

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Üld-ja molekulaarpatoloogia instituut

AUTOANTIKEHADE TÄHENDUS
ENDOMEETRIUMI FUNKTSIOONI HÄIRETEST
TINGITUD NAISEPOOLSES VILJATUSES

AILI SARAPIK

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendajad: Kadri Haller, M.D., Ph.D.

Professor Raivo Uibo, M.D., Ph.D.

TARTU 2007

SISUKORD

1. KASUTATUD LÜHENDID	4
2. SISSEJUHATUS	7
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	9
3.1. Viljatus ja selle naisepoolsed põhjused	9
3.2. Autoimmuunsed protsessid	11
3.2.1. Ülevaade autoimmuunsetest protsessidest naisepoolses viljatuses	11
3.2.2. Endomeetriumi vastased antikehad	14
3.3. Endometrioos	15
3.3.1. Endometrioosi kliiniline pilt ja diagnoosimine	15
3.3.2. Endometrioosi patogeneesi mehhanismid	16
3.3.3. Endometrioosi ravi	19
3.4. Tubaarne infertiilsus	20
3.4.1. Tubaarse infertiilsuse etiopatogenees	20
3.4.2. Tubaarse infertiilsuse diagnoosimine ja ravi	21
3.5. Viljatuse ravi	21
3.5.1. Üldpõhimõtted	21
3.5.2. Kehaväline viljastamine	22
4. TÖÖ EESMÄRGID	24
5. MATERJALID JA METOODIKA	25
5.1. Uuritavad isikud	25
5.2. Kaudne immunofluorestsentsmeetod	25
5.3. Ensüümikaudne immunosorptsioonimeetod	26
5.4. Endomeetriumi koest homogenaadi valmistamine immunoblotmeetodil kasutamiseks	27
5.5. Valgu kontsentratsiooni määramine endomeetriumi koe homogenaadis	28
5.6. SDS-PAGE ja immunoblotanalüüs	29
5.6.1. Anti-endometriaalsete antikehade detekteerimine	29
5.6.2. Anti-endometriaalsete antikehade võimalike märklaudvalkude detekteerimine	31
5.7. Statistiline analüüs	31
6. TULEMUSED	32
6.1. Ülevaade erinevustest üldautoantikehade esinemissageduses patsientide	32

gruppide vahel	
6.2. Anti-endometriaalsed autoantikehad ja nende erinev esinemissagedus	32
patsientide gruppide vahel	
6.3. Seosed IgG tüüpi üldautoantikehade ning anti-endometriaalsete IgG ja	36
IgA tüüpi antikehade esinemise vahel	
6.4. Seosed autoantikehade ja IVF ravitulemuste vahel	40
6.5. Anti-endometriaalsete antikehade võimalikud märklaudvalgud	42
7. ARUTELU	45
7.1. Autoantikehade vahelised seosed endometrioosi ja tubaarse viljatusega	45
patsientidel	
7.2. Anti-endometriaalsete autoantikehade võimalikust tähendusest IVF ravi	50
korral	
8. KOKKUVÕTE	55
9. SUMMARY	56
10. TÄNUAVALDUSED	57
11. KASUTATUD KIRJANDUS	58
12. LISA	68

1. KASUTATUD LÜHENDID

α_2 -HSG	α_2 -Hermans Schmidt glükoproteiin
ACA	Kardioliiniivastased antikehad (<i>Anti-cardiolipin antibodies</i>)
AEA	Endomeetriumi vastased antikehad (<i>Anti-endometrial antibodies</i>)
AMA	Mitokondrite vastased antikehad (<i>Anti-mitochondrial antibodies</i>)
ANA-H	Tuumavastased antikehad inimese HEp-2 rakuliinil (<i>Anti-nuclear antibodies detected on human antigen</i>)
ANA-R	Tuumavastased antikehad närilise maksa-neeru-mao preparaadil (<i>Anti-nuclear antibodies detected on rodent antigen</i>)
AOA	Ovaariumi vastased antikehad (<i>Anti-ovarian antibodies</i>)
AP	Alkaalne fosfataas (<i>Alkaline phosphatase</i>)
APA	Anti-fosfolipiidsed antikehad (<i>Anti-phospholipid antibodies</i>)
ASA	Spermatooside vastased antikehad (<i>Anti-sperm antibodies</i>)
ASRM	(<i>American Society for Reproductive Medicine</i>)
β_2 -GPI	β_2 -glükoproteiin I vastased antikehad (<i>Antibodies against β_2-glycoprotein I</i>)
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat
BBS	Boraatpuhver (<i>Boric buffer saline</i>)
CI	Usaldusvahemik (<i>Confidence interval</i>)
COX	Tsüklooksügenaas (<i>Cyclo-oxygenase</i>)
DTT	1,4-ditio-DL-treitool
EBAF	Emaka verejooksudega seotud faktor (<i>Endometrial bleeding associated factor</i>)
EDTA	Etüleendiamiin tetraatsetaat (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EIÜ	Ensüümi immunoloogiline ühik
ELISA	Ensüümikaudne immunosorptsioonimeetod (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ENO1	α -enolaasi vastane polükloonaalne antikeha
ESHRE	(<i>European Society for Human Reproduction & Embryology</i>)
FITC	Fluorestseiniisotiotsüanaat (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FSH	Folliikuleid stimuleeriv hormoon
GP130	Glükoproteiin 130
HEp-2	HEp-2 rakuliin (<i>Human epitheliod cell line: type 2</i>)

HLA	Inimese leukotsüüdi antigeen (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HRP	Mädarõika peroksüdaas (<i>Horse radish peroxidase</i>)
HSP	Kuumašoki valgud (<i>Heat shock proteins</i>)
ICSI	Seemneraku intratsütoplasmaatiline injektsioon (<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>)
Ig	Immunoglobuliin
IGFBP	Insuliini sarnast kasvufaktorit siduv proteiin (<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>)
IIF	Kaudne immunofluorestsentsmeetod (<i>Indirect immunofluorescence</i>)
IL	Interleukiin
IFN	Interferoon
IVF	Kehaväline viljastamine (<i>In vitro fertilization</i>)
kOR	Kohandatud šansside suhe (<i>Odds ratio</i>)
LH	Luteiniseeriv hormoon
MMP	Maatriks metalloproteinaas
NBT	Nitrosinine tetrasooliumkloriid
NK	Loomulik tapjarakk (<i>Natural killer cell</i>)
OD	Optiline tihedus (<i>Optical density</i>)
OR	Šansside suhe (<i>Odds ratio</i>)
PAPP-A	Rasedusega seotud platsenta proteiin A (<i>Pregnancy associated placental protein A</i>)
PBS	Fosfaatpuhverdatud soolalahus (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCOS	Polütsüstiliste ovaariumide sündroom (<i>Polycystic ovary syndrome</i>)
PID	Väikese vaagna põletikuline haigus (<i>Pelvic inflammatory disease</i>)
p-Npp	Para-nitrofenüülfosfaat (<i>Para-nitrophenyl phosphate</i>)
POF	Enneaegne ovariaalne puudulikkus (<i>Premature ovarian failure</i>)
PP14	Platsenta proteiin 14
PVDF	Polüvinülideen-fluoriid
PVP	Polüvinüülpürrolidoon
SD	Standardhälve (<i>Standard deviation</i>)
SDS	Naatrium-dodetsüülsulfaat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees
SMA	Silelihaskoe vastased antikehad (<i>Smooth muscle antibodies</i>)
STD	Sugulisel teel levivad haigused (<i>Sexually transmitted diseases</i>)

TGF	Transformeeriv kasvufaktor (Transforming growth factor)
TIMP	Metalloproteinaaside koe inhibiitor (<i>Tissue inhibitor metalloproteinase</i>)
TMA	Kilpnäärme mikrosoomide vastased antikehad (<i>Thyroid microsomal antibodies</i>)
TNF	Tuumornekroosifaktor
TRIS	2-amino-2-(hüdrosümetüül)propaan-1,3-diool
VEGF	Veresoonte endoteeli kasvufaktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Maailma Tervishoiuorganisatsioon (<i>World Health Organization</i>)

2. SISSEJUHATUS

Reproduktiivse funktsiooni puudulikkus - võimetus rasestuda või rasedust lõpuni kanda - kujutab endast üha kasvavat meditsiinilist probleemi. Arvatakse, et umbes 15% paaridest kannatab selle all (Crosignani ja Rubin, 1996), millest lähtuvalt oletatakse, et Eestis on viljatuid paare ca 15 000. Pooltel juhtudel on viljatuse põhjus naisepoolne, olles põhjustatud kas endokriinsetest häiretest, seksuaalsel teel ülekantavate infektsioonide tüsistustest, suguorganite anatoomilistest kõrvalekalletest, häiretest immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismides või muudest faktoritest (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

Erinevate viljatuse põhjustega võib kaasneda autoimmuunne aktivatsioon, sealhulgas suurenenud autoantikehade produktsioon. Neil patsientidel on kirjeldatud endomeetriumi, munasarja koe ning teiste organ-spetsiifiliste ja organ-mitte-spetsiifiliste autoantikehade esinemist seerumis ja emakakaela sekreedis, mis on seotud viljatusega erinevatel tasemetel. Nihked immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismides võivad läbi hüpotalamuse-hüpofüüsi-ovariaalse süsteemi avaldada mõju patsiendi neuroendokriinsele süsteemile või suguorganitele. Munasarjade vastased autoantikehad võivad neis põhjustada autoimmuunset põletikku ja mõjutada seeläbi follikulogeneesi ja/või ovulatsiooni. Lisaks võivad autoantikehad kinnituda endomeetriumile, emaka veresoonte endoteelile või ladestuda immunokompleksidena, avaldades mõju emaka limaskestale ja embrüo implantatsioonile (ülevaade Geva jt., 1997a; Van Voorhis ja Stovall, 1997). Naise organismis leiduvad spermatoosidide vastased antikehad võivad takistada seemnerakkude liikuvust, häirida akrosomaalreaktsiooni ja langetada niiviisi nende viljastamisvõimet (Koide jt., 2000).

Endomeetriumi koe vastaste antikehade esinemist peetakse iseloomulikuks eelkõige endometrioosigaistele, mõjutades neil endomeetriumi küpsemist ning embrüo implantatsiooni ja arengut (ülevaade Van Voorhis ja Stovall, 1997). Erinevalt teistest naisepoolsetest viljatuse põhjustest, peetakse tubaarse viljatuse korral primaarseks infertiilsuse põhjuseks munajuhade kahjustust. Samas võib munajuhade kahjustus omada lokaalset immunomodulatoorset toimet emaka limaskestale ning mõjutada seeläbi naise rasestumisvõimet (Edi-Osagie jt., 2004).

Et paremini mõista endometrioosi ja munajuhade kahjustuse ning nende haigustega kaasneda võiva viljatuse patogeneesi mehhanisme ja muuta sellest tulenevalt edaspidist ravi efektiivsemaks, tuleb täpsemalt uurida neil patsientidel

esinevaid autoimmuunseid häireid ja autoantikehi ning nende autoantikehade seoseid viljatuse ravi tulemustega.

Käesolev magistritöö valmis Tartu Ülikooli Üld- ja molekulaarpatoloogia instituudis immunoloogia õppetoolis ning oli jätkuks viljatusega seotud immuunsüsteemi häirete uurimisvaldkonnale, millega on meie töögrupis tegeletud juba 1990. aastatest alates. Varasemates projektides on koostööpartneriteks olnud androloogid ja kolleegid Tartu Ülikooli arstiteaduskonna Ginekoloogia ja sünnitusabi õppetoolist, Sheffieldi Ülikoolist (Ühendkuningriigid), Tampere Ülikoolist (Soome), Henri Poincaré Ülikoolist (Prantsusmaa) ja Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudist. Minu magistritöö valmis koostöös Nova Vita Kliiniku – Lastetuse ravi ja meditsiinigeneetiliste uuringute keskusega. Käesoleva aasta kevadel kaitses meie töögrupis Kadri Haller samas valdkonnas ka doktoritöö.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Viljatus ja selle naisepoolsed põhjused

Definitsiooni kohaselt on viljatus olukord, kus vähemalt 12 kuud kestnud regulaarse suguelu kestel rasestumisvastaseid vahendeid kasutamata, pole tekkinud rasedust (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Lastetusega võivad kokku puutuda umbes 15% paaridest. Viljatus võib 1/3 juhtudel olla kas ainult naisepoolne, 1/3-l ainult mehepoolne või siis 1/3-l mõlemapoolne. Umbes 15%-l jääb viljatuse põhjus aga selgusetuks. Tihtipeale võib ühel partneritest esineda viljakuse langust, mis ei pruugi aga kokkuvõttes viia paari viljatuseeni (Forti ja Krausz, 1998).

Naisepoolses viljakuses on oluline koht hüpotaalamuse-hüpofüüsi-ovariaalse süsteemi koordineeritud regulatsioonil (ülevaade The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Anovulatoorseid menstruaaltsükleid võivad põhjustada häired hormonaalses tasakaalus, mis vastavalt gonadotropiinide tasemele jaotatakse: hüper- või hüpogonadotroopne hüpogonadism ning normogonadotroopne anovulatsioon. Hüpergonadotroopse hüpogonadismi puhul on suurenenud folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja luteiniseeriva hormooni (LH) tase, mis võib tuleneda munarakkude vähenenud hulgast munasarjas või viimase resistentsusest gonadotropiinidele näiteks nende retseptori defekti tõttu. Üheks hüpergonadotroopse hüpogonadismi näiteks on enneaegne ovariaalne puudulikkus (POF – *premature ovarian failure*), mida iseloomustab sekundaarne amenorröa ja kõrgeenenud gonadotropiinide tase alla 40-aastastel naistel. POF esineb 1-2%-l üldpopulatsiooni naistel ning võib olla tingitud mitmetest asjaoludest: munasarjakoe vastastest autoimmuunsetest reaktsioonidest; iatrogenestest põhjustest; süsteemsetest haigustest (galaktoseemia) või geneetilistest faktoritest (X-kromosoomi arvulised ja struktuursed kõrvalekalded, autosomaalsete geenide mutatsioonid) (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

Hüpogonadotroopse hüpogonadismi korral on FSH ja LH sekretsioon vähenenud, mis võib olla põhjustatud näiteks kehakaalu alanemisest. Gonadotropiinide vähenenud sekretsioon on iseloomulik Kallmanni sündroomile, mille korral esineb primaarne amenorröa ja puberteedia hiline mine. Hüperprolaktineemiaga patsientidel, kellest peaaegu pooltel leitakse hüpofüüsi kasvajaid, on samuti kirjeldatud gonadotropiinide alanenud taset (ülevaade The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Kuna prolaktiin suurendab antikehade tootmist (Gleicher, 1998), võivad ovulatsiooni

ning tõenäoliselt ka implantatsiooni mõjutada siinkohal lisaks hormoonspetsiifilistele ka immunoloogilised protsessid (ülevaade The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

Keskeltläbi poole endokriinsete häiretega viljatutest patsientidest moodustab normogonadotroopse anovulatsiooni grupp, kuhu kuuluvad eelkõige adrenaalse hüperandrogenismiga ja polütsüstiliste ovaariumide sündroomiga (PCOS - *polycystic ovary syndrome*) patsiendid (ülevaade The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). PCOS on fenotüübiliselt suuresti varieeruv haigus ja esineb ülemaailmselt ühel 15 naisest. PCOS-le on iseloomulikud hüperandrogenism, oligo-anovulatsioon, polütsüstilised ovaariumid ja insuliinresistentsus. Viimane on riskifaktoriks II tüüpi diabeedile ning võib viia hüperinsulineemiani, mis koos hüperandrogeneemiaga võivad põhjustada follikulogeneesi häireid ja olla seotud raseduste katkemistega. Haiguse etioloogias on veel palju ebaselget, kuid mitmed uuringud viitavad pärilikule komponendile (Norman jt., 2007).

Geneetilistest põhjustest on naisepoolses viljatuses olulisemad kromosomaalsed anomaaliad (Turneri sündroom - 45, X0; Swyer sündroom – 46, XY), kõrvalekaldeid androgeenide sünteesis ja nende insensitiivsussündroomid; samuti muud häired, mis põhjustavad reproduktsooniks vajalike organite vääramendeid. Emaka anatoomilistest kõrvalekalletest, mida esineb vähem kui 5%-l üldpopulatsioonist, on viljatuse patogeneesi seisukohalt olulisemad submukoossed müoomid ja emakasisesed liited (ülevaated The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

Endometrioos on krooniline põletikuline haigus, mille esinemissagedus reproduktiivses eas naiste seas on 10-20% (Wheeler, 1989; Goldman ja Cramer, 1990). Põhilisteks endometrioosi sümptomiteks on valulik menstruatsioon (düsmenorröa), valulik seksuaalvahekord (düspareunia), kroonilised valud väikevaagnas ja viljatus (Murphy, 2004). Enamasti leitakse endometrioosi koldeid väikevaagna kõhukelmel (>90%) (Redwine, 1999). Haiguse diagnoosimisel on põhiliseks meetodiks kollete visualiseerimine laparoskoopial (Murphy, 2004).

Sagedasemateks sugulisel teel levivateks haigusteks (STD – *sexually transmitted diseases*) on *Chlamydia trachomatis*'e ja *Neisseria gonorrhoeae* infektsioonid, mis 25-50%-l koeksisteerivad. Klamüüdia vastaseid antikehi on leitud 20-40%-l seksuaalselt aktiivsetel naistel (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Vastupidiselt lääneriikidele, kus STD juhtumite arv on vähenenud, kasvas Eestis 1990. aastate alguses oluliselt suguhaigustesse esmashaigestunute arv (Uusküla jt., 1997). Sugulisel teel levivate haiguste üheks võimalikuks tüsistuseks on väikese vaagna põletikuline

haigus (PID – *pelvic inflammatory disease*) (Land ja Evers, 2002), millesse haigestub igal aastal ülemaailmselt 1-2% seksuaalselt aktiivsetest naistest (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Korduv PID võib viia munajuhade kahjustuseni ja seeläbi viljatuseeni (Land ja Evers, 2002). Akuutse PID järgne viljatuse esinemine võib varieeruda 6-st kuni 60%-ni, sõltudes mitmesugustest faktoritest (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

3.2. Autoimmuunsed protsessid

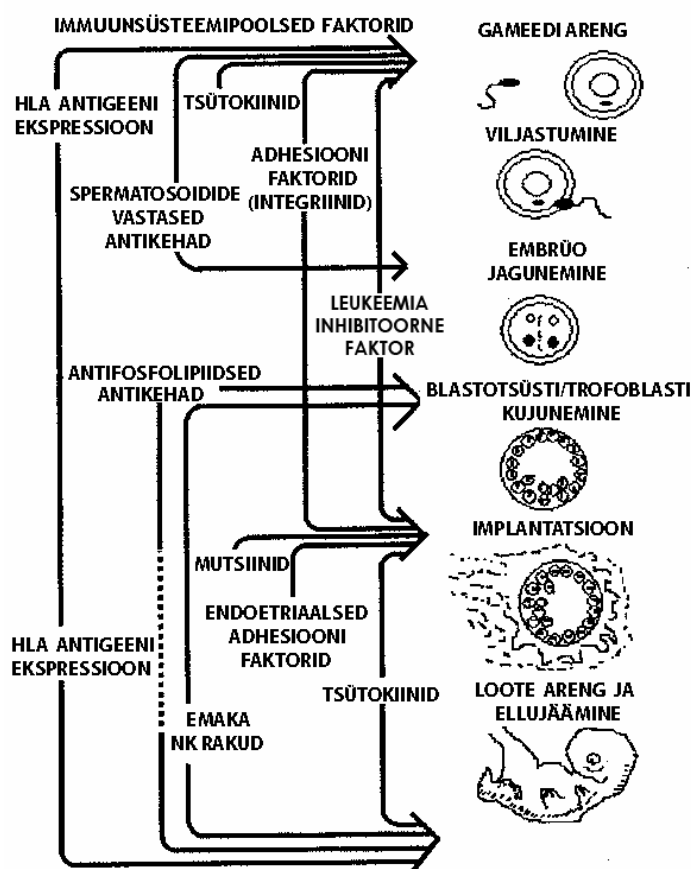
Immuuntolerantsuse häirumisel võivad perifeersesse ringlusesse sattuda autoagressiivsed lümfoidsed rakud, mis reageerides organismi enda antigeenidega põhjustavad neil patsientidel autoimmuunset põletikku. Viimase kujunemine võib olla seotud endokriinsete mehhanismidega. Suguhormoonide roll autoimmuunsete haiguste patogeneesis avaldub nende võime läbi autoimmuunseid protsesse nii inhibeerida kui ka aktiveerida (Beagley ja Gockel, 2003). Näiteks östrogeeni aktiveerivat toimet nimetatud protsessidele peetakse üheks põhjuseks, miks naissugu on võrreldes meessooga vastuvõtlikum autoimmuunsetele haigustele (Geva jt., 1997a; The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Geneetilistest faktoritest on autoimmuunsete haiguste kujunemisel olulised seosed inimese leukotsüüdi antigeeni (HLA - *human leukocyte antigen*) koesobivusklassi alleelidega (ülevaade Ishii jt., 2003). Siinkohal võivad osaleda ka keskkonna faktorid, mis võivad läbi epigeneetiliste mehhanismide muuta autoimmuunsuse kujunemisel oluliste geenide ekspressiooni (Richardson, 2007). Geneetilise eelsoodumusega patsientidel võivad autoimmuunsuse kujunemisele kaasa aidata ka mikroorganismidega seotud põletikulised protsessid, näiteks läbi molekulaarse mimikri autoantigeeni ja väliskeskkonnast tulnud mikrobiaalse antigeeni vahel. Nii võivad näiteks klamüüdia ja inimese kuumašoki valkude (HSP - *heat shock proteins*) aminohappelise järjestuse homoloogia tõttu eelnevalt mikroobi HSP suhtes sensibiliseerunud lümfotsüüdid aktiveeruda ka inimese endogeense HSP ekspresseerumisel ning tekitada seeläbi autoimmuunset põletikku (Neuer jt., 2000).

3.2.1. Ülevaade autoimmuunsetest protsessidest naisepoolses viljatuses

Mitmete autoimmuunhaiguste puhul (süsteemne erütematoosne luupus, reumatoidartriit, suhkurtõbi, kilpnäärme haigused) on neil patsientidel täheldatud

viljakuse langust (ülevaade Gleicher jt., 2002). Samas on mitmete günekoloogiliste haiguste (endometrioos, POF, PCOS), seletamatu infertiilsuse, korduvate raseduste katkemiste ja kehavälise viljastamise (IVF - *in vitro fertilization*) ebaõnnestumiste korral täheldatud kõrvalekaldeid immuunsüsteemi regulatsioonis (Gleicher, 1998; Choudhury ja Knapp, 2000). Illustreerivalt on immuunsüsteemi komponentide interaktsioone raseduse ajal kujutatud joonisel 1 (Choudhury ja Knapp, 2000).

Joonis 1. Immuunsüsteemipoolsed faktorid ja nende interaktsioonid raseduse ajal (Choudhury ja Knapp, 2000).



Seletamatu viljatuse ja korduvate raseduste katkemiste korral on neil patsientidel täheldatud polüklonaalset B-rakkude aktivatsiooni, andes alust oletusele, et sellest tulenev autoantikehade suurenunud kontsentratsioon võiks olla seotud viljatusega (Gleicher jt., 1989). On uuritud mitmeid antikehi erinevate meetoditega, kuid saadud tulemused ei ole üksüheselt kokkulangevad (ülevaated Geva jt., 1997a; Van Voorhis ja Stovall, 1997). Tabel 1 kajastab autoantikehade esinemise seoseid erinevate günekoloogiliste haiguste ja viljatuse põhjuste vahel. Organ-mittespetsiifiliste ja eriti antifosfolipiidsete antikehade (APA - *anti-phospholipid antibodies*) esinemist on põhiliselt seostatud implantatsiooni häiretest tingitud korduvate raseduste katkemistega.

