

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АКУШЕРСТВА,
ГИНЕКОЛОГИИ И РЕПРОДУКТОЛОГИИ ИМЕНИ Д.О.ОТТА»

На правах рукописи

Кривонос Марина Ивановна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННАЯ ПРОФИЛАКТИКА
НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ИСХОДОВ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ЖЕНЩИН
С НАЛИЧИЕМ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Зайнулина М.С.

з.д.н. РФ, доктор медицинских наук, профессор

Сельков С.А.

Санкт-Петербург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	28
1.1 Антифосфолипидный синдром в генезе репродуктивных потерь.....	28
1.2 Роль АФС в неудачных исходах протоколов ВРТ.....	34
1.3 Иммунопатогенез нарушений имплантации и развития ранних репродуктивных потерь у женщин с наличием АФА	39
1.4 Современные подходы к ведению женщин с циркулирующей антифосфолипидных антител при проведении экстракорпорального оплодотворения	43
1.5 Иммунокорректирующая терапия у женщин с АФС при применении ВРТ	50
ГЛАВА 2 КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК	59
2.1 Клиническая характеристика обследованных групп.....	59
2.2 Параметры репродуктивной и менструальной функции	60
2.3 Описание ранее использованных методов ВРТ и причин бесплодия	64
2.4 Структура сопутствующей гинекологической патологии и оперативных вмешательств в области малого таза.....	66
2.5 Характеристика сопутствующей соматической патологии.....	70
2.6 Характеристика функционального состояния гипоталамо-гипофизарной системы исследуемых пациенток	73
2.7 Оценка результатов спермиологического исследования эякулята супругов.....	74
2.8 Сравнительная характеристика протоколов стимуляции и частоты отмены циклов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в исследуемых группах женщин	75
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	77
3.1 Сравнительная оценка иммунологических параметров.....	77
3.1.1 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим и здоровых женщин без репродуктивной патологии	77

3.1.2 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии	81
3.1.3 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с ОАГА и наличием или отсутствием АФА	92
3.2 Частота выявления АФА в обследуемых группах и анализ корреляционной взаимосвязи между АФА различных видов	94
3.3 Оценка показателей системы гемостаза	96
3.3.1 Результаты исследования показателей системы гемостаза у обследованных групп в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ)	97
3.3.2 Результаты сравнительного анализа показателей системы гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ)	103
3.3.3 Динамика изменений показателей системы гемостаза при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)	106
3.3.4 Показатели агрегационной активности тромбоцитов в динамике при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)	110
3.4 Оценка результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ)	113
3.4.1 Сравнение результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с наличием и отсутствием АФА	115
3.4.2 Сравнение результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА, получавших ВВИГ и не получавших ВВИГ	117
3.5 Анализ взаимосвязи между показателями системы гемостаза на разных этапах программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) с показателями результативности у обследованных пациенток	121
3.6 Сравнение качественных показателей развития эмбрионов	123
3.6.1 Сравнение показателей развития эмбрионов среди пациенток всех обследованных групп	124
3.6.2 Сравнение показателей развития эмбрионов у женщин с наличием и отсутствием АФА	125
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	128
ВЫВОДЫ	142

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	144
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	166

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМГ – антимюллеров гормон
- АСК – ацетилсалициловая кислота
- АТ – антитела
- АТ-III – антитромбин III
- АФА – антифосфолипидные антитела
- АФС – антифосфолипидный синдром
- ВА – волчаночный антикоагулянт
- ВВИГ – иммуноглобулины для внутривенного введения
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон
- ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
- ИМТ – индекс массы тела
- КБ – клиническая беременность
- КЛ – кардиолипид
- КСО – контролируемая стимуляция овуляции
- МНО – международное нормализованное отношение
- НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы
- НМГ – низкомолекулярные гепарины
- ОАГА – отягощенный акушерско-гинекологический анамнез
- ОШ – отношение шансов
- ПТИ – протромбиновый индекс
- ПЭ – перенос эмбриона в полость матки
- СКВ – системная красная волчанка
- СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников
- ТВ – тромбиновое время
- ТВП – трансвагинальная пункция
- ТЭО – тромбоэмболические осложнения
- УЗИ – ультразвуковое исследование

ФГ – фосфатидилглицерол

ФИ – фосфатидилинозитол

ФК – фосфатидиловая кислота

ФЛ – фосфолипиды

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЧБПЭ – частота беременности на перенос эмбрионов в циклах ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

ЧБц – частота беременности на цикл ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

ЧР – частота родов в циклах ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

β 2гп-1 – β 2гликопротеин-1

CD – кластер дифференцировки

Ig – иммуноглобулин

NK – натуральные киллеры

Treg – T-регуляторные клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Проблема повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является актуальной для репродуктологов всего мира. Результативность программ ВРТ при использовании собственных ооцитов остается на уровне 28,4-35,8% в зависимости от возраста, количества и качества переносимых эмбрионов и вида протокола [45].

Одной из возможных причин многократных неудачных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является наличие аутоиммунной патологии, в частности антифосфолипидного синдрома (АФС).

Антифосфолипидные антитела (АФА) влияют на процесс имплантации и ранние стадии эмбриогенеза, а также усиливают тромботические механизмы и вносят дисбаланс между процессами фибринообразования и фибринолиза. АФА взаимодействуют с мембранами трофобласта, затрудняя его межклеточные контакты, в частности нарушают процесс инвазии [8].

По данным литературы, частота выявления АФА у женщин с многократными неудачами ЭКО колеблется от 8% до 42,1% [2, 7, 18, 35, 108]. Обнаружение одного или более видов АФА приводит к трехкратному увеличению риска неудач ЭКО [172]. Доказано, что женщины с АФА после проведения ЭКО имеют значимо выше риск невынашивания беременности [50, 85, 105, 126]. Установлена прямая взаимосвязь между неудачами ЭКО и наличием АФА [17, 18, 172]. Получены данные об улучшении результатов ЭКО при применении низких доз ацетилсалициловой кислоты (АСК) и антикоагулянтов у женщин с АФА [17, 113]. Существуют и диаметрально противоположная позиция ряда ученых, отрицающих эту взаимосвязь и выступающих против необходимости обследования на АФА перед протоколом ЭКО и применения терапии с целью улучшения исходов ЭКО [37, 107, 160].

В научной литературе также обсуждаются противоречивые данные о роли аутоиммунной патологии в развитии бесплодия неясного генеза [89], при этом АФА в данной группе выявляются от 15% до 59% [52].

Открытым остается вопрос о влиянии АФА на развитие ранних репродуктивных потерь, то есть на этапе имплантации и инвазии эмбриона, что клинически может проявляться бесплодием неясной этиологии, многократными неудачами ЭКО или так называемыми ранними доклиническими потерями беременности. Возможными патогенетическими вариантами может быть нарушение ангиогенеза в эндометрии под действием АФА, повышение активности натуральных киллеров (NK-клеток), усиление протромботических механизмов и десинхронизация процессов фибринолиза и фибринообразования, а также негативное влияние АФА на развитие эмбриона [14, 36].

Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов, что способствует развитию гиперкоагуляции [106, 109, 114, 165] и может привести к артериальным и венозным тромбозам. Эпизоды венозной тромбоэмболии встречаются в 0,08-0,11% случаев женщин, выполняющих ЭКО [64], представляя, по крайней мере, 10-кратное увеличение базового риска венозной тромбоэмболии у женщин репродуктивного возраста. При развитии синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) средней и тяжелой степени вероятность тромбоэмболических осложнений (ТЭО) достигает 4,1% [36]. Женщины с АФС относятся к группе риска развития ТЭО в протоколе ЭКО, что требует особого подхода к назначению антитромботической терапии [3, 15].

Несмотря на то, что проблеме АФС во всем мире уделяется пристальное внимание, дифференцированной тактики ведения пациенток с АФА в протоколе ЭКО не выработано. Без лечения в цикле ЭКО при выявлении АФА вероятность наступления беременности может быть ниже, чем у женщин без АФА [17, 49].

Среди схем ведения женщин с АФС в протоколе ЭКО наиболее часто встречается комбинация низких доз АСК (75-100 мг) и профилактических доз низкомолекулярных гепаринов (НМГ) [130]. Эффективность данной схемы колеблется от 8,9% до 49%. В недавнем прошлом высокоэффективной считалась схема комбинации низких доз АСК и глюкокортикостероидов. По данным исследований, ее эффективность составляла от 33,3 до 46,6% [27].

Перспективным, но малоизученным является использование иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) при применении ВРТ [75, 175]. Применение ВВИГ у женщин с АФС на ранних сроках беременности и во 2 триместре приводило к снижению частоты невынашивания беременности и развития акушерских осложнений [6]. Высокая эффективность данной терапии объясняется позитивным влиянием на баланс иммунокомпетентных клеток, в частности на уровень Т-регуляторных лимфоцитов [4, 13, 152].

Терапия с использованием НМГ, низких доз АСК и ВВИГ у женщин с наличием АФА увеличивала эффективность ЭКО в 2 раза, по сравнению с женщинами, не имеющими АФА и получавших такую же терапию [26]. Использование ВВИГ в протоколе ЭКО у женщин с неудачами ЭКО и бесплодием неясной этиологии, у которых не проводилось обследование на АФА, увеличивало эффективность ЭКО до 61% [118].

В связи с значительной частотой выявления АФА в группе женщин, имеющих множественные неудачные попытки ЭКО в анамнезе, риском развития ТЭО на фоне гормональной нагрузки, и отсутствием в научной литературе достаточных сведений о подготовке и ведении данной группы женщин в цикле ЭКО, определение роли АФА в развитии неудач ЭКО является актуальным.

Степень разработанности темы. В настоящий момент хорошо исследованы патофизиологические основы и клинические проявления антифосфолипидного синдрома при беременности; на основании принципов доказательной медицины опубликованы клинические рекомендации по ведению данных пациенток [14, 43, 129, 178]. Вопросам ведения пациенток с циркуляцией антифосфолипидных антител в протоколе ЭКО в научной литературе уделено недостаточно внимания. По существующим данным, циркуляция антифосфолипидных антител ассоциирована с ухудшением результативности протоколов ВРТ [17, 18, 172] и увеличением риска невынашивания беременности [49, 50, 105, 126], что делает данную проблему особо актуальной для репродуктологов и акушеров-гинекологов. Одними из перспективных препаратов

для улучшения исходов ВРТ являются иммуноглобулины для внутривенного введения [118].

Целью исследования явилось изучение роли АФА в возникновении неблагоприятных исходов экстракорпорального оплодотворения и оценка эффективности применения иммуноглобулинов для внутривенного введения в комплексе лечебных мероприятий для их профилактики.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клиничко-anamнестические данные у женщин с циркуляцией АФА и бесплодием.
2. Оценить результативность протоколов ЭКО и ЭКО/ИКСИ у женщин с наличием АФА в сравнении с женщинами с отсутствием АФА.
3. Сравнить показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА с аналогичными показателями здоровых женщин репродуктивного возраста и изучить взаимосвязь между показателями субпопуляционного состава лимфоцитов и уровнем АФА, а также провести корреляционный анализ между АФА различных специфичностей.
4. Охарактеризовать динамику показателей системы гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА при проведении протоколов ЭКО и ЭКО/ИКСИ.
5. Оценить клиническую эффективность инфузии иммуноглобулинов для внутривенного введения у женщин с наличием АФА при проведении протоколов ЭКО и ЭКО/ИКСИ.

Научная новизна работы

Впервые определены существенные изменения состава иммунокомпетентных клеток у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА по сравнению с женщинами без репродуктивной патологии. На основании анализа данных субпопуляционного состава лимфоцитов определено, что женщины с АФА характеризуются меньшим содержанием Т-регуляторных лимфоцитов и

большим содержанием В-лимфоцитов, по сравнению со здоровыми женщинами. Установлено значимо большее содержание В-лимфоцитов у женщин с АФА, по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами с бесплодием и отсутствием АФА.

Впервые исследованы корреляционные взаимосвязи между АФА различных видов и обнаружена сильная корреляционная взаимосвязь между антителами к кардиолипину и неконвенциональными антителами (к фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте), а также умеренные корреляционные связи между антителами к β 2гликопротеину-1 и фосфатидиловой кислоте, антителами к фосфатидилсерину.

На современном методическом уровне впервые исследованы динамические изменения в системе гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА на фоне проведения протокола ЭКО (ЭКО/ ИКСИ) и обнаружена значимая динамика изменений показателей системы гемостаза в обеих группах в виде нарастания коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активации внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшения активности антикоагулянтной системы (снижение содержания АТ-III).

Впервые выполнен анализ взаимосвязи между показателями гемостаза, наличием АФА и исходами протоколов ЭКО (ЭКО/ИКСИ). Было показано, что значимое влияние на частоту клинической беременности оказывал волчаночный антикоагулянт и концентрация фибриногена, определенные на этапе после переноса эмбрионов в полость матки.

Впервые проанализированы качественные показатели развития эмбрионов у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА.

Теоретическая и практическая значимость

В результате комплексного обследования установлены клиничко-анамнестические особенности женщин с бесплодием и циркуляцией АФА в виде высокой частоты многократных неудач ЭКО и невынашивания беременности.

Обоснована необходимость обследования женщин с бесплодием на наличие антифосфолипидных аутоантител при наличии у них в анамнезе многократных неудач ЭКО.

По результатам исследования выявлено увеличение частоты ранних репродуктивных потерь у женщин с циркуляцией АФА в виде увеличения доклинических прерываний беременности. Было определено, что у женщин с циркуляцией АФА значимо ниже частота клинической беременности от числа всех женщин с положительным результатом анализа β ХГЧ по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами без АФА.

Доказана клиническая эффективность использования иммуноглобулинов для внутривенного введения при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с наличием антифосфолипидных аутоантител и отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом с целью снижения частоты ранних репродуктивных потерь.

Методология и методы исследования.

Для решения поставленных задач в период с 2012 по 2014 г. проведено обследование 280 женщин репродуктивного возраста, проходивших протокол ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в отделении ВРТ ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (рук. отделения – д.м.н. Гзгзян А.М.).

Все пациентки подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании и были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России от 30.08.2012 N107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Из обследованных женщин в исследование были включены 191, которые соответствовали критериям включения и исключения.

Критерии включения:

- 1) возраст от 18 до 38 лет;

2) отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (невынашивание беременности, многократные неудачные попытки ЭКО (3 и более), преэклампсия, плацентарная недостаточность, антенатальная гибель плода);

3) лечение бесплодия с использованием методов ЭКО (ЭКО/ИКСИ);

4) стимуляция яичников в протоколе с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ);

5) согласие женщины на участие в программе исследования.

Критерии не включения в работу:

1) наличие острых и обострение хронических инфекционных заболеваний;

2) возраст младше 18 и старше 38 лет;

3) наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии (почечной, печеночной недостаточности, сахарный диабет 1 и 2 типа, тяжелых заболеваний печени, свертывающей системы крови);

4) отказ женщины от участия в программе исследования;

5) тяжелые нарушения сперматогенеза: аспермия, азооспермия, астенотератозооспермия тяжелой степени;

6) гипер- и гипогонадотропная недостаточность яичников.

Перед включением в исследование всем женщинам были выполнены однократно анализы на наличие в сыворотке крови ВА, антител (IgG, IgM) к отрицательно заряженным фосфолипидам (кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте), антител к β 2-гликопротеину-1, к аннексину-5, протромбину, выполненные в отделе иммунологии с группой по диагностике СПИД (рук. отделения – з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Сельков С.А).

Женщин включали в исследование с 1 дня контролируемой стимуляции овуляции в программах ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Каждой пациентке трижды выполняли анализ показателей коагулограммы (протромбиновый индекс (ПТИ), активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), тромбиновое время, международное нормализованное отношение (МНО), антитромбин III (АТ-III), концентрация

фибриногена), Д-димеров и агрегационной активности тромбоцитов, выполненные в лаборатории биохимии с клиничко-диагностическим отделением (руководитель отделения – з.д.н. РФ, д.б.н., проф. Арутюнян А.В). Первый раз проводили исследование на этапе начала стимуляции (до 3 дня КСО). Второй раз на завершающем этапе КСО (10-14 день). Третий раз забор крови происходил на 4-5 день после переноса эмбриона в полость матки.

В ходе исследования было выполнено открытое проспективное сравнительное исследование по оценке эффективности и безопасности препарата ВВИГ Интратекта («Биотест фарма», Германия) у пациенток с АФА или наличием АФА при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Схема исследования представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема исследования

Среди 191 женщины, включенной в исследование, у 128 были выявлены превышающие нормы значения уровня антифосфолипидных аутоантител. С целью профилактики ТЭО в протоколе ЭКО, женщинам с АФА были назначены профилактические дозы НМГ и низкие дозы АСК (75 мг). Все женщины с наличием АФА были разделены на 2 группы (основную группу и группу сравнения).

1. Основная группа А (с иммунотерапией) (n=77) – женщины с АФС или циркуляцией АФА, проходящие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) и получающие внутривенный иммуноглобулин – Интратект («Биотест фарма», Германия) в курсовой дозе 300 мл (15 г) в дополнение к низким дозам АСК и профилактическим дозам НМГ.

2. Основная группа Б (без иммунотерапии) (n=51) – женщины с АФС или циркуляцией АФА, проходящие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) и получающие только терапию с использованием низких доз АСК и профилактических доз НМГ.

3. Группа сравнения (n=63) – женщины с отсутствием АФА, проходящие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

4. При оценке иммунологических показателей использовали результаты обследования здоровых небеременных женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, имеющих 1 и более физиологическую беременность, закончившуюся физиологическими родами (n=27).

Пациентки основной группы получали препарат из группы ВВИГ- («Биотест фарма», Германия) в курсовой дозе 300 мл (15 г). Вводили по 100 мл (5 г) внутривенно капельно 1 раз в 5-7 дней, 3 недели подряд в протоколе ЭКО. Все инфузии выполнялись до переноса эмбрионов (ПЭ) в полость матки. Лечение начинали на 1-3 день стимуляции овуляции в протоколе ЭКО с антагонистами ГнРГ, вторая инфузия выполнялась на 7-9 день КСО (100 мл), третья инфузия на 13-15 день КСО.

Стандартной считали терапию, направленную на профилактику ТЭО, включающую низкие дозы АСК (75-100 мг) и профилактические дозы НМГ с учетом веса пациентки.

Общеклинические методы

Клинико-anamнестический обследование пациенток включало в себя оценку жалоб, анамнеза заболевания, акушерско-гинекологического и соматического анамнеза, проведение стандартного физикального и гинекологического исследований.

Лабораторные методы исследования

С помощью лабораторных методов проводилось исследование коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, изучение иммунологических показателей (определение содержания отдельных субпопуляций лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и активированных НК-клеток), определение антифосфолипидных аутоантител и оценка содержания половых гормонов.

Исследование коагуляционного звена гемостаза

Оценку коагуляционного гемостаза проводили по результатам коагулограммы, включающей в себя 6 параметров (протромбиновый индекс (ПТИ), активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), тромбиновое время, международное нормализованное отношение (МНО), антитромбин III (АТ-III), концентрация фибриногена).

Каждой пациентке в процессе исследования 3 раза выполняли анализ показателей коагулограммы. Первый раз проводили исследование на этапе начала стимуляции (до 3 дня КСО). Второй раз на завершающем этапе КСО (10-14 день). Третий раз забор крови происходил на 4-5 день после переноса эмбриона в полость матки.

Коагулограмма выполнялась с использованием коагулометра ACL-200 (Instrumentation Laboratory, Испания) и реактивов HemosIL (Италия).

Определение агрегационной активности тромбоцитов

Исследование сосудисто-тромбоцитарного гемостаза (агрегационной активности тромбоцитов) выполняли на агрегометре 590D (Chrono-log Corporation, США). Для исследования использовали венозную кровь, взятую натощак. С целью предотвращения коагуляции использовали 3,8% раствор цитрата натрия, добавляемый в соотношении 1:9. Тестирование крови выполнялось в течение 3 ч с момента забора образца.

Оценку АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов выполняли путем регистрации светопропускания плазмы со стандартным количеством тромбоцитов под действием агрегирующих агентов (АДФ в концентрации 2 мкМ). Степень агрегации выражали в % увеличения светопропускания. Оценка агрегационной активности тромбоцитов проводилась в соответствии с методикой, описанной в инструкции фирмы-производителя.

Определение уровня Д-димеров

Определение содержания Д-димеров в плазме периферической крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем «Technozym D-Dimer ELISA Kit», 96 фирмы Technoclone (Австрия).

В лунки микропланшета с иммобилизированным на поверхности полистирола моноклональными антителами к Д-димеру вносили по 100 мкл образцов плазмы пациентов. Инкубацию выполняли на термошейкере при температуре 37°С в течение 1 ч, отмывание проводили 4 раза с использованием моющих буферов, после чего вносили 100 мкл античеловеческих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена конъюгата. После окончания инкубации при 37°С в течение 1 ч лунки отмывали и добавляли по 100 мкл субстратно-

хромогенного раствора, содержащего перекись водорода и тетраметилбензидин. Инкубация планшетов проводилась в течение 10 мин. при температуре 37°C в условиях темноты, остановку ферментативной реакции проводили внесением в лунки по 100 мкл «стоп»-реагента. При постановке исследования использовались стандартные образцы для построения калибровочной кривой и контрольные образцы. Оценку результатов анализа проводили путем инструментального измерения оптической плотности на автоматическом фотометре для микропланшетов серии ELx808 производства BioTek Instruments Inc. (США) при длине волны 450 нм. Результаты исследования оценивались количественным способом с построением 4-х параметрической логарифмической кривой.

Определение аутоантител

Определение антител к бета-2 гликопротеину-1, кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте (IgG/IgM) в сыворотке периферической крови выполняли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческих тест-систем «TromboCombo IgG/IgM» фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Определение антител к протромбину (IgG/IgM/IgA) в сыворотке периферической крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческих тест-систем «Anti-Protrombin Screen» фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Определение антител к аннексину 5 (IgG/IgM) в сыворотке периферической крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческих тест-систем «Anti-Annexin V IgG/IgM» фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

«Волчаночный антикоагулянт» определяли на коагулометре ACL-200 (Instrumentation Laboratory, Испания) с применением наборов: ВА скрининговый

тест (LAC Screen) и ВА подтверждающий тест (LAC Confirm) в соответствии с методикой, описанной в инструкции фирмы-производителя.

ВА Скрининговый тест (LAC Screen) содержит разбавленный яд гадюки Рассела (DRVV реагент) и предназначен для скринингового исследования наличия волчаночных антикоагулянтов. ВА Подтверждающий тест (LAC Confirm): содержит богатый фосфолипидами разбавленный яд гадюки Рассела и предназначен для подтверждения наличия волчаночных антикоагулянтов.

Определение отдельных субпопуляций лимфоцитов

Анализ субпопуляционного состава лимфоидных клеток в периферической крови выполняли на проточном цитофлуориметре FacsCanto II (BD, США) с использованием коммерческого набора Multitest 6-Color TBNK (BD, США), содержащим смесь моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами: анти-CD3-FITC, анти-CD16-PE, анти-CD56-PE, анти-CD45-PerCP-Cy5.5, анти-CD4-PE-Cy7, анти-CD19-APC, анти-CD8-APC-Cy7.

Для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов использовали периферическую кровь, взятую в пробирки с антикоагулянтом (литий-гепарин). В полистироловые пробирки, содержащие стандартное количество флуоресцентных микрочастиц (BD Trucount, США) добавляли 50 мкл крови и 20 мкл смеси моноклональных антител из набора Multitest 6-Color TBNK, инкубация проводилась в течение 15 мин. при комнатной температуре в темноте. Затем к имеющимся образцам добавляли 450 мкл лизирующего раствора (BD, США) и инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре в темноте. Определение экспрессии дифференцировочных антигенов (CD3, CD4, CD8, CD19 и CD16+56) выполняли на проточном цитофлуориметре. Относительное и абсолютное содержание субпопуляций лимфоидных клеток рассчитывали с помощью программного обеспечения BD FACSCanto (версия 2.0).

