMP), що сприяє децидуалізації стромальних клітин, продукування ними G-CSF суттєво зростало [32]. Водночас при стимуляції їх 8-Br-CAMP та G-CSF суттєво підвищувалась кількість пролактину (маркера децидуалізації), що виробляли ці клітини.

Отже, можна припустити, що *in vivo* в ендометрії відбувається щось подібне: прогестерон і естрадіол сприяють диференціації стромальних клітин у децидуальні стромальні клітини, які починають виробляти більше G-CSF. Він своєю чергою посилює процес децидуалізації. У сприятливому середовищі, створеному децидуальними стромальними клітинами, посилюється експансія популяції лейкоцитів, у тому числі і мПК, відкривається «імунне вікно імплантації». У частини жінок із повторними НІ така імунна перебудова не відбувається повною мірою.

Однією із форм такої неповної перебудови є незрілий імунний фенотип ендометрія. Додаткове уведення G-CSF може посилити децидуалізацію стромальних

клітин та продукування регуляторних цитокінів, що сприяє «дозріванню» мПК. Не виключено, що G-CSF справляє безпосередній вплив на мПК, урахувавши те, що вони експресують рецептор г-G-CSF. Отже, саме пацієнткам із «незрілим» імунним фенотипом ендометрія може бути показане використання G-CSF для збільшення ймовірності настання вагітності у програмах ДРТ.

ВИСНОВКИ

- У 28 (66,7 %) пацієнток із повторними невдачами імплантації у програмах перенесення генетично тестованих ембріонів виявлено імунні аномалії ендометрія, не характерні для фертильних жінок; у 15 (35,7 %) з них спостерігався особливий імунний статус ендометрія, який нами був названий «незрілий імунний фенотип». Для нього характерною є комбінація таких ознак, як висока експресія HLA-DR та CD16 на маткових природних кілерах.

- Висока експресія HLA-DR та CD16 на маткових природних кілерах достовірно асоціюється із успішною імплантацією після застосування внутрішньоматкового уведення гранулоцит-колонієстимулювального фактора у програмі перенесення ембріонів.

У групі із незрілим імунним ендометріальним фенотипом частота настання вагітності (53,8 %) та частота народження живих дітей (53,8 %) були вдвічі вищими порівняно із рештою пацієнток з іншими варіантами або відсутністю змін імунного профілю (частота вагітності та частота живонароджуваності – 26,9 %).

- Уведення внутрішньоматково гранулоцит-колонієстимулювального фактора зумовлює суттєве зменшення високої експресії HLA-DR, CD16 та CD158a на маткових природних кілерах, не змінюючи водночас інші імунні маркери.

Відомості про авторів

Судома Ірина Олександрівна – д-р мед. наук, проф., кафедра акушерства, гінекології та репродуктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, м. Київ; тел.: (095) 281-00-09. *E-mail: i.sudoma@ivf.com.ua*
ORCID: 0000-0003-4847-9543

Гончарова Яна Олександрівна – канд. мед. наук, акушер-гінеколог, лікар ультразвукової діагностики, відділ медицини плода, Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ; тел.: (044) 537-75-97. *E-mail: y.goncharova@ivf.com.ua*
ORCID: 0000-0002-6776-4641

Донської Борис Владиславович – канд. біол. наук, завідувач, лабораторія імунології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ; тел.: (044) 483-80-67. *E-mail: ipag@amnu.gov.ua; boris_donskoy@ukr.net*
ORCID: 0000-0001-9434-2826

Information about the authors

Sudoma Iryna O. – MD, PhD, DSc, Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv; tel.: (095) 281-00-09. *E-mail: i.sudoma@ivf.com.ua*
ORCID: 0000-0003-4847-9543

Goncharova Yana O. – MD, PhD, Obstetrician-Gynecologist, Doctor of Ultrasound Diagnosis, Fetal Medicine Department, Clinic of Reproductive Medicine “Nadiya”, Kyiv; tel.: (044) 537-75-97. *E-mail: y.goncharova@ivf.com.ua*
ORCID: 0000-0002-6776-4641

Dons'koy Borys V. – PhD, Head of Laboratory of Immunology, State Institution “Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after academician O. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv; tel.: (044) 483-80-67. *E-mail: ipag@amnu.gov.ua; boris_donskoy@ukr.net*
ORCID: 0000-0001-9434-2826