Platsenta veresoonte epiteeli kahjustavat toimet on näidatud nii kardiolipiini (ACA - *anti-cardiolipin antibodies*) kui ka selle kofaktori β 2-glükoproteiin I (β 2-GPI) vastaste antikehade puhul (Geva jt., 1997a; Choudhury ja Knapp, 2000). Ka korduvate IVF ebaõnnestumiste ja varajaste raseduste katkemise korral peetakse põhiliseks põhjuseks implantatsiooni häireid ning neil patsientidel on samuti näidatud APA esinemist (Geva jt., 1997a; Stern jt., 1998). Lisaks on kirjanduse andmeil APA esinemist seostatud endometrioosi ja seletamatu infertiilsusega (ülevaated Geva jt., 1997a; Van Voorhis jt.1997).

Tabel 1. Autoantikehade esinemise seosed erinevate günekoloogiliste haiguste ja viljatuse põhjustega

	APA	Kilpnäärme vastased antikehad	ANA	AOA	SMA	AEA
Endometrioos	X		X	X	X	X
Tubaarne infertiilsus			X		X	X
PCOS		X		X	X	
POF		X		X		
Seletamatu infertiilsus	X			X	X	X
Implantatsiooni häired/ raseduse katkemised*	X	X	X	X		X

* varajased ja korduvad raseduse katkemised, korduvad IVF ebaõnnestumised

Lisaks leitakse raseduste katkemise korral ka kilpnäärme- ja tuumavastaseid antikehi (ANA - *anti-nuclear antibodies*) (ülevaated Geva jt., 1997a). Kilpnäärme vastaseid antikehi on detekteeritud ka POF (Novosad jt., 2003) ja PCOS korral (Janssen jt., 2004). Need antikehad võivad osaleda ema ja loote vahelises immunoloogilises dialoogis või olla markeriks immuunsüsteemi üldistele häiretele (Mecacci jt., 2000). Ka ANA korral on diskuteeritud neist kui „markereist“, mis viitab teiste autoantikehade esinemisele (diskuteeritud Geva jt., 1997a), kuid kuna nad võivad kahjustada embrüot ja seonduda otse trofoblastile, on arutletud nende rolli üle implantatsiooni häirete puhul (Kikuchi jt., 2003). Oluliselt sagedamini on ANA leitud endometrioosiga patsientidel (Van Voorhis ja Stovall, 1997), tubaarse infertiilsusega patsientidel ja korduvate IVF protseduuride ebaõnnestumiste korral (Stern jt., 1998).

Anti-ovariaalseid antikehi (AOA) on seostatud raseduste katkemisega POF, endometrioosi, PCOS ja seletamatu viljatusega patsientidel (Geva jt., 1997a; Luborsky,

2002). AOA võivad olla suunatud steroide produtseerivate rakkude, gonadotropiinide ja nende retseptorite, kollaskeha, *zona pellucida* ja munaraku enda vastu ning olla otseselt seotud viljatuse patogeneesiga (Monnier-Barbarino jt., 2005; Haller jt., 2005; 2007).

Kõrgeenenud silelihaskoe vastaste antikehade (SMA - *smooth muscle antibodies*) taset on leitud endometrioosi, seletamatu- ja tubaarse infertiilsusega ning PCOS patsientidel (ülevaade Van Voorhis ja Stovall, 1997; Reimand jt., 2001). Need antikehad on eelkõige krooniliste viiruslike infektsioonide korral toodetud autoantikehad (Gregorio jt., 2003), mis võivad häirida munajuhade funktsiooni (Geva jt., 1997a).

Viljatutel naistel on lisaks leitud ka spermatoosidide vastaste antikehade (ASA) esinemist (Koide jt., 2000). Naise organismis võivad ASA põhjustada seemnerakkude aglutinatsiooni ja neid immobiliseerida, vallandada enneaegset akrosomaalreaktsiooni või seda blokeerida, muutes spermatoosidid seeläbi viljastamisvõimetuks. Lisaks võivad nad blokeerida ka seemneraku ja munaraku interaktsioone, osaleda implantatsiooni takistamisel ja/või embrüo arengu peatamisel (ülevaated Choudhury ja Knapp, 2000; Koide jt., 2000).

Seega võivad autoimmuunsed häired olla üheks võimalikuks viljatuse põhjustajaks. Teisest küljest võib viljatus olla esimeseks viiteks autoimmuunsetele protsessidele organismis ning viljatud patsiendid võivad kannatada subkliinilise autoimmuunse haiguse all. Siinkohal leiduvad vastuolulised andmed õigustavad neil patsientidel täpsemalt uurida autoantikehade esinemist (Geva jt., 1997a; Gleicher, 2002).

3.2.2. Endomeetriumi vastased antikehad

Anti-endometriaalsete antikehade (AEA) esinemist seostatakse põhiliselt endometrioosiga (Fernández-Shaw jt., 1993), kuid neid on lisaks detekteeritud ka tubaarse ja seletamatu viljatusega patsientidel (ülevaade Choudhury ja Knapp 2000) (tabel 1). AEA esinemine võib olla seotud ovulatsiooni häirete ja munajuhade kahjustusega (Palacio jt., 1997) ning nad võivad sekkuda implantatsiooni protsessidesse. Veelgi enam, AEA esinemine on korrelatsioonis neil patsientidel esineva viljatusega (Fernández-Shaw jt., 1993), kuid siiani on täpsemalt AEA rollist viljatuse korral veel vähe teada.

Kasutades antigeenina eutoopilist või ektoopilist endometriaalset kudet, on

immunoblotmeetodil leitud immunogeenseid antigeene molaarmasside vahemikus 15-170 kDa (Mathur jt., 1995), millest siiani on molekulaarselt identifitseeritud vaid vähesed antigeenid ja nende vastased antikehad. Kaheks põhiliseks immunoblotil detekteeritavaks antigeeni molaarmassi piirkonnaks on 58-64 ja 72 kDa, mis on vastavalt α_2 -Hermans Schmidt glükoproteiin (α_2 -HSG) ja transferriin. Nendevastaseid antikehi esineb endometrioosiga haigetel oluliselt sagedamini (Pillai jt., 1996; Lang ja Yeaman, 2001). AEA reageerimine ektoopilise endomeetriumi viitab, et endometrioosi kolded võivad lisaks autoantikehade immunogeensile olla ka nende sihtmärgid (Fernández-Shaw jt., 1993).

3.3. Endometrioos

3.3.1. Endometrioosi kliiniline pilt ja diagnoosimine

Endometrioos on östrogeen-sõltuv günekoloogiline haigus, mille korral endometriaalne kude asub ka väljaspool emakat. Peaaegu pooltel juhtudel haigus progresseerub ja/või kordub ravi järgselt (D'Hooghe jt., 2004). Endometrioosi kollete sagedaseimaks asukohaks on väikevaagna peritoneum (Murphy, 2004). Vaagnavälised kolded haaravad kõige sagedamini põie ja soole seina või asuvad sügaval pärasoole ja emaka vahel ekstraperitoneaalselt (Redwine, 1999; Murphy, 2004). Põhiliseks endometrioosi vaevuseks on düsmenorröa, mis ei allu mittesteroidsetele põletikuvastastele ravimitele. Valud võivad alata enne menstruatsiooni algust ja seejärel progresseeruda või esineda ühtlaselt kogu menstruatsioonitsükli vältel (Murphy, 2004). Endometrioosi üheks vaevuseks võib olla ka düspareunia, mis võib viidata pärasoole-emakasüvendis asuvatele endometrioosi kolletele (Leng jt., 2007). Lisaks on sagedaseks kaebuseks infertiilsus, mida esineb 30-50%-l endometrioosiga patsientidel (Burns ja Schenken, 1999).

Endometrioosi diagnoosimisel on probleemiks kaebuste mittespetsiifilisus, varieeruvus ja mittevastavus haiguse raskusastmetele ning mitteinvasiivse diagnoosimise viisi puudumine (Murphy, 2004). Endometrioosi esinemisele võivad küll viidata ultraheli või magnetresonantstomograafia leiud (Murphy, 2004), lisaks on pakutud ka mitmeid laboratoorseid teste (Kyama jt., 2003), kuid praeguse ajani on endometrioosi diagnoosimiseks siiski vajalik kollete visualiseerimine laparoskoopial. Kollete ja esineda võivate liidete asukoha ning hulga alusel eristatakse vastavalt

American Society for Reproductive Medicine (ASRM) poolt kinnitatud endometrioosi diagnostika kriteeriumitele neli raskusastet: minimaalne, kerge, mõõdukas või raske (ASRM, 1997).

3.3.2. Endometrioosi patogeneesi mehhanismid

Endometrioos on polügeenne multifaktoriaalne haigus (D'Hooghe jt., 2004). Läbi aegade on välja pakutud kaks põhilist endometrioosi tekketeooriat - implantatsiooni ja metaplaasia teooria - ning tõenäoliselt omavad haiguse tekkel rolli mõlemad mehhanismid (Murphy, 2004). Esimese teooria kohaselt kantakse retrograadse menstruatsiooniga kõhuõõnde endometriaalseid rakke, mis on võimelised kinnituma peritoneumile ja reageerima hormonaalsele regulatsioonile. Kuna retrograadne menstruatsioon on küllaltki sage nähtus, esinedes 76-90%-l naistest (D'Hooghe jt., 2004), endometrioos aga kujuneb vaid 10-20%-l reproduktiivses eas naistest (Wheeler, 1989; Goldman ja Cramer, 1990), peavad haiguse kujunemisele kaasa aitama ka teised faktorid (D'Hooghe jt., 2004). Teise tekketeooria kohaselt kujuneb endometrioosi kolle läbi tsöloomi metaplaasia. Sellele viitavad uurimustulemused, kus peritoneum või mesoteel on võimelised östrogeeni toimel diferentseeruma endomeetriumi sarnaseks koeks (Suginami, 1991; Murphy, 2004). Metaplaasia teooria võimaldab seletada endometrioosi esinemist kõhuõõnest väljaspool ja hormoonteraapiat saavatel meestel (Suginami, 1991).

Mõlemad tekketeooriad hõlmavad immuunsüsteemi häireid (Vinatier jt., 1996). Immuunsüsteemi nõrgenenud reaktiivsus retrograadse menstruatsiooniga kõhuõõnde kantud endomeetriumi rakkude ja sinna tekkinud haiguskollete vastu on oluline komponent haiguse kujunemisel ja püsimisel (Kyama jt., 2003). Endometrioosihaigetel täheldatakse mitmeid rakulise immuunsuse kõrvalekaldeid. Neil esineva reguleerivate T-rakkude häire (Szylo jt., 2003) tulemusena on alanenud CD8⁺ T-rakkude ja loomulike tapjarakkude (NK - *natural killer cell*) funktsioon (Kyama jt., 2003). T-rakkude poolt vahendatud tsütotoksilisuse langus viitab HLA rollile endometrioosi kujunemisel. On leitud seoseid HLA DR4 alleelide [HLA-DRB1*1403 (Ishii jt., 2002) ja HLA-DQB1*0301 (Ishii jt., 2003)] ja endometrioosi haigestumise vahel. NK aktiivsuse langust endometrioosi rakkude suhtes võivad põhjustada aktiveeritud makrofaagide poolt toodetud faktorid [tuumornekroosifaktor (TNF)- β , interleukiin (IL)-12 alaühik p40, prostaglandiin E] ja immunokompleksid. Viimased võivad moodustuda

antikehade suurenenud produktsiooni tulemusena (Witz, 1999).

Endometrioosihaigetel on tõusnud B-lümfotsüütide aktiivsus, mis soodustab autoantikehade tootmist (Kyama jt., 2003). Vereseerumis ja emakakaela sekreedis leiduvad IgG ja IgA tüüpi organ-spetsiifilised ja organ-spetsiifikata antikehad on võimelised kinnituma endomeetriumi, emaka veresoonte endoteelile või ladestuma immunokompleksidena ning seeläbi mõjutama emaka limaskesta küpsemist ja embrüo implantatsiooni (Geva jt., 1997a; Burns ja Schenken, 1999). Lisaks võivad autoantikehad takistada spermatooside liikuvust ja langetada nende viljastamisvõimet (Choudhury ja Knapp, 2000). Endometrioosihaigetel on leitud autoantikehi α_2 -HSG, karboonanhüdraasi ja inimese kooriongonadotropiini glükoproteiinide vastu. Nad kõik kannavad spetsiifilist Thomsen-Friedenreichi disahhariidi epitoopi, mis endometrioosihaigetel on osaliselt muutunud. α_2 -HSG autoantikehad võivad indutseerida monotsüüte produtseerima proinflammatoorseid tsütokiine [IL-1, IL-6, interferoon (IFN)- γ , TNF- α] ning aktiveerida sellega põletiku reaktsiooni. Veelgi enam, α_2 -HSG toimib kui transformeeriva kasvufaktor β (TGF- β - *transforming growth factor* β) retseptor ja antagonist, mis kontrollib maatriksi metalloproteiinase (MMP) (MMP-2 ja -9) ekspressiooni ning on endometrioosi puhul üleekspressioonitud (diskuteeritud Lang ja Yeaman, 2001). Nii IL-1, IL-6, IFN- γ kui TGF- β soodustavad liidete tekkimist väikevaagnasse ja on seotud kaugele arenenud endometrioosi korral esineva viljatusega. Nii nende tsütokiinide kui ka suguhormoonide mõjutusel toodavad endomeetriumi rakud IL-8, mis stimuleerib endomeetriumi rakkude kasvu ja adhesiivsust (ülevaade Kyama jt., 2003) ning on ka kemoatraktandiks ja aktivaatoriks veres tsirkuleerivatele neutrofiilidele (Runesson jt., 2000).

Endometrioosi korral on peritoneaalvedelikus suurenenud põletikuline aktiivsus koos makrofaagide suurenenud aktiivsusega. Selle tagajärjel vabastatakse peritoneaalvedelikku rohkemal määral tsütokiine (IL-1, IL-6, TNF- α) ja kasvufaktoreid [TGF- β , veresoonte endoteeli kasvufaktor (VEGF- *vascular endothelial growth factor*)] (Kyama jt., 2003). IL-6 on üheks oluliseks tsütokiiniks endometrioosi patoloogias ning peale makrofaagide toodavad seda ka endoteeli rakud, fibroblastid ja endomeetriumi strooma rakud (Witz, 1999; Mahnke jt., 2000). Toimides koos teiste eespool nimetatud proinflammatoorsete tsütokiinidega, soodustab IL-6 immuunkompetentsete rakkude kasvu ja diferentseerumist. Inhibeerides endomeetriumi strooma rakkude kasvu, osaleb see endometrioosi kulu pidurdamises (Mahnke jt., 2000). Lisaks osaleb IL-6 munasarjades steroidhormoonide produktsiooni, follikulogeneesi ja implantatsiooniga

seonduvate protsesside reguleerimises (ülevaade Tsudo jt., 2000). IL-6 toimetel toodavad makrofaagid VEGF, mida östrogeeni toimetel produtseerivad ka endomeetriumi ja munasarja rakud. VEGF osaleb fibroosi moodustamises, angiogeneesis ja koevigastuste paranemises (Donnez jt., 1998; Witz, 1999). Normaalse menstruatsioonitsükli korral on VEGF tase tõusnud proliferatiivses faasis, kuid endometrioosi puhul on nii VEGF kui ka IL-6 tasemed tõusnud kogu tsükli vältel ning korreleeruvad haiguse raskusega (Witz, 1999; Mahnke jt., 2000). TNF- α stimuleerib endomeetriumi rakkude adhesiooni ja suurendab MMP ekspressiooni (Kyama jt., 2003). Metalloproteinaasid on ensüümid, mis degradeerivad ekstratsellulaarse maatriksi komponente (Halis ja Arici, 2004). Nad osalevad koos metalloproteinaaside koeinhibiitoritega (TIMP - *tissue inhibitor metalloproteinase*) angiogeneesi, endomeetriumi regeneratsiooni (Kyama jt., 2003) ja põletiku indutseerimise protsessides (Parks jt., 2004). On näidatud muutusi MMP endometriaalses ekspressiooniprofiilis endometrioosiga haigete ja tervete ning haiguse eri vormide vahel (Uzan jt., 2004). Endometriaalse koe implanteerumist ja edasist arengut soodustavad ka IL-1, ja TGF- β ning nad annavad omalt poolt panuse persisteeruva inflammatoorse keskkonna loomisel ja säilimisel (Kyama jt., 2003).

Makrofaagide hüperaktiivsus väljendub lisaks ka rakkude kiirenenud küpsemises, fagotsütoosivõime tõusus, lüsosoomaalsete ensüümide suurenenud produktsioonis ja reaktiivsete hapnikuradikaalide tootmises (Witz, 1999; Halis ja Arici, 2004). Veelgi enam, aktiveeritud makrofaagid omandavad antigeeni esitleva raku omadused, aktiveerides omakorda antigeenspetsiifilist immuunsüsteemi vastust ning autoantikehade tootmist (Witz, 1999).

Intensiivistunud põletikule viitab ka peritoneaalvedelikus suurenenud oksüdatiivne stress (D'Hooghe jt., 2004). Oksüdatiivne DNA kahjustus võib põhjustada rakuliste funktsioonide kõrvalekaldeid. Näiteks esineb endometrioosiga patsientidel apoptoosi häireid, mis võivad suurendada irdunud endomeetriumi rakkude ellujäävust ning mõjutada seega haiguse kujunemist. Häired apoptoosis viivad rakkude persisteerumiseni kudedes ja peritoneumis apoptootiliste kehakestena. Viimastes toimub autoantigeenide oksüdatiivne modifitseerimine. Oksüdatiivsed modifikatsioonid lipiid-proteiinidel on küll normaalne füsioloogiline protsess, kuid nende liig võib viia antigeensete valkude tekkeni ja seega taas suurenenud autoantikehade produktsioonini (Seery, 2006).

Peritoneaalvedelik ümbritseb ja seeläbi ka mõjutab suguorganite tööd. Põletikuliste faktorite taseme tõus peritoneaalvedelikus võib suurendada nende

kontsentratsiooni ka follikulaarvedelikus ning häirida seeläbi follikulogeneesi ja ovulatsiooni, mis omakorda vähendab munarakkude kvaliteeti (Halis ja Arici, 2004). Lisaks avaldavad peritoneaal- ja follikulaarvedelik mõju ka spermatooside funktsioonile. Kui mõõduka või raske endometrioosi korral seostatakse esineda võivat viljatust munajuhade sulgusega, liidetega kõhuõõnes või ovariaalsete endometrioomidega, siis minimaalse või kerge endometrioosi puhul ei ole need muutused nii ulatuslikud ning neil patsientidel esinevat viljakuse langust seostatakse pigem immuunsüsteemi regulatsiooni kõrvalekalletega (Burns ja Schenken 1999).

3.3.3. Endometrioosi ravi

Endometrioosi võib ravida nii medikamentoosselt kui ka kirurgiliselt. Esimese korral leevendatakse väikevaagna valusid või korrigeeritakse menstratsioonitsükli häireid, mille järel võib, kuid ei pruugi paraneda ka naise viljakus. Kuna endometrioosi koldeid mõjutavad naissuguhormoonid (östrogeen, progesteron), viib hüpofüüsi eessagarast ja munasarjadest nende hormoonide eritumise pärssimine kollete regresseerumiseni. Selleks kasutatakse steroidhormoone (danasool, medroksüprogesteron-atsetaat) ning gonadotropiini vabastajahormooni (GnRH - *Gonadotrophin Releasing Hormone*) agonistide analooge (Moghissi, 1999). Haiguse süvenedes suurenevad muutused väikevaagna anatoomias. Põhilisteks ravi eesmärkideks siinkohal on haiguskollete eemaldamine, normaalse anatoomia taastamine ja haiguse edasise progresseerumise pidurdamine kirurgilise raviga. Haiguse kirurgiline ravi võib mõõduka või raske endometrioosi korral parandada ka naise viljatust, mis haiguse selles faasis on põhiliselt seotud anatoomiliste kõrvalekalletega. Medikamentooset ja kirurgilist ravi kasutatakse ka kombineeritult. Preoperatiivne hormoonravi hõlbustab kollete eemaldamist, postoperatiivse hormoonravi ülesandeks on pidurdada eemaldamata jäänud kollete progresseerumist (The Practice Committee of the ASRM, 2004).

Efektiivse viljatuse ravimeetodina kasutatakse endometrioosi korral IVF protseduuri (The Practice Committee of the ASRM, 2004). Alati ei piisa raseduse saavutamiseks ühest ravi tsüklist, mis võib olla tingitud neil patsientidel täheldatud madalamast ovariaalsest vastusest gonadotropiinide stimulatsioonile (Al-Azemi jt., 2000), häiretest endomeetriumi küpsemises ja retseptiivsuse saavutamisel (Mettler jt., 2007) ning raseduste suurenenu katkemisest (ülevaade Geva jt., 1997a).

3.4. Tubaarne infertiilsus

Munajuhade ehk tubaarse viljatuse korral on häiritud või takistatud kas seemnerakkude ligipääs munarakuni või siis juba viljastatud munaraku liikumine munajuhast emakasse. See võib olla tingitud kirurgilisest sterilisatsioonist, PID-st, endometrioosist või muul põhjusel tekkinud munajuhasisestest või väikevaagna liitelistest protsessidest (Seracchioli jt., 1997). Tubaarse viljatuse esinemissagedus on umbes 25-35%, madalama arengutasemega riikides võib see aga ulatuda kuni 85%-ni (Land ja Evers, 2002; The Practice Committee of the ASRM, 2006a).

3.4.1. Tubaarse infertiilsuse etiopatogenees

Sagedaseks tubaarse infertiilsuse põhjustajaks on PID, mis enamasti (>90%) on tingitud kas üksikust või pigem korduvatest STD põdemistest (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Siinkohal on olulised *C.trachomatis*'e infektsioonid, mida seostatakse PID kujunemisega 30-60% juhtudel (Debattista jt., 2004). Persisteeruvale või korduva klamüüdia infektsioonile, mis üle pooltel juhtudel (70-80%) võivad olla asümptomaatilised või subkliinilised (Land ja Evers, 2002), viitavad klamüüdiavastased IgG ja IgA tüüpi antikehad patsiendi seerumis (Guaschino ja De Seta, 2000). Need antikehad võivad olla suunatud *C.trachomatis*'e HSP vastu, mis on nii klamüüdia kui ka mitmete teiste patogeensete mikroobide immunodominantseteks valkudeks ja olulised põletikulise vastuse indutseerijad nii akuutse kui ka püsiva infektsiooni korral (Guaschino ja De Seta, 2000). HSP-del on kaks põhilist rolli. Esiteks on nad molekulaarsed tšaperonid, mis osalevad intratsellulaarses transpordis, hoiavad valke inaktiivses vormis ja kaitsevad neid lagundamise eest. Teiseks toodetakse neid vastusena rakulisele stressile, mis võib olla põhjustatud temperatuuri muutusest, keskkonnas leiduvate vabade radikaalide, raskemetalli ühendite või etanooli tõttu, aga ka infektsioonide ja isheemia korral (Neuer jt., 2000). Kuna mikroobide ja inimese HSP vahel esineb tugev aminohappelise järjestuse homoloogia, võib persisteeruva või korduva infektsiooni korral pidev *C.trachomatis*'e HSP esitamine immuunsüsteemile põhjustada endogeensete HSP vastaste autoantikehade tootmist (Guaschino ja De Seta, 2000; Neuer jt., 2000; Land ja Evers, 2002). Inimese reproduktioonis on olulised HSP60 ja HSP70, mida ekspresseeritakse munajuhades, endomeetriumis, platsentas (Tabibzadeh ja Broome, 1999; Neuer jt., 2000) ning HSP60 ka arenevas embrüos

(Guaschino ja De Seta, 2000). Nende molekulide ekspressioon võib taas aktiveerida eelnevalt mikroobide HSP suhtes sensibiliseerunud lümfotsüüte ning tekitada põletikureaktsiooni. Viimase tulemusena võivad häiruda endomeetriumi küpsemiseks, embrüo arenguks, implantatsiooniks ja raseduse püsimiseks vajalikud immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismid (Neuer jt., 2000; Edi-Osagie jt., 2004).