Определение Т-регуляторных лимфоцитов

Определение содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови выполнялось на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием коммерческого набора Human Regulatory T Cell Cocktail (BD, США), содержащим смесь моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами: анти-CD4-FITC, анти-CD25-PE-CyTM7, анти-CD127-Alexa Fluor® 64.

Для анализа использовали периферическую кровь, взятую в пробирки с антикоагулянтом (литий-гепарин). В полистироловые пробирки, содержащие стандартное количество флуоресцентных микрочастиц (BD Trucount, США) добавляли 50 мкл крови и 20 мкл смеси моноклональных антител из набора Human Regulatory T Cell Cocktail, инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре в темноте, после чего к образцам добавляли 450 мкл лизирующего раствора (BD, США) и инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре в темноте. Определение экспрессии дифференцировочных антигенов проводили на проточном цитофлуориметре. Результаты анализировались при помощи программного обеспечения BD FACSDiva.

Определение содержания активированных НК-клеток

Оценка активности НК-клеток периферической крови выполнялась по анализу экспрессии НК-клетками маркера активации CD107a с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США).

С целью определения активности НК-клеток периферической крови использовали периферическую кровь, взятую в пробирки с антикоагулянтом (литий-гепарин). Выделение популяции лимфоидных клеток выполнялось стандартным методом скоростного центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографина (Histopaque®-1077, Sigma, США). Инкубацию половины клеток проводили в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением стандартного реагента для активации лейкоцитов (содержащего смесь ФМА и иономицина) (BD, США) в течение 3 ч при 37°C с 5% содержанием

CO₂, вторую часть клеток инкубировали в тех же условиях, но без применения активатора. После окончания инкубации, клетки отмывали раствором Хэнкса (Биолот, Россия), после чего обрабатывали моноклональными антителами к CD16+56, CD3, CD45, CD107a (BD, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Оценка экспрессии дифференцировочных антигенов проводилась на проточном цитофлуориметре FacsCanto II (BD, США). Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение BD FACSDiva.

Все иммунологические показатели были выполнены в отделе иммунологии с группой по диагностике СПИД (руководитель отделения – з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Сельков С.А).

Гормональные исследования

Базальные концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола и пролактина проводили иммуноферментным методом на 2-3 день менструального цикла на анализаторе Alisei (Италия) с применением тест-систем фирмы Алкор Био (Россия). Измерение уровня антимюллера гормона (АМГ) в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом на анализаторе Alisei (Италия) с применением наборов фирмы Beckman Coulter (США). При значениях АМГ менее 1 нг/мл выявляли сниженный резерв яичников. Содержание в крови прогестерона (ПГ) определяли в середине лютеиновой фазы менструального цикла (на 21-23 день) на аппарате Access2 (США) с применением наборов Алкор Био (Россия) и Beckman Coulter (США).

Через 14 дней после переноса эмбрионов в полость матки определяли концентрацию β -субъединицы хорионического гонадотропина человека иммуноферментным методом на аппарате Elecsys 2010 (F.Hoffman-la-Roche, Швейцария) с использованием реактивов HCG STAT (Roche Diagnostics, Германия). Положительным результатом на β -ХГЧ считали значение выше 30 Ед/мл.

Функциональные методы исследования

Ультразвуковое исследование

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили при первичном и каждом последующем приеме пациенток на аппаратах Samsung Medison (Корея). Исследование выполняли трансвагинальным датчиком с частотой 7,5 МГц.

С помощью УЗИ на 2-3 день цикла оценивали размеры и структуру тела матки, эндометрия и яичников, определяли количество антральных фолликулов, диагностировали отсутствие объемных образований в малом тазу. Стимуляцию яичников в цикле ЭКО (ЭКО/ИКСИ) проводили, начиная со 2-3 дня менструального цикла, с использованием препаратов антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона («Оргалутран», N.V.Organon, Нидерланды; «Цетротид», Merck Serono, Италия) и гонадотропинов («Менопур», Ferring, Германия; «Пурегон», N.V.Organon, Нидерланды; «Гонал-Ф», Merck Serono, Италия). В дальнейшем с помощью УЗИ выполнялся УЗ-мониторинг роста фолликулов и эндометрия.

При достижении трех и более фолликулов размера 17 мм, вводили триггер овуляции («Прегнил», Organon, Нидерланды; «Овитрель», Merck Serono, Италия), после чего под контролем УЗИ через 35-37 ч проводили ТВП фолликулов.

С помощью УЗИ в асептических условиях проводили перенос эмбриона/эмбрионов в полость матки. Ультразвуковая диагностика клинической беременности проводилась через 26-28 дней после ПЭ в полость матки. Клиническую беременность устанавливали при наличии сердцебиения плода. Доклинические потери беременности устанавливали при наличии положительного анализа на β -ХГЧ (более 30 Ед/мл.), но отсутствии подтверждения клинической беременности по данным УЗИ.

Морфологический метод исследования

На эмбриологическом этапе программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) использовали микроскопический метод для оценки показателей эякулята супруга (партнера),

фолликулярной жидкости яичников на предмет наличия ооцит-кумулюсных комплексов, оплодотворения половых клеток, стадии развития и качества эмбрионов.

На 2 и 3 сутки эмбрионального развития качество эмбрионов оценивали по A. Van Steiterghem et al. [167]. Проводилась оценка степени фрагментации, формы и относительных размеров бластомеров. Классификация проводилась как А, В, С, D, где А – самый лучший, а D – самый худший.

На 4 сутки качество эмбрионов оценивали по J. Tao et al. [168], где учитывалась степень компактизации бластомеров: Grade 4 – эмбрион компактизован полностью, ядра в клетках различимы, хотя клеточные мембраны относительно нечеткие; Grade 3 – эмбрион характеризуется компактизованностью 75% и более бластомеров, сохраняется его сферичная форма, а также гладкая поверхность; Grade 2 – компактизовано не более 50% бластомеров, наблюдается его нетипичная (аномальная) морфология; Grade 1 – компактизовано менее 50% бластомеров, визуализируются аномальные бластомеры.

На 5 день развития эмбрионов качество эмбрионов на стадии бластоцисты оценивали по критериям оценки, предложенным Gardner D.K [93]. Совокупная оценка бластоцисты имеет цифровое (от 1 до 6) и буквенное (А, В,С) выражение. Оценку получают: степень экспансии и статус хэтчинга, состояние внутренней клеточной массы и трофэктодермы. Оценка степени развития бластоцисты и статуса хэтчинга: 1-ранняя бластоциста: бластоцель меньше половины эмбриона (eB1); 2-бластоциста: бластоцель больше половины объема эмбриона (B1 2AA); 3-полная бластоциста: бластоцель полностью заполняет эмбриона (B1 3AA); 4-экспандированная бластоциста: бластоцель полностью заполняет эмбрион; истончение zona pellucida (B1 4AA, B1 5AA); 5-вылупляющаяся бластоциста: трофэктодерма начинает выступать из zona pellucida (h. B15AA); 6-вылупившаяся бластоциста: бластоциста полностью освобождается от zona pellucida (full h.B1).

Оценка внутренней клеточной массы: А-много плотно упакованных клеток; В-несколько свободно сгруппированных клеток; С-очень мало клеток, клетки не сгруппированы. Оценка трофэктодермы: А-много клеток, формирующих

кодгезивный (связанный) эпителий; В-несколько клеток, формирующих свободный эпителий; С-только несколько клеток (3-5) серповидной формы.

При сравнительной оценке эмбрионов в группах определялась доля эмбрионов хорошего качества, определенная как отношение эмбрионов хорошего качества от общего числа эмбрионов на соответствующий день культивации, выраженное в процентах. К эмбрионам хорошего качества относили: на 2 день культивирования – эмбрионы класса А и В с 2-6 бластомерами, на 3 день культивирования – класса А и В, содержащие 6-10 клеток, на 4 день культивирования – морулы Grade 3 и 4, на 5 день культивирования - бластоцисты АА, АВ, ВВ. Все остальные эмбрионы были отнесены к эмбрионам низкого качества. При оценке показателей результативности протоколов ЭКО были исключены женщины, которым был осуществлен перенос эмбрионов низкого качества.

Все морфологические исследования осуществляли на отделении ВРТ ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (руководитель отделения – д.м.н. Гзгзян А.М.).

Статистические методы

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) и «Statistica v 10.0» (StatSoft Inc., USA).

Параметры распределения признаков в выборке оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова.

Все данные в работе представлены в виде: среднее значение (М)±стандартное отклонение (σ) или среднее значение (М) (95% ДИ) – для нормально распределенных данных, и нижний квартиль (25%) медиана (Me) верхний квартиль (75%) или медиана (Me) [нижний квартиль (25%); верхний квартиль (75%)] – для ненормально распределенных данных.

При сравнении 2 групп: для оценки межгрупповых различий при нормальном распределении количественных данных использовали критерий

Стьюдента (t); при распределении, отличающемся от нормального использовали критерии или Манна-Уитни (U). При сравнении 3 групп: при нормальном распределении проводили оценку межгрупповых различий количественных данных с помощью однофакторного дисперсионного анализа (F), при распределении, отличающемся от нормального использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллеса (H).

Статистическая обработка качественных признаков проводилась при анализе четырехпольных таблиц 2×2 с применением критерия хи-квадрат (χ^2), χ^2 с поправкой Йетса (χ^2 -Yates) – при абсолютной частоте признака менее 10 и двустороннего точного критерия Фишера (F-Fisher 2sd) – при частоте одного из признаков менее пяти. Множественные межгрупповые сравнения при оценке качественных признаков проводились с использованием критерия χ^2 Пирсона с учетом степеней свободы (ст.св.). Апостериорное сравнение групп осуществляли с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения.

Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента корреляции Пирсона (R) при нормальном распределении данных и рангового коэффициента Спирмена при непараметрическом распределении данных. Сила корреляционной взаимосвязи оценивалась: 0,1-0,299 – слабая, 0,3-0,699 – умеренная, 0,7-1,0 – сильная.

Гипотезу о равенстве двух значений отвергали при уровне значимости $p < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наличие антифосфолипидных антител является независимым патогенетическим фактором неблагоприятных исходов программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ), связанным с увеличением частоты ранних репродуктивных потерь (биохимических беременностей, прервавшихся до подтверждения по УЗИ).

2. У женщин с бесплодием и циркуляцией антифосфолипидных аутоантител выявлены существенные изменения состава иммунокомпетентных клеток, о чем свидетельствует меньшее содержание Т-регуляторных лимфоцитов

и большее содержание В-лимфоцитов, что является следствием реализации аутоиммунных процессов.

3. В ответ на проведение стимуляции овуляции в протоколе ЭКО у женщин с циркуляцией АФА наблюдается значимая динамика изменений показателей системы гемостаза в виде нарастания коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активации внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшения активности антикоагулянтной системы (снижение содержания АТ-III).

4. Применение иммуноглобулинов для внутривенного введения у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА при проведении программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) способствует увеличению частоты клинической беременности.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала, использованием современных методов исследования и оборудования.

Материалы диссертационной работы представлены на первой и второй Всероссийских конференциях с международным участием «Гемостаз и репродукция» (Санкт-Петербург, 2017 и 2018 гг.); Международной конференции молодых ученых «Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2017» (Санкт-Петербург, 2017 г.); на 3 Международном форуме антикоагулянтной и антиагрегантной терапии «ФАКТ-2017» (Москва, 2017 г.); 7 Международном конгрессе «Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis» в виде постерного доклада (Барселона, 2017 г.).

Работа поддержана грантом правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых, молодых кандидатов наук ВУЗов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга – 2013 год.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 печатных работ, из них 5- в журнал, рекомендуемых ВАК.

Обсуждение диссертации состоялось на заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» 07 июля 2017 г, протокол №8.

Результаты исследования внедрены в работу отделения вспомогательных репродуктивных технологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» и городского акушерского гематологического центра на базе СПб ГУЗ «Родильного дома №6 им. проф. В.Ф.Снегирева».

Автором проведено амбулаторное наблюдение пациентов и выполнено изучение и анализ историй болезни и амбулаторных карт включенных в исследование женщин, проходивших лечение бесплодия с применением процедуры ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в отделении ВРТ ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (рук. д.м.н. Гзгзян А.М.) в 2012-2014 гг. Сбор материала, анализ результатов исследования, статистическую обработку данных автор выполнил самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, клинической характеристики обследованных больных, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего отечественных и зарубежных источников и приложений. Работа иллюстрирована 27 таблицами, 30 рисунками и 2 приложениями, включающими 2 таблицы и 9 рисунков. Список литературы содержит 180 источников, из них 21 отечественных и 159 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Антифосфолипидный синдром в генезе репродуктивных потерь

Проблема репродуктивных потерь при аутоиммунной патологии, а также ассоциированных с ними высоких рисков ТЭО, является одной из наиболее актуальных в современной репродуктивной медицине.

Заболеваемость аутоиммунной патологией неуклонно растет и достигает в популяции 7,6-9,4%, причем преимущественно среди лиц репродуктивного возраста, что придает этой проблеме социально-экономическую значимость [70]. Женщины значительно чаще подвержены данной патологии: у них выявляется 85% аутоиммунных тиреоидитов, системной склеродермии, системной красной волчанкой (СКВ), АФС и других аутоиммунных заболеваний [71].

Наибольшее значение среди аутоиммунных заболеваний в отношении репродуктивных потерь имеет АФС. Беременность при первичном АФС осложняется преэклампсией у 2-8% [134, 147], плацентарной недостаточностью у 11%, преждевременными родами у 28%, внутриутробной гибелью плода у 7% женщин [134]. При вторичном АФС, возникшем на фоне другого аутоиммунного заболевания, например, СКВ, риски акушерских осложнений многократно возрастают. Риск преэклампсии при этом увеличивается и составляет от 32% до 50%, а преждевременных родов от 32% до 65% [55]. Но наибольшее значение АФС имеет в отношении невынашивания беременности, являясь его причиной у 7-42% женщин [12, 19, 56, 87, 134].

Особое значение АФС приобретает не только в связи с высокой частотой репродуктивной патологии, но и высоким риском ТЭО, ассоциированных с высокой летальностью [48]. Наиболее часто в клинической практике встречаются тромбоз глубоких вен голени, тромбоэмболия легочной артерии, острое нарушение мозгового кровообращения, транзиторные ишемические атаки [48]. Характерным для АФС является развитие повторных эпизодов ТЭО, достигающих вероятности до 50% при отсутствии лечения за 10-летний период [150], ежегодный риск при этом составляет 29% [42].

Самую высокую вероятность ТЭО имеют «трижды-позитивные женщины», то есть имеющие антитела к кардиолипину (КЛ), волчаночный антикоагулянт (ВА) и антитела к β 2гликопротеину-1 (β 2гп-1). ТЭО у данной группы пациенток возникают в 30% случаев за 10-летний период наблюдения [66].

У женщин риски развития как первичных, так и повторных эпизодов ТЭО значительно выше, в связи с наличием провоцирующих факторов, таких как беременность, прием оральных контрацептивов и менопаузальной гормональной терапии, а также применение ВРТ [139]. АФС является одной из основных причин тромбозов в акушерско-гинекологической практике [12, 14, 15].

АФС – это аутоиммунное заболевание, характеризующееся развитием тромбозов (артериальных и венозных) и/или акушерской патологии при наличии постоянно циркулирующих антифосфолипидных антител (антител к КЛ, ВА и антител к β 2гп-1), определенных у пациента два и более раз с интервалом не менее 12 недель [116]. С 2006 года диагноз АФС устанавливается в соответствии с Международными критериями, принятыми в Сиднее в 2006 году (Sydney Consensus Workshop, Sydney, 2006) [116].

Лабораторными критериями признаны:

1. Положительный лабораторный тест на ВА обнаруженный в плазме два или более раз, с промежутком между исследованиями не менее 12 недель, с помощью комплекса из скринингового, подтверждающего и корректирующего коагулогических тестов в соответствии с требованиями Международного общества изучения тромбозов и гемостаза.

2. Обнаружение антител к КЛ классов IgG и/или IgM в сыворотке или плазме в среднем или высоком титре (т.е. >40 GPL или MPL, или более 99 перцентилей здоровой популяции), повторно обнаруженные через не менее чем 12 недель, выявленные с помощью, стандартизованной ИФА тест-системы.

3. Обнаружение антител к β 2гп-1 классов IgG и/или IgM в сыворотке или плазме в титре более 99ого перцентилей здоровой популяции, выявленные не менее 2 раз с интервалом 12 недель с помощью, стандартизованной ИФА тест-системы.

Клиническими критериями АФС признаны:

1. Сосудистый тромбоз: один или несколько эпизодов артериального, венозного тромбоза или тромбоза мелких сосудов (за исключением поверхностных вен голени) в любой ткани или органе, подтвержденный с помощью КТ/МРТ, доплеровского исследования или морфологически. При гистологическом исследовании тромбоз не должен сочетаться с воспалительными изменениями стенки сосуда.

2. Патология беременности:

– Одна или более неясная смерть плода при сроке 10 и более недель беременности, с нормальной морфологией по данным ультразвукового исследования (УЗИ) или прямого его обследования.

– Одни или более преждевременные роды морфологически нормальным новорожденным до 34 недель гестации вследствие эклампсии, тяжелой преэклампсии или плацентарной недостаточности.

– Три и более необъяснимых спонтанных выкидыша до 10 недель беременности после исключения анатомических, гормональных и генетических причин невынашивания.

Таким образом, АФС является широко распространенной проблемой в современном акушерстве и одной из главных причин репродуктивных потерь и ТЭО среди аутоиммунных заболеваний.

АФА представляют собой семейство гетерогенных иммуноглобулинов IgG, IgM и IgA, направленных против отрицательно-заряженных фосфолипидов (ФЛ) плазматической мембраны клеток [9]. Одна из основных ролей в инициации патологического аутоиммунного ответа при АФС отводится фосфатидилсерину (ФС) – анионному фосфолипиду, расположенному на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны и поэтому защищенному от взаимодействия с плазмой, содержащей АФА. Однако в некоторых случаях может происходить экстернализация ФС в наружный слой мембраны. ФС экспонируется на

поверхности клеточных мембран клеток, которые подлежат разрушению, либо реинтернализация происходит очень быстро [14].

С использованием моноклональных антител к ФЛ было показано, что трофобласт при дифференцировке и инвазии в экстрацеллюлярный матрикс также экспонирует ФС. Так как слияние клеток и рост синцития продолжается почти всю беременность, то клетки трофобласта, возможно, являются единственными клетками в организме человека, столь длительно экспонирующими на своей поверхности отрицательно заряженные ФЛ [9].

Патогенез практически всех клинических проявлений АФС, включая акушерские осложнения, универсален и осуществляется вследствие нарушения микроциркуляции, гемостаза и патологии сосудистой стенки [14]. АФА способны опосредованно повреждать мембрану эндотелия, нарушая баланс в звене естественных антикоагулянтов и ингибиторов свертывания, и провоцировать гиперкоагуляцию [17, 20].

АФА самостоятельно или при образовании комплексов с другими белками плазмы (кофакторами – $\beta 2$ -GP, аннексин 5, протромбин) оказывают опосредованное повреждающее действие на клетки. Непосредственное повреждение клетки происходит в результате иммунного цитолиза, возникающего при образовании комплекса антиген-антитело на поверхности клетки, что является проявлением гиперчувствительности II типа. Иммунный цитолиз может реализовываться 2 путями: через активацию системы комплемента или за счет лимфокинзависимой и антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой макрофагами и цитотоксическими лимфоцитами [21].

Причиной развития акушерских осложнений при АФС длительное время считалось формирование тромбов в маточно-плацентарном кровотоке, однако гистологические исследования плацент женщин с АФС продемонстрировали множество других патологических процессов [177]. Так например, на культуре эндометрия человека, прокультивированном с поликлональными $\beta 2$ -гликопротеинзависимыми IgG, выделенными из крови пациенток с АФС,

обнаружено, что АФА ингибируют процессы ангиогенеза в эндометрии благодаря снижению выработки сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF [36].

В экспериментах с клетками трофобласта плацент женщин с физиологической беременностью, прокультивированными с АФА, полученными от женщин с АФС, было обнаружено ингибирование дифференцировки синцитиотрофобласта и снижение выработки хорионического гонадотропина человека (β ХГЧ) [36]. Установлено, что АФА влияют на экспрессию трофобластом адгезионных молекул: подавляют экспрессию альфа 1 интегрина и VE-кадгерина и активируют экспрессию альфа 5 интегрина и E-кадгерина [41]. Вышеперечисленные повреждающие механизмы приводят к дефекту имплантации и снижению глубины децидуальной инвазии трофобласта и нарушению ангиогенеза в эндометрии [137], что клинически проявляется невынашиванием беременности, а в случае ее прогрессирования является причиной развития поздних акушерских осложнений [14].

Важным патогенетическим механизмом в развитии акушерской патологии является воспаление [29, 136, 158]. У женщин с повышенным уровнем АФА при гистологическом исследовании плаценты отмечают: плацентарные инфаркты, нарушение ремоделирования спиральных артерий, децидуальное воспаление, увеличение числа синцитиальных почек, уменьшение васкулосинцитиальных мембран и отложение продуктов активации системы комплемента C4d [177]. Полагают, что в присутствии АФА в плацентарном кровотоке происходит активация системы комплемента. Компонент комплемента C5a способствует привлечению моноцитов, нейтрофилов, тучных клеток, из которых высвобождается большое количество медиаторов воспаления, включая хемокины, цитокины, протеолитические ферменты, свободные радикалы [29]. В результате этих процессов происходит активация воспалительных реакций, процессов коагуляции и развитие тканевых повреждений плаценты и плода [14].

Инактивация системы комплемента в сыворотках женщин с АФС снижает их цитотоксический эффект в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с сыворотками крови женщин с АФС с неинaktivированным комплементом [20].

Мыши с дефицитом компонентов комплемента C3, C5, C6 или рецепторов к C5a резистентны к АФА-индуцированной тромбофилии и активации эндотелия [143]. В опытах на мышах было показано, что пассивный перенос человеческих АФА вызывает активацию комплемента, тогда как при ингибировании системы комплемента удается предотвратить потери плода и внутриутробную задержку развития [68, 69, 153]. Кроме того, у пациенток с АФА с наличием и при отсутствии клинических проявлений обнаружено повышение содержания в сыворотке крови компонентов C3a и Bb [82, 141], однако повышение C3a не коррелировало с развитием тромбозов [82].

В связи с важной ролью системы комплемента в патогенезе осложнений АФС, в клинической практике у пациентов, рефрактерных к стандартной терапии АФС, стали успешно применять антиC5a моноклональные антитела [22, 24, 83]. Высокая эффективность препаратов, ингибирующих функцию C5a у пациентов с АФС подтверждает ключевую роль системы комплемента в патогенезе развития клинических проявлений у пациентов с АФС.

Другим возможным патогенетическим механизмом в развитии репродуктивных потерь при АФС можно назвать разрушение «аннексинового щита» на поверхности клеток трофобласта. В процессе дифференцировки трофобласта одновременно с экстернализацией ФЛ происходит выработка естественного антикоагулянта аннексина V [9]. Он покрывает ФЛ по типу ковра, оказывая местный антикоагулянтный эффект, что препятствует тромбообразованию во время беременности. АФА в присутствии β 2гп-1 нарушают локальную антикоагулянтную активность аннексина V, вытесняя его с поверхности трофобласта, в результате чего отрицательно заряженные фосфолипиды начинают свободно контактировать с плазмой крови, что приводит к запуску коагуляционного каскада [9].

Таким образом, АФА многосторонне и опосредованно влияют на течение беременности с самых ранних сроков, приводя к прерыванию беременности и закладыванию предпосылок для дальнейших акушерских осложнений. Общеизвестной акушерской патологией при АФС является привычное

невынашивание беременности, антенатальная гибель плода, плацентарная недостаточность, преэклампсия и эклампсия. Широко обсуждаемым и крайне актуальным вопросом является схожесть иммунных повреждающих механизмов при невынашивании беременности и при ранних репродуктивных потерях, включающих доклинические потери беременности и повторные неудачи имплантации после ЭКО.