ПОСИЛАННЯ

1. Aleyasin A, Abediasl Z, Nazari A, Sheikh M. Granulocyte colony-stimulating factor in repeated IVF failure, a randomized trial. *Reproduction*. 2016;151(6):637-42. doi: 10.1530/REP-16-0046.
2. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med*. 2013;19(5):548-56. doi: 10.1038/nm.3160.
3. Barad DH, Yu Y, Kushnir VA, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Lee HJ, Gleicher N. A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2014;101(3):710-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.016.
4. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):121. doi: 10.1186/s12958-018-0414-2.
5. Chernyshov VP, Dons'koi BV, Sudoma IO, Goncharova YO. Comparison of T and NK lymphocyte subsets between human endometrial tissue and peripheral blood. *Cent Eur J Immunol*. 2019;44(3):316-21. doi: 10.5114/cej.2019.89610.
6. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demiroglu A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.
7. Eftekhari M, Miraj S, Farid Mojtahedi M, Neghab N. Efficacy of Intrauterine infusion of granulocyte colony stimulating factor on patients with history of implantation failure: A randomized control trial. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(11):687-90.
8. Erokshina SA, Streltsova MA, Kanevskiy LM, Grechihina MV, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. HLA-DR-expressing NK cells: Effective killers suspected for antigen presentation. *J Leukoc Biol*. 2021;109(2):327-37. doi: 10.1002/jlb.3ru0420-668rr.
9. Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Saito S, Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 1999;41(6):413-22. doi: 10.1111/j.1600-0897.1999.tb00456.x.
10. Gleicher N, Vidali A, Barad DH. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil Steril*. 2011;95(6):2123.e13-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.143.
11. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*. 2009;15(5):517-35. doi: 10.1093/humupd/dmp004.
12. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(3):262-9. doi: 10.1111/aji.12259.
13. Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI, et al. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest*. 2004;114(11):1612-23. doi: 10.1172/JCI22787.
14. Junovich G, Azpiroz A, Incera E, Ferrer C, Pasqualini A, Gutierrez G. Endometrial CD16(+) and CD16(-) NK cell count in fertility and unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(3):182-9. doi: 10.1111/aji.12132.
15. King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol*. 1989;24(3):195-205. doi: 10.1016/0198-8859(89)90060-8.
16. Canella PRBC, Vincos SS, Silva AR, Sanches PHG, Barini R, Porcari AM, et al. Altered profile of plasma phospholipids in woman with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure treated with lipid emulsion therapy. *Am J Reprod Immunol*. 2022:e13673. doi: 10.1111/aji.13673.
17. Marron K, Harrity C. Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(5):837-46. doi: 10.1007/s10815-019-01427-8.
18. Marron K, Walsh D, Harrity C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(2):199-210. doi: 10.1007/s10815-018-1300-8.
19. Mascarenhas M, Jevic Y, Polanski L, Sharpe A, Yasmin E, Bhandari HM, et al. Management of recurrent implantation failure: British Fertility Society policy and practice guideline. *Hum Fertil (Camb)*. 2022;25(5):813-37. doi: 10.1080/14647273.2021.1905886.
20. Moffett A, Chazara O, Colucci F, Johnson MH. Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(6):763-9. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.08.019.
21. Nardo LG, El-Toukhy T, Stewart J, Balen AH, Potdar N. British Fertility Society Policy and Practice Committee: adjuvants in IVF: evidence for good clinical practice. *Hum Fertil (Camb)*. 2015;18(1):2-15. doi: 10.3109/14647273.2015.985454.
22. Obidniak D, Gzgyan A, Dzhemlikhanova L, Feoktistov A. Effect of colony-stimulating growth factor on outcome of frozen-thawed embryo transfer in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2016;106:134-5.
23. Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med*. 2004;200(8):951-5. doi: 10.1084/jem.20041783.
24. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM, et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 1999;14(9):2386-91. doi: 10.1093/humrep/14.9.2386.
25. Rahmati M, Petitbarat M, Dubanchet S, Bensussan A, Chaouat G, Ledee N. Granulocyte-Colony Stimulating Factor related pathways tested on an endometrial ex-vivo model. *PLoS One*. 2014;9(9):e102286. doi: 10.1371/journal.pone.0102286.
26. Richman S, Naftolin F. Evolution of the Mammalian Reproductive Tract and Placentation. In: Mor G, (eds) *Immunology of Pregnancy*. Medical Intelligence Unit. Springer, New York, NY; 2006. https://doi.org/10.1007/0-387-34944-8_1.
27. Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood*. 2002;100(7):2562-71. doi: 10.1182/blood-2001-12-0291.
28. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-10. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x.
29. Davari-Tanha F, Shahrokh Tehrani-najad E, Ghazi M, Shahrazi Z. The role of G-CSF in recurrent implantation failure: A randomized double blind placebo control trial. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(12):737-42.
30. Shaulov T, Sierra S, Sylvestre C. Recurrent implantation failure in IVF: A Canadian Fertility and Andrology Society Clinical Practice Guideline. *Reprod Biomed Online*. 2020;41(5):819-33. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.08.007.
31. Singh R, Singh M, Jindal A, Jindal PC. A prospective randomized controlled study (RCT) of intrauterine administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) before embryo-transfer on resistant thin endometrium in IVF cycles. *Hum Reprod*. 2015;30:280.
32. Tanaka T, Miyama M, Masuda M, Mizuno K, Sakamoto T, Umesaki N, et al. Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol*. 2000;14(6):399-404. doi: 10.3109/09513590009167710.
33. Wang C, Guan D, Li Z, Yang Y, Yang K. Emerging trends and frontier research on recurrent implantation failure: a bibliometric analysis. *Ann Transl Med*. 2022;10(6):307. doi: 10.21037/atm-22-703.
34. Würfel W. Approaches to a better implantation. *J Assist Reprod Genet*, 2000;17:473.
35. Yang X, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Ovarian and endometrial immunity during the ovarian cycle. *J Reprod Immunol*. 2019;133:7-14. doi: 10.1016/j.jri.2019.04.001.
36. Yano N, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H, Rifai A. Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Hum Immunol*. 1996;49(1):64-70. doi: 10.1016/0198-8859(96)00057-2.

Стаття надійшла до редакції 16.12.2022. – Дата першого рішення 22.12.2022. – Стаття подана до друку 19.01.2023