Munajuhade põletiku tagajärjel võib tekkida hüdroosalpink, mis on munajuhade liiteliste protsesside tõttu sinna kogunenud seroosse vedeliku kogum. Hüdrosalpinksi esinemine vähendab rasedumise ja suurendab raseduste katkemise tõenäosust veelgi ning neil patsientidel on IVF ravi tulemused võrreldavad teiste lastetute paaridega, vaatamata munajuhade puudulikkusest tingitud probleemi ületamisest, viljastades munarakud kehaväliselt (Bontis ja Theodoridis, 2006). Hüdrosalpink sisaldab põletikumediaatoreid (tsütokiinid, prostaglandiinid, leukotrieenid) ja immuunsüsteemi rakke (lümfotsüüdid, makrofaagid), mis mõjutavad lokaalselt endomeetriumi talitlust ning võivad mõjuda embrüotoksiliselt. Seega, olles ise sageli põletikulise protsessi tüsistuseks, on sarnaselt endometrioosile, mille korral on iseloomulik immuunsüsteemi nii süsteemne kui ka lokaalne aktiveeritus, ka tubaarse viljatuse puhul oodata lokaalset põletikureaktsiooni. Tubaaarse viljatuse korral esinevad nihked lokaalses immuunsüsteemi regulatsioonis võivad aga luua ebasoodsad tingimused raseduse tekkeks ja püsimiseks (Seracchioli jt., 1997; Bontis ja Theodoridis, 2006).

3.4.2. Tubaaarse infertiilsuse diagnoosimine ja ravi

Munajuhade läbitavust hinnatakse hüsterosalpingograafial või laparoskoopial (Forti ja Krausz, 1998; The Practice Committee of the ASRM, 2006a). Viljatuse ravimeetodina on üldiselt kasutusel munajuhade struktuuri kirurgiline korrektsioon, kuid põhiliselt on näidustatud munajuhade eemaldamine ning soovi korral viljatuse ravi IVF-meetodil (The Practice Committee of the ASRM, 2006a).

3.5. Viljatuse ravi

3.5.1. Üldpõhimõtted

Viljatuse ravi alustatakse enamasti põhihaiguse raviga, mille tulemusena võib taastuda ka viljakus. Medikamentoosselt on võimalik korrigeerida menstruatsioonitsükli häireid: korrigeerides suukaudsete rasedumisvastaste hormoonpreparaatidega

menstruaaltsükli regulaarsust; stimuleerides gonadotropiinide manustamisega munasarja funktsiooni; stimuleerides antiöstrogeenraviga (klomifeentsitraat) ovulatoorsest puudulikkusest tingitud lastetust. Kirurgiliselt on võimalik eemaldada tubaarse infertiilsuse või endometrioosi korral esineda võivad liited, endometrioosi kolded või taastada munajuhade läbitavus (Forti ja Krausz, 1998; The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Viljatuse ravil kasutatakse ka laboratoorseid ehk abistava reproduktsiooni meetodeid (ART - *Assisted Reproduction Techniques*), kus olenevalt viljatuse raskusastmest võib kasutada intrauteriinset inseminatsiooni, IVF või seemneraku intratsütoplasmaatilist injektsiooni (ICSI - *intracytoplasmic sperm injection*) (Forti ja Krausz, 1998; The Practice Committee of the ASRM, 2006b). Kumulatiivselt ulatub enamike abistava reproduktsiooni meetodite puhul sünnituste arv 50%-ni. Mitmete protseduuride läbiviimine on aga patsientidele küllaltki kulukas. Kõige efektiivsema ravitulemuse saavutamiseks kombineeritakse erinevaid raviviise omavahel (Forti ja Krausz, 1998).

3.5.2. Kehaväline viljastamine

Kehaväline viljastamine on levinud abivahendiks viljatutele paaridele mitmete erinevate infertiilsuse põhjuste korral. Protseduuri esimeses etapis stimuleeritakse munasarjades polüfollikulogeneesi, manustades naisele eksogeenselt FSH vastavalt gonadotropiini vabastajahormooni (GnRH - *Gonadotrophin Releasing Hormone*) agonisti või antagonist protokoll järgi (Salumets jt., 2002). Kontrollitud ovariaalse hüperstimulatsiooni lõpus indutseeritakse ootsüütide lõplik küpsemine eksogeenselt inimese kooriongonadotropiini manustades ning munarakud kogutakse 36 tunni pärast transvaginaalselt (Vilska jt., 1999). Seemnerakkude kvaliteeti hinnatakse vastavalt Maailma Tervishoiuorganisatsiooni (WHO, 1999) poolt kinnitatud normidele (tabel 2). Viljastumiseks inkubeeritakse mõlemad sugurakke koos kindlaksmääratud vahekorras. Keskmiselt viljastub IVF protseduuris 60% munarakkudest (Salumets jt., 2002).

Raskema mehepoolse, teatud naisepoolsete viljatuse põhjuste (munaraku morfoloogilised kõrvalekalded, munarakkude vähesus), aga ka eelnevate IVF protseduuride ebaõnnestumise korral, kasutatakse ICSI meetodit (Forti ja Krausz, 1998; The Practice Committee of the ASRM, 2006b). Selleks valitakse munaraku viljastamiseks välja üks seemnerakk, mis süstitakse otse munaraku tsütoplasmasse. Nii IVF kui ICSI korral hinnatakse embrüote morfoloogiat ja muid parameetreid ning 2. või

3. päeval pärast viljastamist siiratakse emakasse 1 või 2 kõige kvaliteetsemat embrüot (Vilksa jt., 1999).

Tabel 2. Seemnerakkude normaalsed parameetrid (WHO, 1999)

Parameeter	Väärtus
Maht	>2ml
pH	7,2-8,0
Sperma kontsentratsioon	>20x10 ⁶ spermatooside/ml
Spermatooside arv	>40x10 ⁶ spermatooside ejakulaadis
Liikuvus	>50% mõõdukalt ning kiiresti liikuvaid seemnerakke või >25% kiiresti liikuvaid seemnerakke
Morfoloogia	>30% normaalse morfoloogiaga seemnerakke

Mitmete vastuoluliste tulemuste tõttu on diskuteeritud, kas IVF patsientidele iseloomulik autoantikehade taseme tõus seerumis võib olla üheks IVF ebaõnnestumise põhjuseks, kuna autoantikehad võivad põhjustada implantatsiooni või platsentatsiooni häireid (ülevaade Van Voorhis ja Stovall, 1997). Neil patsientidel on põhiliselt uuritud APA esinemist, mis võivad osaleda embrüo implantatsiooni häiretes (ülevaade Van Voorhis ja Stovall, 1997; Putowski jt., 2004). Sagedamini on leitud ka ANA (Stern jt., 1998; Putowski jt., 2004), SMA, ASA, kilpnäärme vastaste antikehade (Putowski jt., 2004), AOA (Monnier-Barbarino jt., 2005) ja FSH vastaste antikehade esinemist (Haller jt., 2007).

4. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

1. Määrata endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide vereseerumis esinevad IgG tüüpi organ-spetsiifilised ja organ-spetsiifikata üldautoantikehad ning IgG ja IgA tüüpi AEA.
2. Hinnata endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide seerumi IgG tüüpi üldautoantikehade ja IgG ning IgA tüüpi AEA vahelisi seoseid.
3. Hinnata AEA esinemise seoseid IVF ravitulemustega ning täpsemalt identifitseerida olulisemad AEA antigeenid.

5. MATERJALID JA METOODIKA

5.1. Uuritavad isikud

Käesolevasse töösse olid kaasatud 190 naispatsienti, kes läbisid IVF-protseduuri Nova Vita lastetuse ravi kliinikus (Viimsi, Harjumaa) ajavahemikul juuli 2004.-detsember 2006. aasta. Uurimustöö läbiviimiseks oli saadud luba Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komiteelt ning kõigilt uuritavatelt oli saadud informeeritud nõusolek. Uuritavaks materjaliks oli patsientidelt folliikulite punktsiooni päeval võetud venoossest verest eraldatud seerum. Endometrioosi diagnoosiga oli 31 patsienti [keskmine vanus $\pm$ standardhälve (SD) $33,9 \pm 4,50$ aastat], tubaarse viljatusega 159 patsienti ($33,7 \pm 4,03$ aastat). Endometrioosi diagnoos oli kinnitatud laparoskoopilise leiu alusel vastavalt ASRM nõuetele (ASRM, 1997). Tubaarne infertiilsus oli diagnoositud hüsterosalpingograafial või laparoskoopial (Forti ja Krausz, 1998). Põhiliselt oli munajuhade sulguse põhjuseks PID. Kehavälise viljastamise protseduuridest viidi 113 patsiendil läbi IVF ja 48-l ICSI. Ülejäänud 29 patsiendil jäi embrüo siirdamine ära või siirati külmutatud ja seejärel sulatatud embrüo ning neil IVF ravi tulemusi ei analüüsitud. IVF ravi tulemus loeti edukaks, kui 5.-6. embrüo siirdamise päeva järgsel nädalal teostatud ultraheli uuring kinnitas emakasisest rasedust.

5.2. Kaudne immunofluorestsentsmeetod

Et detekteerida IgG tüüpi organspetsiifilisi ja organspetsiifikata üldautoantikehi patsientide vereseerumist, kasutati kaudset immunofluorestsentsmeetodit (IIF - *indirect immunofluorescence*) erinevatel antigeensetel substraatidel. Inimese kartsinoomi (HEp-2 - *human epitheloid cell line: type 2*) rakuliinil (ImmunoConcepts®, Sacramento, CA, USA) määrati tuumavastaseid antikehi ANA-H (*anti-nuclear antibodies on human antigen*), roti neeru ja maksa koelõigul aga ANA-R (*anti-nuclear antibodies on rodent antigen*) tüüpi antikehi. Roti neeru ja maksa ning hiire mao koelõikudel määrati SMA ja mitokondrite vastaseid antikehi (AMA - *anti-mitochondrial antibodies*). Inimese kilpnäärme koelõigul detekteeriti kilpnäärme mikrosoomide vastaseid (TMA - *thyroid microsomal antibodies*) ning hiire mao koelõigul parietaalrakkude vastaseid antikehi. Koed olid külmutatud spetsiaalses viskoosses lahuses (Sakura Tissue-Tek O.C.T.TM, Compound, Holland) ning nendest lõigati krüostaadi abil (Microm HM 505N, Walldorf,

Saksamaa) 5µm lõigud, mis kanti alusklaasidele (O. Kindler GmbH, Freiburg im Breisgau, Saksamaa). Olenevalt määratava antikeha tüübist inkubeeriti koelõike seerumi erinevate lahjendustega. Madalas tiitris antikehade detekteerimiseks kasutati seerumite 1:10 lahjendust fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS - *phosphate buffered saline*: 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na₂HPO₄ • 7H₂O; 0,24 g/l KH₂PO₄; pH 7,2). Kõrges tiitris antikehade määramiseks kasutati seerumite 1:100 lahjendust PBS-is. Detekteerimaks ANA-H kasutati seerumite 1:40 lahjendust PBS-is. Inkubatsioonid nii seerumitega kui ka sellele järgnevalt sekundaarse antikehaga kestsid 30 minutit toatemperatuuril ning inkubatsioonide lõppedes pesti koelõike 2x10 minutit PBS-is. Sekundaarseks antikehaks oli fluorestseiniisotiotsüanaadiga (FITC) konjugeeritud küüliku inimese-IgG vastase antikeha (DAKO, Glostrup, Taani) 1:40 lahjendus PBS-is. Seejärel kaeti alusklaasid katteklaasidega. Preparaati ergastati UV kiirgusega ning emiteeritavat valgust detekteeriti fluorestsentsmikroskoobi (Olympus BX50F4, Tokyo Jaapan) abil nähtava rohelise valguse lainepikkusel. Igal eksperimendil kasutati kontrolliks uuritava autoantikeha suhtes positiivset ja negatiivset kontrollseerumit. Testi tulemus väljendati antikehade esinemise suhtes negatiivse või positiivsena madalas või kõrges tiitris.

5.3. Ensüümikaudne immunosorptsioonimeetod

Ensüümikaudsel immunosorptsioonimeetodil (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) määrati IgG tüüpi β2-GPI ja ACA vastaseid autoantikehi. Igal eksperimendil kasutati kontrolliks uuritava autoantikeha suhtes positiivset ja negatiivset kontrollseerumit. β2-GPI vastaste antikehade määramiseks kasutati 5 µg/ml antigeeni (Crystal Chem, Chicago, IL, USA) lahust boraatpuhveris (BBS - *boric buffer saline*: 0,2M H₃BO₃; 0,075M NaCl; pH 8,4). Üheksakümne kuue mikroküvetiga plaadid (Nunc Maxi Sorp, Roskilde, Taani) kaeti 50 µl antigeeni lahusega ning inkubeeriti üleöö 4°C juures. Inkubatsioonide ja blokeerimise vahel pesti plaati 4 korda pesulahusega (0,1% Tween-20; BBS). Kaevukesi blokeeriti 100 µl BBS-albumiini lahusega [0,5% albumiin (Fluka Chemie, Buchs, Šveits); 0,4% Tween-20; BBS] 1,5 tundi 20°C juures. Järgnes inkubatsioon seerumite 1:100 lahjendusega BBS-albumiini lahuses. Igasse mikroküveti kanti 100 µl seerumi lahjendust ning inkubatsioon kestis 2 tundi 20°C juures. Järgnevalt kaeti mikroküvetid 100 µl sekundaarse antikeha lahusega. Selleks kasutati alkaalse fosfataasiga (AP - *alkaline phosphatase*) märgistatud küüliku inimese-IgG vastase

antikeha (DAKO, Glostrup, Taani) 1:1000 lahjendust BBS-albumiini lahuses. Inkubatsioon kestis 1 tund 20°C juures. Järgnevalt kanti mikroküvettesse 100 µl substraadi lahust, milleks oli 1 g/l p-nitrofenüül fosfaat dissoodiumi (p-NPP - *para-nitrophenyl phosphate*, Serva, Heidelberg, Saksamaa) lahus 1 M dietanoolamiinpuhvril (9,7% C₄H₁₁NO₂; 0,01% MgCl₂·6H₂O; 0,02% NaN₃; pH 9,8) ja inkubeeriti 45 minutit 37°C juures. Värvusreaktsiooni mikroküvettes mõõdeti Labsystems Multiscan MCC/340 (Helsingi, Soome) lugejaga lainepikkusel 405 nm, millest lahutati maha neeldumine 492 nm juures. Saadud optilise tiheduse (OD) väärtustest arvutati antikehade hulk ensüümi immunoloogilistes ühikutes (EIÜ) vastavalt valemile:

$$\frac{(\text{uuritava seerumi OD}) - (\text{negatiivse kontrollseerumi OD})}{(\text{positiivse kontrollseerumi OD}) - (\text{negatiivse kontrollseerumi OD})} \times 100 = \text{EIÜ}$$

EIÜ väärtused 10-29 loeti nõrgalt positiivseks ning väärtused >30 tugevalt positiivseks.

Kardioliipiini vastaste autoantikehade määramiseks kasutati 50 µg/ml kardioliipiini (Sigma, Glostrup, Taani) antigeeni lahust 95% etanoolis. Mikroküvettesse kanti 50 µl antigeeni lahust ning plaati inkubeeriti üleöö 4°C juures. Inkubatsioonide ja blokeerimise vahel pesti plaati 4 korda PBS lahusega. Blokeerimiseks kanti mikroküvettesse 75 µl veise vereseerumi (pärineb Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudist) 10% lahust PBS-is. Blokeerimine kestis 1,5 tundi 20°C juures. Uuritavate seerumitega inkubatsioonil kasutati seerumite 1:50 lahjendust 10%-lises veise vereseerumi PBS lahuses, mida kanti 50 µl igasse mikroküveti. Inkubatsioon kestis 3 tundi 20°C juures. Järgnevalt kanti mikroküvettesse 50 µl sekundaarse antikeha lahust, milleks oli AP märgisega küüliku inimese-IgG vastase antikeha 1:1000 lahjendus BBS-albumiini lahuses. Inkubatsioon kestis üleöö 20°C juures. Seejärel kanti mikroküvettesse 50 µl substraadina kasutatud p-NPP ja dietanoolamiinpuhvri lahust, inkubatsioon kestis 45 minutit 37°C juures. Testi tulemusi hinnati nagu kirjeldatud β2-GPI ELISA meetodi juures. Nõrgalt positiivseks loeti EIÜ väärtused 30-59 ja tugevalt positiivseks >60 EIÜ.

5.4. Endomeetriumi koest homogenaadi valmistamine immunoblotmeetodil kasutamiseks

Immunoblotil kasutati antigeeninäidena kuue kontrollisiku endomeetriumi

bioptaatidest saadud homogenaati. Testis kasutatud endomeetriumi koe proovid korjati Nova Vita Kliiniku patsientidelt (vanuses 31-35 aastat) kliinilisel näidustusel teostatud endomeetriumi histoloogiliseks uuringuks läbi viidud biopsia käigus. Histoloogilise analüüsi näidustuseks oli kõigil juhtudel varasema IVF ravi ebaõnnestumine. Biopsia teostati loomuliku menstruatsioonitsükli 16. (ühel juhul) – 21. (viiel juhul) päeval, mis histoloogiliselt vastas endomeetriumi varajasele sekretoorsele faasile. Kõikidelt proovi loovutajatelt oli saadud selleks kirjalik nõusolek. Koeproovid külmutati ning hoiti -70°C juures kuni homogeniseerimiseni. Kuue isiku koeproovide kogukaal oli 0,58 g. Et vähendada biopsia materjalis olevate endogeensete immunoglobuliinide mõju immunobloti tulemustele, pesti koeproove PBS lahusega ning tsentrifuugiti seejärel 3 minutit 500 g 4°C juures. Supernatant eemaldati ning sademele lisati 5 ml puhvrit, mis sisaldas 4,5 ml PBS ja 0,5 ml proteaasi inhibiitorite 10x lahust [20 µl 0,5 M EDTA-K₂; 80 µl 50 mg/ml Defoblo; 10 µl 1 mg/ml pepstatiin A metanoolis; 20 µl 1 mg/ml leupeptiin; 5 µl 1 M 1,4-ditio-DL-treitol (DTT); PBS ad 10 ml]. Esmalt purustati koeproovid klaasist Dounce homogenisaatori abil, seejärel sonikeeriti 4x15 sekundit 30% võimsusega (Bandelin Sonoplus HD 2200, Berliin, Saksamaa). Proovidele lisati võrdses koguses proovipuhvrit [2x puhvri koostis: 0,0625 M TRIS-HCl (pH 6,8); 3% SDS; 10% glütserool; 0,1 M DTT; 0,02% bromofenoolsinine; destilleeritud H₂O ad 10 ml] ning proove kuumutati esmalt 10 minutit 65°C juures ning seejärel 5 minutit 95°C juures, neid pidevalt loksutades (600 rpm). Kui proovid olid jahtunud, tsentrifuugiti neid 10 minutit 14000 rpm juures ning säilitati immunoblotanalüüsini -20°C juures.

5.5. Valgu kontsentratsiooni määramine endomeetriumi koe homogenaadis

Valgu kontsentratsiooni määramiseks homogenaadi lahuses kasutati Bio-Rad DC Protein Assay meetodit (http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9005.pdf). Lühidalt: reagentile A (alkaliinne vasktartraat) lisati 2% reagenti S; seejärel valmistati valgu standardlahusest II (500 007, veise seerumi albumiin) 5 erinevat lahjendust valgu kontsentratsioonidega 0,1 mg/ml kuni 1 mg/ml ja 5 erinevat lahjendust uuritavast homogenaadi lahusest. Valgulahjendustest pipeteeriti 100 µl igasse tuubi ning lisati 500 µl reagentide A ja S lahust. Viimasena lisati igasse tuubi 4 ml reagenti B (lahjendatud Folin'i reagent) ning lahused segati. Viieteistkümne minuti möödudes mõõdeti lahuste valguse adsorptsiooni 750 nm juures (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Cambridge, Ühendkuningriik). Võrreldes proovide tulemusi

standardlahusest valmistatud kalibratsioonikõvera tulemustega, saadi proovilahuse valgu kontsentratsiooniks 3,2 mg/ml kohta.

5.6. SDS-PAGE ja immunoblotanalüüs

5.6.1. Anti-endometriaalsete antikehade detekteerimine

Selleks, et detekteerida uuritavate patsientide seerumist AEA reaktsioone, kasutati immunoblotmeetodit, mis võimaldas hinnata antikeha reaktsioone endomeetriumi koe erinevate valkude vastu. Leidmaks gradientgeeliga immunoblotmeetodi jaoks sobivad antigeeni kontsentratsioon ja seerumite lahjendused, viidi esmalt läbi SDS-PAGE (naatrium-dodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees) Mini-geelidega, kus valkude lahutamiseks kasutati 5%-list kontsentreerivat ja 10%-list lahutavat geeli. Antigeeni lahjendust 40 µg/cm kohta kasutati erinevate seerumilahjenduste (1:50, 1:100, 1:200) testimiseks. Seerumi lahjendust 1:100 kasutati erinevate antigeeni kontsentratsioonide (10, 20, 40 ja 80 µg/cm kohta) testimiseks. Molaarmassi markerina kasutati All Blue 10-250 kDa markereid (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Elektroforees viidi läbi vertikaalsel elektroforeesi süsteemil Mini Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tingimustel: 15 minutit 80 mA, 50 V; 1 tund 80 mA, 150 V. Lahutatud valgud kanti geelilt poolkuival ülekandel (Semiphor TE 77, Hoefer, San Francisco, CA, USA) nitrotselluloosi membraanile (poori suurus 0,2-0,45 µm) tingimustel: 1 mA/cm² kohta; 50 V; 1 tund ja 15 minutit [ülekande puhver: 25 mM TRIS-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 8,3, 192 mM glütsiin, 10% metanool]. Järgnevalt blokeeriti membraane blokeerimislahuses (25 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 3% lõssipulber) horisontaalsel loksutil 1 tund toatemperatuuril, misjärel lõigati membraanist ca 3 mm laiused ribad. Ribadele kanti eelpool mainitud seerumite lahjendused ning inkubeeriti blokeerimislahuses üleöö 4°C juures horisontaalsel loksutil. Seejärel pesti ribasid 5% pesulahusega (25 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,05% Tween 20) 4x5 minutit horisontaalsel loksutil ja inkubeeriti sekundaarse antikeha [AP konjugeeritud küüliku inimese-IgG vastane antikeha (DAKO, Glostrup, Taani)] 1:1000 lahjendusega blokeerimislahuses 1 tund toatemperatuuril. Järgnevalt pesti ribasid taas 4x5 minutit pesulahusega ning inkubeeriti horisontaalsel loksutil substraadilahusega [(100 mM dietanoolamiin, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5); 0,5% NBT; 0,5%

BCIP] 10 minutit toatemperatuuril. Reaktsioon lõpetati ribasid destilleeritud H₂O-ga loputades.