1.2 Роль АФС в неудачных исходах протоколов ВРТ

Появление ВРТ в 80-х годах XX века дало возможность нескольким миллионам супружеских пар иметь детей. За 35 лет активного развития ВРТ достигнут огромный прогресс: внедряются новые технологии, синтезируются более современные фармакологические препараты, совершенствуются эмбриологические методики. Однако, несмотря на все успехи, эффективность одного протокола ЭКО при использовании собственных ооцитов составляет 28,4-35,8% в зависимости от возраста, количества и качества переносимых эмбрионов и вида протокола [45, 47, 48]. После проведения 3 протоколов ЭКО только 40-55% женщин становятся беременными. При увеличении количества проведенных циклов ЭКО в 2 раза (до 6 протоколов) данный показатель возрастает лишь на 20% [92, 164], а при достижении 12 попыток эффективность составляет 85% [92]. Таким образом, прогрессивное увеличение эффективности ЭКО наблюдается только до 3 циклов, далее наблюдается снижение роста эффективности ВРТ, что говорит о наличии скрытой патологии, требующей изучения и дообследования.

В научных исследованиях все чаще появляется термин «повторные неудачи имплантации», «неудачи ЭКО» или «неудачи ВРТ». Общего мнения ученых относительно определения данного термина нет.

В настоящее время полагают, что повторные неудачи имплантации – это «отсутствие имплантации, определяемой по уровню ХГЧ в сыворотке крови на 14 день после пункции ооцитов, после 2 и более последовательных циклов ЭКО, ИКСИ или криопротоколов, когда общее количество перенесенных эмбрионов не менее 4 для эмбрионов на стадии дробления или не менее 2 для бластоцист, при

этом все эмбрионы должны быть хорошего качества и соответствовать стадии развития» [180].

Среди основных причин повторных нарушений имплантации можно выделить: патологию эндометрия, наличие воспалительных образований в маточных трубах, иммунологические нарушения, эндокринологические заболевания, генетическую патологию супругов, наследственную и приобретенную тромбофилию и врачебные ошибки [180].

В последние годы все больше внимания ученых отводится именно иммунным нарушениям и возможности их коррекции с целью улучшения эффективности ВРТ. К таким иммунным нарушениям относятся: наличие аутоиммунных аутоантител (антифосфолипидных, антинуклеарных, к тиреопероксидазе и тиреоглобулину и др.), аллоиммунных антител (антиспермальных), возрастание активности тканевых (маточных) и периферических натуральных киллеров (NK-клеток CD16+CD56+), совпадение по HLA-антигенам, возрастание активности В-лимфоцитов CD19+CD5+ [69, 96, 116, 118, 145, 169].

Повышенный интерес к влиянию АФА на имплантацию при проведении ВРТ способствовал проведению множества клинических исследований по определению взаимосвязи между наличием АФА и негативным анамнезом в виде многократных неудач ЭКО.

Обнаружено, что 8% женщин с неудачами имплантации после ЭКО и 9% женщин с бесплодием неясного генеза имеют более 1 вида АФА, что значительно больше по сравнению с группой здоровых фертильных женщин, где частота выявления АФА составила 1,5% [146]. При исследовании широкого спектра АФА методом ELISA (IgG, IgM, IgA антитела к КЛ, ФС, фосфатидилинозитолу (ФИ), фосфатидиловой кислоте (ФК), фосфатидилглицеролу (ФГ), фосфатидилхолину (ФХ)) были выявлены значимые различия в отношении IgG и IgM антител. Все виды IgG АФА были достоверно выше у женщин с бесплодием неясной этиологии, по сравнению с контролем в виде здоровых фертильных женщин, кроме антител к фосфатидилэтаноламину (ФЭ) и ФХ [146]. У женщин с

многократными неудачами имплантации после ЭКО значимо чаще выявлялись IgG антитела к КЛ, ФК, ФС и ФЭ. В отношении IgM изотипов значимая разница по сравнению с контролем выявлена в отношении антител к ФХ у женщин с неудачами имплантации после ВРТ и бесплодием неясного генеза [146]. При исследовании аналогичного спектра АФА у женщин с многократными неудачами имплантации (перенос 12 и более эмбрионов с отрицательным результатом теста на β ХГЧ), также было выявлено, что у женщин с многократными неудачами имплантации значимо чаще, по сравнению с фертильными здоровыми женщинами, выявляли АФА (22% и 5%, соответственно). Среди 22% женщин с АФА только 4% имели антитела к КЛ [60].

Другие исследователи под руководством Т. Eldar-Geva пришли к выводу об отсутствии взаимосвязи между наличием АФА и исходом ЭКО, а также между наличием АФА и количеством неудачных протоколов ВРТ в анамнезе, и не рекомендуют обследование на АФА женщинам с многократными неудачами имплантации после ЭКО [72].

М. Sanmarco выделяет среди других видов АФА антитела к ФЭ. В его работе определялись IgG, IgM и IgA антитела к КЛ, к ФЭ, к β 2гп-1 и ВА у 101 женщины с 3 и более неудачными протоколами ЭКО и у 160 контрольных фертильных женщин. АФА были выявлены у 39,65% женщин, что значимо выше по сравнению с 5% женщин в группе контроля [35]. Среди обнаруженных видов АФА антитела к ФЭ выявлялись значимо чаще по сравнению с ВА, антителами к КЛ и $\alpha\beta$ 2гп-1 (67,5% по сравнению с 0%, 15%, и 40%, соответственно). Интересным является факт, что в 70% антитела к ФЭ обнаруживались при отсутствии других АФА. Несмотря на то что авторы подтверждают значимое повышение АФА у женщин с неудачами ЭКО, они опровергают их влияние на исход протокола и частоту наступления беременности [35].

Группой исследователей под руководством Ulcova-Gallova Z. при анализе сывороток крови у 2995 женщин с различной репродуктивной патологией на широкий спектр АФА было выявлено, что у 48% пациенток с 2 и более неудачными протоколами обнаружены антитела к ФИ, и у 51% женщин антитела

к ФС. Четверть женщин была позитивна на 3 и более видов АФА. Авторы рекомендуют обследовать женщин с данной патологией не только на антитела к КЛ, но и на другие виды АФА [32].

Данные мета-анализа продемонстрировали, что обнаружение одного или более видов АФА приводило к более чем трехкратному увеличению риска неудач ЭКО. Наиболее часто в группе женщин с неудачными попытками ЭКО выявляли ВА (отношение шансов (ОШ)=5,6), антитела к ФИ (ОШ=5,03) и антитела к ФС (ОШ=4,51). Однако авторы делают выводы о высокой гетерогенности включенных исследований [124].

В работе Хизроевой Д.Х. повышенный уровень АФА в группе женщин с неудачами ЭКО в анамнезе был диагностирован у 42,1% пациенток. Авторы делают выводы о менее удачных репродуктивных исходах у женщин с АФА, по сравнению с женщинами без циркуляции АФА [18].

Проспективное исследование женщин с наличием и отсутствием антител к КЛ продемонстрировало меньшую частоту удачных исходов ВРТ у женщин с АФА. Частота имплантации, частота наступления беременности были ниже в группе женщин с наличием антител к КЛ (31,3% и 48,6%, 16,1% и 28,1%). Важным является то, что частота невынашивания беременности у женщин с АФА была выше в 2 раза (32% и 15,1% соответственно) [105].

По данным Chilcott I.T. 23,4% бесплодных женщин, выполняющих ЭКО, были дважды позитивны на АФА, однако это не повлияло на исходы протокола [148].

Американское Общество Репродуктивной Медицины также не поддерживает взаимосвязь АФА и исходов протоколов. В опубликованном практическом бюллетене, основанном на систематическом обзоре, не рекомендуется лечение этих женщин. По их данным, количество клинических беременностей и рожденных детей в группе женщин с наличием АФА составило 57 и 46%, по сравнению с 49,2 и 42,9% в группе женщин без АФА [160].

В научной литературе также имеются сообщения о взаимосвязи бесплодия неясной этиологии с наличием АФА. По данным некоторых исследователей, АФА

при бесплодии неясной этиологии выявляются в 15-59% случаев [52]. У женщин с бесплодием и АФС (первичным или вторичным на фоне СКВ) частота бесплодия неясной этиологии составила 24%. Интересным является факт, что на фоне прегравидарной подготовки с патогенетической терапией у 16,21% женщин возникла спонтанная беременность без применения ВРТ [112].

В ответ на растущий интерес к этому вопросу появился критический обзор Buckingham K.L., подвергающий глубокому сомнению возможность повреждающего влияния АФА, находящихся в крови матери, на зиготу или эмбрион, а также отвергающий возможность фармакологического влияния на данном этапе [57].

В настоящее время обследование на АФА у женщин с бесплодием и неудачами ЭКО не входит в перечень обследования в российских и международных клинических протоколах, однако некоторые эксперты считают его необходимым [2, 40, 144]. Carp H.J. не подтверждает влияние АФА на имплантацию в протоколе ЭКО, однако считает необходимым обследование на АФА женщин с неудачами ЭКО и бесплодием с целью изменения подходов к ведению их беременностей [47]. Высокий риск невынашивания индуцированной беременности у женщин с бесплодием и наличием АФА может быть причиной обследования на АФА на этапе планирования протокола не только с целью улучшения эффективности ЭКО, но и с целью выделения группы высокого риска и своевременной профилактики прерывания беременности и других акушерских осложнений [50, 105, 115].

Среди наиболее часто выявляемых антител у пациенток с многократными неудачами ЭКО можно назвать антитела к ФС [32, 33, 172], антитела к ФЭ [33, 35], антитела к ФИ [32, 172], антитела к КЛ [51, 105] и ВА [51, 172]. Таким образом, наиболее часто выявляемые антитела не входят в перечень АФА, входящих в критерии постановки диагноза АФС. Некоторые ученые рекомендуют обследовать женщин из данной группы на широкую панель АФА с целью полноценного обследования данной группы пациенток [60, 135, 149, 155, 171].

Несмотря на пристальный интерес к данному вопросу, исследователи до сих пор не пришли к консенсусу о значимости роли АФА в неудачах ЭКО. Многие исследователи подтверждают взаимосвязь между наличием АФА и неудачными попытками ЭКО [8, 38, 60, 78, 124, 135, 160], тогда как другие не поддерживают это предположение [37, 79, 101, 132, 149, 161]. В отношении влияния АФА на частоту имплантации после ЭКО также нет единого мнения: часть ученых признает их негативное влияние [8, 16, 32, 47, 149], другая часть отрицает [34, 77, 148, 160]. Кроме того, существует группа ученых, подтверждающих более частое выявление АФА у женщин с неудачами ЭКО, но при этом отрицающих их негативное влияние на исход протокола [34, 35, 148].

Роль АФА в развитии неудач ЭКО до конца не определена, но данный вопрос является крайне актуальным для широкого круга исследователей, изучающих иммунопатогенез нарушений имплантации и ранних прерываний беременности, а также множества клиницистов, возлагающих большие надежды на терапевтические возможности улучшения репродуктивных исходов при выполнении ВРТ.

1.3 Иммунопатогенез нарушений имплантации и развития ранних репродуктивных потерь у женщин с наличием АФА

Многостороннее влияние АФА на процессы формирования и развития трофобласта подтверждено с момента установления маточно-плацентарного кровотока, когда начинается активный контакт с плазмой матери, содержащей циркулирующие АФА [6, 7]. Открытым и широко обсуждаемым остается вопрос о влиянии АФА на развитие более ранних репродуктивных потерь, то есть на этапе имплантации и инвазии эмбриона. Ряд ученых выдвинули теории о схожести механизмов неудач имплантации и раннего прерывания беременности с привычным невынашиванием беременности, связывая это с наличием АФА [28, 35, 63, 74, 113].

В зависимости от времени прерывания беременности выделяют предимплантационные, периимплантационные и постимплантационные потери.

Клинически повторяющиеся предимплантационные (преэмбрионические) потери выглядят как бесплодие неясной этиологии, периимплантационные нарушения наблюдаются при многократных неудачных протоколах ЭКО, переносах эмбрионов и представляют собой биохимические (или доклинические) потери беременности. Постимплантационные потери представляют собой невынашивание беременности [14].

На экспериментальных моделях с помощью введения мышам моноклональных АФА было доказано их негативное влияние как на эмбрион [31, 124], так и на эндометрий [79]. Показано, что введение мышам моноклональных антител к КЛ приводит к сбою имплантации эмбриона в результате связывания АФА с клетками трофэктодермы [31]. Также подтверждена задержка развития или гибель эмбрионов мышей, прокультивированных с IgG АФА, по сравнению с эмбрионами, прокультивированными с контрольными Ig [124]. Показано, что эмбрионы, полученные от мышей после введения им моноклональных IgG АФА, теряют способность к имплантации после их удаления из среды с АФА и помещения в матку интактных мышей [79]. При исследовании женщин с трубным фактором и бесплодием неясной этиологии обнаружено, что у 50% женщин с нарушением морфологии эмбрионов, выявлены высокие титры антител к КЛ, среди женщин с нормальной морфологией эмбрионов частота выявления данных антител была значимо ниже и составила 20% [98].

Другим возможным механизмом влияния АФА на этапы имплантации является ингибирующее влияние АФА на процессы ангиогенеза в эндометрии, о чем было упомянуто выше [36, 94, 156]. При изучении влияния АФА на процессы ангиогенеза *in vivo* и *in vitro*, было обнаружено, что АФА значительно уменьшают количество и общую длину трубочек, образованных эндотелиальными клетками эндометрия в условиях *in vitro* на трехмерном матриксе Матригель, и уменьшает количество вновь образованных сосудов у мышей, которым были введены IgG АФА [36]. Кроме того, АФА значительно снижают выработку сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF и матричных металлопротеиназ на ядерном уровне. Сделаны выводы о том, что АФА ингибируют процессы ангиогенеза, что

может объяснить дефекты плацентации [36]. Данные о нарушении процессов ангиогенеза в эндометрии могут свидетельствовать о нарушении не только более поздних процессов плацентации, но и на более раннем этапе – снижении рецептивности эндометрия и нарушению имплантации [137].

Выдвинута и доказана теория способности влияния АФА на экспрессию генов, ответственных за воспаление в децидуальных клетках [38].

Негативное воздействие АФА на имплантацию объясняют опосредованным повышением периферической активности НК-клеток. У 78% женщин с антителами к ФС и ФЭ обнаружена повышенная периферическая активность НК-клеток, по сравнению с 8% женщин без АФА и 13% женщин, имеющих другие АФА (кроме антител к ФС и ФЭ). У женщин с бесплодием при отсутствии мужского фактора частота выявления АФА и повышения НК-активности значительно выше (57% и 34%), по сравнению с женщинами, бесплодие которых обусловлено мужским фактором (19% и 13%, соответственно) [33]. При изучении содержания НК-клеток в биоптатах эндометрия у женщин с многократными неудачами ЭКО не было обнаружено корреляции между наличием АФА и повышением НК-клеток в эндометрии [163].

К сожалению, в данных экспериментальных исследованиях представлены лишь результаты патологического действия АФА, но отсутствует трактовка данных результатов.

АФА могут содержаться не только в плазме, но и тканевой жидкости, с которой имеет контакт эмбрион с начала момента имплантации [10]. Эмбрион может контактировать с IgA АФА в полости матки, и IgG и IgM АФА в составе межклеточной жидкости в процессе погружения бластоцисты в эндометрий. Кроме того, яйцеклетка, окруженная фолликулярной жидкостью, являющейся разновидностью тканевой жидкости, также находится в контакте с АФА.

Теоретическое представление о нахождении АФА в вышеперечисленных локализациях можно подтвердить рядом практических работ. По данным иммуногистохимического исследования, выполненного на мышах, IgG и IgA были обнаружены в строме эндометрия, вокруг эндометриальных желез, во

внеклеточном пространстве lamina propria и других структурах, при этом количество иммуноглобулинов значительно увеличивалось с 1 по 5 день беременности. IgA превосходило количество IgG в 3-4 раза. IgM антитела обнаружены не были [140]. При изучении изменения содержания иммуноглобулинов в половом тракте мышей в зависимости от дня цикла, иммуногистохимическим методом обнаружены IgG и IgA в строме эндометрия, вокруг базальных желез, при этом максимум концентрации иммуноглобулинов наблюдался перед овуляцией, в дальнейшем их концентрация снижалась [103].

В ряде экспериментальных работ и клинических исследований, выполненных на пациентках, подвергающихся ВРТ, в фолликулярной жидкости проводилась идентификация и отслеживалась динамика изменения концентрации IgG, IgA, IgM, а также таких иммунологических показателей как компоненты системы комплемента и других веществ [72, 100, 102, 156]. Изучение содержания IgG АФА в фолликулярной жидкости у пациенток с многократными неудачами ВРТ в анамнезе продемонстрировало, что у всех пациенток с наличием в крови IgG и/или IgM АФА были обнаружены IgG АФА также и в фолликулярной жидкости. IgM в фолликулярной жидкости обнаружены не были. У пациентов с отсутствием АФА в плазме крови, в фолликулярной жидкости IgG АФА обнаружены не были [100].

Еще одним возможным объяснением патологического влияния АФА на имплантацию может быть тот факт, что в процессе протокола ВРТ во время стимуляции овуляции происходит увеличение титра АФА в плазме [34, 169]. При изучении изменения концентрации АФА во время проведения протокола ЭКО при трехкратном взятии сыворотки крови было отмечено возрастание концентрации IgM антител к КЛ, ФС, а также IgG антител к КЛ, ФС, и ФХ [169].

У женщин с эндометриозом и трубным фактором было обнаружено значимое возрастание титра IgG антител к КЛ на 14 день после переноса, по сравнению с титром до начала протокола [34]. Учитывая то, что АФА могут находиться в фолликулярной жидкости, в межклеточной жидкости в эндометрии, увеличение их концентрации также может усиливать их негативный эффект.

Значимо большая частота АФА была выявлена среди женщин с биохимическими беременностями (прервавшимися до регистрации УЗИ-признаков клинической беременности), по сравнению с женщинами с отрицательным тестом на β ХГЧ. Частота выявления антинуклеарных антител, повышения активности НК-клеток и циркулирующих эмбриотоксинов была сопоставима. Автор связывает причину прерывания биохимических беременностей с дефектом ангиогенеза [74].

Таким образом, нарушение имплантации и ранних доклинических потерь беременности при наличии АФА может быть следствием нарушения процессов ангиогенеза в эндометрии и негативного влияния АФА на развитие эмбриона. АФА могут оказывать неблагоприятное влияние на созревание ооцита, находясь в фолликулярной жидкости. Во время имплантации эмбрион контактирует с межклеточной жидкостью эндометрия, где также содержатся АФА, которые могут оказывать неблагоприятное влияние на данный процесс. Кроме того, контролируемая стимуляция овуляции (КСО) в протоколе ЭКО приводит к увеличению титра АФА в сыворотке крови. Применение обоснованной патогенетической терапии у женщин с АФА может положительно повлиять на эффективность методов ВРТ.

1.4 Современные подходы к ведению женщин с циркулирующей антифосфолипидных антител при проведении экстракорпорального оплодотворения

Проведение протокола ЭКО с большой гормональной нагрузкой, быстрыми нефизиологическими изменениями в системе гемостаза является опасным провоцирующим фактором для развития тромботических осложнений у женщин с АФС. Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов [81, 109], что способствует развитию гиперкоагуляции и может привести к артериальным и венозным тромбозам. При исследовании отдельных факторов свертывания на этапе стимуляции овуляции отмечается достоверное увеличение в плазме крови

коагуляционного потенциала: фактора Виллебранда и его активности, фактора VIII, фактора V, фибриногена наряду с уменьшением активности антикоагулянтной системы: снижение уровня антитромбина III, протеинов C и S [81, 135]. Во время проведения стимуляции овуляции у женщин без тромбофилии отмечается увеличение общего гемостатического потенциала до 32% и увеличения общего коагуляционного потенциала до 27% [81].

Эпизоды венозной тромбозии встречаются в 0,08-0,11% случаев женщин, выполняющих ЭКО [64]. Риск тромбозов при беременности, наступившей после ЭКО возрастает в 4 раза для одноплодной беременности и в 6 раз для двойни [36]. При развитии синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) вероятность ТЭО достигает 4,1% [36].

В литературе имеется множество статей с описанием случаев тромбозов различной локализации у женщин с АФС, выполняющих ЭКО: интракардиальной [117], церебральных артерий [23], подключичных артерий [159] и других, а также развития катастрофической формы АФС [60, 61].

Несмотря на то, что женщины с АФС (как первичным, так и вторичным на фоне СКВ) имеют более высокий риск ТЭО, данный диагноз не является противопоказанием для выполнения ЭКО. Стимуляция овуляции при применении ВРТ может быть безопасной и успешной, когда проводится в состоянии клинической ремиссии при применении антикоагулянтной и противовоспалительной терапии [53, 88, 111, 126]. Наличие высокого титра АФА рассматривается как относительное противопоказание к применению ВРТ [17].

В большинстве исследований, посвященных проблемам ВРТ у женщин с АФС, в совокупности обсуждаются вопросы ведения ВРТ и у женщин с СКВ [53, 73, 88, 111, 126]. Опубликованы клинические рекомендации по ведению протоколов ВРТ у женщин с АФС и СКВ [53]:

- бережная стимуляция овуляции;
- препарат выбора для стимуляции овуляции – кломифена цитрат;
- профилактика СГЯ;

- сопутствующая терапия: антикоагулянты, кортикостероиды, иммунодепрессанты;
- перенос замороженных эмбрионов и донация яйцеклеток;
- ЭКО в естественном цикле предпочтительнее; натуральные эстрогены предпочтительнее, чем синтетические эстрогены; трансдермальный путь для введения эстрогенов предпочтительнее, чем пероральный;
- поддержка лютеиновой фазы: прогестерон лучше, чем ХГЧ; натуральный прогестерон лучше синтетического.

В целом, количество исследований по ведению протокола ЭКО у женщин с АФС и СКВ очень ограничено. В мета-анализе 2015 года группой французских ученых найдено всего 3 таких исследования [111]. В первом исследовании включено 17 пациентов, 63 цикла индукции овуляции/ЭКО, в результате у 25% было зарегистрировано обострение СКВ, у 3% СГЯ, тромбозов не было. Второе исследование включило 10 пациентов, 40 циклов ЭКО, обострение СКВ отмечено у 31% женщин, ТЭО и СГЯ не было. В третьем исследовании включено 34 пациентки и проведено 83 протокола ЭКО, 8% обострений СКВ, 5% тромбозов и отсутствие СГЯ. Авторы объясняют такой высокий процент тромбозов в третьем исследовании неправильной тактикой терапии [111].

В последующем проспективном исследовании данного автора было включено 37 женщин, планирующих ЭКО (ЭКО/ИКСИ). У 23 включенных женщин было СКВ (среди которых у 8 носительство АФА), у 10 первичный АФС, и у 4 сочетание АФС и СКВ. Частота бесплодия неясной этиологии в данной группе пациенток составила 24%. В протоколе ЭКО применялись различные методы терапии: гидроксихлорохин (72%), глюкокортикоиды (70%), азатиоприн (3%), АСК (92%), и/или НМГ (62%). На фоне проводимой терапии у 6 женщин возникла спонтанная беременность без применения ВРТ. Общее число попыток ЭКО было 2,6 (от 1 до 8). Во время исследования у 70% пациенток наступила беременность, закончившаяся рождением живых здоровых детей. В 8% протоколов ЭКО были выявлены осложнения: у 4 женщин было отмечено

обострение СКВ (у 3 полиартрит, у 1 волчаночный энтерит), у 4 женщин произошли ТЭО [112].

Множественные стимуляции овуляции с развитием гиперэстрогении для женщин с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям могут выступать провоцирующим фактором для дебюта заболевания. В литературе описаны случаи дебюта сахарного диабета I типа, СКВ на фоне множественных стимуляций овуляции [138]. В связи с чем, необходимо стремиться к уменьшению количества циклов с увеличением их эффективности и к более мягким протоколам стимуляции с предпочтением ЭКО в естественных циклах.