Mini-geelidega immunoblotanalüüsil saadud tulemuste alusel valiti edasiseks gradientgeeliga immunoblotmeetodil analüüsiks antigeeni kontsentratsioon 140 µg/cm kohta ja seerumi lahjendus 1:100, mille korral olid antikehade reaktsioonid endometriaalsete valkudega kõige selgemini näha. Endomeetriumi homogenaadi valgud lahutati 5-20%-lisel gradientgeelil 5%-lise kontsentreeriva geeliga. Molaarmassi markerina kasutati All Blue 10-250 kDa markereid (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Elektroforees kestis 5 tundi ning viidi läbi 40 mA, 200V juures kasutades vertikaalset elektroforeesi süsteemi SE-600 (Hoefer, San Francisco, CA, USA). Lahutatud valgud kanti geelilt 0,45 µm poori läbimõõduga polüvinülideen-fluoriid (PVDF) membraanile poolkuiva elektroblotter-süsteemiga (Hoefer, San Francisco, CA, USA). Ülekanne kestis 1,5 tundi ning viidi läbi voolutugevusel 1 mA/cm² kohta, puhvrina kasutati TRIS-HCl/glütsiin/atsetooni lahust. Ülekandele järgnevalt blokeeriti membraane esmalt 15 minutit etanoolamiini/glütsiini puhvris, mis sisaldas 10 g/l polüvinüülpürrolidooni (PVP) (M = 40 000 kDa) ja 25% metanooli ning seejärel 15 minutit etanoolamiin/glütsiini puhvris, mis sisaldas 0,14% Tween-20 ning 5 g/l želatiinhüdrolüsaati. Seejärel lõigati membraanist 3-4 mm laiused ribad ning pesti neid 10 minutit inkubatsioonipuhvris (pH 8,6) (1,25 g/l želatiinhüdrolüsaat; 0,25 g/l Tween-20; 6,1 g/l NaCl; 0,06 g/l TRIS-HCl, pH 6,8). Ribadele kanti peale seerumi 1:100 lahjendus inkubatsioonipuhvris ning inkubeeriti üleöö 4°C juures neid horisontaalsel loksutil pidevalt loksutades. Järgmisel päeval loputati ribasid esmalt 3x10 minutit inkubatsioonipuhvris ning seejärel kanti ribadele mädarõika peroksüdaasiga (HRP - *horse radish peroxidase*) konjugeeritud inimese-IgG või -IgA vastase küüliku antikeha (DAKO, Glostrup, Taani) 1:500 lahjendused inkubatsioonipuhvris. Inkubatsioon kestis 1,5 tundi, viidi läbi toatemperatuuril horisontaalsel loksutil ning selle lõpetamiseks pesti ribasid 3x10 minutit inkubatsioonipuhvris. Antikehade reaktsioonid ilmutati pimedas 45 minuti jooksul naatriumatsetaatpuhvris (50 mM, pH 5,0), millele oli lisatud 0,04% 3-amino-9-etiülkarbasooli ja 0,015% vesinikperoksiidi. Reaktsiooni lõpetamiseks loputati ribasid destilleeritud H₂O-ga. Iga eksperimendi korral kasutati sekundaarse antikeha taustareaktsioonide kontrolliks riba, mida inkubeeriti vaid sekundaarse antikeha lahjendusega.

5.6.2. Anti-endometriaalsete antikehade võimalike märklauvalkude detekteerimine

Et uurida immunoblotmeetodil detekteeritud AEA spetsiifikat uuritavate patsientide seerumis, kasutati glükodeliin A (PP14) (kloon 001-13) 1,00 mg/ml; surviviini (kloon 60.11) 33,60 mg/ml; kalpastiini (kloon 2G11D6) ja CD130 (GP130) (kloon B-S12) 1,00 mg/ml hiire monoklonaalseid antikehi ja α -enolaasi (ENO1) 1,00 mg/ml polükloonaalset küüliku antikeha (kõik Abcam plc, Cambridge, Ühendkuningriik). Need antikehad olid välja valitud vastavalt uuritavate seerumitega läbi viidud immunoblotmeetodi tulemuste statistilisele analüüsile. Nende antikehadega viidi läbi immunoblotanalüüs nagu kirjeldatud eespool, kus neid kasutati testis seerumite asemel (monoklonaalseid antikehi lahjendusel 1:500 ja polükloonaalset antikeha kontsentratsioonis 0,03 μ g/ml). Erinevad olid ka sekundaarsed antikehad: monoklonaalsete antikehade korral kasutati HRP konjugeeritud hiire-IgG vastaseid kitse antikehi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), polükloonaalse ENO1 puhul HRP konjugeeritud küüliku-IgG vastaseid kitse antikehi (DAKO, Glostrup, Taani). Mõlemaid kasutati 1:500 lahjendusel. Muus analüüsi osas toimiti sarnaselt uuritavate seerumitega inkubeerides.

5.7. Statistiline analüüs

Statistiline analüüs teostati R2.3.1 keelt ja keskkonda kasutades (Free-Software Foundation, Boston, MA). Statistilistest meetoditest kasutati proportsiooni testi koos 95% usaldusvahemikuga (CI), χ^2 -testi Yates'i korrigeerimisega, lineaarset ja logistilist regressiooni mudelit, mille seosed väljendati vastavalt regressiooni kordajana (r) ja šansside suhtena (OR). $P < 0,05$ loeti statistiliselt oluliseks esinevuseks. Täpsemalt on statistiliseks analüüsiks kasutatud teste kirjeldatud iga tulemuse juures eraldi.

6. TULEMUSED

6.1. Ülevaade erinevustest üldautoantikehade esinemissageduses patsientide gruppide vahel.

Uuritavate gruppide keskmine vanus ei erinenud oluliselt: endometrioosi diagnoosiga patsientide keskmine vanus oli $33,9 \pm 4,5$ aastat ja tubaarse viljatusega patsientidel $33,7 \pm 4,03$ aastat (lineaarse regressiooni kordaja $r = 0,16$; $p = 0,849$). IIF ja ELISA meetodil detekteeritud IgG tüüpi organ-spetsiifiliste ja organ-spetsiifikata üldautoantikehade esinemissageduste võrdlemiseks kasutati proportsiooni testi koos 95% usaldusvahemikuga (CI). IgG tüüpi üldautoantikehade esinemine oli sage mõlemas uuritavate grupis (tabel 3) (publikatsioon toodud lisas). Endometrioosiga patsientidel esines võrreldes tubaarse infertiilsusega patsientidega oluliselt sagedamini ANA alates tiitrist 1:10 ja $\beta 2$ -GPI vastaseid antikehi alates tugevalt positiivsest piirväärtusest. Samuti erinesid uuritavad grupid üldautoantikehade reaktiivsuse ulatuse poolest ehk endometrioosiga patsientide hulgas oli võrreldes tubaarse faktoriga uuritavatega oluliselt sagedamini patsiente, kellel esines vähemalt üks 8-st uuritavast autoantikehast (82,4%); tubaarse infertiilsusega patsientidel esines vähemalt üks 8-st uuritavast autoantikehast 62,2%-l (vanuse ja AEA IgG ning IgA reaktiivsuse ulatuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs $kOR = 5,0$; $p = 0,003$).

6.2. Anti-endometriaalsed autoantikehad ja nende erinev esinemissagedus patsientide gruppide vahel

Nii endometrioosi ($n = 31$) kui ka tubaarse viljatusega ($n = 159$) patsientide vereseerumis olid detekteeritavad IgG ja IgA tüüpi antikehad, mis reageerisid endometriaalsete antigeenidega. Et võrrelda uuritavate gruppide AEA reaktiivsust ehk mitu erinevat antikeha reaktsiooni esines, moodustati tunnus „IgG ja IgA tüüpi antikehade reaktsioonide ulatus“. Tubaaarse infertiilsusega patsientide grupis esines oluliselt rohkem IgA tüüpi reaktsioone (keskmiselt $13,72 \pm 4,5$ reaktsiooni) kui endometrioosiga patsientidel (keskmiselt $10,26 \pm 3,5$). Läbi viidud logistiline regressioonanalüüs näitas, et tubaarse infertiilsusega patsientidel oli tõenäosus omada IgA tüüpi AEA suurenenud 1,2 korda (vanuse ja AEA IgG ning IgA reaktsioonide ulatuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs $kOR = 1,20$; $p < 0,001$).

Tabel 3. Üldautoantikehade esinemissagedused haigusgruppide vahel

Üldautoantikehad	Endometriioos (n = 31)	Tubaarne infertiilsus (n = 159)
Alates madalast tiitrist, n (%; 95% CI)*		
ANA	5 (16,1%; 6,1-34,5)***	12 (7,6%; 4,1-13,1)
SMA	2 (6,5%; 1,1-22,8)	15 (9,4%; 5,6-15,4)
PCA	2 (6,5%; 1,1-22,8)	11 (6,9%; 3,7-12,4)
TMA	-	6 (3,8%; 1,5-8,4)
AMA	-	1 (0,6%; 0,0-4,0)
HEp-2	1 (3,2%; 0,2-18,5)	3 (1,9%; 0,5-5,9)
ACA	1 (3,2%; 0,2-18,5)	9 (5,7%; 2,1-9,3)
β2-GPI	5 (16,1%; 6,1-34,5)***	22 (13,8%; 9,1-20,4)
Alates kõrgest tiitrist, n (%; 95% CI)**		
ANA	1 (3,2%; 0,2-18,5)	3 (1,9%; 0,5-5,9)
SMA	-	-
PCA	2 (6,5%; 1,1-22,8)	-
TMA	-	1 (0,6%; 0,0-4,0)
AMA	-	-
HEp-2	-	-
ACA	1 (3,2%; 0,2-18,5)	2 (1,3%; 0,2-4,9)
β2-GPI	2 (6,5%; 1,1-22,8)	3 (1,9%; 0,5-5,9)

* Antikehade esinemissagedust alates madalast tiitrist hinnati positiivse testi tulemusega seerumi lahjendusel 1:10 ANA, SMA, PCA, TMA, AMA ja HEp-2 puhul ning nõrgalt positiivne testi tulemus ACA ja β2-GPI korral

** Antikehade esinemissagedust alates kõrgest tiitrist hinnati positiivse testi tulemusega seerumi lahjendusel 1:100 ANA, SMA ja TMA, 1:10 PCA puhul ning tugevalt positiivne testi tulemus ACA ja β2-GPI korral

*** Statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,05$)

Erinevalt IgA reaktsioonidest olid IgG tüüpi AEA reaktsioonid uuritavate gruppide vahel sarnased, tubaarse viljatusega patsientidel keskmiselt $20,81 \pm 6,3$ ja endometriooisahaigetel $18,48 \pm 4,8$ ($kOR = 1,00$; $p = 0,100$). IgG ja IgA tüüpi reaktsioonide üldreaktiivsust endomeetriumi täishomogenaadil kajastavad joonised 2 ja 3. Joonistelt on näha ka seerumita inkubeeritud taustreaktsioonide ribadel (K) esinenud mittespetsiifilisi antikeha reaktsioone, mis võivad kajastada homogenaadis leidunud endogeensete Ig raskete ja kergete ahelate ning nende laguproduktide vastaseid

reaktsioone. Reaktsioonid, mis kattusid taustreaktsioonide ribade mittespetsiifiliste reaktsioonidega, jäeti analüüsist välja.

Selleks, et hinnata patsientide gruppide vahelisi erinevusi iga üksiku antikeha reaktsiooni sageduses, kasutati proportsiooni testi (tabel 4). Endometrioosiga patsientidel esines sagedamini IgG tüüpi antikeha reaktsioone valkudega, mille ligikaudne molaarmass oli 35-37, 30-31, ca 24, 18-20 ning ca 12 kDa. IgA tüüpi antikeha reaktsioone oli endometrioosiga uuritavatel rohkem ligikaudses molaarmassi piirkondades 90-100, 70-73, ca 70 ja ca 21 kDa. Et analüüsida AEA esinemise riski endometrioosi haigestumisega, viidi läbi vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs ning nende antikehade statistilise analüüsi tulemused, mis näitasid riski endometrioosi haigestumisega, on toodud tabelis 5.

Tubaarse viljatusega patsientidel esines sagedamini IgG tüüpi antikeha reaktsioone valkudega molaarmassi piirkondades 90-200, ca 45, ca 36, ca 28, 21-22 ning ca 14 kDa; IgA tüüpi reaktsioone aga sagedamini valkudega molaarmassi piirkondades 110-150, 45-55, 36-40, ca 34, ca 32, ca 30, 22-25, 18-20 ning 14-16 kDa. (tabel 4). Et analüüsida AEA esinemise riski tubaarse infertiilsuse kujunemisega, viidi läbi vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs ning nende antikehade statistilise analüüsi tulemused, mis näitasid riski tubaarse viljatuse kujunemisega, on toodud tabelis 6.

IgG ja IgA tüüpi AEA üksikreaktsioonide sagedused endometrioosi ja tubaarse infertiilsusega patsientidel on illustreeritud joonistel 4 ja 5. Joonistelt võib näha, et sagedamini esines antikeha reaktsioone valkudega keskmistes molaarmassi piirkondades.

Tabel 4. Anti-endometriaalsete IgG ja IgA tüüpi antikehadega reageerinud homogenaadi valkude molaarmassi piirkonnad endometrioosiga ja tubaarse viljatusega patsientide hulgas

Ligikaudne molaarmass (kDa)	Endometrioos		Tubaarne viljatus	
	IgG	IgA	IgG	IgA
~200	-		+	
150-160	-	0	+	0
~150	-		+	
110-150	-	-	+	+
100-110	-	0	+	0
~100	-	+	+	-
90-100		+		-
75-90	0	0	0	0
75-78	0	0	0	0
70-73	0	+	0	-
~70		+		-
~55	0	-	0	+
50-53		-		+
45-48	0	-	0	+
~45	-	-	+	+
43-45	0	0	0	0
40-43		-		+
~40	0	-	0	+
~37	+	-	-	+
~36	-	-	+	+
~35	+		-	
~34	0	-	0	+
~33		0		0
~32		-		+
~31	+	0		0
~30	+	-	-	+
~29			+	
~28	-		+	
~26	0		0	
~25		-		+
~24	+		-	
~22	-	-	+	+
~21	-	+	+	-
~20	+	-	-	+
~19	0		0	
~18	+	-	-	+
~17	0	0	0	0
~16	0	0	0	+
~14	-	-	+	+
~12	+		-	
~10	0		0	

(+) positiivne seos, (-) negatiivne seos (proportsiooni test, $p < 0.05$), (0) seos puudub ($p > 0.05$), (tühi lahter) immunobloti reaktsioon puudus

Tabel 5. Endometrioosihaigetel detekteeritud homogenaadi valkude molaarmassi piirkonnad, mille vastaste anti-endometriaalsete antikehade esinemine oli seotud endometrioosi haigestumise riskiga

IgG reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos endometrioosi haigestumisega		IgA reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos endometrioosi haigestumisega	
	kOR	p		kOR	p
~24	4,74	0,015	90-100	5,21	0,000
~20	13,32	0,000	~70	4,84	0,015
			70-73	1,13	0,001

Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs

Tabel 6. Tubaarse viljatusega patsientidel detekteeritud homogenaadi valkude molaarmassi piirkonnad, mille vastaste anti-endometriaalsete antikehade esinemine oli seotud tubaarse infertiilsuse kujunemise riskiga

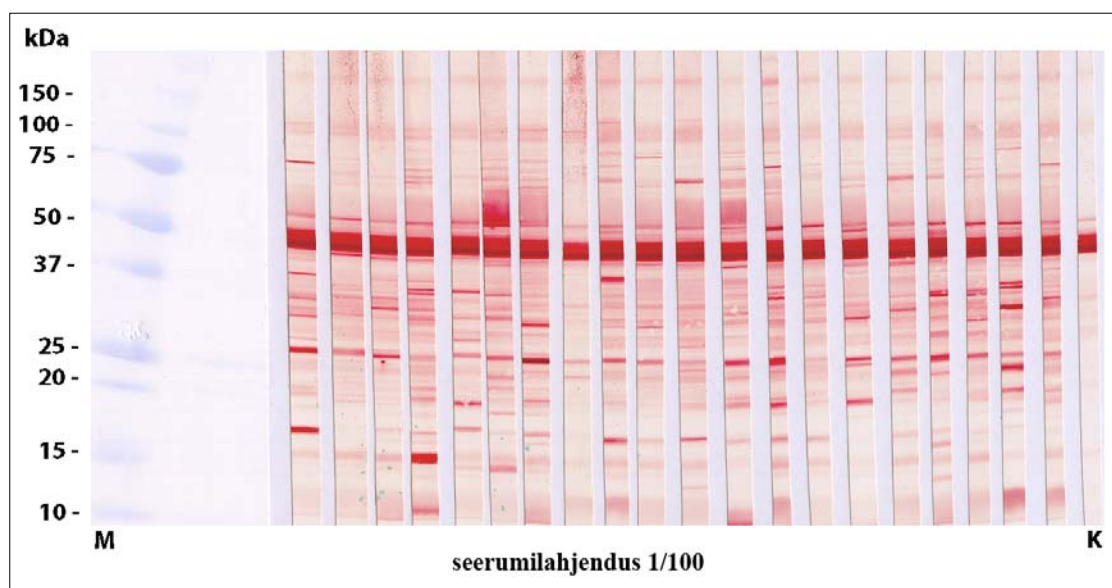
IgG reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos tubaarse viljatuse kujunemisega		IgA reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos tubaarse viljatuse kujunemisega	
	kOR	p		kOR	p
~200	1,33	0,013	45-55	1,45	< 0,01
~150	1,12	0,004	~37	1,56	0,023
100-110	1,08	0,000	~34	1,10	0,002
~45	1,14	0,000	~22	1,33	0,015
~28	1,09	0,000	14-16	1,11	< 0,001

Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs

6.3. Seosed IgG tüüpi üldautoantikehade ning anti-endometriaalsete IgG ja IgA tüüpi antikehade esinemise vahel

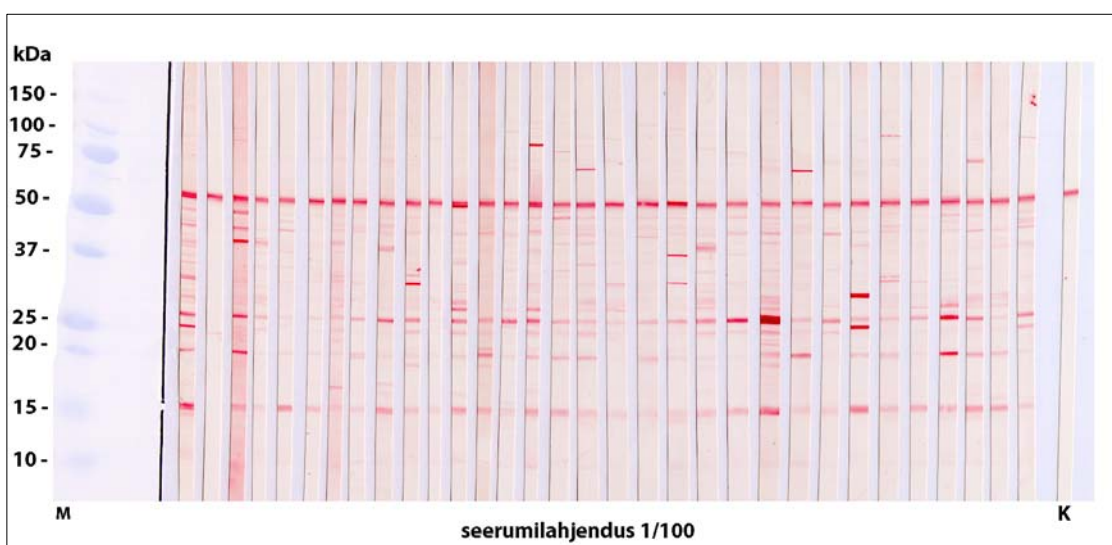
Vanuse ja AEA IgG ning IgA tüüpi antikehade reaktsioonide ulatusega kohandatud logistiline regressioonanalüüs näitas, et IgG tüüpi üldautoantikehade esinemine oli seotud nii IgA (kOR = 1,18; p = 0,002) kui IgG (kOR = 1,08; p = 0,017) tüüpi AEA samaaegse esinemisega. Samas eksisteeris positiivne seos ka AEA IgA ja IgG tüüpi reaktiivsuse vahel (vanuse järgi kohandatud lineaarse regressiooni kordaja $r = 0,32$; $p < 0,001$). Lineaarse regressiooni kordaja lubab väita, et keskmiselt oli ühe IgA tüüpi antikeha kohta 3 IgG tüüpi antikeha reaktsiooni.

Joonis 2. Anti-endometriaalsete IgG tüüpi antikeha reaktsioonide esinemine endomeetriumi täishomogenaadil endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide hulgas immunoblotanalüüsil.



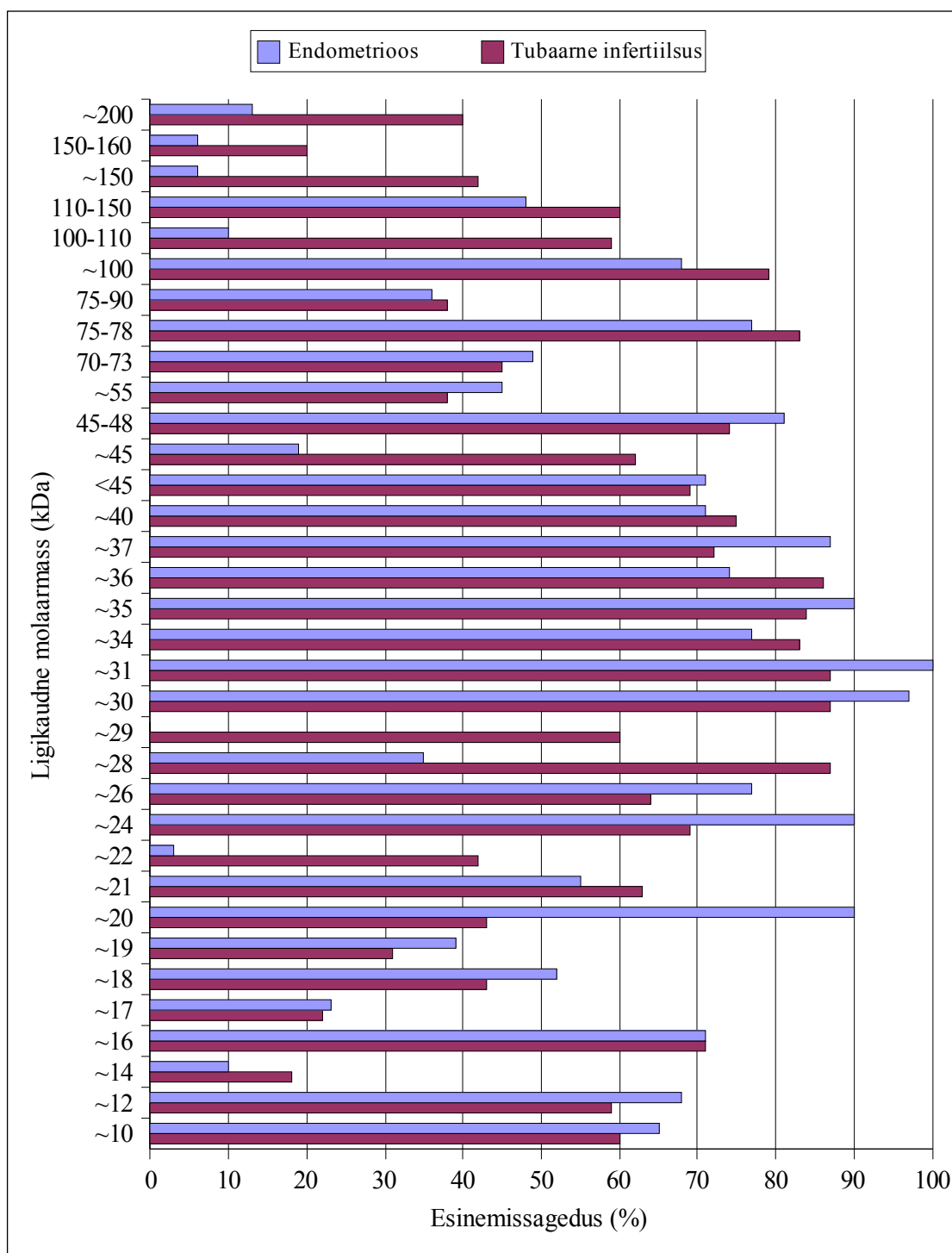
M: All Blue molaarmassi marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); K: taustreaktsioonide riba - inkubeeritud ilma uuritava seerumita.

Joonis 3. Anti-endometriaalsete IgA tüüpi antikeha reaktsioonide esinemine endomeetriumi täishomogenaadil endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide hulgas immunoblotanalüüsil.

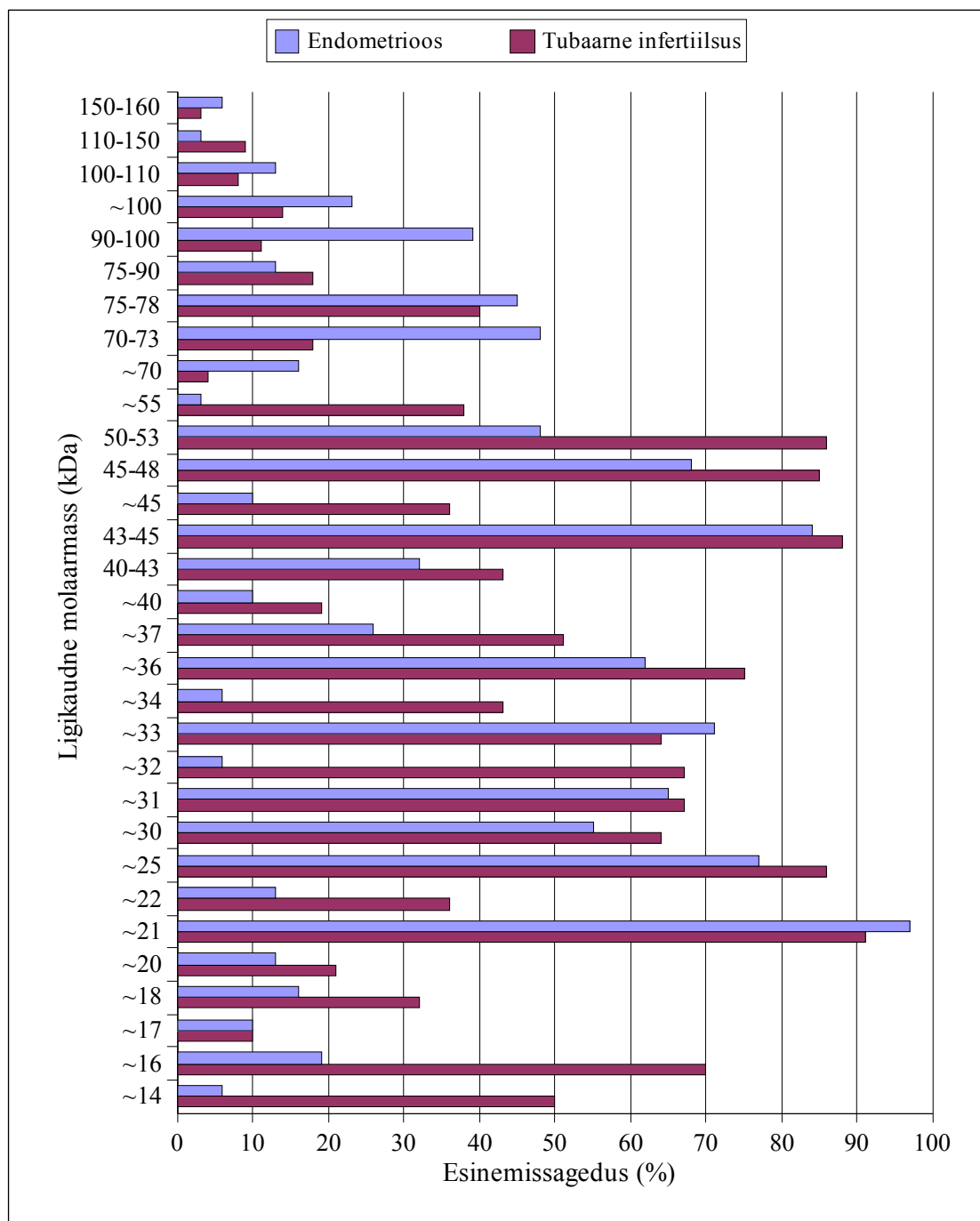


M: All Blue molaarmassi marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); K: taustreaktsioonide riba - inkubeeritud ilma uuritava seerumita.

Joonis 4. Anti-endometriaalsete IgG tüüpi antikeha reaktsioonide sagedused endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide hulgas hinnatuna immunoblotanalüüsi abil.



Joonis 5. Anti-endometriaalsete IgA tüüpi antikehade reaktsioonide sagedused endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide hulgas, hinnatuna immunoblotanalüüsi abil.



6.4. Seosed autoantikehade ja IVF ravitulemuste vahel

IgG tüüpi üldautoantikehade esinemine ei olnud seotud IVF ravitulemutsega nii endometrioosiga patsientide gruppi eraldi vaadeldes (vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs $kOR = 2,32$; $p = 0,383$) kui ka tubaarse infertiilsusega haigete gruppi eraldi vaadeldes ($kOR = 1,46$; $p = 1,388$). Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs näitas, et raseduste arv ei erinenud endometrioosi ja tubaarse infertiilsusega patsientide vahel ($kOR = 1,66$; $p = 0,297$), mistõttu AEA esinemise seoseid hinnati kõikidel uuritavatel koos ($n = 190$), kasutades selleks vanuse järgi kohandatud logistilist regressioonanalüüsi (tabel 7). Halvemate IVF ravitulemustega olid seotud IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega, mille ligikaudne molaarmass oli 90-110, ca 40, 28-29 ja ca 14 kDa ning IgA tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega, mille ligikaudne molaarmass oli 75-90, ca 45, ca 37, ca 32, ca 25 ja ca 16 kDa. Et analüüsida AEA esinemise riski halvematele IVF ravitulemustele, viidi läbi vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs ning nende antikehade statistilise analüüsi tulemused, mis näitasid riski halvematele IVF ravitulemustele, on toodud tabelis 8.

Paremate IVF ravitulemustega olid seotud IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega, mille ligikaudne molaarmass oli ca 150, ca 30 ja ca 20 kDa ning IgA tüüpi reaktsioonid valkudega, mille ligikaudne molaarmass oli ca 70 ja ca 33 kDa. Seoste edasiseks analüüsiks viidi läbi vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs ning nende antikehade statistilise analüüsi tulemused, mille esinemine suurendas raseduse tõenäosust IVF ravi järgselt, on toodud tabelis 9.

Analüüsides AEA reaktsioonide ulatuse seotust ravi tulemustega, võis näha, et IgG tüüpi antikeha reaktsioonide üldarv ei olnud seotud IVF ravi järgsete ravitulemustega (vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs $kOR = 1,00$; 95% CI = 0,94-1,06; $p = 0,921$) ja seda ka juhul kui arvesse võeti kehavälise viljastamise viis (IVF või ICSI). Patsientidel, kellel käesoleva uurimustöö ajal teostatud IVF ravi lõppes rasedusega ja neil, kes rasedaks ei jäänud, võis vastavalt hinnata keskmiselt $20,35 \pm 6,09$ ja $20,28 \pm 6,54$ erinevat IgG tüüpi antikeha reaktsiooni. Ka IgA reaktsioonide üldarv polnud seotud raseduste tulemustega ($kOR = 0,95$; 95% CI = 0,88 – 1,04; $p = 0,257$) ning sarnaselt IgG tüüpi antikeha reaktsioonidele, ei erinenud tulemused ka peale kehavälise viljastamise viisi arvestamist statistilises analüüsis. IgA tüüpi antikehade puhul oli patsientidel, kellel IVF ravi lõppes rasedusega ja neil, kes

rasedaks ei jäänud, võimalik vastavalt hinnata keskmiselt $13,16 \pm 4,25$ ja $12,11 \pm 4,66$ erinevat IgA tüüpi antikeha reaktsiooni.

Tabel 7. Anti-endometriaalsete IgG ja IgA tüüpi antikeha reaktsioonide esinemise seos IVF ravitulemustega

Ligikaudne molaarmass (kDa)	Antikeha reaktsioonide seos ravitulemusega		Ligikaudne molaarmass (kDa)	Antikeha reaktsioonide seos ravitulemusega	
	IgG	IgA		IgG	IgA
~200	0		~34	0	0
150-160	0 / +	0	~33		+
~150	0		~32		-
110-150	0	0	~31	0	0
100-110	-	0	~30	0 / +	0
~100	-	0	~29	0 / -	
90-100		0	~28	0 / -	
75-90	0	-	~26	0	
75-78	0	0	~25		-
70-73	0	+	~24	0	
~70		+	~22	0	0
~55	0	0	~21	0	0
50-53		0	~20	0 / +	0
45-48	0	-	~19	0	
~45	0	0	~18	0	0
43-45	0	0	~17	0	0
40-43		0	~16	0	-
~40	0 / -	0	~14	-	0
~37	0	-	~12	0	
~36	0	0	~10	0	
~35	0				

Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs: (+) positiivne seos, (-) negatiivne seos ($p < 0.05$), (0/+) positiivse tendentsiga, (0/-) negatiivse tendentsiga ($p < 0.1$), (0) seos puudub ($p > 0.1$), (tühi lahter) immunoblotti reaktsioon puudus

Tabel 8. Endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientidel detekteeritud homogenaadi valkude molaarmassi piirkonnad, mille vastaste anti-endometriaalsete antikehade esinemine oli seotud halvemate IVF ravitulemustega

IgG reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos halvemate IVF ravitulemustega			IgA reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos halvemate IVF ravitulemustega		
	kOR	95% CI	p		kOR	95% CI	p
100-110	1,45	0,14-0,69	0,004	75-90	1,28	0,06-0,77	0,018
90-100	1,59	0,16-0,85	0,020	>45	1,59	0,15-0,90	0,029
~40	1,82	0,20-1,03	0,058	~37	1,72	0,19-0,92	0,030
~29	1,96	0,23-1,04	0,065	~32	1,79	0,21-0,94	0,034
~28	1,92	0,20-1,12	0,089	~25	1,59	0,14-0,96	0,042
~14	1,39	0,08-1,00	0,049	~16	1,64	0,18-0,84	0,017

Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs

Tabel 9. Endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientidel homogenaadi valkude molaarmassi piirkonnad, mille vastaste anti-endometriaalsete antikehade esinemine oli seotud paremate IVF ravitulemustega

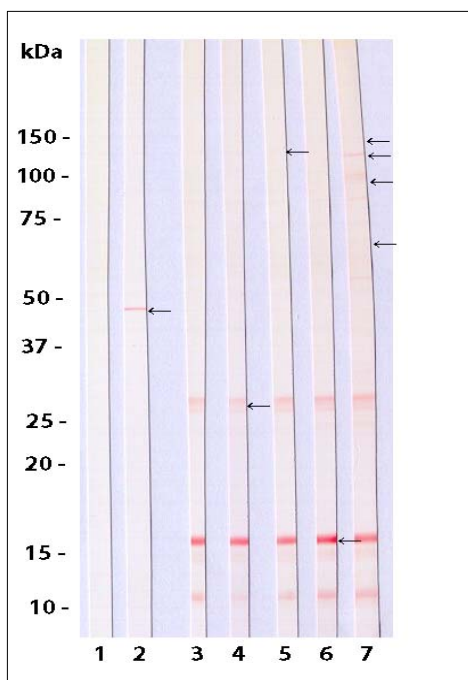
IgG reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos paremate IVF ravitulemustega			IgA reaktsioonide ligikaudne molaarmass (kDa)	Seos paremate IVF ravitulemustega		
	kOR	95% CI	p		kOR	95% CI	p
150-160	2,30	0,88-5,98	0,088	70-73	4,19	1,69-10,37	0,002
~33	3,76	0,81-17,43	0,091	~70	10,7 1	1,18-97,58	0,035
~20	2,03	0,96-4,32	0,066	~33	2,64	1,12-6,19	0,026

Vanuse järgi kohandatud logistiline regressioonanalüüs

6.5. Anti-endometriaalsete antikehade võimalikud märklaudvalgud

Vastavalt immunoblotmeetodil detekteeritud AEA tulemuste statistilisele analüüsile valiti edasiseks uurimiseks 5 antikeha, mille endometriaalsete valkudega reaktsioonide esinemissagedus oli uuritavate gruppide vahel erinev ja/või, mis olid seotud raseduse tõenäosuse vähenemisega. Reaktsioonide tõenäoliste märklaudmolekulide kindlakstegemiseks kasutati glükodeliin A, surviviini, GP130 ja kalpastatiini vastaseid hiire monoklonaalseid antikehi (joonis 6). Endomeetriumi täishomogenaadiga andis spetsiifilise reaktsiooni vaid kalpastatiin, kus eristusid selgelt

oodatavad reaktsioonid molaarmassi piirkondades 125 ja 90 kDa ja õrn reaktsioon 150 kDa juures. Kasutatud monoklonaalne antikeha võis tootja andmetel anda reaktsiooni ka 70 kDa piirkonnas, kuid käesolevas töös selles piirkonnas reaktsioon puudus. Monoklonaalne GP130 vastane antikeha ei andnud oodatavas piirkonnas (130 kDa) nähtavat reaktsiooni. Glükodeliin A ja surviviini reaktsioonide piirkonnad langesid kokku kõigil ribad el olnud mittespetsiifiliste reaktsioonidega (vastavalt 28 ja 16,5 kDa). Joonisel 6 on lisaks näha ka oodatud reaktsioonide piirkondadest välja jäävaid reaktsioone, mis tõenäoliselt tähistavad vastavate valkude laguprodukte. Viiendaks täpsemaks identifitseerimiseks valiti α -enolaasi piirkond. Kasutati polükloonaalset α -enolaasi vastast antikeha (ENO1), mis andis reaktsiooni oodatavas piirkonnas 47 kDa (joonis 6).

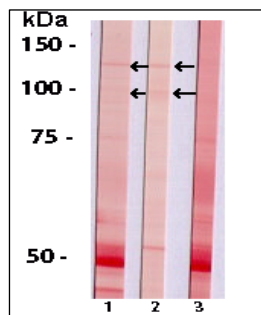


Joonis 6. Monoklonaalsete ja polükloonaalse IgG tüüpi antikehade reaktsioonid (←) endomeetriumi täishomogenaadil.

- 1 – taustreaktsioonide riba küüliku inimese-IgG vastase sekundaarse antikehaga
- 2 – ENO1-ga inkubeeritud riba (47 kDa)
- 3 – taustreaktsioonide riba kitse hiire-IgG vastase sekundaarse antikehaga
- 4 – glükodeliin A-ga inkubeeritud riba (28 kDa)
- 5 – GP130-ga inkubeeritud riba (130 kDa)
- 6 – surviviiniga inkubeeritud riba (16,5 kDa)
- 7 – kalpastatiiniga inkubeeritud riba (150, 125, 90, 70 kDa)

Joonistel 7 ja 8 on kõrvuti ribad el inkubeeritud vastavalt kalpastatiini ja α -enolaasi vastaste antikehade suhtes arvatavalt positiivsed ja negatiivsed seerumid ning mono- ja polükloonaalne antikeha. Reaktsioonide molaarmasside kokkulangevus viitab vastava antigeeni olemasolule selles piirkonnas. Nende valkude molaarmassi piirkondade vastaseid antikehi esines tubaarse infertiilsusega patsientidel rohkem. Näiteks IgG tüüpi antikehi endometriaalsete valkude vastu molaarmassi piirkonnas ca 150 kDa detekteeriti 42%-l tubaarse viljatusega patsiendil ja 6%-l endometrioosihagel ning IgA tüüpi antikehi endometriaalsete valkude vastu molaarmassi vahemikus 45-48

kDa detekteeriti 85%-l tubaarse viljatusega patsiendil ja 68%-l endometrioosiga (joonis 4). Nii kalpastatiini kui ka α -enolaasi vastaste antikehade esinemine olid seotud ka raseduse tõenäosuse vähenemisega IVF ravi järgselt (tabel 8).

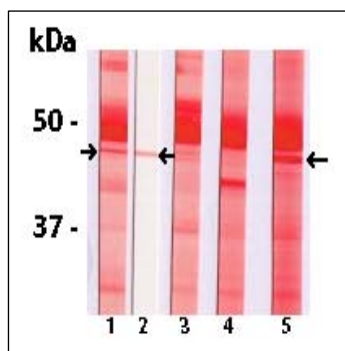


Joonis 7. Kalpastatiini vastase monoklonaalse antikeha ja seerumite reaktsioonid (↔) endomeetriumi täishomogenaadil.

1 – kalpastatiini suhtes arvatavalt positiivne seerum

2 – monoklonaalne kalpastatiini vastane antikeha

3 – kalpastatiini suhtes arvatavalt negatiivne seerum



Joonis 8. α -enolaasi vastase polükloonaalse antikeha ja seerumite reaktsioonid (↔) endomeetriumi täishomogenaadil.

1 – α -enolaasi suhtes arvatavalt positiivne seerum

2 – polükloonaalne α -enolaasi vastane antikeha

3, 4 – α -enolaasi suhtes arvatavalt negatiivsed seerumid

5 – α -enolaasi suhtes arvatavalt positiivne seerum

7. ARUTELU

7.1. Autoantikehade esinemissageduste vahelised seosed endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientidel.

Käesolevas töös detekteeriti endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide seerumist IgG tüüpi organ-spetsiifilisi ja organ-spetsiifikata üldautoantikehi. Määramaks neil patsientidel ka IgG ja IgA tüüpi AEA kasutati immunoblotmeetodit. Tulemuste analüüs näitas, et esines seoseid üld- ja anti-endometriaalsete autoantikehade esinemissageduste vahel. Neist seostest lähtuvalt valiti täpsemaks molekulaarseks identifitseerimiseks 5 AEA-ga reageerinud valkude piirkonda, kasutades selleks glükodeliini A, GP130, surviviini, kalpastiini ja α -enolaasi vastaseid antikehi.

Detekteeritud üldautoantikehi esines nii endometrioosi kui ka tubaarse viljatusega patsientide vereseerumis. Kirjanduse andmeil on neid antikehi põhiliselt seostatud viljatutel patsientidel esinevate implantatsiooni häiretega (Geva jt., 1997a). ACA ja β 2-GPI puhul on näidatud nende platsenta veresoonte epiteeli kahjustavat toimet, kilpnäärme vastased antikehad võivad häirida ema ja loote vahelisi immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanisme, ANA võivad kahjustada embrüot ja seonduda otse trofoblastile, AOA võivad olla suunatud mitmete follikulogeneesi, viljastumise ja implantatsiooni protsessides oluliste komponentide vastu ning olla seeläbi otseselt seotud viljatuse patogeneesiga, SMA võivad aga häirida munajuhade funktsiooni (ülevaated Geva jt., 1997a; Choudhury ja Knapp, 2000; Mecacci jt., 2000; Kikuchi jt., 2003; Haller jt., 2005; 2007). Sarnaselt käesoleva tööga, on kirjanduse andmeil endometrioosihaigetel sagedasti esinevateks autoantikehadeks ANA ja β 2-GPI (APA). Mõlema puhul on diskuteeritud neist kui implantatsiooni häiretega seotud olevatest antikehadest varajaste raseduste katkemiste ja korduvate IVF ebaõnnestumiste korral (Geva jt. 1997a; Van Voorhis ja Stovall, 1997).

Varasemad uuringud on immunoblotmeetodit kasutades leidnud antikehi mitmete endometriaalsete antigeenide vastu, mõned neist spetsiifilised endometrioosihaigetele, teisi esineb ka erinevate võrdlusgruppide indiviididel (Fernández-Shaw jt., 1993; Mathur jt., 1995; Pillai jt., 1996). Kuna aga immunoblotmeetodi üheks puuduseks on võimetus eristada valkude segust kõiki valke, võib antikehaga reageerinud konkreetne valkude molaarmassi vahemik sisaldada mitut antigeeni. Seetõttu ei pruugi sama piirkonna vastu esinenud antikeha reaktsioonid olla omavahel võrreldavad (Mathur jt., 1995). Veelgi enam, detekteeritud IgG või IgA tüüpi

antikeha reaktsioonid võivad ka immuunsüsteemi koha pealt kajastada erinevaid protsesse. IgA tüüpi antikehade esinemist seostatakse eelkõige lokaalse immuunsüsteemi regulatsiooniga (Brunham ja Rey-Ladino, 2005) ning on näidatud nende suurenenud taset akuutsete limaskestade infektsioonide korral (Candolfi jt., 2007). Seevastu IgG esinemine on iseloomulik süsteemsetele autoimmuunsetele haigustele (William jt., 2005).

Käesolevas töös endometrioosiga patsientidel antikehadega reageerinud endometriaalsete valkude molaarmassi vahemikud langesid enamjaolt kokku kirjanduses kajastatutega. Nende seas vastas nii mõnigi valkude molaarmassi piirkond endometrioosi kujunemisel ja patogeneesis osalevatele olulistele faktoritele molaarmassidele. Näiteks endometrioosiga patsientidel oluliselt sagedamini esinenud IgA tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas 70-75 kDa võivad tähendada antikehi tsüklooksügenaasi (COX - *cyclo-oxygenase*) ensüümide vastu. Viimased võivad oma laia toimete amplituuda tõttu (olulised rakkude jagunemisel, angiogeneesis, immunomodulaatorse toimega) olla seotud endometrioosi tekke või kuluga (Esfandiari jt., 2007). Käesolevas töös uuritud endometrioosiga patsientidel esines sarnaselt teistele uuringutele sagedamini β 2-GPI vastaseid antikehi, mis on APA kofaktoriks (Choudhury ja Knapp, 2000). APA aga võivad suurendada COX-2 ekspressiooni (Habib jt., 1995). Sama piirkonna IgA tüüpi antikeha reaktsioonid võivad olla suunatud ka transferriini vastu (Pillai jt., 1996). Transferriin on glükoproteiin, mis vastutab seerumis raua transpordi eest ning osaleb rakkude jagunemise ja invasiivsuse stimuleerimisel (Weinzimer jt., 2001). Kuna transferriini vastaseid antikehi esineb endometrioosiga patsientidel tunduvalt sagedamini, on neid pakutud üheks markeriks haiguse diagnoosimisel (Pillai jt., 1996).

Lisaks COX ensüümidele ja transferriinile võivad valkude molaarmassi piirkonna 70-75 kD vastased IgA tüüpi antikeha reaktsioonid olla suunatud ka MMP-2 vastu. Endometrioosiga patsientidel täheldatakse MMP-2 ekspressiooni häireid: haiguskolletes on näidatud nii alanenud- (Uzan jt., 2004) kui ka üleekspressiooni (Ueda jt., 2002). Ka mitmed teised endometrioosiga patsientidel sagedamini esinenud IgA tüüpi antikeha reaktsioonid endometriaalsete valkudega võivad tähendada antikehi erinevate MMP ja nende inhibiitorite vastu. Antikehadega reageerinud valkude molaarmassi piirkonna 90-100 kDa üheks antigeeniks võib olla MMP-9, mille ekspressioon eutoopilises endomeetriumis on endometrioosiga patsientidel suurenenud (Collette jt., 2006). Endometrioosi patogeneesis võib osaleda ka TIMP-2, mis käesoleva töö tulemuste

põhjal võib olla valkude molaarassi piirkonna ca 21 kDa vastaste antikeha reaktsioonide üheks antigeeniks (Uzan jt., 2004). MMP ja nende inhibiitorid osalevad endometrioosi kujunemisel olulistes implantatsiooni-, angiogeneesi- (Collete jt., 2006), inflamatoorsetes- (Parks jt., 2004) ja apoptoosi protsessides (Garcia-Velasco ja Arici, 2003). Nendevastased antikehad võivad häirida MMP normaalset aktivatsiooni või inhibitsiooni (Yeaman jt., 2002).