В отношении женщин с АФС мнение относительно обязательной антикоагулянтной и антиагрегантной терапии едино [17, 73, 88]. Тромбопрофилактику рекомендуют всем женщинам с АФС при наличии ТЭО в анамнезе, при возрасте старше 40 лет, при подтвержденной тромбофилии и при развитии СГЯ. Отмена антикоагулянтов рекомендуется за 24 ч до пункции яичников и восстановление терапии через 24 ч после забора яйцеклеток, также доказана необходимость продолжения данной терапии при подтверждении беременности [73].

В международных рекомендациях европейской лиги борьбы с ревматизмом EULAR 2017 года группа экспертов рекомендует при проведении ВРТ всем женщинам с АФС или АФА проводить тромбопрофилактику антикоагулянтами и/или низкими дозами АСК [88].

Женщинам с АФА без наличия тромбозов в анамнезе антикоагулянтную терапию советуют начинать не раньше момента переноса эмбрионов. В отношении женщин с АФА и наличием тромбозов в анамнезе даны рекомендации о переходе с варфарина на гепарин с момента начала стимуляции овуляции. Для снижения риска кровотечения введение гепарина должно быть прекращено за 12-24 ч до пункции и начато через 6-8 ч после нее [174]. В обоих случаях введение гепарина должно быть пролонгировано до теста на β -ХГЧ и в случае наступления беременности продолжено. Низкие дозы АСК также должны быть назначены, но с

целью профилактики кровотечения отменены за 5-7 дней до пункции яичников и после пункции продолжены [53].

В стандартах 2012 года американского общества пульмонологов по антитромботической терапии и профилактике тромбозов отсутствуют рекомендации по ведению протоколов ВРТ у женщин с АФС. Однако предполагают схожие причины высокого риска ТЭО для ВРТ, как и для беременности (в том числе и для АФС). Авторы не рекомендуют рутинную тромбопрофилактику всем женщинам антикоагулянтами и антиагрегантами в протоколе ЭКО, а назначение НМГ считается обоснованным только при развитии СГЯ и на протяжении 3 месяцев после разрешения его клинических проявлений, не ориентируясь на наличие наследственной и приобретенной тромбофилии [36].

Скрининг на АФА и тромбофилию перед проведением ЭКО рутинно не рекомендован и мало распространен, поэтому рекомендации по тромбопрофилактике часто основываются на наличии тромбоза в анамнезе и факторах риска [135].

В рекомендации Королевского колледжа акушеров и гинекологов по снижению риска ТЭО у женщин при беременности и послеродовом периоде авторы предлагают балльную оценку риска, в зависимости от чего рекомендуется длительность и начало антикоагулянтной терапии. Опасность наличия АФА оценивается в зависимости от наличия или отсутствия тромбозов в собственном или семейном анамнезе. Отсутствие ТЭО в анамнезе расценивается как тромбофилия низкого риска [151].

Важным вопросом является тактика ведения пациенток с бессимптомной циркуляцией АФА во время проведения ЭКО. По мнению экспертов, стимуляция овуляции во время проведения ВРТ у таких пациенток является показанием к назначению НМГ и низких доз АСК [50]. Однако некоторые исследователи отрицают циркуляцию АФА как повод к назначению терапии, рекомендуемой при АФС [36]. Но женщины, нуждающиеся в применении ВРТ, в силу бесплодия не имеют акушерского анамнеза, отягощение которого является основным поводом к постановке диагноза АФС. Таким образом, наличие АФА у таких женщин может

нести в себе большую опасность как с точки зрения ТЭО, так и с точки зрения невынашивания беременности и другой акушерской патологии [35, 105].

В целом, в ведении пациенток с наличием АФА имеет множество дискуссионных вопросов. Противоречивым и важным является не только влияние АФА на эффективность ЭКО, но также и подходы к ведению данной группы женщин: какую терапию считать стандартной? Наиболее часто в литературе рекомендуется терапия, аналогичная терапии АФС при беременности – комбинация низких доз АСК и гепарина или НМГ [3, 15, 50, 88]. У женщин с АФС она является необходимой частью тромбопрофилактики, в то время как у пациенток с носительством АФА данная схема предлагается для улучшения исходов ЭКО. Работы на данную тему немногочисленны и включают маленькую выборку пациентов, однако некоторые исследователи отмечают значимое улучшение эффективности ЭКО в группе женщин с циркуляцией АФА, получивших гепарин и низкие дозы АСК [97, 113].

Сочетание низких доз АСК и НМГ не всегда оказывается эффективно [25]. Применение гепарина и низких доз АСК у женщин с неудачами ЭКО и наличием АФА или антинуклеарных антител не привело к увеличению частоты имплантации и наступления беременности [25].

НМГ применяется в репродуктивной медицине не только в качестве антикоагулянта с минимальным количеством побочных эффектов, но и в качестве иммуномодулирующей терапии, оказывающей позитивное влияние на процессы ангиогенеза. При изучении влияния тинзапарина и энокспарина на эндометриальный ангиогенез в условиях его нарушения под действием АФА было продемонстрировано, что добавление НМГ предотвращает ингибирование ангиогенеза, обусловленное действием АФА. В условиях *in vivo* и *in vitro* доказано позитивное влияние НМГ на изменение активности транскрипционных факторов (NekB и/или STAT3), секрецию эндотелиального фактора роста (VEGF) и матричных металлопротеиназ [84].

Так как процессы ангиогенеза участвуют в формировании рецептивности эндометрия и нормальной имплантации, а АФА способны опосредованно

угнетать и нарушать ангиогенез, то положительное влияние гепарина на ангиогенез может объяснить улучшение частоты имплантации [91, 84].

– Однако данный эффект описан именно в отношении женщин с циркуляцией АФА. Тем не менее, гепарин начали применять и в отношении женщин без АФА, а также женщинам с многократными неудачами имплантации и подтверждали его высокую эффективность [96, 128], и у женщин с наследственной тромбофилией [128]. Однако не все исследователи подтверждают эффективность такой терапии [46, 170], в связи с чем данный препарат не рекомендуется в качестве рутинной профилактики при проведении ВРТ и используется по показаниям.

Добавление глюкокортикостероидов к низким дозам АСК также показало свою эффективность у женщин с АФС и другими аутоиммунными заболеваниями [27, 142]. Применение 10 мг преднизолона и 81 мг АСК привело к улучшению эффективности в 2 раза у 307 женщин, принявших участие в исследовании [146]. Сочетание метилпреднизолона и низких доз АСК у АФА-положительных женщин привело к достоверному улучшению частоты имплантации и наступления беременности [27].

Несмотря на то, что ВРТ в мире применяется уже более 35 лет, тактика ведения пациенток с наличием АФА до конца не определена. Существуют немногочисленные рекомендации, основанные на результатах работ по ведению протокола ЭКО у женщин с АФС и СКВ с выборкой до 100 человек [126, 127]. Также существуют протоколы по профилактике ТЭО, в которых на основании наличия факторов риска прописываются рекомендации по тромбопрофилактике пациенток с АФС при проведении ЭКО [36, 44, 120].

В отношении женщин с циркуляцией АФА и без тромбозов в анамнезе вопрос о профилактике ТЭО часто не рассматривается [120]. В основном опубликованы исследования, оценивающие эффективность в отношении частоты наступления имплантации и частоты наступления беременности при применении различных сочетаний гепарина, НМГ, низких доз АСК и преднизолона [2, 3, 31, 38, 100, 137, 147, 156]. Однако единого мнения у исследователей на этот счет

также нет. В связи с установлением важности роли иммунной системы в развитии неудач ВРТ, в литературе последних лет широко обсуждается иммунокорректирующая терапия у женщин с АФС.

1.5 Иммунокорректирующая терапия у женщин с АФС при применении ВРТ

В настоящее время не существует единых терапевтических рекомендаций в отношении иммунотерапии АФС как при ведении беременности, так и при проведении ВРТ. До начала 90-х годов с этой целью наиболее широко применялись методы иммуносупрессии глюкокортикоидами. Теоретическим обоснованием применения глюкокортикоидов является их противовоспалительная активность и снижение уровня АФА при их применении. Однако в 1989 году Lockshin M. публикует данные о неэффективности преднизолона у пациенток с синдромом потери плода и АФС, а также данные об угрозе здоровью для матери и плода при его применении [127]. Наличие многочисленных побочных эффектов у глюкокортикоидов переключило внимание ученых в сторону разработки методов иммуномодуляции, в том числе с помощью ВВИГ.

ВВИГ появились в клинической практике в 40-х годах XX века, когда Кон с сотрудниками описал метод выделения иммуноглобулинов путем спиртового фракционирования человеческой плазмы. Первыми показаниями к применению были врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния. С 80-х годов XX века их стали применять с иммуномодулирующей целью при некоторых аутоиммунных заболеваниях, в том числе при АФС [1]. В акушерско-гинекологической практике для лечения женщин с АФС ВВИГ были предложены к применению как альтернатива глюкокортикоидам. К настоящему времени они стали препаратами выбора при лечении АФС у беременных женщин, а также внутриутробной цитомегаловирусной инфекции [11].

ВВИГ – полиспецифические интактные иммуноглобулины, преимущественно IgG-класса, полученные из плазмы здоровых доноров. Вследствие большого числа доноров (от 3000 до 1000000 человек) препараты ВВИГ имеют широкий спектр антител, синтезируемых плазматическими клетками человека в результате

активации адаптивного иммунитета против часто встречающихся чужеродных антигенов, а также естественные аутоантитела. ВВИГ содержат IgG и небольшое количество IgA и IgM антител [1]. Кроме иммуноглобулинов в их составе содержатся растворимые рецепторы – CD4 и CD8, белки главного комплекса гистосовместимости человека (HLA) и некоторые цитокины [90]. Распределение субклассов IgG соответствует профилю нормальной сыворотки. Время полувыведения инфузироваанных ВВИГ – около 3 недель.

Механизм действия ВВИГ сложен и многосторонен. Эффективность больших доз ВВИГ при заболеваниях, в основе которых ведущую роль выполняют аутоантитела, основана на насыщении Fc-рецепторов, что приводит к увеличению катаболизма IgG, в том числе и аутоантител [11, 54]. ВВИГ содержат антиидиотипические антитела, связывающие и нейтрализующие патогенные антитела и препятствующие их взаимодействию с антигеном [154], обладают способностью воздействовать на продукцию и активность цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8 и других), увеличивают экспрессию TGF-бета, IL-10, и транскрипционного фактора FoxP3 в T-регуляторных клетках (T-reg), что приводит к повышению их супрессорной активности [120].

Как возможный механизм протективного действия ВВИГ рассматривается их влияние на экспрессию молекулы CD200 на эндотелиальных клетках, клетках трофобласта, децидуальной ткани, В-, Т-клетках и других. При взаимодействии молекулы CD200 с рецептором CD200R, экспрессирующимся на дендритных клетках, макрофагах, происходит активация IDO (индоламин 2,3-диоксигеназы), в результате чего происходит депривация триптофана и снижение пролиферации Т-клеток, NK-клеток и, как итог, обеспечение иммунологической толерантности, необходимой для сохранения беременности [11].

Одним из важных свойств ВВИГ является защита эндотелия сосудов от повреждающего действия различных факторов, приводящих к развитию претромботического состояния. При терапии внутривенными иммуноглобулинами, за счет использования больших доз биопрепарата, создается высокая концентрация иммуноглобулинов в кровотоке, благодаря чему

происходит подавление провоспалительной и прокоагулянтной активности эндотелиальных клеток, снижение экспрессии молекул адгезии P-selectin, ICAM-1, в результате чего происходит сдерживание лейкоцитарной инфильтрации тканей и предотвращение дальнейшего прогрессирования патологического процесса, приводящего к повышенной тромбогенности сосудистой стенки [11].

Однако, несмотря на широкое применение ВВИГ, исследователи так и не пришли к единому мнению о механизмах их действия.

Иммуномодулирующая терапия ВВИГ с целью коррекции иммунного ответа у больных с системными и аутоиммунными заболеваниями относится к числу наименее изученных областей. АФС на настоящий момент не включен в список показаний по применению ВВИГ и находится за пределами инструкций. Однако ВВИГ в последние несколько лет получили широкое распространение в терапии АФС при беременности, особенно в комплексной терапии АФС рефрактерного к стандартной терапии, при катастрофическом АФС [30, 44, 67, 123].

Данные мета-анализа литературы продемонстрировали отсутствие эффективности применения ВВИГ в больших группах гетерогенных пациентов с бесплодием, однако его применение было эффективно в группах пациентов, отобранных на основании иммунологических тестов [59].

Изучение эффективности и механизма действия ВВИГ проведено группой исследователей [4, 5, 13]. Терапия препаратами ВВИГ у пациенток с АФС и невынашиванием беременности (основная группа, n=48) статистически значимо снижала частоту осложнений беременности: угрозу выкидыша – в 3 раза, угрозу преждевременных родов – на 54%, вероятность гестоза – на 37%, плацентарную недостаточность – в 4 раза, задержка внутриутробного развития плода наблюдалась в 5,7 раз реже, по сравнению с контрольной группой беременных с АФС, получавших только традиционную терапию НМГ и низкими дозами АСК. Улучшение исходов беременности объясняется влиянием на баланс иммунокомпетентных клеток [13].

Данных о лечении пациенток с АФС в протоколе ЭКО с включением ВВИГ значительно меньше, по сравнению с их применением при беременности. Однако

результаты этих исследований говорят о такой же высокой эффективности их применения на этапе протокола ЭКО и необходимости дальнейших исследований [148, 149].

Сравнение эффективности лечения бесплодия методом ЭКО у женщин младше 40 лет с наличием АФА при добавлении ВВИГ к низким дозам АСК и гепарину, по сравнению с группой женщин, получавших только данные препараты без ВВИГ, показало высокую эффективность применения иммунотерапии ВВИГ. При выполнении двух протоколов ЭКО у женщин с АФА, получавших аспирин и гепарин, беременность наступила у 46%, по сравнению с 17% в группе женщин с АФА, не получавших терапию. У 121 женщины с АФА, у которой не наступила беременность в первых двух циклах в третьем цикле к аспирину и гепарину добавили ВВИГ. После добавления ВВИГ показатель рождаемости составил 41%, по сравнению с 17% в группе, получавшей только аспирин и гепарин в третьем протоколе. Исследователи делают вывод о высокой эффективности схемы в виде низких доз АСК и гепарина, об улучшении исходов ЭКО при добавлении ВВИГ и рекомендуют его применение при выявлении антител к ФС и антител к ФИ [155].

Исследование эффективности добавления ВВИГ к терапии гепарином и низкими дозами АСК у женщин с 4 и более неудачными попытками ЭКО независимо от наличия АФА показало, что в группе женщин с АФА частота наступления беременности оказалась выше и составила 42%, по сравнению с 19% в группе женщин без АФА. Авторы говорят о высокой эффективности добавления ВВИГ к стандартной терапии гепарином и АСК у женщин с циркулирующей АФА и неудачами ЭКО [26].

Показанием к назначению ВВИГ также может быть наличие бесплодия неясного генеза или неудачных попыток ЭКО [118]. В работе 2012 г. Michael R. Virro ВВИГ назначался сразу после переноса эмбриона 229 женщинам с 2 и более неудачными попытками ЭКО ($3,3 \pm 2,1$) или бесплодием неясной этиологии ($3,8 \pm 2,7$ лет). Показатель наступления беременности составил 60,3% (138/229) на один цикл, а показатель рождения живых детей составил 40,2% (92/229) на один

цикл, что было значимо выше по сравнению со средними показателями по Канаде. В случаях переноса 1 эмбриона, показатель беременности при применении ВВИГ был в 2 раза выше, по сравнению со средними показателями по Канаде. В случаях переноса 2 эмбрионов высокого качества – бластоцисты на 5 день – эффективность составила почти 100% у женщин, получивших иммуноглобулин (30/31). Авторы делают выводы о высокой эффективности применения ВВИГ при неоднократных неудачных попытках ЭКО и/или бесплодии неясной этиологии [118].

Данные систематического обзора трех рандомизированных контролируемых исследований и двух когортных контролируемых исследований продемонстрировали данные об улучшении исходов при применении ВВИГ у женщин с привычным невынашиванием и многократными неудачными попытками ЭКО. Частота рождения живых детей в группе пациенток, получавших ВВИГ составила 36%, что было значимо выше, чем в контрольной группе 19,3%. Также применение ВВИГ способствовало значимому снижению частоты прерывания беременности (с 38,5% до 15,8%) и увеличению частоты регистрации клинической беременности (с 31,3% до 42,6%) [65].

У пациенток с многократными потерями беременности после ЭКО была получена высокая эффективность сочетания ВВИГ и преднизолона в отношении процента рождения живых детей, кумулятивный показатель которого достигал 61,5%. Авторы делают выводы о необходимости продолжения клинических испытаний [104].

Причиной назначения ВВИГ у женщин с невынашиванием беременности и многократными неудачными попытками ЭКО также может быть выявление повышения содержания НК-клеток (CD3-CD56+/CD16+) и НКТ-клеток (CD3+CD56+/CD16+). Процент наступления беременности при применении ВВИГ в этом случае составил 92,5%, показатель рождения живых детей 82,5%, что было значимо выше по сравнению в пациентки, не получавшими ВВИГ и имеющими такой же анамнез и иммунологические отклонения (25% и 12,5%, соответственно) [122].

Эффективность ВВИГ была доказана в исследовании, в котором приняли участие 188 женщин с многократными неудачами ЭКО и повышением числа НК-клеток ($>12\%$), а также отмечено достоверное снижение уровня НК-клеток после инфузии ВВИГ [62]. Применение ВВИГ у 32 женщин со стойким повышением циркулирующих НК-клеток ($>12\%$), и безрезультатным переносом не менее 12 эмбрионов в полость матки (в течение нескольких протоколов ЭКО (ЭКО/ИКСИ)) также показало крайне высокую эффективность. При применении ВВИГ беременность наступила у 56%, без него у 9%. Вероятность рождения живых детей составила 38% с ВВИГ и 0% без ВВИГ [76].

В литературе наиболее часто показанием для назначения ВВИГ является: привычное невынашивание беременности и многократные неудачи имплантации при наличии АФА и/или повышении активности НК-клеток [75].

Систематический обзор результатов эмпирического назначения ВВИГ женщинам с многократными неудачами ЭКО (по сравнению с плацебо) продемонстрировал значимое улучшение исходов ВРТ: увеличение частоты имплантации (ОШ=2,7, 95%ДИ=1,3-5,6), клинической беременности (ОШ=1,475, 95%ДИ=1,19-1,82) и рождения живых детей (ОШ=1,61, 95%ДИ=1,24-2,1). Частота невынашивания беременности была значимо ниже у пациенток, получивших ВВИГ (ОШ=0,35, 95% ДИ=0,17-0,74), однако значимых различий в частоте рождения живых детей выявлено не было (ОШ=2,89, 95%ДИ=0,8-10,3). Авторы выступают с поддержкой назначения ВВИГ пациенткам с многократным неудачами ЭКО [121].

Применение ВВИГ включено в клинические рекомендации корейского общества по репродуктивной иммунологии [119]. Основным показанием к назначению ВВИГ для женщин с повторными неудачами имплантации является наличие нарушений в клеточном звене иммунитета, при этом наличие аутоиммунной патологии отрицается для назначения терапии. Авторами рекомендуются иммунологические тесты (содержание и цитотоксичность периферических НК-клеток, отношение Th1/Th2) при привычном невынашивании

беременности и повторных неудачах имплантации, на основании чего рекомендуется применение ВВИГ.

Режимы дозирования и время введения ВВИГ несколько отличаются: в исследовании M. Moragu вводили 400 мг/кг перед переносом эмбрионов и через 15 дней после переноса, затем каждые 3 недели до 13 недель беременности [122]. В работе Michael R. Virgo ВВИГ вводили сразу после переноса эмбриона в дозе 400 мг/кг. И при повышении активности НК-клеток при наступлении беременности вводили по 25 г в 1 триместре беременности [118]. В другом исследовании до переноса вводили 500 мг/кг и затем при положительном ХГЧ продолжали терапию ежемесячно по 500 мг/кг до 28 недель беременности [76]. К сожалению, объем и количество исследований немногочисленны, что требует продолжения изучения этого вопроса в более крупных исследованиях.

В литературе также встречаются сочетанная терапия ВВИГ с ингибиторами опухоли-некротизирующего фактора α (TNF α) Адалимумабом (Humira®) [173]. В работе Winger E.E. и соавторов приняло участие 85 субфертильных женщин с повышением Th1/Th2 цитокинов. Все пациентки были поделены на 4 группы: в 1 группе 51 пациентка получила комбинированную терапию ВВИГ и ингибиторами TNF α , во 2 группе 23 пациентки получили только ВВИГ, в 3 группе 6 пациенток получили только ингибиторы TNF α , в 4 группе 5 пациенток, которые не получали иммунотерапию. Частота имплантации, частота клинической беременности и рождений живых детей, рассчитанные на количество перенесенных эмбрионов, были значимо выше у женщин 1 группы, по сравнению с 4 группой (59%(50/85) и 0% (0/9); 80% (33/41) и 0% (0/5); 73% (30/41%) и 0% (0/5), соответственно. Также частота имплантации, частота клинической беременности и рождений живых детей, рассчитанные на количество перенесенных эмбрионов, были значимо выше у женщин 2 группы, по сравнению с 4 группой (47%(21/45) и 0% (0/9); 57% (13/23) и 0% (0/5); 52%(12/23%) и 0%(0/5), соответственно. Авторы делают выводы о высокой эффективности сочетания терапии ВВИГ с TNF α у молодых пациенток с подъемом соотношения Th1/Th2 цитокинов.

Также встречаются единичные сообщения об успехе иммунотерапии пациентов с АФА и многократными неудачами ЭКО моноклональными антителами к CD20 антигену (Ритуксимаб) [161].

К сожалению, в большинстве исследований по применению ВВИГ в протоколе ЭКО у женщин с многократными неудачами ЭКО и бесплодием неясной этиологии не описана структура репродуктивных неудач. Объяснением столь высокой эффективности их применения могут быть многочисленные данные о широком распространении АФА и АФС как причин ранних репродуктивных потерь при проведении ВРТ [16, 38, 60, 77] и высокая эффективность ВВИГ у женщин с АФА при проведении ВРТ [26, 155].

Суммируя данные обзора литературы, можно сделать вывод о том, что АФС является значимой проблемой в современном акушерстве и среди аутоиммунных заболеваний занимает первое место в развитии репродуктивных потерь. Доказана роль АФА в развитии акушерской патологии, но актуальным вопросом для репродуктивной медицины является схожесть иммунных механизмов при невынашивании беременности и при ранних репродуктивных потерях, включающих прерывание беременности до регистрации клинической беременности и повторные неудачи имплантации после ЭКО.

Дискуссионным вопросом остается необходимость обследования женщин с бесплодием и многократными неудачами ЭКО на АФА, при этом ряд исследователей считают его необходимым [2, 40, 144]. Обсуждается необходимость выявления АФА перед протоколом ЭКО не только с целью улучшения эффективности ЭКО, но и для определения групп высокого риска прерывания беременности и других акушерских осложнений [50, 105, 115].

В литературе широко обсуждается роль неконвенциональных АФА, не указанных в критериях обследования при АФС, ввиду их частого выявления у женщин с многократными неудачами ЭКО: антитела к ФС [32, 33, 172], антитела к ФЭ [33, 35], антитела к ФИ [32, 172].

В качестве патогенетического объяснения негативной роли АФА в развитии нарушения процессов имплантации и ранних репродуктивных потерь

обсуждается нарушение процессов ангиогенеза в эндометрии и негативное влияние АФА на развитие эмбриона. Доказано нахождение АФА в фолликулярной жидкости, что может оказывать неблагоприятное влияние на созревание ооцита. Кроме того, во время имплантации эмбрион контактирует с межклеточной жидкостью эндометрия, где также содержатся АФА, что может оказывать неблагоприятное влияние на данный процесс, а проведение контролируемой стимуляции овуляции (КСО) в протоколе ЭКО сопровождается увеличением титра АФА в сыворотке крови.

Крайне дискуссионной остается тактика ведения пациенток с наличием АФА при проведении ВРТ. В отношении женщин с циркуляцией АФА и без тромбозов в анамнезе вопрос о профилактике ТЭО часто не рассматривается [120]. В основном, в исследованиях оценивается эффективность применения НМГ, низких доз АСК, нефракционированного гепарина и преднизолона в отношении частоты наступления имплантации и частоты наступления клинической беременности [2, 3, 31, 38, 100, 137, 147, 156].

В связи с подтверждением важности роли иммунной системы в развитии неудач ВРТ, в литературе последних лет широко обсуждается иммунокорректирующая терапия у женщин с АФС с применением глюкокортикостероидов, ВВИГ, моноклональных антител к CD20 антигену, ингибиторов опухоль-некротизирующего фактора α (TNF α). Применение иммуномодулирующей терапии препаратами ВВИГ у женщин с наличием АФА показало свою высокую эффективность и безопасность при беременности, при наличии многократных неудач ЭКО и является перспективным с целью улучшения эффективности программ ВРТ и повышения уровня рождаемости у данной группы женщин.

В связи с высокой частотой выявления АФА среди женщин с многократными неудачами ЭКО в анамнезе, неясностью механизмов патогенетического воздействия АФА на развитие ранних репродуктивных потерь, а также недостаточным количеством данных о тактике подготовки и ведения данных пациенток в цикле ЭКО, указанная проблема является весьма актуальной.

ГЛАВА 2 КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК

2.1 Клиническая характеристика обследованных групп

С целью оценки сопоставимости групп перед началом лечения, было выполнено сравнение клинико-anamnestических данных в 3 обследуемых группах: основной группы А (женщины с наличием АФА, получившие в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) ВВИГ, основной группы Б (женщины с наличием АФА, не получившие в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) ВВИГ и группы сравнения (женщины с отсутствием АФА, не получившие ВВИГ).

Средний возраст пациенток всех групп составил $32,13 \pm 3,44$ лет (ДИ95% 31,6-32,62). Наибольшее число всех обследованных женщин 54,45% (n=104) находилось в возрастном интервале 30-34 года. Наименьшее число женщин находилось в возрасте до 25 лет – 1,57% (n=3). Количество женщин в возрасте 25-29 и 35-38 лет было примерно сопоставимо и составило 20,42% (n=39) и 23,56% (n=45), соответственно. Увеличение количества женщин в возрастном интервале старше 35 лет отражает современную тенденцию по смещению возраста деторождения в сторону позднего репродуктивного периода. Подробная характеристика распределения обследованных групп пациенток по возрасту представлена на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, максимальное количество пациенток также пришлось на возрастной период 30-34 года, минимальное на период до 25 лет. Основные отличия оказались в соотношении между группой 25-29 и 35-38. В основных группах А и Б количество пациенток в старшей возрастной группе 35-38 преобладало над группой 25-29 и составило 29,87% (n=23) и 27,45% (n=14) по отношению к 18,18% (n=14) и 25,49% (n=13), соответственно. В группе сравнения наблюдалось обратное соотношение с преобладанием группы 25-29 над старшей возрастной группой 35-38, что составило 12,69% (n=8) и 19,05% (n=12) соответственно. Но в группе сравнения было более равномерное распределение и максимальное количество пациенток – 66,67% (n=42) находилось в диапазоне

30-34 года, что на 17,32% больше чем в основной группе А и на 19,61% больше основной группы Б. В связи с этим, достоверных различий по группам при распределении по возрастным интервалам выявлено не было.

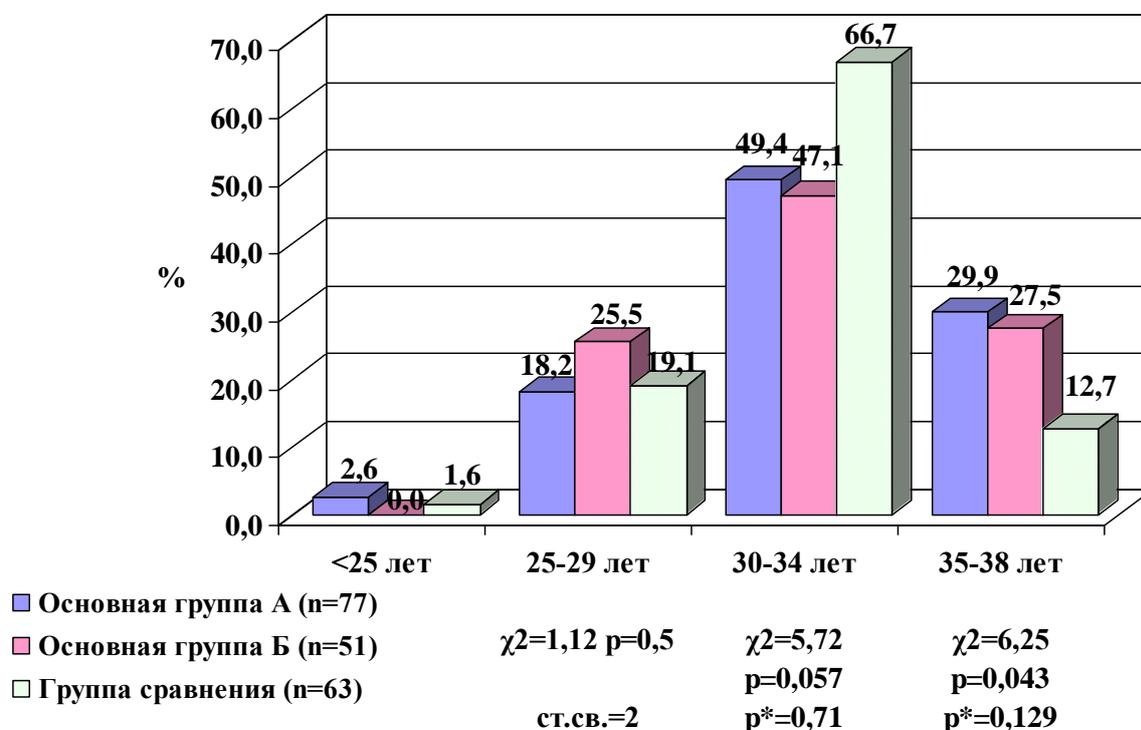


Рисунок 2 – Распределение пациенток по возрасту

p* – с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения

Таким образом, пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по возрастным характеристикам.

2.2 Параметры репродуктивной и менструальной функции

Длительность бесплодия у обследованных женщин составила 6,16 (5; 10) лет. Статистических различий по этому параметру между пациентками основной группы А, основной группы Б и группы сравнения установлено не было: 6,27 (3,5; 8), 6,06 (3; 8) и 6,13 (4; 8) лет, соответственно (Критерий Краскела-Уоллеса=0,63, p=0,73).

Первичное бесплодие отмечено у 105 из 191 (54,97%), вторичное – у 86 пациенток (45,03%). В репродуктивном анамнезе у обследованных были: искусственный (у 30 женщин из 191, 15,71%) и самопроизвольный аборт (33/191, 17,27%), неразвивающаяся (30/191, 15,7%) и эктопическая трубная беременность (34/191, 17,8%), роды (17/191, 8,9%). У 3 пациенток с 2 случаями невынашивания в анамнезе прерывание беременности происходило как по типу неразвивающейся беременности, так и по типу самопроизвольного выкидыша.

Среди женщин с циркуляцией АФА у 32,8% (42/128) в анамнезе было невынашивание беременности. У 14,06% женщин (18/128) один эпизод невынашивания, у 16,4% (21/128) дважды у 2,34% (3/128) трижды наблюдалось невынашивание беременности в анамнезе.

Сравнительная характеристика репродуктивной функции женщин обследованных групп представлена в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, не было обнаружено статистически значимых различий между обследованными женщинами по исходам беременностей в анамнезе и виду бесплодия. Отсутствие различий обусловлено параметрами включения в группу исследования женщин, имеющих отягощенный акушерско-гинекологический анамнез в виде невынашивания беременности и многократных неудачных протоколов ЭКО.

Таблица 1 – Характеристика репродуктивной функции пациенток обследованных групп

Показатель		Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77		Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51		Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63		Значения статистики, уровень p
		абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Бесплодие	первичное	46	59,74	29	56,86	30	47,62	ст.св.=2 $\chi^2=2,16$ p=0,34
	вторичное	31	40,26	22	43,14	33	52,38	
Неразвивающаяся беременность		18	23,37	5	9,80	7	11,11	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =2,97 p _{1,2} =0,08 χ^2 -Yates _{1,3} =2,76 p _{1,3} =0,09 χ^2 -Yates _{2,3} =0,06 p _{2,3} =0,9
Самопроизвольный выкидыш		12	15,58	10	19,61	11	17,46	ст.св.=2 $\chi^2=0,34$ p=0,83
Роды		4	5,19	5	9,80	8	12,70	ст.св.=1 F-Fisher 2sd _{1,2} p _{1,2} =0,48 F-Fisher 2sd _{1,3} p _{1,3} =0,14 χ^2 -Yates _{2,3} =0,03 p _{2,3} =0,85
Искусственный аборт		9	11,69	9	17,65	12	19,05	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,48 p _{1,2} =0,49 χ^2 -Yates _{1,3} =0,95 p _{1,3} =0,33 χ^2 -Yates _{2,3} =0,0 p _{2,3} =0,96
Эктопическая беременность		13	16,88	8	15,69	13	20,63	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,0 p _{1,2} =0,95 χ^2 _{1,3} =0,32 p _{1,3} =0,57 χ^2 -Yates _{2,3} =0,19 p _{2,3} =0,66

Примечание: при межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Анализ менструальной функции обследованных женщин выявил, что овуляторный менструальный цикл имел место у 66 пациенток из 191 (34,55%), недостаточность лютеиновой фазы (НЛФ) – у 40 (20,94%), ановуляция – у 85 женщин (44,5%). Нарушения менструального цикла (опсоменорея и олигоменорея) были выявлены у 31,94% (61/191) и 2,09% (4/191) обследованных, соответственно. Параметры менструальной функции у пациенток обследуемых групп представлены на рисунке 3.

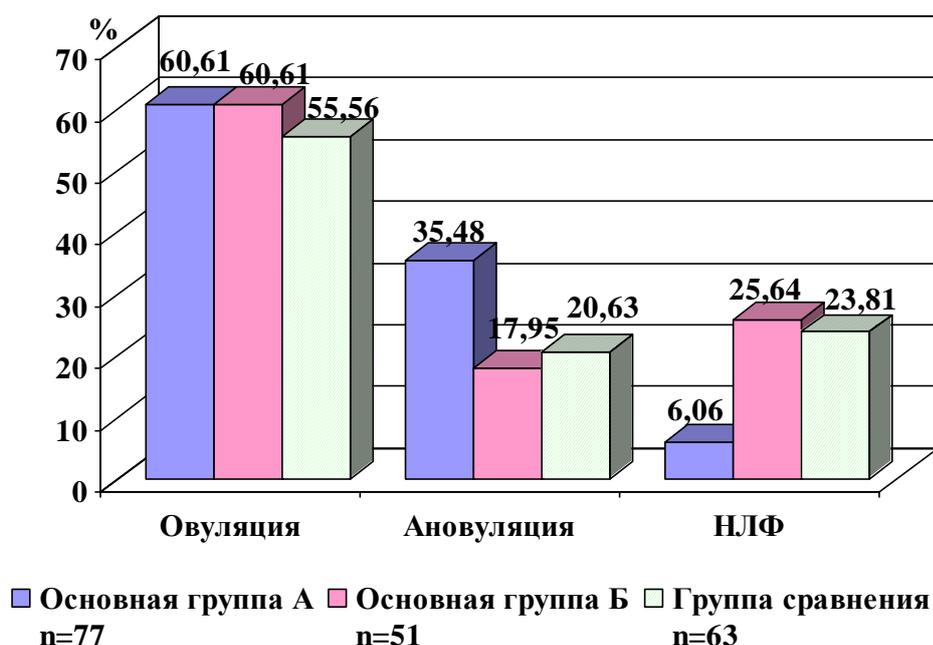


Рисунок 3 – Параметры менструальной функции у пациенток обследуемых групп

Не было выявлено статистически значимых отличий между пациентками обследованных групп по параметрам менструальной функции: наличию овуляторного цикла ($\chi^2=0,23$, ст.св.=2, $p=0,88$), частоте НЛФ ($\chi^2=5,35$, ст.св.=2, $p=0,06$) и ановуляции ($\chi^2=3,45$, ст.св.=2, $p=0,18$).

Женщины из основной группы А и Б и группы сравнения также сопоставимы по частоте выявления нарушений менструального цикла ($\chi^2=2,89$, ст.св.=2, $p=0,23$), которые были выявлены у 27,27%, 41,18% и 36,51%, соответственно.

Таким образом, пациентки обследуемых групп были сопоставимы по характеристикам репродуктивной и менструальной функции.

2.3 Описание ранее использованных методов ВРТ и причин бесплодия

В анамнезе у некоторых из обследованных женщин уже были попытки лечения бесплодия, в том числе с применением ВРТ (от 1 до 9 попыток). Циклы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) были проведены более чем у половины обследованных (126 женщин из 191, 65,97%). Данная попытка ЭКО была первой у 34,03% (65/191), второй у 18,32% (35/191), третьей у 15,8% (29/191) женщин. У 32,98% женщин (63/191) были многократные неудачные попытки ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в анамнезе (3 и более попытки при условии исключения переносов эмбрионов неудовлетворительного качества). Среди женщин с циркуляцией АФА у 36,7% (47/128) женщин в анамнезе были многократные неудачные попытки ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Среднее количество неудачных попыток в основных группах А и Б и группе сравнения составило $2,37 \pm 0,23$, $2,11 \pm 0,18$ и $1,83 \pm 0,16$, соответственно, $p > 0,05$. Отсутствие различий в количестве неудачных попыток ЭКО в анамнезе может быть связано с тем, что одним из критериев включения в исследование было наличие многократных неудач ВРТ.

Таким образом, сравниваемые группы были сопоставимы по количеству проведенных ранее циклов ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

В данном исследовании у 15 женщин с циркуляцией АФА (11,72%) был установлен диагноз АФС на основании данных акушерского анамнеза. Тромбоэмболических осложнений в анамнезе выявлено не было. Среди женщин с АФС 46,67% (7/15) имели многократные неудачные попытки ЭКО (ЭКО/ИКСИ) (3 и более), что было сопоставимо с группой женщин с циркуляцией АФА 35,4% (40/113), ст.св.=1, $p=0,28$, и сопоставимо с женщинами с отсутствием АФА, среди которых 23,8% (15/63) имели 3 и более неудачных попыток ЭКО (ЭКО/ИКСИ), ст.св.=1, $p=0,1$. Отсутствие отличий также может быть объяснено тем, что наличие неудачных попыток ЭКО (ЭКО/ИКСИ) было одним из критериев включения в исследование.

Лидирующими факторами бесплодия были трубно-перитонеальный и мужской факторы, составившие 56,54% (108/191) и 56,02% (107/191), частота сочетания этих 2 факторов составляла 20,94% случаев (40/191). Эндокринная патология была признана причиной бесплодия у 15,7% (30/191), наружный генитальный эндометриоз у 17,8% (34/191) женщин. Причину бесплодия установить не удалось у 7,85% женщин (15/191). Анализ структуры причин бесплодия приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Структура причин бесплодия

Вид бесплодия	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77		Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51		Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63		Значение статистики, значение p (ст.св.=2)
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Трубно-перитонеальное	50	64,94	27	52,94	31	49,21	$\chi^2=3,85$ p=0,14
Мужской фактор	47	61,04	27	52,94	33	52,38	$\chi^2=1,32$ p=0,51
Мужской+трубно-перитонеальный фактор	14	18,18	11	21,57	15	23,81	$\chi^2=0,68$ p=0,71
Эндокринное	13	16,88	12	23,53	15	23,81	$\chi^2=1,28$ p=0,52
НГЭ	13	16,88	9	17,65	12	19,05	$\chi^2=1,28$ p=0,52
Бесплодие неясного генеза	8	10,39	4	7,84	3	4,76	ст.св.=1 F-Fisher 2sd p _{1,2} =0,76 p _{1,3} =0,34 p _{2,3} =0,7

Примечание: при межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Как видно из таблицы 2, пациентки исследуемых групп не различались по структуре причин бесплодия. Во всех группах лидирующими причинами бесплодия являются трубно-перитонеальный и мужской фактор, которые были выявлены у 64,94% и 61,04% в основной группе А, у 52,94% и 52,94% в основной группе Б, и 49,21% и 52,38% в группе сравнения, ($\chi^2=3,85$ p=0,14, ст.св.=2 и $\chi^2=1,32$, ст.св.=2, p=0,51 соответственно). Сочетание этих 2 факторов было

выявлено у 18,18%, 21,57% и 23,81% ($\chi^2=0,68$, ст.св.=2, $p=0,71$) в основных группах А и Б и группе сравнения, соответственно.

В данном исследовании диагноз бесплодия неясной этиологии имели 10,39% и 7,84% женщин из основных групп А и Б, что было несколько больше, по сравнению с женщинами с отсутствием АФА (4,76%), но данные различия не были статистически значимы (F-Fisher 2sd, $p_{1,2}=0,76$, $p_{1,3}=0,34$, $p_{2,3}=0,7$).

По остальным причинам бесплодия все женщины были также сопоставимы, в связи с чем, можно сделать вывод об отсутствии взаимосвязи АФА с причинами бесплодия.

2.4 Структура сопутствующей гинекологической патологии и оперативных вмешательств в области малого таза

Сопутствующая гинекологическая патология была представлена хроническим эндометритом (19,37%, 37/191), хроническим сальпингоофоритом (73,3%, 140/191), миомой матки (7,33%, 14/191), наружным генитальным эндометриозом (26,7%, 51/191), аденомиозом (5,76%, 11/191), синдромом поликистозных яичников (6,8%, 13/191), доброкачественными заболеваниями шейки матки (4,71%, 9/191), аномалиями развития полового аппарата (2,62%, 5/191), инфекцией мочеполовых путей в анамнезе (16,23%, 31/191), доброкачественными образованиями яичников в анамнезе (20,94%, 40/191), спаечным процессом брюшной полости и малого таза (49,74%, 95/191).

Структура сопутствующей гинекологической патологии и гинекологического анамнеза у больных обследованных групп представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Структура сопутствующей гинекологической патологии и гинекологического анамнеза

Вид патологии	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77		Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51		Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63		Значение статистики, значение p
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Хронический эндометрит	19	24,68	7	13,73	11	17,46	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =1,64 χ^2 _{1,3} =1,07 χ^2 -Yates _{2,3} =0,08 p _{1,2} =0,19 p _{1,3} =0,3 p _{2,3} =0,77
Хронический сальпингоофорит	61	79,22	36	70,59	43	68,25	ст.св.=2 χ^2 =2,39 p=0,3
Миома матки	4	5,19	3	5,88	7	11,11	ст.св.=1 p _{1,2} =1,0 F-Fisher 2sd p _{1,3} =0,22 p _{2,3} =0,5
Наружный генитальный эндометриоз	22	28,57	15	29,41	14	22,22	ст.св.=2 χ^2 =0,97 p=0,61
Аденомиоз	4	5,26	4	7,84	3	4,76	ст.св.=1 p _{1,2} =0,71 F-Fisher 2sd p _{1,3} =1,0 p _{2,3} =0,7
Синдром поликистозных яичников	5	6,49	6	11,76	2	3,17	ст.св.=1 p _{1,2} =0,34 F-Fisher 2sd p _{1,3} =0,46 p _{2,3} =0,14
Доброкачественные заболевания шейки матки	5	6,49	3	5,88	1	1,59	ст.св.=1 p _{1,2} =1,0 F-Fisher 2sd p _{1,3} =0,22 p _{2,3} =0,32
Аномалия развития полового аппарата	3	3,90	1	1,96	1	1,59	ст.св.=1 p _{1,2} =0,65 F-Fisher 2sd p _{1,3} =0,63 p _{2,3} =1,0
Инфекции мочеполовых путей	17	22,08	7	13,73	7	11,11	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,91 χ^2 -Yates _{1,3} =2,21 χ^2 -Yates _{2,3} =0,02 p _{1,2} =0,34 p _{1,3} =0,14 p _{2,3} =0,89
Доброкачественные образования яичников в анамнезе	19	24,68	13	25,49	8	12,70	ст.св.=1 χ^2 _{1,2} =0,0 χ^2 -Yates _{1,3} =3,03 χ^2 -Yates _{2,3} =2,28 p _{1,2} =0,95 p _{1,3} =0,08 p _{2,3} =0,13
Гиперпластические процессы эндометрия в анамнезе	14	18,18	8	15,69	14	22,22	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,01 χ^2 _{1,3} =0,35 χ^2 -Yates _{2,3} =0,41 p _{1,2} =0,94 p _{1,3} =0,55 p _{2,3} =0,52
Спаечный процесс брюшной полости и малого таза	35	45,45	25	49,02	35	55,56	ст.св.=2 χ^2 =1,42 p=0,49

Примечание: при межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Как видно из таблицы 3, все группы были сопоставимы по сопутствующим гинекологическим заболеваниям и гинекологическому анамнезу и имели похожую структуру гинекологической патологии, в которой преобладали хронический сальпингоофорит (79,22%, 70,59% и 68,25%, $\chi^2=2,39$, $p=0,3$), спаечный процесс в брюшной полости и области малого таза (45,45%, 49,02% и 55,56%, $\chi^2=1,42$, $p=0,49$) и наружный генитальный эндометриоз (28,57%, 29,41% и 22,22%, $\chi^2=0,97$, $p=0,61$) в основных группах А и Б и группе сравнения, соответственно.

В литературе имеются данные о более частом выявлении АФА у женщин с наружным генитальным эндометриозом. В исследовании Eldar-Geva Т. и соавторов, частота обнаружения АФА в группе пациенток с патологией малого таза (эндометриозом и наличием спаек) была значимо больше, по сравнению с женщинами без данной патологии (46,8% и 29,7% соответственно) [77]. В исследовании Sher G. данные различия также были значимы и составили 53% и 14%, соответственно [97].

По результатам нашего исследования, у женщин с циркуляцией АФА по сравнению с женщинами без АФА не было выявлено значимых отличий по частоте выявления эндометриоза и другой гинекологической патологии.

В качестве подготовки к проведению программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) или с целью экстренного или планового хирургического вмешательства операции с применением лапароскопического доступа были выполнены у 75,91% (145/191), гистероскопия у 74,87% (143/191) женщин. Чревосечение выполнялось у 8,37% (16/191) женщин только по экстренным хирургическим показаниям при нарушении эктопической беременности. Цистэктомия была выполнена у 20,94% (40/191), тубэктомия (односторонняя и двухсторонняя) у 9,94% (19/191) и 16,23% (31/191), миомэктомия у 3,66% (7/191) пациентов.