Kuna käesoleva töö näol on tegemist esialgse eksperimentaalse lähenemisega, valiti täpsemaks molekulaarseks identifitseerimiseks vaid mõned endometriaalsete valkudega reageerinud antikehad. Kuigi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmasside piirkonnas 70-75 kDa võivad tähendada mitmeid endometrioosi patoloogias olulisi faktoreid, jäeti see piirkond ja ka mitmed teised antikehadega reageerinud valkude piirkonnad esialgu valikust välja. Seetõttu ei saa me täpsustada, milliste komponentide vastu olid suunatud antikehad neis piirkondades. Kindlasti aga kuuluvad need piirkonnad edaspidisele täpsemale molekulaarsele identifitseerimisele.

Endometrioosi patogeneesis on oluline koht immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismidel. Neid mehhanisme võivad mõjutada antikehad, mis on suunatud näiteks immunomodulaatorsete komponentide vastu. Üheks selliseks komponendiks on IL-6 retseptori subühik - endometriaalne GP130. Käesolevas töös esines endometrioosihaigetel sagedamini IgA tüüpi antikeha reaktsioone piirkonnas 100-110 kDa, mis võib tähendada antikehi GP130 lahustuva vormi vastu. Lahustunud GP130 vorm on IL-6 antagonist (Narazaki jt., 1993). Viimane on aga oluline endometrioosi progresseerumise pidurdamises, kuna omab endometriaalsete rakkude proliferatsiooni inhibeerivat toimet (Mahnke jt., 2000). Need toimed olid üheks põhjuseks, miks GP130-le vastav molaarmassi piirkond valiti täpsemaks molekulaarseks identifitseerimiseks. Selleks kasutati monoklonaalset GP130 vastast antikeha, mille reaktsiooni endomeetriumi homogenaadil ei olnud aga võimalik hinnata, kuna reaktsioon oodatud piirkonnas puudus. See võib olla seletatav antigeeni madala kontsentratsiooniga homogenaadis ning sellest tuleneva liiga nõrga reaktsiooniga. Seetõttu reageeris selles piirkonnas uuritavate seerumites leidunud autoantikehadega tõenäoliselt mõni teine valk.

Endometrioosi korral võivad immunomodulaatorset rolli omada ka HSP. HSP60-le vastavas molaarmassi piirkonnas oli spetsiifilise antikeha reaktsiooni olemasolu võimatu hinnata, kuna piirkond langes kokku üldise mittespetsiifilise antikeha reaktsiooniga. Küll oli aga piirkonnas ~70 kDa endometrioosihaigetel

võrreldes tubaarse infertiilsusega patsientidega oluliselt rohkem IgA tüüpi antikeha reaktsioone. HSP perekonda kuuluvatele proteiinidele, eriti aga HSP70-le, on endomeetriumis omistatud kaitsefunktsioon tsütotoksiliste koekahjustuste eest, mida võivad põhjustada tsütokiinid või apoptoosi häired (Koshiyama jt., 1995; ülevaade Tabibzadeh ja Broome, 1999). Ka endometrioosihaigetele iseloomuliku α_2 -HSG vastaste antikehade oodatav reaktsioon molaarmassi piirkonnas (58-64 kDa) (Lang ja Yeaman, 2001) langes kokku üldise mittespetsiifilise antikehade reaktsiooniga ning seetõttu ei saanud me seda reaktsiooni eristada.

Vastavalt Taskin jt. (1996) tööle võivad käesolevas töös endometrioosihaigetel sagedamini detekteeritud IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkondades ca 24, 30-31 ja ca 37 kDa olla suunatud erinevate insuliini sarnaste kasvufaktorit siduvate valkude (IGFBP - *insulin-like growth factor binding protein*) vastu, mis võivad muuta hormonaalset tasakaalu peritoneumis ja emakas ning läbi insuliini sarnase kasvufaktori toime mõjutada lisaks folliikulite küpsemisele ka emaka küpsemist. Endometrioosihaigetel on täheldatud kõrvalekaldeid IGFBP ekspressioonis (Taskin jt., 1996). Valkude molaarmassi piirkonnas 30-31 kDa esinenud IgG tüüpi antikeha reaktsioonid võivad olla suunatud ka karboonanhüdraasi vastu (Kiechle jt., 1994), mille vastaseid autoantikehi peetaksegi iseloomulikuks eelkõige endometrioosihaigetele (Lang ja Yeaman, 2001; Reimand jt., 2001). Veelgi enam, on näidatud nende autoantikehade osalemist endometrioosi kollete kujunemisel (Hu ja Spencer, 2005).

Täpsemaks molekulaarseks identifitseerimiseks valiti ka valkude molaarmassi piirkond, mis võib sisaldada surviviini. Surviviin valiti selle apoptoosi inhibiitori toime tõttu, mis võib kaasa aidata endometriaalsete rakkude apoptoosist pääsemisele, mõjutades seega haiguse kujunemist (Ueda jt., 2002). Kasutatud monoklonaalse surviviini vastase antikeha oodatava reaktsiooni piirkond langes aga kokku kõigil ribadel esinenud mittespetsiifilise reaktsiooniga, mistõttu ei saanud me surviviini vastast reaktsiooni eristada.

Sarnaselt endometrioosiga patsientidele esines ka tubaarse infertiilsusega patsientide seerumis sagedasti AEA, kusjuures neil detekteeriti endometrioosihaigetega võrreldes rohkem just IgA tüüpi antikehi. Võttes siinkohal arvesse, et tubaarsele viljatusele on iseloomulikud põletikulised protsessid, mis võivad põhjustada nihkeid lokaalses immuunsüsteemi regulatsioonis (Geva jt., 1997b; Edelstam jt., 1991), on saadud tulemus isegi ootuspärane. Persisteeruvad klamüüdia infektsioonid, mis on

tubaarse infertiilsuse üheks põhjuseks, võivad viia kroonilise põletiku tekkimiseni ja munajuhade limaskestast kahjustumiseni (Debattista jt., 2004). See on aga eelduseks autoagressiivsete lümfotsüütide aktivatsioonile ja antikehade tekkele (Stern jt., 1998). Kuna aga munajuhades ekspresseerub ka endomeetriumi ühiseid geene, võivad nendevastased autoantikehad reageerida vastavate endometriaalsete antigeenidega ja häirida emaka retseptiivsust ning normaalset keskkonda (Edi-Osagie jt., 2004). Näiteks võib üheks antigeeniks IgA tüüpi antikeha reaktsioonidele valkudega molaarmassi piirkonnas 45-55 kDa olla α -enolaas. Selle vastaseid antikehi on leitud mitmete põletikuliste ja autoimmuunsete haiguste korral, kus nad võivad osaleda endoteeli rakkude kahjustamisel läbi komplemendi aktiveerimise ja immuunkomplekside moodustumise indutseerimise (Terrier jt., 2007). On näidatud, et *Candida albicans*'i enolaas võib olla inimese omaga ristreageeriv. Seetõttu võivad *C.albicans*'i enolaasi vastased antikehad kroonilise põletiku korral ära tunda ka endogeenset enolaasi ning seeläbi kahjustada munajuhade ja endomeetriumi endoteeli (Terrier jt., 2007). Lisaks on α -enolaasi pakutud ka üheks võimalikuks AOA (Sundblad jt., 2006) ja AEA (Walter jt., 1995) antigeeniks.

Tubaarse infertiilsusega patsientidel esines sagedamini IgG tüüpi antikeha reaktsioone valkudega molaarmassi piirkonnades 28-29 kDa, mille antigeenideks võivad olla embrüo implantatsioonil osalevad ja endomeetriumi retseptiivsust määravad valgud EBAF (emaka verejooksudega seotud faktor - *endometrial bleeding associated factor*) (Tabibzadeh jt., 2000) ja glükodeliin A (Koistinen jt., 2003). IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas ca 21 kDa võivad aga olla suunatud kortikotropiini vabastajahormooni vastu, mis on põletikuprotsesside mediaator ning võib läbi oma immunomodulaatorse toime mõjutada ovulatsiooni, implantatsiooni või varajast emapoolset tolerantsi (Kalantaridou jt., 2007).

Lisaks detekteeriti tubaarse viljatusega uuritavate seerumis sagedamini IgA tüüpi antikeha reaktsioone valkudega molaarmassi piirkonnas ca 16 kDa, mis võib sisaldada leptiini. Viimase produktsiooni tõstavad infektsioon ja põletikulised protsessid (Fantuzzi ja Faggioni, 2000), mis ongi just iseloomulikud selle haiguse patogeneesile (Edelstam jt., 1991).

7.2. Anti-endometriaalsete autoantikehade võimalikust tähendusest IVF ravi korral

Käesolevas töös leidsime endometriaalseid autoantikehi, mille esinemine oli seotud raseduse tõenäosuse vähenemisega. Samas saime mitmete antikehade reaktsioonidega hoopiski vastupidise seose. Kuna käesoleva uurimustöö näol on tegemist esialgse eksperimentaalse lähenemisviisiga, ei identifitseeritud täpsemalt neid antikehi, mis olid seotud raseduse tõenäosuse suurenemisega ning seetõttu on siinkohal raske arendada nende tulemuste sisulist diskussiooni. Üheks võimalikuks seletuseks oleks aga kommenteerida neid tulemusi läbi autoantikehade erinevate toimete – kirjeldatud on nii blokeerivat kui ka stimuleerivat toimet (Schott jt., 2005). Antikehade seondumine retseptorile võib takistada molekuli funktsiooni (Sato jt., 2003). Viljatuse lähtekohast, inhibeerides või blokeerides reproduktsooniks vajalikke molekule, näiteks emaka retseptiivsust määravaid faktoreid, võib see vähendada viljakust neil patsientidel. Reznik jt. (1998) uurisid IgG FSH blokeerivate antikehade esinemist IVF embrüo siirdamisel ja leidsid, et 85%-l patsientidest, kellel protseduur õnnestus, detekteeriti seerumis just FSH retseptorit blokeerivaid antikehi. Sealjuures esines ebaõnnestunud IVF tsükliga naistel vastavaid antikehi vaid 7%-l. Antikehade aktiveeriv toime võib avalduda teatud rakkudega seondumise järgselt neis rakkudes geeniekspressiooni muutmise läbi (Ishibashi jt., 2001). Lunardi jt. (2007) näitasid, et antikehad olid võimelised stimuleerima endoteeli rakkudes geenide ekspressiooni, mis kodeerivad adhesiooni molekule, kemokiine ja immuunvastuses ning põletiku protsessides osalevaid molekule. Sama toimega faktorid on olulised ka endometrioosi puhul ning on näidatud nende faktorite muutunud ekspressiooni selle haiguse korral (Mettler jt., 2007).

Lähtudes eespool toodud näidetest, kus antikehad võivad inhibeerida või aktiveerida valgu funktsiooni, on loogiline, et käesolevas töös ei leitud seoseid AEA vastaste üldreaktsioonide ja ravitulemuste vahel. Küll aga näitasime seoseid konkreetseid reaktsioonide piirkondi eraldi vaadeldes. Raseduse tõenäosust vähendava efektiga olid IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas 100-110 kDa. Siinkohal võib antigeeniks olla kalpastiin - kalpapiinide endogeenne inhibiitor, mis osaleb endomeetriumi funktsioonide takistamisel ning omab seeläbi rolli blastotsüsti implantatsioonil (Nozawa jt., 2006). Kalpastiini leidub ka imetajate spermatooside pinnal akrosomaalreaktsiooni piirkonnas, kus see osaleb viljastumisel

olulises akrosomaalreaktsioonis (Koide jt., 2000). Endogeense kalpastatiini vastased antikehad endomeetriumis võivad reageerida ka spermatooside pinnal leiduva kalpastatiiniga, vallandades viimastel enneaegset akrosomaalreaktsiooni, mis muudab spermatoosid munarakuni jõudes viljastamisvõimeetuks. Selle toime tõttu valiti kalpastatiinile vastav antikeha reaktsioonide piirkond täpsemaks identifitseerimiseks. Kasutatud kalpastatiini vastane monoklonaalne antikeha andis endomeetriumi homogenaadil reaktsioone oodatud molaarmassi piirkonnades (150, 125 ja 90 kDa) ning need reaktsioonid langesid kokku kalpastatiini suhtes arvatavalt positiivse seerumi reaktsioonidega. Need tulemused annavad alust oletusele, et endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientide seerumis esineb kalpastatiinide vastaseid antikehi, mis on seotud halvemate IVF ravitulemustega neil patsientidel.

Teiseks võimalikuks antigeeniks selles piirkonnas on juba eelpool mainitud GP130, mis IL-6 toimet modifitseerides võib lisaks endometrioosi patogeneesis osalemisele mõjutada ka reproduktsiooni, kuna IL-6 on embrüotoksiline, inhibeerib blastotsüstide implanteerumist, mõjutab follikulogeneesi ja ovariaalsete steroidide tootmist. Veelgi enam, IL-6 kompleks lahustuva IL-6 retseptoriga võib seostuda GP130-ga ning omandada seeläbi spermatooside liikumist inhibeeriva toime (Yoshida, 2004).

Raseduse tõenäosuse vähenemisega olid seotud antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas 47 kDa, mis tõenäoliselt tähendavad α -enolaasi vastaseid antikehi. See seos oli teiseks põhjuseks, miks mainitud piirkond valiti täpsemaks molekulaarseks identifitseerimiseks. Kasutades α -enolaasi vastast polükloonaalset antikeha detekteeriti endomeetriumi täishomogenaadil reaktsioon oodatud piirkonnas, mis langes kokku ka α -enolaasi suhtes arvatavalt positiivse seerumi reaktsiooni molaarmassiga. Seega on tõenäoline, et käesolevas töös uuritud naiste seerumis esinevad α -enolaasi vastased antikehad, mis võivad olla seotud neil patsientidel esineva viljatuse patogeneesiga.

IgG tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas ca 40 kDa võivad tähendada antikehi haptoglobiini vastu. Viimane võib reproduktsioonis osaleda mitmeti: muutes emaka mikrokeskkonda läbi immunomodulatoorse toime, omades rolli implantatsiooni protsessides (diskuteeritud Bottini jt., 1999) või osaledes angiogeneesi protsessides (Sharpe-Timms, 2001). On diskuteeritud haptoglobiini erinevate genotüüpide seosest viljakusega. Oma töös näitasid Bottini jt. (1999), et haptoglobiini genotüüp 1/1, mille korral eristuvad antigeeni reaktsioonid molaarmassiga 18 ja 22 kDa,

on seotud suurema viljakusega kui genotüüp 2/2, mille puhul on nähtav vaid üks 22 kDa reaktsioon. Huvitav on see, et ka käesolevas töös võis näha sarnast seost, küll vaid tendentsiga, kus ca 22 kDa vastased IgG tüüpi antikeha reaktsioonid olid seotud raseduse tõenäosuse vähenemisega, samas kui ca 18 kDa vastased IgG tüüpi antikeha reaktsioonid olid seotud raseduse tõenäosuse suurenemisega (tabel 7). Kuna käesolevas töös immunoblotmeetodil kasutatud molaarmassi markerid ei võimalda molaarmasse nii täpselt eristada, annab kasutatud analüüsi meetod antikeha reaktsioonidele absoluutsete molaarmasside asemel pigem nende piirkonnad. Seetõttu ei saa me siinkohal nende tulemuste kohta täpsemaid järeldusi teha. Berkova jt. (1997) leidsid, et haptoglobiinile vastavates antigeeni piirkondades esines endometrioosihaigetel vähem antikeha reaktsioone kui viljakail kontrollgrupi uuritavatel ning nad seostasid nende antikehade esinemist viljatusega. Käesolevas töös olid mõlema haigusgrupi patsiendid viljatud ning antikehadega reageerinud valkude mainitud molaarmassi piirkondades saavutati statistiliselt oluline vahe võrdlusgruppide vahel vaid IgA tüüpi reaktsioone hinnates. Haptoglobiini sarnaste valkude vastaste antikehade esinemist tubaarse viljatusega patsientidel pole teadaolevalt seni veel uuritud.

Viljatusega võivad olla seotud ka IGFBP, mis võivad mõjutada follikulogeneesi (Adashi, 1998) või osaleda munaraku viljastamiseks soodsa keskkonna loomisel munajuhades (Jin ja Wang, 2001). Käesolevas töös detekteeritud IgA tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkonnas ca 32 kDa võivad olla suunatud IGFBP PAPP-A (rasedusega seotud platsenta proteiin A - *pregnancy associated placental protein A*) vastu, mis osaleb folliikulite küpsemises (Wang jt., 2006). IgG tüüpi antikeha reaktsioonide üheks antigeeniks valkude molaarmassi piirkonnas 28-29 kDa võib olla EBAF, mida peetakse mitteretseptiivse emaka üheks markeriks ning leitakse viljatutel patsientidel võrreldes viljakate naistega oluliselt sagedamini (Tabibzadeh jt., 2000). Lisaks võib vastava piirkonna antigeeniks olla ka glükodeliin A, mis võib mõjutada spermatooside seondumist munarakuga (Koistinen jt., 2003), olla läbi immunosupressiivses toime (surub alla emapoolset immunoloogilist reaktsiooni loote suhtes) seotud viljatust põhjustavate mehhanismidega (Mishan-Eisenberg jt., 2004). Glükodeliin A puhul on diskuteeritud selle kasutamisest patsiendi viljakuse taseme mõõtmiseks pärast kontrollitud ovariaalset hüperstimulatsiooni IVF protseduuri korral (Westergaard jt., 2004). Nende kaalutluste alusel valiti glükodeliin A-le vastav antikehadega reageerinud homogenaadi valkude molaarmassi piirkond täpsemaks identifitseerimiseks monoklonaalsete antikehadega. Oodatav glükodeliin A reaktsioon

langes aga kokku kõigil ribadel esinenud mittespetsiifilise reaktsiooniga, mistõttu võis glükodeliin A vastane reaktsioon küll olemas olla, kuid me ei saanud seda eristada. Tõenäoliselt kajastavad need mittespetsiifilised reaktsioonid homogenaadi endogeense IgG ahelate komponentide vastu suunatud antikeha reaktsioone, kuna samas piirkonnas võis reaktsioone näha ka taustreaktsioonide kontrollribal, mida oli inkubeeritud vaid IgG-vastase sekundaarse antikehaga. Glükodeliin A vastaste antikeha reaktsioonide detekteerimiseks on seetõttu sobilikumad teised meetodid, näiteks kahedimensionaalne immunoblotanalüüs.

IgA tüüpi antikeha reaktsioonid valkudega molaarmassi piirkondades ca 14 ja ca 16 kDa võivad olla suunatud vastavalt greliini ja leptiini vastu, mis võivad osaleda emaka ja embrüo vahelistes immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismides ja implantatsiooniprotsessides. On näidatud, et leptiin soodustab neid protsesse, greliin aga inhibeerib (diskuteeritud Budak jt., 2006).

Kokkuvõttes hinnati käesoleva töö eksperimentaalse osa tulemusena immunoblotmeetodil endomeetriumi täishomogenaadil esinevaid AEA reaktsioone võrdlevalt kahe lokaalse ja süsteemse immuunsüsteemi häirega haiguse korral - endometrioosi ja tubaarse infertiilsusega patsientidel. Saadud tulemus, et sarnaselt endometrioosihaigetele esines ka tubaarse infertiilsusega patsientidel sagedasti või kohati isegi rohkem autoantikehi, on üllatav ning viitab mõlemal patsientide grupil esinevale immuunsüsteemi regulatsiooni mehhanismide kõrvalekalletele. Neil uuritavatel esinevaid antikehi on seostatud mainitud haiguste patogeneesi või neil patsientidel esineva viljatusega, millele viitab ka käesolevas töös läbi viidud analüüs endometriaalsete antigeenide vastaste antikehade esinemise seostest IVF ravitulemustega. Lisaks viitavad käesolevas töös saadud tulemused endomeetriumi mikrokeskkonna muutuste olulisusele tubaarse viljatuse korral, aidates seletada neil patsientidel esinevaid oodatust halvemaid IVF ravitulemusi võrreldes teiste viljatuse põhjustega.

Need tulemused andsid edasiseks tööks mitmeid hüpoteese ja uurimussuundi. Selleks, et paremini mõista nende haiguste patogeneesi ja neil patsientidel esinevat viljatust mõjutavaid lokaalseid protsesse, on tarvis täpsemalt identifitseerida neis protsessides osalevaid antigeene ja nendevastaseid antikehi. Seega õigustavad käesoleva töö tulemused endometrioosi ja tubaarse viljatusega patsientidel edasisi autoantikehade

uuringuid, detekteerimaks näiteks autoantikehi vahetult endomeetriumi sekreedis või *in vivo* kasvatatud endomeetriumi rakkudel, ning leitud autoantikehade täpsemat identifitseerimist näiteks kahedimensionaalsel geelelektroforeesil.

8. KOKKUVÕTE

Reproduktiivse funktsiooni häired käivad tihtipeale käsikäes immuunsüsteemi kõrvalekalletega, kuid siiani on selles palju ebaselget ning tagajärg-põhjuslik seos kinnitamata. Autoimmuunseid mehhanisme ja suurenenud autoantikehade produktsiooni esineb erineva põhjusega infertiilsuse korral, seejuures tunduvalt sagedamini kehavälise viljastamise (IVF) protseduuri läbivate patsientide hulgas.

Käesoleva dissertatsiooni eksperimentaalses osas detekteeritud IgG tüüpi organ-spetsiifilised ja organ-spetsiifikata üldautoantikehad esinesid sagedasti nii endometrioosi kui ka tubaarse infertiilsusega patsientidel. Üksikute antikehadest esines endometrioosigaistel siiski oluliselt rohkem ANA ja β 2-GPI vastaseid antikehi. Ka gradientgeeliga immunoblotmeetodil tuvastatud endometriaalsete antigeenide (molaarmassi vahemikus 10-200 kDa) vastaseid IgG ja IgA tüüpi antikehi esines sagedasti mõlemas uuritavate grupis. Endometriaalsete valkude konkreetsete molaarmassi piirkondadega reageerinud AEA reaktsioonide sagedused erinesid grupiti. IgG tüüpi üldautoantikehade esinemine oli positiivselt seotud IgG ning IgA tüüpi AEA esinemisega ning positiivselt oli omavahel seotud ka IgG ja IgA tüüpi AEA esinemine. Erinevad AEA reaktsioonid olid seotud nii halvemate kui ka paremate IVF ravitulemustega, mida hinnati ultrahelis kinnitatud raseduse abil. Kasutades monoklonaalseid antikehi õnnestus täpsemalt identifitseerida kalpastatiini ja α -enolaasi vastu suunatud autoantikehad, mille esinemine oli seotud halvemate IVF ravitulemustega.

Uuringu tulemused kinnitavad, et viljatutel endometrioosi ja tubaarse infertiilsusega patsientidel esineb kõrvalekaldeid immuunsüsteemi regulatsioonis ning detekteeritud autoantikehad võivad olla seotud neil esineva infertiilsuse patogeneesiga. Käesoleva uurimistööga on loodud alus edasisteks täpsemateks uuringuteks selles vallas, et lõpptulemusena paremini mõista viljatuse põhjuste etiopatogeneesi ning sellest tulenevalt muuta edaspidist viljatuse ravi efektiivsemaks.