Анализ структуры оперативных вмешательств у женщин из обследованных групп представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика оперативных вмешательства в области малого таза

Название оперативного вмешательства		Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77		Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51		Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63		Значение статистики, значение p		
		абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %			
Лапароскопия		58	75,32	39	76,47	48	76,19	ст.св.=2	$\chi^2=0,02$	p=0,99
Гистероскопия		55	71,43	39	76,47	49	77,78	ст.св.=2	$\chi^2=0,84$	p=0,66
Чревосечение		6	7,79	6	11,76	4	6,35	ст.св.=1	χ^2 -Yates _{1,2} =0,2	p=0,66
								F-Fisher 2sd _{1,3}		p _{1,3} =0,5
								F-Fisher 2sd _{2,3}		p _{2,3} =0,34
Цистэктомия		19	24,68	13	25,49	8	12,70	ст.св.=1	χ^2 _{1,2} =0,01	p _{1,2} =0,91
								χ^2 -Yates _{1,3} =2,47		p _{1,3} =0,12
								χ^2 -Yates _{2,3} =2,28		p _{2,3} =0,13
Тубэктомия	односторонняя	5	6,49	6	11,76	8	12,70	ст.св.=1	F-Fisher 2sd _{1,2}	p _{1,2} =0,34
	двухсторонняя	14	18,80	5	9,80	12	19,05	F-Fisher 2sd _{1,3}		p _{1,3} =0,24
								χ^2 -Yates _{2,3} =0,02		p _{2,3} =1,0
Миомэктомия		3	3,90	2	3,92	2	3,17	ст.св.=1	F-Fisher 2sd	
								p _{1,2} =0,1	p _{1,3} =1,0	p _{2,3} =1,0

Примечание: при межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

При анализе структуры хирургических вмешательств у женщин из обследованных групп не было выявлено достоверных различий по виду доступа или объему проведенных вмешательств. Большая часть женщин имели в анамнезе лапароскопию (75,32%, 76,47% и 76,19%, $\chi^2=0,02$, ст.св.=2, $p=0,99$) и гистероскопию (71,43%, 76,47% и 77,78%, $\chi^2=0,84$, $p=0,66$). Наиболее частым оперативным вмешательством было выполнение тубэктомии (24,67%, 21,56% и 32,79%, $\chi^2=0,86$, ст.св.=2, $p=0,35$), которая чаще была двусторонней (18,8%, 9,8% и 19,05%, F-Fisher 2sd_{1,2}, $p_{1,2}=0,34$, F-Fisher 2sd_{1,3}, $p_{1,3}=0,24$, χ^2 -Yates_{2,3}=0,02, $p_{2,3}=1,0$), чем односторонней (6,49%, 11,76% и 12,7%, F-Fisher 2sd_{1,2}, $p_{1,2}=0,21$, $\chi^2_{1,3}=0,02$, $p_{1,3}=0,89$, F-Fisher 2sd_{2,3}, $p_{2,3}=0,19$). Значения приведены для основных групп А и Б и группы сравнения, соответственно.

Таким образом, женщины из обследуемых групп были сопоставимы по данным гинекологического анамнеза, частоте выполнения оперативных вмешательств в области малого таза, а также виду доступа и объему выполненных операций.

2.5 Характеристика сопутствующей соматической патологии

Перед проведением программы ВРТ всем пациенткам определяли индекс массы тела. Нормальные значения ИМТ (индекса Кетле от 18,5 до 24,99 кг/м²) имели 61,78% женщин (118/191). Значения ИМТ от 25 до 29,9 кг/м² (малая степень риска метаболических осложнений, избыток массы тела) определяли у 21,46% (41/191). У 23 женщин (12%) ИМТ варьировал от 30 до 34,9 кг/м² (средняя степень риска метаболических осложнений, ожирение I степени).

Повышенную массу тела (избыток массы тела и ожирение I степени) наблюдали у 33,46% больных. Дефицит массы тела (ИМТ <18,5 кг/м²) выявляли у 4,71% (9/191) женщин.

Пациентки исследуемых групп не отличались по значениям ИМТ, медианы которых были равны 24 (21; 27) 26 (22; 28) 23 (20; 25) кг/м² для основной, группы сравнения и контроля (H=2,31, $p=0,12$).

Во всех группах у большей части пациенток индекс массы тела находился в пределах нормальных значений (63,64%, 47,06% и 71,43%). На втором месте по количеству пациенток располагались значения ИМТ женщин с избытком массы тела (15,58, 31,37% и 20,63). Наименьшая часть женщин имела дефицит массы тела (5,19%, 1,96% и 6,35%) и ожирение 1 степени (15,58%, 19,61% и 1,59%). Значения приведены для основных групп А и Б и группы сравнения, соответственно. Распределение обследованных женщин по значениям ИМТ представлено на рисунке 4.

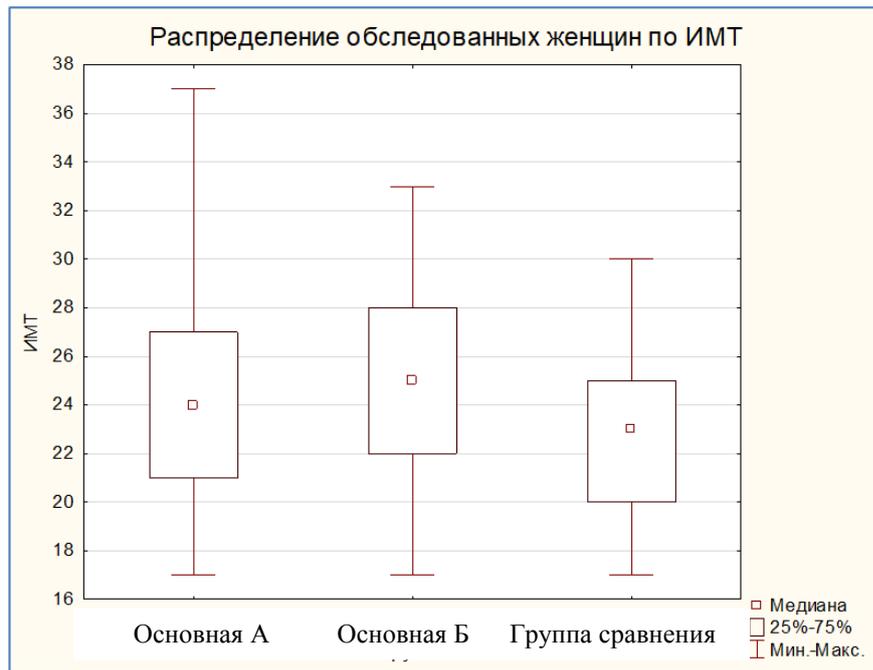


Рисунок 4 – Распределение пациенток обследованных групп по значениям ИМТ

Как видно из рисунка 4, пациентки исследуемых групп не отличались по значениям ИМТ, медианы которых были равны 24 (21; 27) 26 (22; 28) 23 (20; 25) $\text{кг}/\text{м}^2$ для основных групп А и Б и группы сравнения ($H=2,31$; $p=0,12$).

Наиболее часто выявляемыми соматическими заболеваниями были заболевания сердечно-сосудистой системы (вегетососудистая дистония, варикозная болезнь, гипертоническая болезнь), обнаруженные почти у каждой пятой пациентки (17,8%, 34/191). Заболевания щитовидной железы (аутоиммунный тиреоидит, диффузный и узловой нетоксический зоб) были обнаружены у 16,23% (31/191), желудочно-кишечного тракта (хронический

гастрит, язвенная болезнь, желчнокаменная болезнь) у 9,94% (19/191), мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит, хронический цистит), у 8,9% (17/191), молочных желез (диффузная и железисто-кистозная мастопатия, фиброаденома) у 13,08% (25/191).

Структура сопутствующей соматической патологии представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Структура сопутствующей соматической патологии

Заболевания	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77		Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51		Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63		Значения статистики, значение p
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Желудка и 12-перстной кишки	7	9,09	7	13,73	5	7,94	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,28 p _{1,2} =0,59 χ^2 -Yates _{1,3} =0,01 p _{1,3} =0,9 χ^2 -Yates _{2,3} =0,4 p _{2,3} =0,52
Мочевыделительной системы	6	7,79	2	3,92	9	14,29	ст.св.=1 F-Fisher 2sd _{1,2} p _{1,2} =0,47 χ^2 -Yates _{1,3} =0,92 p _{1,3} =0,33 F-Fisher 2sd _{2,3} p _{2,3} =0,1
Молочных желез	10	12,98	6	11,76	9	14,28	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,0 p _{1,2} =0,95 χ^2 -Yates _{1,3} =0,0 p _{1,3} =0,98 χ^2 -Yates _{2,3} =0,01 p _{2,3} =0,9
Щитовидной железы	14	18,18	7	13,73	10	15,87	ст.св.=1 χ^2 -Yates _{1,2} =0,18 p _{1,2} =0,67 χ^2 _{1,3} =0,08 p _{1,3} =0,78 χ^2 -Yates _{2,3} =0,02 p _{2,3} =0,9
Сердечно-сосудистой системы	11	14,28	12	23,52	11	17,46	ст.св.=2 χ^2 =0,35 p=0,84

Примечание: при межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Как видно из таблицы 5, пациентки были сопоставимы между собой по частоте сопутствующей соматической патологии. Значимых различий выявлено не было. В основной группе А наиболее распространенным заболеванием была патология щитовидной железы, которая была выявлена у 14 из 77 женщин (18,18%). В основной группе Б и группе сравнения самой частой патологией были заболевания сердечно-сосудистой системы, обнаруженные у 12 из 51 женщины (23,52%) и у 11 из 63 (17,46%), соответственно.

Таким образом, пациентки обследуемых были сопоставимы между собой по частоте сопутствующей соматической патологии и значениям ИМТ.

2.6 Характеристика функционального состояния гипоталамо-гипофизарной системы исследуемых пациенток

Средние значения базальных уровней гонадотропинов, гормонов яичников, пролактина у пациенток обследуемых групп представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты гормонального исследования пациенток обследованных групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63			Значение статистики, значение p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
ФСГ, МЕ/л	7,37	6,2	8,7	6,3	4,77	7,91	6,89	6,09	7,46	H=4,2 p=0,12
ЛГ, МЕ/л	5,07	3,51	7,56	4,44	2,93	5,95	4,85	3,06	5,79	H=2,53 p=0,28
Эстрадиол, пмоль/л	89,0	61,0	135,0	71,5	47,15	161,0	87,0	42,0	150,0	H=0,34 p=0,8
Пролактин, МЕ/л	233,0	169,0	395,0	331,0	190,0	459,0	291,5	187,0	390,0	H=1,82 p=0,4
Прогестерон, нмоль/л	16,8	3,6	38,8	18,3	8,8	31,6	21,44	8,1	36,0	H=0,5 p=0,77
АМГ, нг/мл	1,14	0,84	2,3	2,7	1,36	3,8	2,03	1,1	3,79	H=5,37 p=0,06

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Колмагорова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1

Как видно из данных, представленных в таблице 6, значимых различий по сывороточным уровням гормонов между пациентками обследованных групп выявлено не было. У 16,75% всех обследованных женщин (32/191) на основании уровня АМГ в сыворотке крови был установлен сниженный резерв яичников. Пациентки обследуемых групп не отличались по частоте сниженного резерва яичников, который был выявлен у 16,88% (13/77), 13,73% (7/51) и 19,05% (12/63) у основных групп А и Б и группы сравнения ($\chi^2=0,5$, ст.св.=2 $p=0,75$), соответственно.

2.7 Оценка результатов спермиологического исследования эякулята супругов

Анализ показателей спермограммы супругов (партнеров) пациенток обследованных групп представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Показатели спермограммы супруга (партнера) у пациенток обследованных групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63			Значение статистики, значение p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
Объём, мл	3,5	2,5	4,6	3,0	2,4	4,5	3,0	2,0	4,0	H=2,44 p=0,29
Концентрация, млн в мл	53,0	26,0	110	60,0	16,0	103,0	72,0	40,0	103,0	H=3,02 p=0,22
Прогрессивная подвижность, %	45,0	25,0	58,0	37,0	13,0	48,0	48,0	30,0	60,0	H=2,29 p=0,32
Нормальные формы, %	11,0	5,0	21,5	7,0	3,0	15,0	10,45	4,0	50,0	H=2,53 p=0,28
MAR-test, %	0	0	2,0	0	0	0,18	0	0	0,56	H=0,05 p=0,97

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Колмагорова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1

При оценке основных показателей спермограммы половых партнеров пациенток не было выявлено статистически значимых различий в концентрации, подвижности и числе морфологически патологических форм сперматозоидов.

2.8 Сравнительная характеристика протоколов стимуляции и частоты отмены циклов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в исследуемых группах женщин

Оценка основных параметров стимуляции яичников у пациенток обследованных групп проводилась на основании сравнения курсовой дозы гонадотропинов, длительности проведения стимуляции, частоте получения ооцитов, количеству фолликулов в день введения триггера и количеству полученных ооцитов, что представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Параметры стимуляции яичников у пациенток обследованных групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77			Основная группа Б (АФА+ ВВИГ-) n=51			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63			Значение статистики, Р
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
Курсовая доза гонадотропинов (ФСГ), МЕ	1600	1350	1875	1800	1400	2000	1600	1200	1975	H=3,01 p=0,22
Длительность стимуляции, дней	9,0	8,0	10,0	9,0	8,0	10,0	9,0	8,0	9,0	H=2,04 p=0,36
Частота получения ооцитов, %	100,0	86,6	100,0	100,0	86,6	100,0	100	90	100	H=2,6 p=0,27
Количество фолликулов в день введения триггера	10,0	6,0	15,0	11,0	6,0	17,0	10,5	7,0	14,0	H=0,06 p=0,97
Количество полученных ооцитов	9,5	5,0	14,0	9,0	5,0	15,0	10,0	7,0	13,0	H=0,33 p=0,85

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения р для критерия Комарова-Смирнова и Лилиефорса – менее 0,1

При оценке параметров стимуляции, представленных в таблице 8, не было выявлено статистически значимых различий в курсовых дозах рекомбинантного ФСГ, длительности стимуляции, частоте получения ооцитов, количестве фолликулов в день введения триггера и количества полученных ооцитов.

У одной пациентки из 191 обследованных женщин ооцитов при ТВП получено не было. Синдром гиперстимуляции яичников I и II степени был выявлен у 9,95% (19/191) женщин; его частота не отличалась между пациентками

основных групп А и Б и группы сравнения: 10,39% (8/77), 11,76% (6/51) и 7,94% (5/63) соответственно ($\chi^2=0,48$, ст.св.=2, $p=0,783$).

Частота отмены цикла ЭКО (ЭКО/ИКСИ) на различных этапах программы у обследованных пациенток составила 6,8% (13/191).

Программа ЭКО (ЭКО/ИКСИ) была прервана по причине неполноценного оогенеза (отсутствия ооцитов при ТВП фолликулов, их деградации или неправильного оплодотворения) у 4 женщин (у 2 женщин из основной группы А и 2 женщин из группы сравнения, $p>0,05$). Частота отмены цикла в связи с синдромом гиперстимуляции средней степени тяжести составила 4,71% (9/191) (у 7 женщин из основной группы А, 2 женщин из основной группы Б и не было зарегистрировано в группе сравнения).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по клинико-anamнестическим, исходным лабораторным данным и основным параметрам стимуляции и возможно проведение дальнейшего сравнения результативности их программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Сравнительная оценка иммунологических параметров

Сравнительную оценку иммунологических параметров проводили у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА) в сравнении со здоровыми женщинами без репродуктивной патологии. Наиболее выраженные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов среди женщин ОАГА наблюдались у женщин с циркуляцией АФА, в связи с чем отдельно было выполнено сравнение результатов их иммунологического обследования с данными здоровых женщин без репродуктивной патологии. Для выявления отличий в группе женщин с ОАГА между женщинами с наличием и отсутствием АФА было выполнено внутригрупповое сравнение их иммунологических данных.

Для сравниваемых групп проводилась оценка абсолютных и относительных величин субпопуляционного состава лимфоцитов (лимфоцитов CD3+, Т-хелперов CD3+CD4+, цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+, В-лимфоцитов CD19+, иммунорегуляторный индекс CD3+CD4+/CD3+CD8+, NK-клеток CD3-CD16+CD56+), Т-регуляторных лимфоцитов и их индексных показателей (Т-reg, Т-reg/NK, Т-reg/CD19+), а также содержания NKT-клеток (CD3+CD56+) и активированных NK-клеток (NK-клеток, экспрессирующих CD107 и CD107a).

3.1.1 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим и здоровых женщин без репродуктивной патологии

На первом этапе работы была выполнена оценка различий в субпопуляционном составе лимфоцитов у женщин с ОАГА (наличие невынашивания беременности, многократных неудачных попыток ЭКО (3 и более), преэклампсии, плацентарной недостаточности, антенатальной гибели плода) и здоровых небеременных женщин с неотягощенным акушерско-

гинекологическим анамнезом, имеющих 1 и более физиологическую беременность, закончившуюся физиологическими родами. Результаты сравнения представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с ОАГА (n=191) (АФА+ и АФА-)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значение статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Лимфоциты (CD3+), тыс./мкл	1,24	1,15-1,33	0,41	1,59	1,4-1,78	0,49	t=-3,59 p=0,0005
Лимфоциты (CD3+), %	74,74	73,38-76,1	6,14	73,39	69,83-76,94	8,98	t=0,87 p=0,38
CD 45, тыс./мкл	1,66	1,55-1,78	0,51	2,18	1,92-2,43	0,64	t=-4,21 p=0,00005
Т-хелперы (CD3+CD4+), тыс./мкл	0,76	0,7-0,82	0,27	0,95	0,82-1,08	0,33	t=-2,99 p=0,003
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	45,8	44,19-47,43	7,29	43,49	40,43-46,55	7,73	t=1,4 p=0,16
ЦТЛ (CD3+CD8+), тыс./мкл	0,43	0,4-0,47	0,17	0,55	0,48-0,62	0,18	t=-3,02 p=0,003
ЦТЛ (CD3+CD8+), %	26,2	24,9-27,51	5,85	25,70	23,39-28,0	5,83	t=0,39 p=0,69
NK-клетки, %*	12,61	0,19-0,23	0,1	14,74	9,14-20,33	9,69	U=986 p=0,5
	11,82 (9,16; 16,07)			14,65 (10,2; 15,4)			
NK-клетки, тыс./мкл	0,2	0,18-0,23	0,1	0,35	0,16-0,54	0,09	t=-3,51 p=0,0006
	0,19 (0,14-0,28)			0,49 (0,39; 0,67)			
В-лимфоциты (CD19+), тыс./мкл	0,19	0,17-0,21	0,1	0,22	0,19-0,25	0,08	t=-1,11 p=0,24
В-лимфоциты (CD19+), %*	11,46	10,63-12,28	3,7	10,22	9,10-11,34	2,83	U=895 p=0,19
	10,54 (8,83-13,42)			9,85 (8,43; 11,78)			
ИРИ (CD3+CD4+/ CD3+CD8+)	1,84	1,72-1,97	0,55	1,79	1,56-2,02	0,58	t=0,48 p=0,635

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%)).

Как видно из таблицы 9, у женщин с ОАГА в субпопуляционном составе лимфоцитов выявлены множественные значимые различия, по сравнению с женщинами без репродуктивной патологии.

У женщин с ОАГА было значимо ниже абсолютное содержание лимфоцитов CD3+, Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) и NK-клеток (CD3-CD16/56+) по сравнению со здоровыми женщинами (1,24±0,41 и 1,59±0,49, p=0,0005), (0,76±0,27 и 0,95±0,33, p=0,003), (0,43±0,17 и 0,55±0,18, p=0,003) и (0,19 (0,14-0,28) и 0,49 (0,39; 0,67), p=0,0003), соответственно.

В популяции CD4 лимфоцитов наибольший интерес представляют Т-регуляторные лимфоциты, в связи с чем следующим этапом стало сравнение содержания Т-регуляторных лимфоцитов и наиболее важных индексных показателей соотношения с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с ОАГА и здоровых женщин без репродуктивной патологии, представленные в таблице 10.

Таблица 10 – Сравнение содержания Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с ОАГА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с ОАГА (n=191) (АФА+ и АФА-)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значение статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Treg, %	4,83	4,47-5,2	1,6	5,89	5,31-6,47	1,46	t=-3,01 p=0,003
Treg, тыс./мкл	0,01	0,009-0,01	0,006	0,02	0,014-0,02	0,01	U=538 p=0,0002
	0,008 (0,006; 0,013)			0,014(0,01; 0,025)			
Treg/NK, %*	0,46	0,39-0,53	0,3	0,54	0,4-0,68	0,35	U=879 p=0,2
	0,4 (0,28; 0,56)			0,47 (0,34; 0,68)			
Treg/NK, тыс./мкл	0,048	0,04-0,05	0,016	0,06	0,05-0,06	0,01	t=-1,14 p=0,003
Treg/CD19+, %	0,46	0,41-0,5	0,2	0,6	0,53-0,68	0,19	t=-3,33 p=0,001
Treg/CD19+, тыс./мкл	0,056	0,05-0,06	0,03	0,09	0,064-0,1	0,06	t=-3,21 p=0,002

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

В результате сравнения содержания Т-регуляторных лимфоцитов и наиболее важных индексных показателей соотношения с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с ОАГА и здоровых женщин без репродуктивной патологии были выявлены значимые различия во всех изучаемых значениях.

У женщин с ОАГА значимо ниже абсолютное и относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов, по сравнению с женщинами без ОАГА ($4,83 \pm 1,6$ и $5,89 \pm 1,46$, $p=0,003$) и ($0,008$ ($0,006$; $0,013$) и $0,014$ ($0,01$; $0,025$), $p=0,0002$), соответственно.

У женщин с ОАГА значимо ниже индексный показатель отношения абсолютного содержания Т-регуляторных лимфоцитов к НК-клеткам, по сравнению с женщинами без ОАГА ($0,048 \pm 0,016$ и $0,06 \pm 0,01$, $p=0,003$).

У женщин с ОАГА значимо ниже индексный показатель отношения абсолютного и относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов к В-лимфоцитам CD19+, по сравнению с женщинами без ОАГА ($0,46 \pm 0,02$ и $0,6 \pm 0,19$, $p=0,001$) и ($0,056 \pm 0,03$ и $0,09 \pm 0,06$, $p=0,002$), соответственно.

Ввиду важности роли НК-клеток и НКТ-клеток в развитии репродуктивных потерь, также выполнено сравнение содержания данных показателей и индуцированной активности НК-клеток у женщин с ОАГА и здоровых женщин, результаты чего представлены в таблице 11.

Как видно из таблицы 11, у женщин с ОАГА значимо ниже абсолютное содержание НКТ-клеток ($0,08$ ($0,04$; $0,13$) и $0,13$ ($0,08$; $0,17$), $p=0,003$), по сравнению с женщинами с отсутствием репродуктивной патологии.

Также у женщин с ОАГА значимо ниже активность НК-клеток (абсолютное содержание НК-клеток, экспрессирующих CD107a), по сравнению с женщинами с отсутствием ОАГА ($0,015$ ($0,01$ - $0,02$) и $0,02$ ($0,014$; $0,03$), $p=0,014$), соответственно.

Таким образом, у женщин с ОАГА выявлены множественные значимые различия в иммунологических показателях, по сравнению со здоровыми

женщинами без репродуктивной патологии, что может говорить о важности данных показателей в реализации репродуктивной функции.

Таблица 11 – Сравнение показателей индуцированной активности НК-клеток у женщин с ОАГА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с ОАГА (n=191) (АФА+ и АФА-)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значение статистики, значение p
	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б	
НКТ-клетки, %*	5,66	4,67-6,66	4,46	6,54	5,14-7,95	3,56	U=904,5 p=0,2
	5 (3,3; 6,6)			6,1 (3,4; 8,1)			
НКТ-клетки, тыс./мкл*	0,09	0,07-0,11	0,08	0,142	0,107-0,178	0,02	U=670 p=0,003
	0,08 (0,04; 0,13)			0,13 (0,08; 0,17)			
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), %*	1,07	0,93-1,22	0,66	1,17	0,92-1,42	0,63	U=953 P=0,41
	0,9 (0,7; 1,3)			1,1 (0,8; 1,3)			
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), тыс./мкл*	0,02	0,015-0,02	0,01	0,25	0,019-0,03	0,002	U=729 p=0,014
	0,015 (0,01; 0,02)			0,02 (0,014; 0,03)			
Индуцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), %*	26,18	24,06-28,3)	7,46	24,61	22,44-26,78	5,49	U=532 p=0,13
	27,7 (23,1; 30,3)			24,9 (20,5; 29,1)			
Индуцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), тыс./мкл*	0,46	0,42-0,5	0,15	0,53	0,46-0,59	0,03	U=567 p=0,25
	0,48 (0,4; 0,57)			0,49 (0,39; 0,67)			

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

3.1.2 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Особый интерес в группе женщин с ОАГА представляют женщины с циркуляцией АФА, в связи с чем отдельно была выделена группа женщин с АФА (n=128) и последовательно выполнено сравнение их иммунологических

показателей с данными здоровых женщин без репродуктивной патологии, что подробно описано в приложении в таблице 1. Для наглядности построено графическое изображение наиболее значимо различающихся данных, что представлено на рисунках 5-9 и 15-17.