9. SUMMARY

Human reproductive failure is often associated with immunological abnormalities, but a cause or consequence relationship still has to be established. Autoimmune mechanisms and increased production of autoantibodies have been detected in infertility patients of many causes, especially in those who are undergoing IVF treatment.

The aims of present study were: to detect and compare the prevalence of common IgG (using IIF and ELISA) and anti-endometrial IgG and IgA antibodies (AEA) (using SDS-PAGE and immunoblotting) in sera of endometriosis and tubal factor infertility patients. Secondly, to evaluate associations between common antibodies and AEA and thirdly, to also evaluate the association of detected AEA with IVF treatment results and identify some of the antigens.

Our experiments showed that detected common IgG antibodies were frequent in both study groups, but the incidence in endometriosis patients was much higher, especially when ANA and β 2-GPI antibody positivity levels were measured. Immunoblot analyses of study groups' sera with endometrial extracts demonstrated the presence of IgG and IgA type AEA to antigens with molecular weight range of 10-200 kDa. Our analyses showed a difference in positive antibody reaction frequencies to different proteins between endometriosis and tubal factor infertility patients. The prevalence of common IgG type antibodies was positively correlated with the prevalence of IgG or IgA AEA. Also the prevalence of different types of AEA (IgG and IgA) was positively correlated. Certain AEA were associated with IVF pregnancy failure. There were also some AEA that were associated with positive pregnancy outcome. Analyses with antibodies directed against calpastatine, glycodelin-A, GP130, survivine (all monoclonal antibodies) and ENO1 (polyclonal antibody) showed binding with calpastatine and ENO1 indicating the presence of these antigens in the endometrial extracts. The presence of corresponding antibodies were associated with IVF pregnancy failure.

The results of this study demonstrate activation of humoral immune system in infertile endometriosis and tubal factor patients and a possible association of detected antibodies in the aetiology of infertility. Further studies in this field would be necessary for a better understanding of infertility etiopathogenesis and therefore for improved infertility treatment options.

10. TÄNUAVALDUSED

Töö on valminud Tartu Ülikooli Üld- ja molekulaarpatoloogia instituudis immunoloogia uurimisgrupis ajavahemikul 2005. kuni 2007. aasta. Uurimustööd toetati järgmistest allikatest: grandid nr ETF6585 ja ETF6514 ning sihtfinantseeritav teadusteema SF0182586s03. Töös kasutatud uuritav materjal ja kliinilised andmed pärinesid Nova Vita Kliiniku – Lastetuse ravi ja meditsiinigeneetiliste uuringute keskusest.

Suure abi eest käesoleva töö valmimisel soovin eelkõige tänada oma juhendajaid Kadri Hallerit ja professor Raivo Uibot asjakohaste nõuannete, kannatliku meele ja võimaluse eest tegeleda huvitava projektiga. Lisaks soovin tänada kaasautoreid ja kolleege Andres Salumetsa, Kaupo Teesalu ja Ija Taljat, kes olid abiks katsete planeerimisel ja tulemuste analüüsimisel. Tänuõnad ka Nova Vita Kliiniku spetsialistidele Elle Talvingule, Peeter Karitsale ja Kaie Rohtlale patsientide kliinilise uurimise ning uuritava materjali kogumise eest. Veel soovin tänada tervet immunoloogia õppegruppi, eriti Maire Linki ning peret ja sõpru abi ja toetuse eest.

11. KIRJANDUSE LOETELU

- Adashi, E. Y. (1998). The IGF family and folliculogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 39: 13-19.
- Al-Azemi, M., Bernal, A.L., Steele, J., Gramsbergen, I., Barlow, D., Kennedy, S. (2000). Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum. Reprod.* 15: 72-75.
- American Society for Reproductive Medicine (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil. Steril.* 67: 817-821.
- Beagley, K.W., Gockel, C.M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:13-22.
- Berkova, N., Lemay, A., De Grandpre, P., Goupil, S., Maheux, R. (1997). Immunoblot detection of decreased antibodies to haptoglobin-like protein in the serum of infertile women with or without endometriosis. *Biol. Reprod.* 57: 178-185.
- Bontis, J.N., Theodoridis, T.D. (2006). Laparoscopic management of hydrosalpinx. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092: 199-210.
- Bottini, N., Gimelfarb, A., Gloria-Bottini, F., La Torre, M., Lucarelli, P., Lucarini, N. (1999). Haptoglobin genotype and natural fertility in humans. *Fertil. Steril.* 72: 293-296.
- Brunham, R.C., Rey-Ladino, J. (2005). Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 149-161.
- Budak, E., Fernández Sánchez, M., Bellver, J., Cerveró, A., Simón, C., Pellicer, A. (2006). Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil. Steril.* 85: 1563-1581.
- Burns, W.N., Schenken, R.S. (1999). Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin. Obstet. Gynecol.* 42: 586-610.
- Candolfi, E., Pastor, R., Huber, R., Filisetti, D., Villard, O. (2007). IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 83-88.
- Choudhury, S.R., Knapp, L.A. (2001). Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum. Reprod. Update.* 7: 113-134.

- Collette, T., Maheux, R., Mailloux, J., Akoum, A. (2006). Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 21: 3059-3067.
- Crosignani, P.G., Rubin, B. (1996). Guidelines to the prevalence, diagnosis and management of infertility. *Hum. Reprod.* 11: 1775-1807.
- Debattista, J., Gazzard, C.M., Wood, R.N., Allan, J.A., Allan, J.M., Scarman, A., Mortlock, M., Timms, P., Knox, C.L. (2004). Interaction of microbiology and pathology in women undergoing investigations for infertility. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 12: 135–145.
- D'Hooghe, T.M., Kyama, C., Debrock, S., Meuleman, C., Mwenda, J.M. (2004). Future directions in endometriosis research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034: 316-325.
- Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Nisolle, M. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum. Reprod.* 13: 1686-1690.
- Edi-Osagie, E.C., Seif, M.W., Aplin, J.D., Jones, C.J., Wilson, G., Lieberman, B.A. (2004). Characterizing the endometrium in unexplained and tubal factor infertility: a multiparametric investigation. *Fertil. Steril.* 82: 1379-1389.
- Esfandiari, N., Ai, J., Nazemian, Z., Javed, M.H., Gotlieb, L., Casper, R.F. (2007). Expression of glycodelin and cyclooxygenase-2 in human endometrial tissue following three- dimensional culture. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57: 49-54.
- Fantuzzi, G., Faggioni, R. (2000). Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 68: 437-446.
- Fernández-Shaw, S., Hicks, B.R., Yudkin, P.L., Kennedy, S., Barlow, D.H., Starkey, P.M. (1993). Anti-endometrial and anti-endothelial auto-antibodies in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 8: 310-315.
- Forti, G., Krausz, C. (1998). Clinical review 100 Evaluation and treatment of the infertile couple. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 4177-4188.
- Garcia-Velasco, J.A., Arici, A. (2003). Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis. *Semin. Reprod. Med.* 21: 165-172.
- Geva, E., Amit, A., Lerner-Geva, L., Lessing, J.B. (1997a). Autoimmunity and reproduction. *Fertil. Steril.* 67: 599-611.
- Geva, E., Lessing, J.B., Lerner-Geva, L., Azem, F., Yovel, I., Amit, A. (1997b). The presence of antithyroid antibodies in euthyroid patients with unexplained infertility and tubal obstruction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37: 184-186.

- Gleicher, N., El-Roeiy, A., Confino, E., Friberg, J. (1989). Reproductive failure because of autoantibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160: 1376-1380.
- Gleicher, N. (1998). Autoantibodies in infertility: current opinion. *Hum. Reprod. Update.* 4: 169-176.
- Gleicher, N., Vidali, A., Karande, V. (2002). The immunological “Wars of the Roses”: disagreements amongst reproductive immunologists. *Hum. Reprod.* 17: 539-542.
- Goldman, M.B., Cramer, D.W. (1990). The epidemiology of endometriosis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 323: 15-31.
- Gregorio, G.V., Choudhuri, K., Ma, Y., Pensati, P., Iorio, R., Grant, P., Garson, J., Bogdanos, D.P., Vegnente, A., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. (2003). Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 133: 404-413.
- Guaschino, S., De Seta, F. (2000). Update on Chlamydia trachomatis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 900: 293-300.
- Habib, A., Martinuzzo, M.E., Carreras, L.O., Levy-Toledano, S., Maclouf, J. (1995). Increased expression of inducible cyclooxygenase-2 in human endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Thromb. Haemost.* 74: 770-777.
- Halis, G., Arici, A. (2004). Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034: 300-315.
- Haller, K., Mathieu, C., Rull, K., Matt, K., Bene, M.C., Uibo, R. (2005). IgG, IgA and IgM antibodies against FSH: serological markers of pathogenic autoimmunity or of normal immunoregulation? *Am. J. Reprod. Immunol.* 54: 262-269.
- Haller, K., Sarapik, A., Talja, I., Salumets, A., Uibo, R. (2006). Controlled ovarian hyperstimulation changes the prevalence of serum autoantibodies in in vitro fertilization patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 56: 364-370.
- Haller, K., Salumets, A., Grigorova, M., Talja, I., Salur, L., Bene, M.C., Laan, M., Uibo, R. (2007). Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on in vitro fertilization patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57: 193-200.
- Hu, J., Spencer, T.E. (2005). Carbonic anhydrase regulate endometrial gland

- development in the neonatal uterus. *Biol. Reprod.* 73: 131-138.
- Ishibashi, Y., Ito, H., Seyama, Y., Kubota, S. (2001). Anti- α 2 integrin antibody induces secretion and activation of 72-kDa progelatinase by human fibroblasts. *IUBMB Life.* 51: 25-31.
- Ishii, K., Takakuwa, K., Mitsui, T., Kenichi, T. (2002). Studies on the human leukocyte antigen-DR in patients with endometriosis: genotyping with HLA-DRB1 alleles. *Hum. Reprod.* 17: 560-563.
- Ishii, K., Takaeue, K., Kashima, K., Tamura, M., Tamaka, K. (2003). Associations between patients with endometriosis and HLA class II, the analysis of HLA-DPB1 genotypes. *Hum. Reprod.* 18: 985-989.
- Janssen, O.E., Mehlmauer, N., Hahn, S., Öffner, A.H., Gärtner, R. (2004). High prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 150: 363-369.
- Jin, H.Y., Wang, Z.N. (2001). Insulin-like growth factors and their receptors in human fallopian tube in reproductive-age women. *Fertil. Steril.* 75: 1037-1038.
- Kalantaridou, S.N., Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Godoy, H., Chrousos, G.P. (2007). The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Horm. Metab. Res.* 39: 474-477.
- Kiechle, F.L., Quattrociochi-Longe, T.M., Brinton, D.A. (1994). Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 101: 611-615.
- Kikuchi, K., Shibahara, H., Hirano, Y., Kohno, T., Hirashima, C., Suzuki, T., Takamizawa, S., Suzuki, M. (2003). Antinuclear antibody reduces the pregnancy rate in the first IVF-ET treatment cycle but not the cumulative pregnancy rate without specific medication. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50: 363-367.
- Koide, S.S., Wang, L., Kamada, M. (2000). Antisperm antibodies associated with infertility: properties and encoding genes of target antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224: 123-132.
- Koistinen, H., Easton, R.L., Chiu, P.C., Chalabi, S., Halttunen, M., Dell, A., Morris, H.R., Yeung, W.S., Seppala, M., Koistinen, R. (2003). Differences in glycosylation and sperm-egg binding inhibition of pregnancy-related glycodefin. *Biol. Reprod.* 69: 1545-1551.
- Koshiyama, M., Konishi, I., Nanbu, K., Nanbu, Y., Mandai, M., Komatsu, T.,

- Yamamoto, S., Mori, T., Fujii, S. (1995). Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1106-1112.
- Kyama, C.M., Debrock, S., Mwenda, J.M., D'Hooghe, T.M. (2003). Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 123.
- Land, J.A., Evers, J.L. (2002). Chlamydia infection and subfertility. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 16: 901-912.
- Lang, G.A., Yeaman, G.R. (2001). Autoantibodies in endometriosis sera recognize a Thomsen-Friedenreich-like carbohydrate antigen. *J. Autoimmun.* 16: 151-161.
- Leng, J.H., Lang, J.H., Dai, Y., Li, H.J., Li, X.Y. (2007). Relationship between pain symptoms and clinico-pathological features of pelvic endometriosis. *Zhonghua. Fu Chan Ke Za Zhi* 42: 165-168.
- Luborsky, J. (2002). Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies. *J. Womens. Health. Gend. Based. Med.* 11: 585-599.
- Lunardi, C., Dolcino, M., Peterlana, D., Bason, C., Navone, R., Tamassia, N., Tinazzi, E., Beri, R., Corrocher, R., Puccetti, A. (2007). Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. *PLoS ONE.* 2: 473.
- Mahnke, J.L., Dawood, M.Y., Huang, J.C. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 73: 166-170.
- Mathur, S., Butler, W.J., Chihal, H.J., Isaacson, K.B., Gleicher, N. (1995). Target antigen(s) in endometrial autoimmunity of endometriosis. *Autoimmunity.* 20: 211-222.
- Mecacci, F., Parretti, E., Cioni, R., Lucchetti, R., Magrini, A., La Torre, P., Mignosa, M., Acanfora, L., Mello, G. (2000). Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 46: 39-50.
- Mettler, L., Salmassi, A., Schollmeyer, T., Schmutzler, A.G., Pungel, F., Jonat, W. (2007). Comparison of c-DNA microarray analysis of gene expression between

- eutopic endometrium and ectopic endometrium (endometriosis). *J. Assist. Reprod. Genet.* 24: 249-258.
- Mishan-Eisenberg, G., Borovsky, Z., Weber, M.C., Gazit, R., Tykocinski, M.L., Rachmilewitz, J. (2004). Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J. Immunol.* 173: 5524-5530.
- Moghissi, K.S. (1999). Medical treatment of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 42: 620-632.
- Monnier-Barbarino, P., Forges, T., Faure, G.C., Bene, M.C. (2005). Gonadal antibodies interfering with female reproduction. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19: 135-148.
- Murphy, A.A. (2004). Clinical aspects of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955: 1-10.
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G.D., Taga, T., Kishimoto, T. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood.* 82: 1120-1126.
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z., Witkin, S.S. (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 6: 149-159.
- Norman, R.J., Dewailly, D., Legro, R.S., Hickey, T.E. (2007). Polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 370: 685-697.
- Nozawa1, K., Ozaki1, Y., Guto1, S., Nakanishi1, T., Aoyama, K., Ogasawara, M.S. (2006). Cleavage of integrin by calpain in patients with recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* 55: 402.
- Novosad, J.A., Kalantaridou, S.N., Tong, Z.B., Nelson, L.M. (2003). Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. *BMC Women's Health.* 3: 2.
- Palacio, J.R., Iborra, A., Gris, J.M., Andolz, P., Martinez, P. (1997). Anti-endometrial autoantibodies in women with a diagnosis of infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38: 100-105.
- Parks, W.C., Wilson, C.L., Lopez-Boado, Y.S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617-

- Pillai, S., Zhou, G.X., Arnaud, P., Jiang, H., Butler, W.J., Zhang, H. (1996). Antibodies to endometrial transferrin and alpha 2-Heremans Schmidt (HS) glycoprotein in patients with endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35: 483-494.
- Putowski, L., Darmochwal-Kolarz, D., Rolinski, J., Oleszczuk, J., Jakowicki, J. (2004). The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure (preliminary study). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 112: 192-196.
- Redwine, D.B. (1999). Ovarian endometriosis: a marker for more extensive pelvic and intestinal disease. *Fertil. Steril.* 72: 310-315.
- Reimand, K., Talja, I., Metsküla, K., Kadastik, Ü., Matt, K., Uibo, R. (2001). Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J. Reprod. Med.* 51: 167-176.
- Reznik, Y., Benhaim, A., Morello, R., Herlicoviez, M., Ballet, J.J., Mahoudeau, J. (1998). High frequency of IgG antagonizing follicle-stimulating hormone-stimulated steroidogenesis in infertile women with a good response to exogenous gonadotropins. *Fertil. Steril.* 69: 46-52.
- Richardson, B. (2007). Primer: epigenetics of autoimmunity. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3: 521-527.
- Runesson, E., Ivarsson, K., Janson, P.O., Brannstrom, M. (2000). Gonadotropin- and cytokine-regulated expression of the chemokine interleukin 8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 4387-4395.
- Salumets, A., Suikkari, A.-M., Möls, T., Söderström-Anttila, V., Tuuri, T. (2002). Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development. *Fertil. Steril.* 78: 1082-1087.
- Sato, S., Hayakawa, I., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K. (2003). Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* 120: 542-547.
- Schott, M., Scherbaum, W.A., Morgenthaler, N.G. (2005). Thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease. *Trends. Endocrinol. Metab.* 16: 243-248.
- Seery, J.P. (2006). Endometriosis associated with defective handling of apoptotic cells in the female genital tract is a major cause of autoimmune disease in women. *Med. Hypotheses.* 66: 945-949.

- Seracchioli, R., Trevisi, M.R., Ferlini, F., Petracchi, S., Colombi, C., Borini, A., Balicchia, B., Porcu, E. (1997). Laparoscopic surgery and assisted reproductive techniques. Combined strategies of therapy in infertile women. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 26: 316-325.
- Sharpe-Timms, K.L. (2001). Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 943: 131-147.
- Szylo, K., Tchorzewski, H., Banasik, M., Glowacka, E., Lewkowicz, P., Kamber-Bartosinska, A. (2003). The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators. Inflamm.* 12: 131-138.
- Stern, C., Chamley, L., Hale, L., Kloss, M., Speirs, A., Baker, H.W. (1998). Antibodies to beta2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study. *Fertil. Steril.* 70: 938-944.
- Suginami, H. (1991). A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 214-218.
- Sundblad, V., Bussmann, L., Chiauzzi, V.A., Pancholi, V., Charreau, E.H. (2006). Alpha-enolase: a novel autoantigen in patients with premature ovarian failure. *Clin. Endocrinol.* 65: 745-751.
- Zhou, X.L., Lei, Z.M., Rao, C.V. (1999). Treatment of human endometrial gland epithelial cells with chorionic gonadotropin/luteinizing hormone increases the expression of the cyclooxygenase-2 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3364-3377.
- Tabibzadeh, S., Broome, J. (1999). Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7: 5-9.
- Tabibzadeh, S., Mason, J.M., Shea, W., Cai, Y., Murray, M.J., Lessey, B. (2000). Dysregulated expression of ebf, a novel molecular defect in the endometria of patients with infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2526-2536.
- Taskin, O., Giudice, L., Mangal, R., Dunn, R.C., Dsupin, B.A., Poindexter, A.N., Wiehle, R.D. (1996). Insulin-like growth factor binding proteins in peritoneal fluid of women with minimal and mild endometriosis. *Hum. Reprod.* 11: 1741-1746.
- Terrier, B., Degand, N., Guilpain, P., Servettaz, A., Guillevin, L., Mouthon, L.

- (2007). Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 6: 176-182.
- The ESHRE Capri Workshop Group (2002). Physiopathological determinants of human infertility. *Hum. Reprod. Update.* 8: 435-447.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2004). Endometriosis and infertility. *Fertil. Steril.* 81: 1441-1446.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2006a). The role of tubal reconstructive surgery in the era of assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 86 (5 Suppl): S31-34.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2006b). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertil. Steril.* 86 (5 Suppl): S41.
- Tsuda, T., Harada, T., Iwabe, T., Tanikawa, M., Nagano, Y., Ito, M., Taniguchi, F., Terakawa, N. (2000). Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil. Steril.* 73: 205-211.
- Ueda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Terai, Y., Kumagai, K., Ueki, K., Kanda, K., Hung, Y.C., Ueki, M. (2002). Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol. Endocrinol.* 16: 391-402.
- Uzan, C., Cortez, A., Dufournet, C., Fauvet, R., Siffroi, J.P., Darai, E. (2004). Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. *Virchows. Arch.* 445: 603-609.
- Uusküla, A., Silm, H., Vessin, T. (1997). Sexually transmitted diseases in Estonia: past and present. *Int. J. STD AIDS.* 8: 446-450.
- Vilksa, S., Tiitinen, A., Hyden-Granskog, C., Hovatta, O. (1999). Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum. Reprod.* 14: 2392-2395
- Vinatier, D., Dufour, P., Oosterlynck, D. (1996). Immunological aspects of endometriosis. *Hum. Reprod. Update.* 2: 371-384.
- Walter, M., Berg, H., Leidenberger, F.A., Schweppe, K.W., Northemann, W. (1995). Autoreactive epitopes within the human alpha-enolase and their recognition by sera from patients with endometriosis. *J. Autoimmun.* 8: 931-945.
- Wang, T.H., Chang, C.L., Wu, H.M., Chiu, Y.M., Chen, C.K., Wang, H.S. (2006). Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and

- IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil. Steril.* 86: 1392-1401.
- Weinzimer, S.A., Gibson, T.B., Collett-Solberg, P.F., Khare, A., Liu, B., Cohen, P. (2001). Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1806-1813.
- Westergaard, L.G., Yding Andersen, C., Erb, K., Laursen, S.B., Rasmussen, P.E., Rex, S., Teisner, B. (2004). Placental protein 14 concentrations in circulation related to hormonal parameters and reproductive outcome in women undergoing IVF/ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 8: 91-98.
- Wheeler, J.M. (1989). Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J. Reprod. Med.* 34: 41-46.
- William, J., Euler, C., Leadbetter, E., Marshak-Rothstein, A., Shlomchik, M.J. (2005). Visualizing the onset and evolution of an autoantibody response in systemic autoimmunity. *J. Immunol.* 174: 6872-6878.
- Witz, C.A. (1999). Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 42: 566-585.
- World Health Organization 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction 4th ed. Cambridge University Press, UK.
- Yeaman, G.R., Collins, J.E., Lang, G.A. (2002). Autoantibody responses to carbohydrate epitopes in endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955: 174-182.
- Yoshida, S., Harada, T., Iwabe, T., Taniguchi, F., Mitsunari, M., Yamauchi, N., Deura, I., Horie, S., Terakawa, N. (2004). A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum. Reprod.* 19: 1821-1825.

LISA

Controlled Ovarian Hyperstimulation Changes the Prevalence of Serum Autoantibodies in *In Vitro* Fertilization Patients

Kadri Haller^{1,2}, Aili Sarapik¹, Ija Talja¹, Andres Salumets^{2,3,4}, Raivo Uibo¹

¹Department of Immunology, Institute of General and Molecular Pathology, Centre of Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia;

²Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tartu, Tartu, Estonia;

³Nova Vita Clinic, Centre for Infertility Treatment and Medical Genetics, Haabneeme, Viimsi County, Harjumaa, Estonia;

⁴Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonian Biocentre, Tartu, Estonia

Keywords

Common autoantibodies, infertility, supraphysiological sex hormone levels

Correspondence

Raivo Uibo, Department of Immunology, Institute of General and Molecular Pathology, Centre of Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Ravila Str. 19, Biomedicum, Tartu 50411, Estonia.
E-mail: raivo.uibo@ut.ee

Submitted 7 July, 2006;
accepted 21 September, 2006.

Citation

Haller K, Sarapik A, Talja I, Salumets A, Uibo R. Controlled ovarian hyperstimulation changes the prevalence of serum autoantibodies in *in vitro* fertilization patients. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56:364–370

doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00438.x

Problem

Autoimmune mechanisms are involved in etiology of female infertility, the medical problem frequently treated by *in vitro* fertilization (IVF). Controlled ovarian hyperstimulation (COH) with supraphysiological levels of sex hormones is achieved by IVF.