К наиболее важным различиям, не выявленным при сравнении женщин с ОАГА и здоровых женщин, но полученным при сравнении женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин явилось значимо большее относительное содержание В-лимфоцитов CD19+ у женщин с циркуляцией АФА (11,6 (9,7; 13,78) и 9,85 (8,43; 11,78), $p=0,029$), что изображено на рисунке 5.

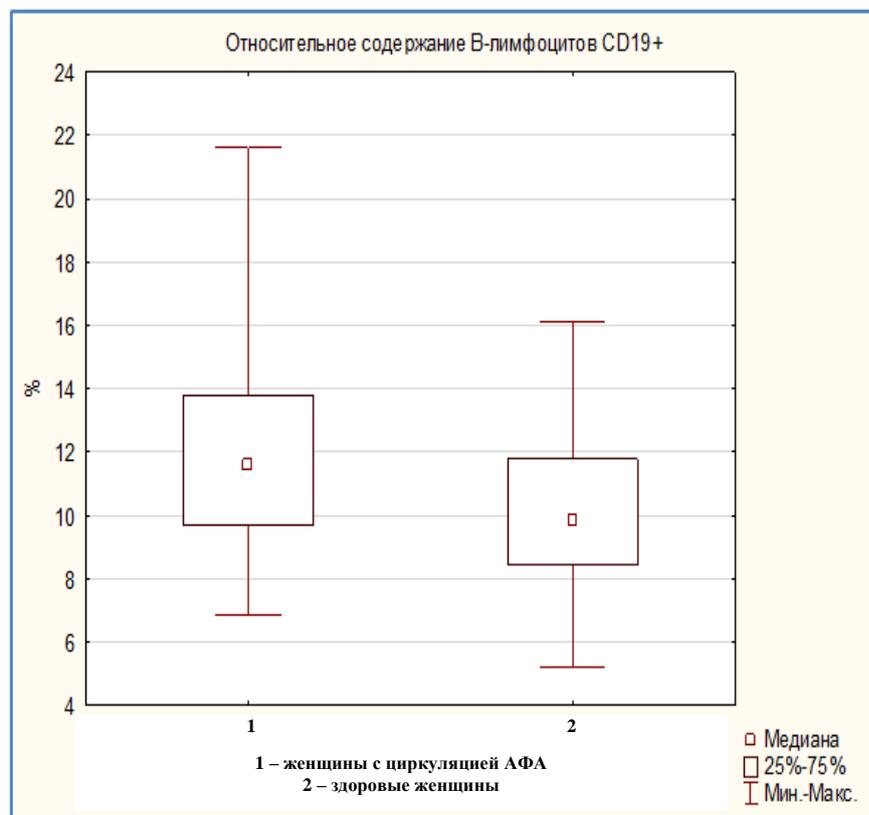


Рисунок 5 – Сравнение относительного содержания В-лимфоцитов CD19+ у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

На рисунках 6-8 представлены значимые различия в других показателях субпопуляционного состава лимфоцитов, выявленные при сравнении женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин. Тенденция данных различий аналогична при сравнении группы женщин с ОАГА и здоровых женщин без репродуктивной патологии (таблица 9).

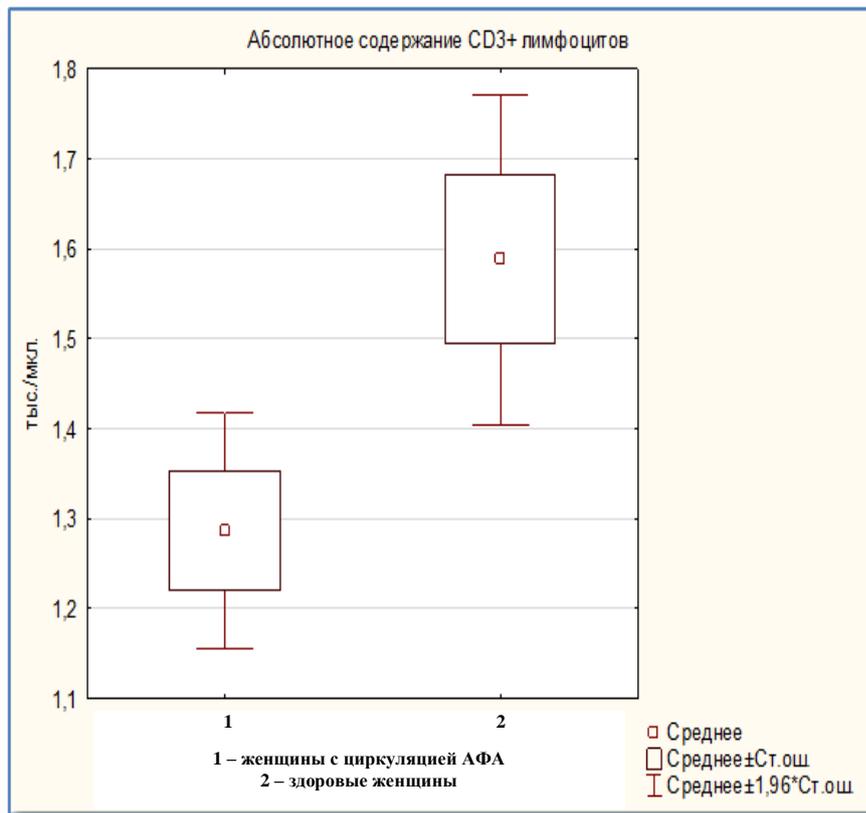


Рисунок 6 – Сравнение абсолютного содержания CD3+лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

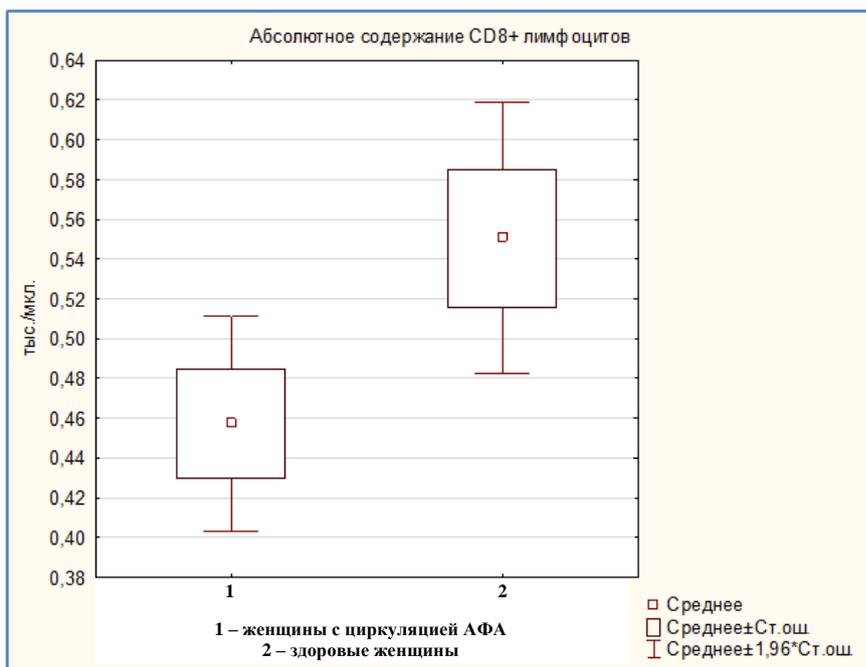


Рисунок 7 – Сравнение абсолютного содержания цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+ у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

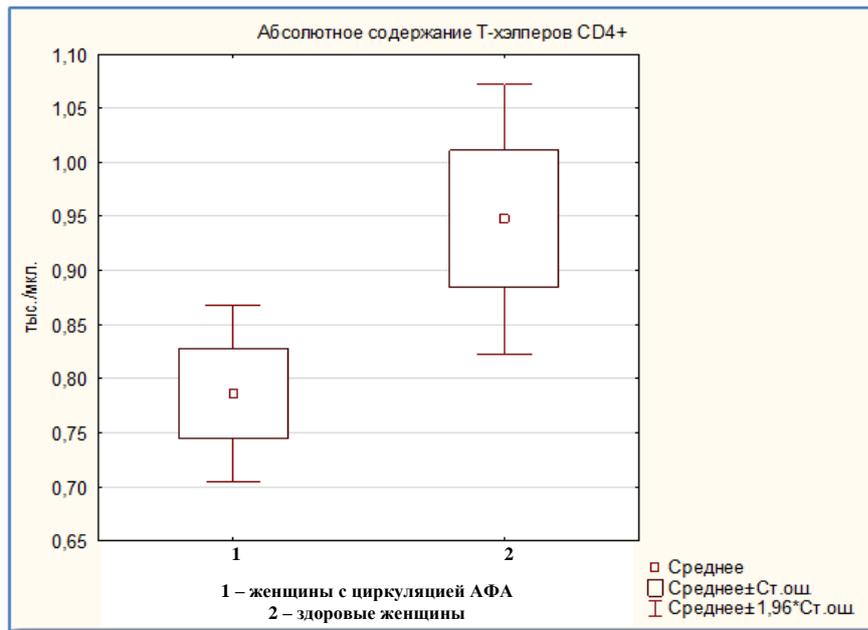


Рисунок 8 – Сравнение абсолютного содержания Т-хелперов CD3+CD4+ у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

Как видно из графиков 6-8, у женщин с циркуляцией АФА достоверно ниже абсолютное содержание CD3+ лимфоцитов ($1,29 \pm 0,46$ и $1,59 \pm 0,49$, $t = -2,66$, $p = 0,010$), абсолютное содержание цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+ ($0,46 \pm 0,19$ и $0,55 \pm 0,18$, $t = -2,06$, $p = 0,043$) и абсолютное содержание Т-хелперов CD3+CD4+ ($0,79 \pm 0,29$ и $0,95 \pm 0,33$, $t = -2,21$, $p = 0,030$).

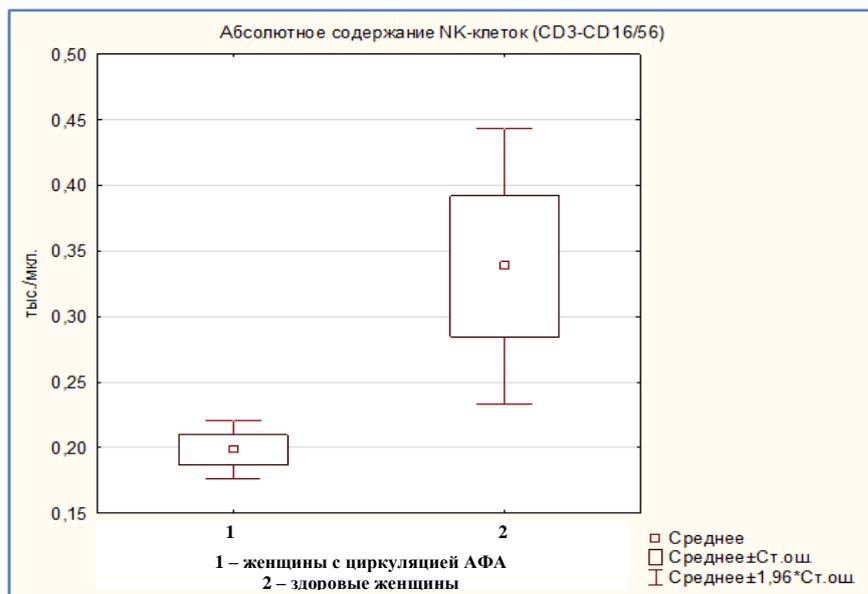


Рисунок 9 – Сравнение абсолютного содержания НК-клеток у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

Как видно из рисунка 9, у женщин с циркуляцией АФА значимо ниже показатель абсолютного содержания CD3-CD16/56 ($0,2 \pm 0,08$ и $0,34 \pm 0,28$, $t = -3,26$, $p = 0,002$), по отношению к группе здоровых женщин-доноров.

Выявлена корреляционная взаимосвязь между абсолютным и относительным содержанием В-лимфоцитов CD19+ и уровнем ВА, что представлено на рисунках 11-12.

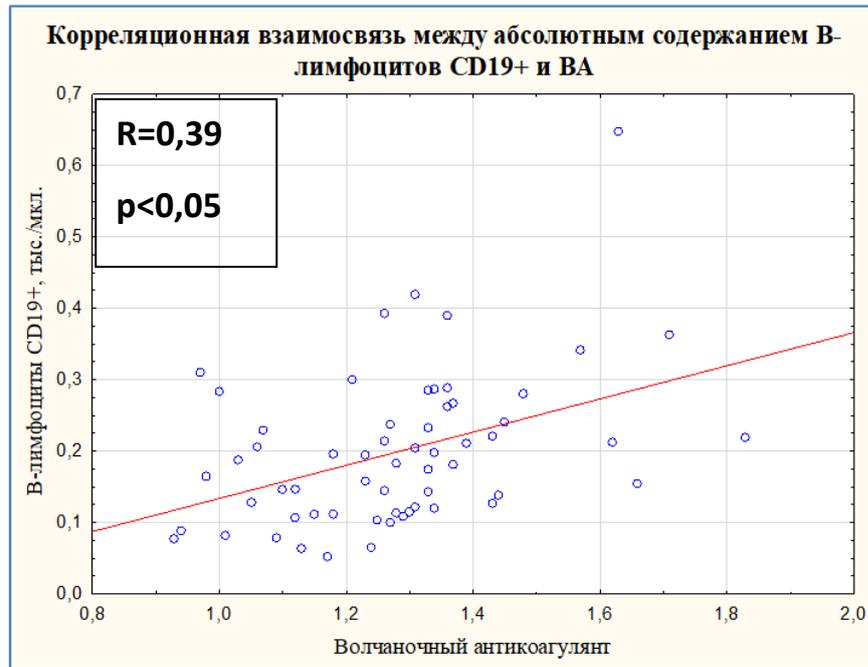


Рисунок 11 – Корреляционная взаимосвязь между абсолютным содержанием В-лимфоцитов CD19+ и уровнем ВА

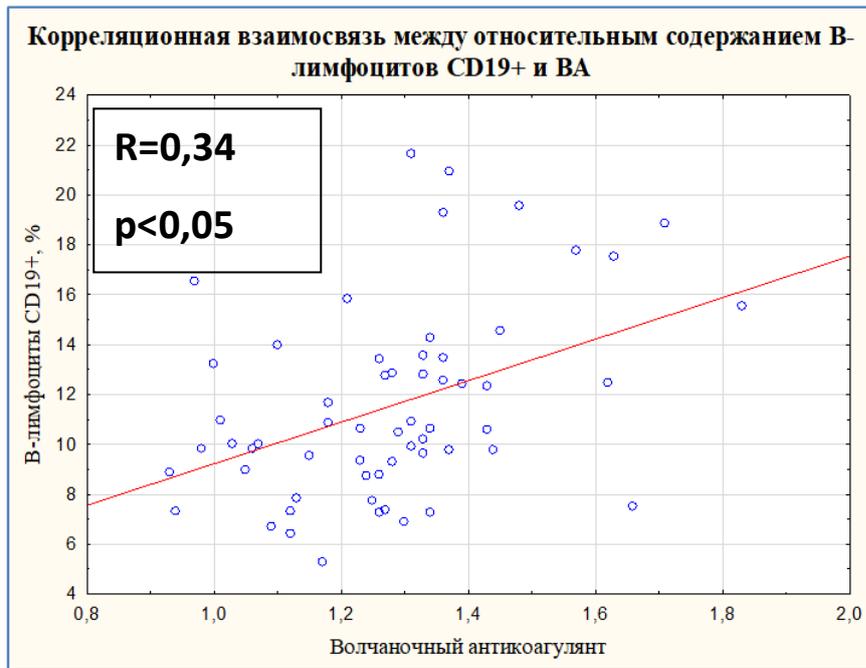


Рисунок 12 – Корреляционная взаимосвязь
между относительным содержанием В-лимфоцитов CD19+ и уровнем ВА

В-лимфоциты (CD19+) как в абсолютном, так и в относительном содержании имели прямую корреляционную взаимосвязь умеренной силы с уровнем волчаночного антикоагулянта ($r=0,39$ и $r=0,34$, соответственно). Женщины с АФА отличались большим содержанием В-лимфоцитов CD19+ по отношению к здоровым женщинам и по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами с бесплодием без АФА, что может указывать на патогенетическую взаимосвязь данных показателей.

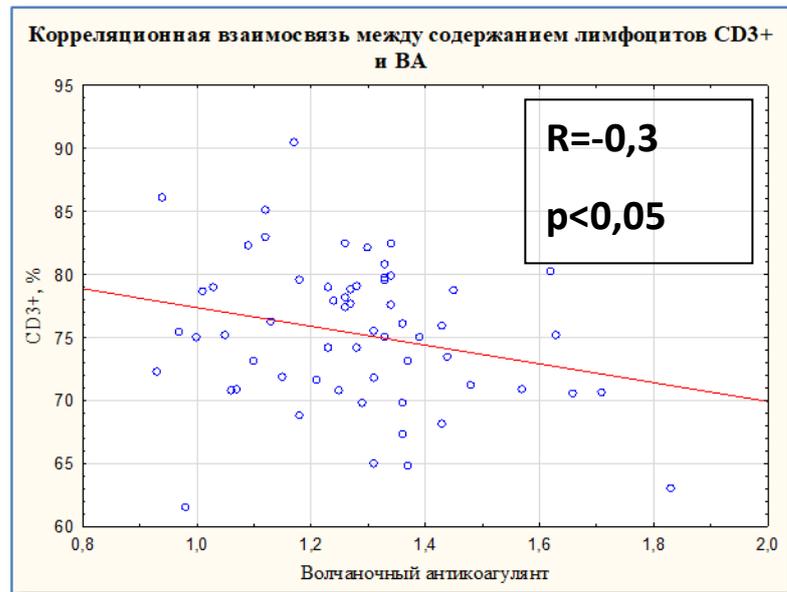


Рисунок 13 – Корреляционная взаимосвязь между относительным содержанием CD3+ лимфоцитов и уровнем ВА

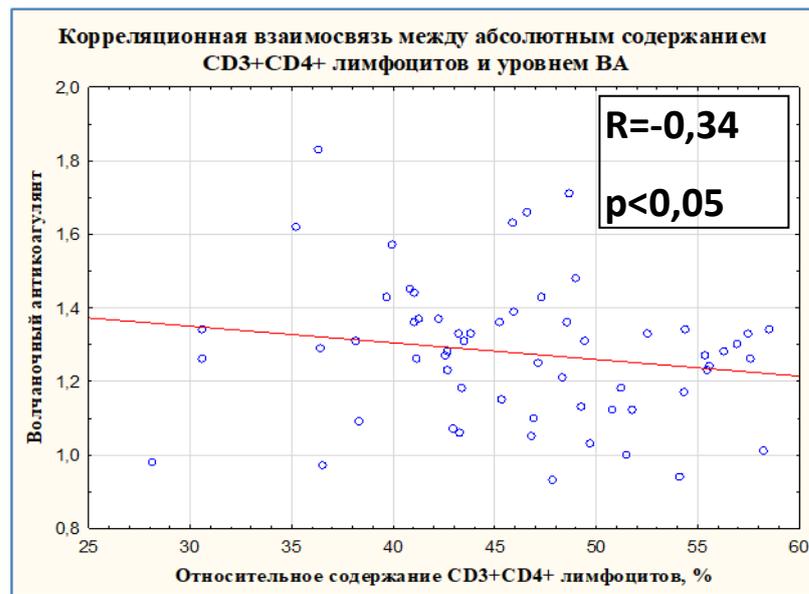


Рисунок 14 – Корреляционная взаимосвязь между абсолютным содержанием CD3+CD4+ лимфоцитов и уровнем волчаночного антикоагулянта

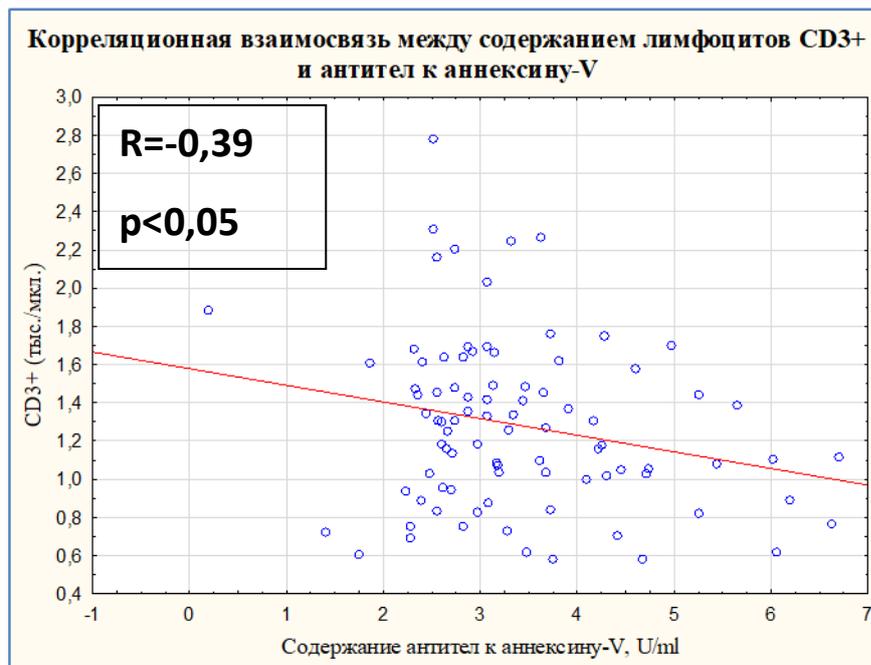


Рисунок 15 – Корреляционная взаимосвязь между абсолютным содержанием CD3+ лимфоцитов и содержанием антител к аннексину-V

Относительное содержание Т-хелперов CD3+CD4+ имело отрицательную корреляционную связь с показателем волчаночного антикоагулянта ($r=-0,34$). Абсолютное содержание CD3+ лимфоцитов имело обратную корреляционную взаимосвязь с содержанием аннексина-V ($r=-0,39$). Относительное содержание CD3+ лимфоцитов имело обратную корреляционную взаимосвязь с уровнем волчаночного антикоагулянта ($r=-0,3$). У женщин с АФА по сравнению со здоровыми женщинами были выявлены значимо ниже показатели содержания лимфоцитов, участвующих в клеточном иммунном ответе (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+). Полученные данные могут отражать тенденцию к взаимосвязи между АФА и клеточным звеном иммунитета у женщин с АФА.

Так как наибольший интерес в популяции CD4+ лимфоцитов представляют Т-регуляторные лимфоциты, было выполнено сравнение их абсолютного и относительного содержания, а также наиболее важных индексных отношений с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов для женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии, что

представлено в приложении в таблице 2. Наиболее значимые различия для наглядности представлены в графическом виде на рисунках 16-18.