Methods of study

Anti-human-ovary and eight common autoantibodies [nuclear (ANA-H, ANA-R on human HEp-2 cell line and rodent antigen, respectively), smooth muscle (SMA), parietal cell, thyroid microsomal, mitochondrial, β 2-glycoprotein-I, cardiolipin antibodies] found in IVF patients ($n = 129$) were analyzed with regard to the number of previous IVF procedures and the age of the patient. The changes in autoimmune reactions caused by the COH were determined.

Results

Endometriosis and polycystic ovary syndrome were associated with a higher number of common serum autoantibodies compared with the tubal factor infertility (Proportion test, $P < 0.05$). ANA-R was associated with unexplained infertility [adjusted odds ratio (aOR) 8.79, $P = 0.038$]. SMA correlated with endometriosis (aOR 37.29, $P = 0.008$), male factor infertility (aOR 20.45, $P = 0.018$) and with the previous IVF procedures (aOR 2.87, $P = 0.013$). There was an overall decrease in the number of detectable autoantibodies after COH (Proportion test, $P < 0.05$).

Conclusion

COH may have a suppressive effect on the humoral immunity by the time of embryo transfer but more conclusive studies are needed.

Introduction

A high prevalence of autoimmune mechanisms responsible for reproductive failure has been demonstrated by others¹ and conformed by us.^{2,3} However, the impact of a particular autoantibody on the path-

ogenesis of infertility is not uniformly understood. Some of the autoantibodies have been associated with certain diseases as patients with endometriosis often possess anti-nuclear (ANA) and anti-smooth muscle autoantibodies (SMA). Ovarian autoantibodies have been associated with premature ovarian

failure, antiphospholipid and thyroid autoantibodies have been associated with recurrent pregnancy loss.^{1,4,5} Some studies suggest lesser importance of specific autoantibodies and stress the key role of overall activation of the immune system in reduced fecundity.⁶

Steroid sex hormones have substantial impact on both development and modulation of the immune system and general susceptibility to autoimmunity. Steroid hormones exert dose and time dependent actions both locally in the tissues in which they are produced and centrally after entering into the circulation.⁷ These hormones modulate immune system after extended administration but also during the menstrual cycle.^{8,9} Additionally, sex hormones are implicated in the immune response with dual effects: estrogens as enhancers of the humoral immunity and androgens and progesterone as immunosuppressors.^{7,8} At physiological level, estradiol and especially its metabolite 16 α -hydroxyestrone, may favor autoimmunity by increasing B cell differentiation and antibody production as well as by activating T cells.⁷ The effect of progesterone on immunoglobulin (Ig) secretion is believed to be mediated by hormonal effects on immunocompetent cells.⁹ Testosterone shifts suppressor/cytotoxic CD4⁻CD8⁺ cells to predominate over the helper CD4⁺CD8⁻ lymphocytes among mature thymocytes.⁸ The altered estradiol/testosterone ratio and peripheral conversion of sex hormones are believed to be pathogenic factors for impaired immunosuppression in several autoimmune diseases.⁷

In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) has become a promising treatment for infertility of many causes. During IVF-ET procedure, multiple follicles are enabled to grow and mature by stimulating the ovaries with the administration of exogenous follicle-stimulating hormone (FSH). This procedure is routinely known as controlled ovarian hyperstimulation (COH). COH is associated with rapid increase of the production of gonadal sex hormones, with the level of estradiol exceeding at least five to 10 times the estradiol level at the luteal stage of spontaneous menstrual cycle.¹⁰ In this context, the COH determines the hormonal and immunological status at which the embryo transfer takes place.

The prospective of the present study was to (i) describe the autoimmune reactions in IVF patients with different causes of infertility and to analyze the results with regard to the number of previous IVF procedures and the age of the patient, and (ii) detect the changes in autoimmune reactions caused by COH.

Materials and methods

Patients

The Ethics Committee of the University of Tartu approved the study and informed consent was obtained from all participants after the nature of the study was explained to them. A total of consecutive 129 infertile patients (mean age 33.0 years, SD = 5.5) undergoing IVF-ET at Nova Vita Clinic between July 2004 and October 2005 were enrolled in the study. The indications for IVF within the study group were as follows: 43.4% ($n = 56$) tubal factor infertility, 22.5% ($n = 29$) male factor infertility, 16.3% ($n = 21$) polycystic ovary syndrome (PCOS), 9.3% ($n = 12$) endometriosis and 8.5% ($n = 11$) unexplained infertility. Patients with other causes of infertility as endometrial hyperplasia, myoma uteri, ovulatory dysfunction, autoimmune diseases (Hashimoto's thyroiditis) or chronic infections were excluded from this study. Among the patients participated, 85 women (65.9%) were about to start their first IVF procedure, 26 (20.2%) had had one, 10 (7.7%) had had two, and eight (6.2%) had had three or more previous IVF procedures. All patients had been suffering from infertility for at least 1 year before entering the study. The pregnancy rate (positive chorionic gonadotropin test) and clinical pregnancy rate per embryo transfer were 40.5% (51/126) and 30.2% (38/126), respectively.

Endometriosis and PCOS were diagnosed as reported previously.³ Tubal factor infertility due to the fallopian tube occlusion was diagnosed either by hysterosalpingography or diagnostic laparoscopy.¹¹ The main cause for tubal occlusion was an episode of infection (pelvic inflammatory disease). Male factor infertility was diagnosed when the woman lacked known reasons for infertility, while her partner experienced decreased semen quality.¹² Unexplained infertility was assumed if the woman lacked any of the abovementioned reasons for infertility and her partner had normal semen quality, but the couple had suffered from infertility for more than a year.

The blood samples were drawn twice from each patient: (1) during the 3–5 days of the patient's spontaneous menstrual cycle before administering gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists/antagonists and starting the COH; and (2) on the day of oocyte retrieval immediately after the COH. The ovarian hormonal stimulation was conducted

according to either the conventional long protocol using GnRH agonists [$n = 7$ (5.4%)], or antagonists [$n = 122$ (94.6%)] protocols and administering recombinant FSH. The levels of serum estradiol, progesterone, and testosterone were measured using chemiluminescence immunoassay (Immulite 2000® station, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Immunological Methods

Stored sera were assayed for the presence of anti-human ovary (AOA) and common autoantibodies: nuclear (ANA-H, ANA-R on human HEp-2 cell line and rodent antigen, respectively), SMA, parietal cell (PCA), thyroid microsomal (TMA) and mitochondrial (AMA) antibodies using the indirect immunofluorescence method as described previously.² The antibody levels were expressed as negative or as positive at lower (1:10) or higher (1:100) titers.

Indirect in-house ELISA was used to detect antibodies against β 2-glycoprotein I² (B2-GPI) and cardiolipin¹³ (ACA). The results were expressed in enzyme-immunological units (EIU). The cut-off values for weak and strong positive result were 10 and 30 EIU for B2-GPI, and 30 and 60 EIU for ACA. All immunological tests are clinically available and have been periodically subjected to external quality assessment by UK NEQAS (Sheffield, UK).

Statistical Analysis

To evaluate the statistical difference between autoantibody levels before and after COH the R 2.3.1 A Language and Environment (Free Software Foundation, Boston, MA, USA) was used for proportion test with continuity correction, Wilcoxon test, paired *t*-test and logistic regression analysis. Patients with tubal factor infertility participated in the study as a reference group. A *P*-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The Patients' Hormonal Profile Before and After COH

The following steroid hormone profiles of patients were recorded during the follicular phase of the spontaneous menstrual cycle (SPC): estradiol (mean $\pm$ SD)

161.1 $\pm$ 117.0 pmol/L, progesterone 1.6 $\pm$ 1.4 nmol/L, and testosterone 1.5 $\pm$ 0.7 nmol/L. The levels of the hormones increased significantly (paired *t*-test, $P < 0.0001$) by the day of the oocyte pick-up (OPU): estradiol 5768.0 $\pm$ 7867.0 pmol/L, progesterone 32.3 $\pm$ 19.1 nmol/L, and testosterone 3.3 $\pm$ 1.9 nmol/L. The levels of estradiol, progesterone and testosterone at SPC were similar in all patient groups (data not shown). The level of estradiol at OPU was significantly higher in PCOS patients compared with the tubal factor infertility group [medians 6533 (from 885 to 45520) pmol/L and 2818 (from 712 to 31130) pmol/L, respectively] (Wilcoxon test, $P = 0.017$). Patients with endometriosis, male factor infertility and unexplained infertility demonstrated similar OPU-estradiol levels as the tubal factor infertility group (data not shown). The levels of progesterone and testosterone at OPU were similar in all patient groups (data not shown).

The Prevalence of Autoantibodies in Different Patient Groups at Early Follicular Phase of Spontaneous Menstrual Cycle

All patients who represented autoantibodies followed the GnRH antagonist protocol (94.6%), while the patients in the GnRH agonist protocol group (5.4%) were negative for all measured autoantibodies. We did not detect any patients positive for AOA or AMA antibodies. In the group of endometriosis and PCOS, there were more patients positive for at least one autoantibody at the lower titer (endometriosis only) and at the higher titer than in the group of the tubal factor infertility (Table I).

To evaluate the putative associations between the certain autoantibodies at SPC and the cause of infertility the logistic regression analysis was used. The logistic regression models for each antibody studied were adjusted by the age and the number of previous IVF procedures. The number of previous IVF cycles was only associated with the higher frequency of 1:10 SMA (adjusted OR 2.87, $P = 0.013$). Higher prevalence of 1:10 SMA was also associated with endometriosis and male factor infertility (adjusted OR 37.29, $P = 0.008$ and 20.45, $P = 0.018$) and showed a tendency to be more frequent in PCOS (adjusted OR 11.19, $P = 0.067$). Additionally, our model revealed higher frequency of ANA-R 1:10 antibodies in unexplained infertility group (adjusted OR 8.79, $P = 0.038$) compared with the tubal factor infertility.

Table I The prevalence of autoantibodies (Ab) in serum obtained during the 3–5 days of the patients' spontaneous menstrual cycles

Infertility group (n)	Ab at lower titer*, n (%; 95% CI)	Proportion test (P-value)	Ab at higher titer**, n (%; 95% CI)	Proportion test (P-value)
Tubal factor (56)	17 (30.4; 19.2–44.3)	Reference	6 (10.7; 4.4–22.6)	Reference
Male factor (29)	11 (37.9; 21.3–57.6)	N.S.	1 (3.4; 0.2–19.6)	N.S.
PCOS (21)	9 (42.9; 22.6–65.6)	N.S.	5 (23.8; 9.11–47.5)	< 0.05
Endometriosis (12)	7 (58.3; 28.6–83.5)	< 0.05	4 (33.3; 11.3–64.6)	< 0.05
Unexplained infertility (11)	4 (36.4; 12.4–68.4)	N.S.	2 (18.2; 3.2–52.2)	N.S.

*Antibody-positivity at the lower titer was assessed by counting the number of positive tests at the following titers: 1:10 for ANA-R, ANA-H, SMA, TMA and PCA or ACA and B2GP I present at least at the weak positive value.

**Antibody-positivity at the higher titer was assessed by counting the number of positive tests at the following titers: 1:100 for ANA-R, SMA, TMA, 1:10 for PCA and 1:40 for ANA-H or highly positive results for ACA and B2GP I autoantibodies.
N.S., statistically not significant ($P > 0.05$).

The Dynamics of Autoantibody Levels During the COH

The increased ANA-R, ANA-H, SMA, TMA and PCA antibody levels after the COH were measured as changes in titers from negative to positive at the lower titer, or from positive at the lower titer to positive at the higher titer. The decrease in antibody levels was assessed by the opposite changes in titers. The increase of ACA and B2GP I levels were assessed in two ways: (i) by changes from negative to weak positive reading, and from weak positive to highly positive reading (comparisons were done using proportion test); and (ii) as a continuous values (comparisons were done using paired t -test). The decrease of ACA and B2GP I levels were detected opposite way to the increase. The levels of SMA, PCA, TMA, ACA and B2-GP I antibodies did not change during the COH. However, the ANA-H level decreased significantly (proportion test between the patients with decreased and increased antibody levels, $P < 0.05$). In comparison, the level of B2-GP I antibody raised during the COH (mean levels $\pm$ SD before and after COH were 2.0 ± 8.4 and 2.3 ± 6.9 EIU, $P = 0.031$, paired t -test), but this change was insufficient to increase the number of tests above the cut-off (proportion test, $P > 0.05$). The same changes in ANA-H and B2-GP I antibody levels were detected for patients studied with only the GnRH antagonist protocol (data not shown).

The Changes in Autoantibodies During the COH

After the COH, we counted patients falling into the following groups: (i) patients with more autoantibodies detected at OPU than at SPC either at lower

or higher titer, representing the phenomenon of antibody-increase after the COH; (ii) patients with unchanged number of detectable autoantibodies after the COH either at lower or at higher titer; or (iii) patients with fewer autoantibodies detected at OPU than at SPC either at lower or at higher titer, representing the phenomenon of antibody-decrease after the COH. The number of patients with increased antibody titer was compared with the number of patients with decreased antibody titer using the proportion test. Our results showed an overall reduction in autoantibodies during the COH, as there were significantly more patients who showed a decrease in detectable autoantibodies after the COH compared with the patients with increased number of autoantibodies (Table II). Same results were obtained for patients following only the GnRH antagonist protocol (data not shown).

Table II The comparison of the frequency of patients showing the increase or the decrease in number of detected autoantibodies (Ab) during the COH

	Patients with increased number of Ab (95% CI) ^a	Patients with decreased number of Ab (95% CI) ^b
Ab at lower titer	9.0% (5.0–15.6)	18.8% (12.7–26.7)*
Ab at higher titer	3.8% (1.4–9.0)	9.8% (5.5–16.5)*

The number of patients was counted for both situations following the COH: ^amore autoantibodies were detected at OPU than at SPC either at lower or higher titer, or ^bfewer autoantibodies were detected at OPU than at SPC either at lower or higher titer.

*Statistically significant difference (proportion test, $P < 0.05$)

Discussion

A large variety of non-organ- and organ-specific autoantibodies are associated with female infertility.^{1,14} Therefore, it has been challenging to look for a particular antibody most strongly associated with certain cause of infertility.^{1,4,5} Concordant with previous studies, we found that a low titer of ANA (detected by rodent antigen substrate) was strongly associated with the unexplained infertility. The association was independent of the age of the patient and the number of previous IVF procedures. Because ANA has been associated with early implantation failure,¹ these antibodies may promote infertility in otherwise clinically healthy woman. We also showed an association between the presence of lower titer SMA and endometriosis and male factor infertility. In addition, SMA was the only antibody in our study which correlated positively with the previous use of IVF procedures in an age-independent fashion. The association between the production of SMA and infertility due to the male factor could not be easily explained. In the group of patients with male factor infertility, unexplained or undetected subfertility of the woman cannot always be ruled out. In addition, there is clear evidence that the production of SMA can be caused by persistent viral infection and these antibodies alter the fallopian tube function.¹ Although we were not aware of any viral infections among our IVF patients one cannot exclude some similarities between the immune system dysregulation in chronic inflammation and endometriosis or repeated IVF procedures. An increase of autoantibodies after repeated IVF attempts has previously been reported.^{14–16}

Rather than the presence of one particular autoantibody, the detection of activation of immune system, in general, can help to predict the patient's fecundity and the outcome of IVF-ET treatment.^{6,17} We analyzed the association between the cause of infertility and the autoimmune reaction, with regard to the number of autoantibodies detected. Our results showed that infertile patients with endometriosis and PCOS were associated with significantly higher number of common serum autoantibodies compared with the women with tubal factor infertility. The higher prevalence of autoantibodies in these patient groups compared with the fertile controls has been demonstrated by many authors.^{2,18–20}

It was somewhat surprising to us, that the number of autoantibodies detected after the COH showed an overall decrease. Of all the autoantibodies studied,

the level of ANA-H decreased, while only the level of B2-GPI increased slightly. Regardless of the high prevalence of autoantibodies in the group of IVF patients¹ and the hazardous effect of anti-ovarian,¹⁴ ANA and antiphospholipid^{1,16} antibodies on embryo as well as on early pregnancy, only a few studies have been conducted so far to explore the effect of COH on the levels of common autoantibodies. Fisch et al.²¹ showed no significant changes in the levels of ANA or ACA during the hormonal stimulation. Similarly, Monnier-Barbarino et al.²² concluded the absence of influence of ovarian stimulation (performed by classical long GnRH agonist protocol) on anti-ovarian autoimmunity. We were not able to compare two protocols used in ovarian stimulation – GnRH antagonists and agonists, because of only seven (5.4%) patients followed the agonist protocol none of whom represented the autoantibodies studied. Thus, our results are restricted to GnRH antagonist protocol only.

The activating effect of estrogens on the humoral immune system has been reported by studying women during menstrual cycles, by evaluating the patients suffering from rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus, and by using animal models.^{7–9} The level of serum estradiol is typically within the physiological range in abovementioned autoimmune diseases⁷ and serum levels used in animal studies were five to 14 times lower than the levels found during pregnancy.^{23–25} However, it has been demonstrated for chronic inflammatory diseases that depending on the concentration, estradiol can exert the opposite effect on immune system.⁷ In our study, the production of estradiol increased rapidly during COH and the levels reached the values of 10 times higher than those at luteal stage of spontaneous menstrual cycle. In addition to the supraphysiological levels of estradiol, the production of immunosuppressive testosterone and progesterone^{7,8} also increased. Therefore, the specific changes in the levels of all three sex hormone associated with COH may explain the decrease in number of autoantibodies detected after the COH.

Although the effect of sex hormones on immune reactions can take place within a short period of time^{9,24} the produced autoantibodies could stay in the circulation for a longer period. The time period for COH in our study was 9–12 days. IgG has a half-life of 7–23 days, depending on the specific subclass.²⁶ However, in case of autoimmunity, the considerable increase in the catabolic rate of IgG

antibodies has been recorded, shortening their expected half-life to less than a third of the normal value.^{27–29} Our data along with the data from literature suggest that COH may have an effect on the humoral immunity by the time of embryo transfer but profound studies are still required to further explore this effect. A question of how these changes in autoimmune reactions caused by COH could be related to the outcome of IVF treatment is the priority of our future studies.

Conclusions

Our results indicate that different forms of infertility are associated with various autoimmune disturbances along with the slight deviations in the profile of autoantibodies. We showed that the ovarian hormonal stimulation and repeatedly performed IVF procedures themselves could conversely modulate the autoimmune reactions. These data suggest that COH may have a suppressive effect on the humoral immunity by the time of embryo transfer but further studies are required.

Acknowledgments

This study was supported by the Estonian Science Foundation (Grants no. 6498 and 6514) and the Estonian Ministry of Education and Science (Core grants no. 0182582Cs03 and 0182586s03). We thank Anu Kaldmaa, Küllike Koppel and Ele Prans from the Department of Immunology of the University of Tartu, Estonia for their skillful laboratory assistance. Heti Pisarev, MSc from Department of Epidemiology and Biostatistics of the University of Tartu, Estonia is greatly appreciated for her advice with statistical analysis. We thank Dr Elle Talving and Dr Peeter Karits from Nova Vita Clinic, Estonia for collecting the patient data. This study was presented at the 16th European Congress of Immunology – ECI, September 6–9, 2006, Paris, France.

References

- Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Lessing JB: Autoimmunity and reproduction. *Fertil Steril* 1997; 67:599–611.
- Reimand K, Talja I, Metsküla K, Kadastik Ü, Matt K, Uibo R: Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2001; 51:167–176.
- Haller K, Mathieu C, Rull K, Matt K, Béné MC, Uibo R: IgG, IgA and IgM antibodies against FSH: serological markers of pathogenic autoimmunity or of normal immunoregulation? *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:262–269.
- Van Voorhis BJ, Stovall DW: Autoantibodies and infertility: a review of the literature. *J Reprod Immunol* 1997; 33:239–256.
- Mecacci F, Parretti E, Cioni R, Lucchetti R, Magrini A, La Torre P, Mignosa M, Acanfora L, Mello G: Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2000; 46:39–50.
- Gleicher N: Antiphospholipid antibodies (aPL) affect *in vitro* fertilization (IVF) outcome. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46:330–331.
- Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Serio B, Straub RH: Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004; 13:635–638.
- Tanriverdi F, Silveira LFG, MacColl GS, Bouloux PMG: The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* 2003; 176:293–304.
- Beagley KW, Gockel CM: Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS. Immunol Med Microbiol* 2003; 38:13–22.
- Orvieto R, Schwartz A, Bar-Hava I, Abir R, Ashkenazi J, La-Marca A, Ben-Rafael Z: Controlled ovarian hyperstimulation - a state of endothelial activation. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:257–260.
- Forti G, Krausz C: Clinical review 100 valuation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4177–4188.
- World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, Cambridge University Press, 1999.
- Khamashta MA, Hughes GRV: Detection and importance of anticardiolipin antibodies. *J Clin Pathol* 1993; 46:104–107.
- Monnier-Barbarino P, Forges T, Béné MC: Gonadal antibodies interfering with female reproduction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19:135–148.
- Birdsall MA, Lockwood GM, Ledger WL, Johnson PM, Chamley LW: Antiphospholipid antibodies in women having in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996; 11:1185–1189.

- 16 Delgado Alves J, Radway-Bright EL, Lee S, Grima B, Hothersall J, Ravirajan CT, Isenberg DA: Antiphospholipid antibodies are induced by *in vitro* fertilization and correlate with paraoxonase activity and total antioxidant capacity of plasma in infertile women. *Lupus* 2005; 14:373–380.
- 17 Ulcova-Gallova Z, Krauz V, Novakova P, Milichovska L, Micanova Z, Bibkova K, Sucha R, Turek J, Balvin M, Rokyta Z: Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:112–117.
- 18 Lucena E, Cubillos J: Immune abnormalities in endometriosis compromising fertility in IVF-ET patients. *J Reprod Med* 1999; 44:458–464.
- 19 Fénichel P, Gobert B, Carré Y, Barbarino-Monnier P, Hiéronimus S: Polycystic ovary syndrome in autoimmune disease. *Lancet* 1999; 353:2210.
- 20 Mathur SP: Autoimmunity in endometriosis: relevance to infertility. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:89–95.
- 21 Fisch B, Rikover Y, Shohat L, Zurgil N, Tadir Y, Ovadia J, Witz IP, Yron I: The relationship between *in vitro* fertilization and naturally occurring antibodies: evidence for increased production of antiphospholipid autoantibodies. *Fertil Steril* 1991; 56:718–724.
- 22 Monnier-Barbarino P, Jouan C, Dubois M, Gobert B, Faure G, Béné MC: Anti-ovarian antibodies and *in vitro* fertilization: cause or consequence? *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31:770–773.
- 23 Ito A, Bebo BF Jr, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, Fyfe-Johnson A, Offner H: Estrogen treatment down-regulates THF- α production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol* 2001; 167:542–552.
- 24 Karpuzoglu-Sahin E, Hissong BD, Ahmed SA: Interferon- γ levels are upregulated by 17- β -estradiol and diethylstilbestrol. *J Reprod Immunol* 2001; 52:113–127.
- 25 Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B: Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 2002; 109:1625–1633.
- 26 Shackelford PG: IgG subclasses: importance in pediatric practice. *Pediatr Rev* 1993; 14:291–296.
- 27 Newkirk MM, Novick J, Stevenson MM, Fournier MJ, Apostolakis P: Differential clearance of glycoforms of IgG in normal and autoimmune-prone mice. *Clin Exp Immunol* 1996; 106:259–264.
- 28 Ogushi F, Tani K, Endo T, Tada H, Kawano T, Asano T, Huang L, Ohmoto Y, Muraguchi M, Moriguchi H, Sone S: Autoantibodies to IL-1 α in sera from rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Invest* 2001; 48:181–189.
- 29 Zhou J, Pop LM, Ghetie V: Hypercatabolism of IgG in mice with lupus-like syndrome. *Lupus* 2005; 14:458–466.