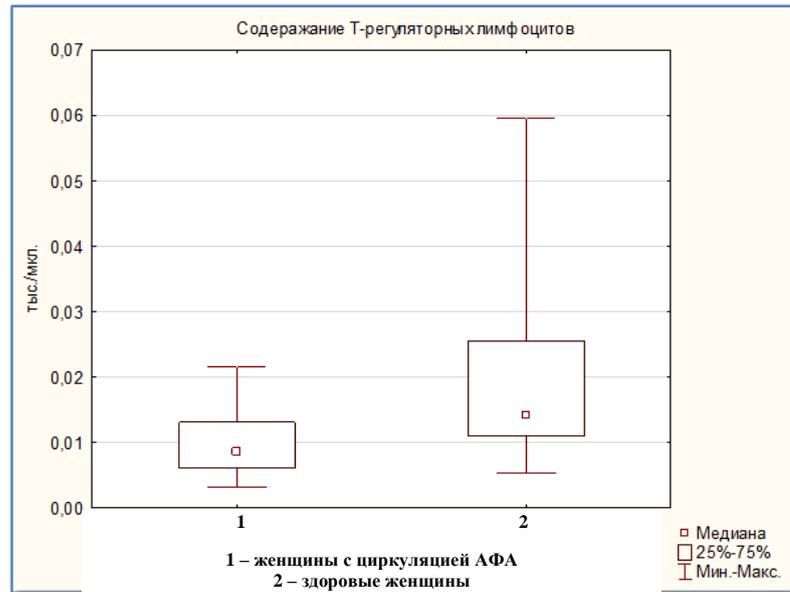


Рисунок 16 – Сравнение абсолютного содержания Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

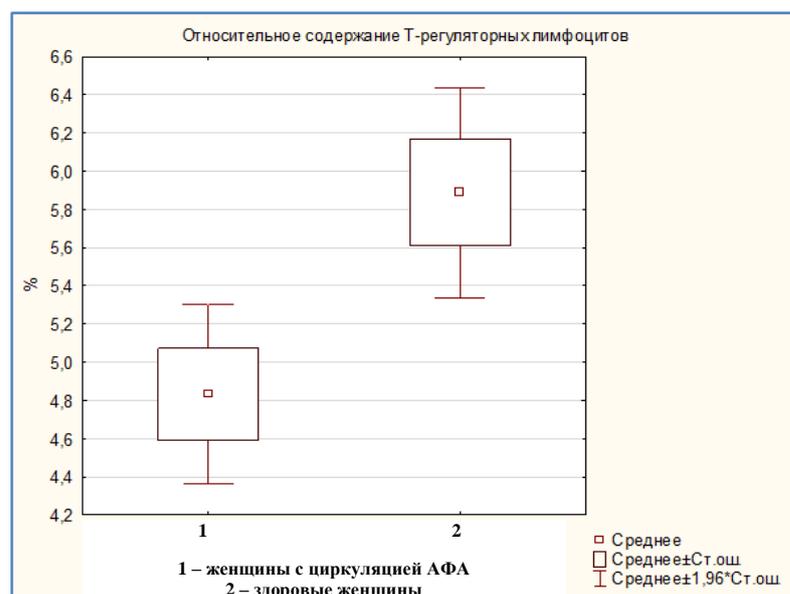


Рисунок 17 – Сравнение относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин.

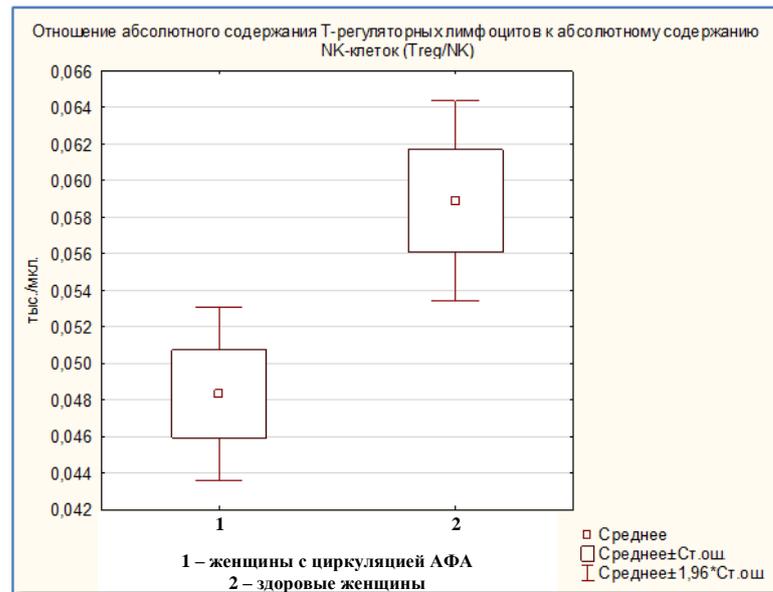


Рисунок 18 – Сравнение отношения абсолютного содержания Т-регуляторных лимфоцитов к абсолютному содержанию НК-клеток у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин

Как видно из графиков, изображенных на рисунках 16-18, у женщин с циркуляцией АФА значимо ниже показатели абсолютного (0,008 (0,006; 0,013) и 0,014 (0,01; 0,025), $U=293$, $p<0,001$) и относительного ($4,83\pm 1,63$ и $5,89\pm 1,46$, $t=-2,78$, $p=0,007$) содержания Т-регуляторных лимфоцитов, по сравнению со здоровыми женщинами. У женщин с циркуляцией АФА также достоверно ниже отношение абсолютного содержания Т-регуляторных клеток к НК-клеткам ($0,05\pm 0,02$ и $0,06\pm 0,01$, $t=-2,78$, $p=0,007$).

Наибольший уровень значимости имел показатель отношения абсолютного и относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов к В-лимфоцитам CD19+. У женщин с циркуляцией АФА данный показатель был значимо ниже, по сравнению с группой женщин без репродуктивной патологии ($0,42\pm 0,17$ и $0,6\pm 0,19$, $p=0,00005$) и ($0,049\pm 0,02$ и $0,09\pm 0,06$, $p=0,0002$), соответственно.

У женщин с циркуляцией АФА также проводилось сравнение показателей активности НК-клеток и содержания НКТ-клеток с результатами женщин без репродуктивной патологии, что представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнение показателей индуцированной активности НК-клеток у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с циркуляцией АФА (n=128)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значение статистики, значение p
	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б	
НКТ-клетки, %*	5,69	4,18-7,2	5,21	6,54	5,14-7,95	3,56	U=536 p=0,221
	4,9 (3,25; 7,9)			6,1 (3,4; 8,1)			
НКТ-клетки, тыс./мкл*	0,098	0,069-0,126	0,014	0,142	0,107-0,178	0,02	U=410 p=0,009
	0,089 (0,036; 0,133)			0,13 (0,08; 0,17)			
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), %*	1,09	0,87-1,31	0,76	1,17	0,92-1,42	0,63	U=555,5 P=0,310
	0,9 (0,7; 1,25)			1,1 (0,8; 1,3)			
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), тыс./мкл*	0,019	0,015-0,022	0,012	0,25	0,019-0,03	0,002	U=458 p=0,036
	0,015(0,01; 0,02)			0,02 (0,014; 0,03)			
Индуцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), %*	25,63	22,52-28,74	8,18	24,61	22,44-26,78	5,49	U=315,5 p=0,216
	27,7 (22,5; 30,3)			24,9 (20,5; 29,1)			
Индуцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), тыс./мкл*	0,47	0,41-0,54	0,03	0,53	0,46-0,59	0,03	U=354 p=0,54
	0,49 (0,4-0,62)			0,49 (0,39; 0,67)			

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

Как видно из таблицы 12, у женщин с циркуляцией АФА значимо ниже абсолютное содержание НКТ-клеток (0,089 (0,036; 0,133) и 0,13 (0,08; 0,17), p=0,009) и активность НК-клеток (0,015(0,01; 0,02) и 0,02 (0,014; 0,03), p=0,036), по сравнению женщин без ОАГА.

Таким образом, сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА с показателями здоровых женщин без репродуктивной патологии показало множественные значимые отличия в показателях клеточного и гуморального иммунитета, в содержании

Т-регуляторных клеток, NKT-клеток, а также NK-клеток и их индуцированной активности.

3.1.3 Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с ОАГА и наличием или отсутствием АФА

После сравнения показателей субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с АФА с данными показателями здоровых женщин, выполнено сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с АФА с сопоставимым по акушерско-гинекологическому и соматическому анамнезу женщин с бесплодием без АФА, что представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнение показателей субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови у женщин с бесплодием и наличием или отсутствием АФА

Показатель	АФА+ (n=128)			Группа сравнения (АФА-) (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Treg, %	4,83	1,35-2,05	0,24	4,72	4,09-5,34	1,61	t=0,29 p=0,77
Treg, тыс./мкл	0,009	0,004-0,006	0,001	0,01	0,008-0,014	0,01	U=616 p=0,76
	0,008 (0,006; 0,013)			0,014(0,01; 0,025)			
Treg/NK, %*	0,47	0,27-0,4	0,047	0,40	0,31-0,48	0,22	U=550 p=0,3
	0,42 (0,29; 0,53)			0,351 (0,211; 0,540)			
Treg/NK, тыс./мкл	0,048	0,013-0,02	0,002	0,05	0,04-0,053	0,02	t=0,29 p=0,77
NK-клетки, %	12,01	10,87-13,15	3,87	14,38	11,94-16,82	6,30	t=-1,7 p=0,09
NK-клетки, тыс./мкл	0,2	0,17-0,22	0,011	0,23	0,16-0,3	0,03	U=372 p=0,68
	0,19 (0,14-0,25)			0,19 (0,16-0,31)			
NKT-клетки, %*	5,69	4,18-7,2	5,21	5,88	4,64-7,12	3,19	U=611 p=0,51
	4,9 (3,25; 7,9)			5,4 (3,5; 7,45)			
NKT-клетки, тыс./мкл	0,1	0,07-0,13	0,014	0,09	0,07-0,12	0,11	U=377 p=0,65
	0,09 (0,4-0,62)			0,08 (0,06-0,12)			

Продолжение таблицы 13

Показатель	АФА+ (n=128)			Группа сравнения (АФА-) (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), %*	1,09	0,87-1,31	0,76	1,10	0,9-1,3	0,50	U=568 p=0,38
	0,9 (0,7; 1,25)			1,1 (0,7; 1,5)			
Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), тыс./мкл	0,019	0,019-0,022	0,002	0,018	0,012-0,023	0,003	U=380 p=0,96
	0,015 (0,01-0,026)			0,017 (0,009-0,023)			
Индукцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), %*	25,63	22,52-28,74	8,18	27,80	25,34-30,24	5,23	U=273 p=0,74
	27,7 (22,5; 30,3)			27,8 (25,65; 30,35)			
Индукцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), тыс./мкл	0,48	0,42-0,54	0,002	0,46	0,38-0,55	0,04	U=138 p=0,52
	0,49 (0,4-0,62)			0,45 (0,41-0,57)			
Лимфоциты (CD3+), тыс./мкл	1,29	1,15-1,42	0,46	1,20	1,07-1,33	0,33	t=0,86 p=0,39
Лимфоциты (CD3+), %	74,71	73,32-76,1	4,79	73,72	70,91-76,54	7,26	t=0,71 p=0,48
CD 45 тыс/мкл	1,72	1,55-1,88	0,56	1,63	1,47-1,79	0,42	t=0,69 p=0,49
В-лимфоциты (CD19+), тыс./мкл	0,21	0,18-0,25	0,11	0,16	0,14-0,19	0,06	t=2,35 p=0,021
В-лимфоциты (CD19+), %*	12,24	11,15-13,22	3,74	10,28	9,06-11,5	3,38	U=513 p=0,013
	11,6 (9,7; 13,78)			9,78 (7,74; 12,17)			
Т-хелперы (CD3+CD4+), тыс./мкл	0,79	0,70-0,87	0,29	0,73	0,64-0,82	0,24	t=0,41 p=0,82
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	46,12	43,99-48,25	7,32	44,89	42,05-47,73	7,33	t=0,48 p=0,7
ЦТЛ (CD3+CD8+), тыс./мкл	0,46	0,40-0,51	0,19	0,41	0,36-0,45	0,12	t=1,2 p=0,23
ЦТЛ (CD3+CD8+), %	26,38	24,6-28,17	6,14	25,24	23,4-27,07	4,73	t=1,2 p=0,39
ИРИ (CD3+CD4+/CD3+CD8+)	1,86	1,69-2,03	0,59	1,84	1,66-2,03	0,47	t=0,12 p=0,9

Как видно из таблицы 13, женщины с циркуляцией АФА имели значимо выше показатели абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов (CD19+) по сравнению с сопоставимыми по акушерско-гинекологическому

анамнезу женщинами с бесплодием и без АФА ($0,21 \pm 0,11$ и $0,16 \pm 0,06$, $p=0,021$; $12,24 \pm 3,73$ и $10,28 \pm 3,38$, $p=0,013$), соответственно.

Таким образом, обследованные женщины с АФА имели достоверные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов не только по сравнению со здоровыми женщинами без репродуктивной патологии, но и с сопоставимыми по анамнезу женщинами без АФА и с бесплодием, что указывает на возможное влияние АФА на показатели иммунного статуса пациенток и может быть одной из причин различий в результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

3.2 Частота выявления АФА в обследуемых группах и анализ корреляционной взаимосвязи между АФА различных видов

В данном исследовании проводилось определение аутоантител к фосфолипидам, выполненное перед началом контролируемой стимуляции овуляции (КСО). Обследование на АФА включило в себя: антитела к кардиолипину (IgG, IgM), антитела к фосфатидилсерину (IgG, IgM), антитела к фосфатидилинозитолу (IgG, IgM), антитела к фосфатидиловой кислоте (IgG, IgM), антитела к $\beta 2$ гликопротеину-1 (IgG, IgM), антитела к аннексину V (IgG, IgM), антитела к протромбину (IgG, IgM), волчаночный антикоагулянт (ВА). Частота выявления повышенных значений данных аутоантител, а также сочетания основных видов АФА между собой: представлены в таблице 14.

Как видно из таблицы 14, значимых различий по частоте выявления различных видов аутоантител в основной и группе сравнения выявлено не было. Наиболее часто в обеих группах выявлялся волчаночный антикоагулянт (51,94% и 62,74%, $\chi^2=1,02$, $p=0,31$), что может быть объяснено тем, что скрининговый тест на ВА входит в перечень показателей коагулограммы, выполняемой в ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». У каждой третьей женщины из основной группы А (24/77 (31,16%)) и у каждой четвертой женщины из основной группы Б (10/51 (19,6%)) были выявлены антитела к $\beta 2$ гликопротеину-1. Наиболее опасное сочетание 3 видов антител (волчаночного антикоагулянта, антител к кардиолипину и антител к $\beta 2$ гликопротеину-1) было выявлено у 2 пациенток из

основной группы А и 1 пациентки из основной группы Б (2,59% и 1,96%, F-Fisher 2sd, $p=1,0$). Таким образом, женщины из основных групп А и Б были сопоставимы по частоте определения различных видов АФА и их сочетаний.

Таблица 14 – Частота выявления повышенного уровня аутоантител и их сочетаний в основной группе А и Б

Вид АФА	Основная группа А (n=77)		Основная группа Б (n=51)		значение p (ст.св.=1)
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Антитела к кардиолипину	17	22,07	8	15,69	F-Fisher 2sd $p=0,22$
Антитела к фосфатидилсерину	9	11,68	4	7,8	F-Fisher 2sd $p=1,0$
Антитела к фосфатидилинозитолу	7	9,0	3	5,89	F-Fisher 2sd $p=0,66$
Антитела к фосфатидиловой кислоте	7	9,0	2	3,92	F-Fisher 2sd $p=0,29$
Антитела $\beta 2$ гп-1	24	31,16	10	19,6	F-Fisher 2sd $p=0,21$
Антитела к аннексину V	9	11,69	8	15,69	χ^2 - Yates=0,37 $p=0,53$
Антитела к протромбину	3	3,89	5	9,8	F-Fisher 2sd $p=0,11$
ВА	40	51,94	32	62,74	$\chi^2=1,02$ $p=0,31$
Антитела к КЛ+ $\beta 2$ гп-1	9	11,68	4	5,19	F-Fisher 2sd $p=0,24$
Антитела к КЛ+ $\beta 2$ гп-1+ВА	2	2,59	1	1,96	F-Fisher 2sd $p=1,0$
Антитела к КЛ+ВА	6	7,79	4	7,84	F-Fisher 2sd $p=0,38$
Антитела $\beta 2$ гп-1+ВА	8	10,38	4	7,84	F-Fisher 2sd $p=1,0$

У части женщин было выявлено неоднократное появление АФА (у 10,9% антитела к кардиолипину, у 18% антитела $\beta 2$ гликопротеину-1, у 5,6% антитела к ФС, у 3,9% антитела к ФИ, у 3,1% антитела к ФК, у 3,12% антитела к протромбину). У 15 пациенток на основании международных критериев установлен диагноз АФС [116]. В основной группе А в соответствии с международными критериями диагностики АФС был диагностирован у

11 женщин (14,29%), в основной группе Б у 4 женщин (7,84%), но данные различия не были значимы (ст.св.=1, F-Fisher 2sd, p=0,4).

Корреляционный анализ между различными видами АФА не выявил значимой взаимосвязи между количественными значениями антител к аннексину-5, антител к протромбину и ВА. Однако между другими видами АФА была выявлена умеренная и сильная ассоциация, что представлено в таблице 15.

Таблица 15 – Корреляционная взаимосвязь между АФА различных видов

	аКЛ	аФС	аФИ	аФК	аβ2гп-1
аКЛ	–	0,77	0,77	0,76	0,63
аФС	0,77	–	0,92	0,89	0,69
аФИ	0,77	0,92	–	0,89	–
аФК	0,76	0,89	0,89	–	0,67
аβ2гп-1	0,63	0,69	–	0,67	–

Как видно из таблицы 15, наибольшая корреляционная взаимосвязь обнаружена между неконвенциональными антителами. Антитела к ФС имели прямую сильную взаимосвязь с антителами к ФИ (R=0,92), к ФК (R=0,89). Прямую взаимосвязь чуть меньшей силы имели антитела к КЛ: с антителами к ФС (R=0,77), к ФИ (R=0,77), к ФК (R=0,76). Наименьшая прямая корреляционная взаимосвязь умеренной силы наблюдалась между антителами к β2гп-1 и антителами к КЛ (R=0,64), к ФК (R=0,67) и антителами к ФС (R=0,69).

Обнаруженные умеренные и сильные корреляции между антителами к КЛ и β2гп-1 и неконвенциональными видами АФА говорят о важности последних в лабораторной диагностике и необходимости исследования их роли в развитии репродуктивной патологии.

3.3 Оценка показателей системы гемостаза

При оценке системы гемостаза использовали следующие параметры: протромбиновый индекс, международное нормализованное отношение (МНО),

концентрация фибриногена, АПТВ, тромбиновое время, Д-димеры, АТ-III, агрегация тромбоцитов (скорость и степень). Оценку данных параметров проводили 3 раза за время проведения протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ). Первый раз проводили исследование на этапе начала контролируемой стимуляции овуляции (до 3 дня КСО). Второй раз на завершающем этапе КСО (10-14 день). Третий раз забор крови происходил на 4-5 день после переноса эмбриона в полость матки. Введение ВВИГ начинали на 1-3 день стимуляции овуляции в протоколе ЭКО с антагонистами ГнРГ, вторая инфузия выполнялась на 7-9 день КСО (100 мл), третья инфузия на 13-15 день КСО.

3.3.1 Результаты исследования показателей системы гемостаза у обследованных групп в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

На этапе начала КСО значимые различия между группами были выявлены по следующим параметрам: протромбиновый индекс (ПТИ), МНО, фибриноген, АПТВ, Тромбиновое время, Д-димеры. Средние показатели не выходили за пределы нормативных показателей.

Подробный сравнительный анализ показателей на этапе начала КСО в протоколе ЭКО (ЭКО/ ИКСИ) между всеми обследованными пациентами представлен в таблице 16.

Таблица 16 – Показатели системы гемостаза на этапе начала КСО в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) (n=77)			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) (n=51)			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
ПТИ по Квику, %	100,25	96,4-104,09	15,51	104,20	99,2-109,2	12,65	109,12	105,93-112,32	11,24	F=6,01 p _{1,2} =0,53 p _{2,3} =0,37 p=0,003 p _{1,3} =0,003
МНО*	1,01	0,99-1,04	0,09	0,99	0,97-1,01	0,06	0,96	0,94-0,98	0,06	H=12,48 p _{1,2} =0,25 p _{2,3} =0,012 p=0,0019 p _{1,3} =0,001
	1,01 (0,94; 1,07)			0,98 (0,96; 1,02)			0,96 (0,93; 0,98)			
Фибриноген, г/л	3,27	3,13-3,4	0,55	3,50	3,33-3,67	0,45	3,14	2,98-3,3	0,56	F=4,23 p _{1,2} =0,21 p _{2,3} =0,027 p=0,016 p _{1,3} =0,45
АПТВ, индекс*	0,92	0,9-0,95	0,09	0,96	0,92-1,0	0,09	0,95	0,87-1,02	0,27	H=6,95 p _{1,2} =0,04 p _{2,3} =0,01 p=0,03 p _{1,3} =0,38
	0,91 (0,87; 0,99)			0,96 (0,91; 1,02)			0,91 (0,85; 0,95)			
Тромбиновое время, с	15,40	15,09-15,7	1,23	15,76	15,26-16,25	1,31	16,19	15,79-16,59	1,42	F=5,08 p _{1,2} =0,54 p _{2,3} =0,42 p=0,007 p _{1,3} =0,007
Д-димеры*	132,27	63,52-201,02	263,80	54,26	29,7-78,82	56,80	64,03	43,52-84,53	62,38	H=8,3 p _{1,2} =0,01 p _{2,3} =0,42 p=0,01 p _{1,3} =0,037
	68 (44; 118)			46 (18; 60)			53 (26; 83)			
АТ-III, %	101,92	98,9-104,95	12,31	101,80	95,18-108,41	16,72	99,02	94,52-103,52	14,62	F=0,61 p=0,54

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова и Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

При межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Как видно из таблицы 16, на этапе начала КСО различия в показателях системы гемостаза чаще всего наблюдаются между основными группами А и Б (ПТИ, МНО, тромбиновое время, Д-димеры), а также между основной группой Б и группой сравнения (МНО, фибриноген, АПТВ, Д-димеры).

Протромбиновый индекс находится в пределах нормативных показателей во всех группах, но в основной группе А его показатель значимо ниже по сравнению с группой сравнения ($100,25 \pm 15,51\%$ и $109,12 \pm 11,24\%$ соответственно, $p=0,003$). Показатель концентрации фибриногена был в пределах нормативных показателей, но в основной группе Б был достоверно выше по сравнению с группой сравнения ($3,5 \pm 0,45$ г/л и $3,14 \pm 0,56$ г/л, $p=0,027$).

Международное нормализованное отношение было достоверно выше в основной группе А по сравнению с группой сравнения ($1,01 \pm 0,09$ и $0,96 \pm 0,06$ $p=0,001$), а также в основной группе Б, по сравнению с группой сравнения ($0,99 \pm 0,06$ и $0,96 \pm 0,06$ $p=0,012$).

Тромбиновое время было достоверно ниже в основной группе А по сравнению с группой сравнения ($15,4 \pm 1,23$ с и $16,19 \pm 1,42$ с, соответственно, $p=0,007$), однако находилось в пределах нормативных значений.

Значения Д-димеров также не выходили за пределы референсных значений, однако были значимо выше в основной группе А по сравнению с основной группой Б ($63,52-201,02$ и $29,7-78,82$, $p=0,01$) и с группой сравнения ($63,52-201,02$ и $43,52-84,53$, $p=0,037$).

Достоверных отличий в уровне естественного антикоагулянта АТ-III между группами выявлено было.

При исследовании системы гемостаза на завершающем этапе КСО значимые различия были выявлены в отношении тромбинового времени, Д-димеров, АТ-III, однако только значения Д-димеров выходили за пределы референсных значений, что представлено в таблице 17.

Таблица 17 – Сравнение показателей системы гемостаза на завершающем этапе КСО у пациенток обследуемых групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) (n=77)			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) (n=51)			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) (n=63)			Значения статистики, значение p	
	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б		
ПТИ	104,62	100,44-108,8	15,47	110,35	104,91-115,8	12,89	109,73	102,73-116,74	15,39	F=1,66	p=0,19
МНО	0,99	0,97-1,01	0,08	0,96	0,94-0,98	0,06	0,96	0,92-0,99	0,08	F=2,01	p=0,13
Фибриноген, г/л	3,62	3,44-3,8	0,67	3,70	3,42-3,98	0,69	3,51	3,25-3,78	0,60	F=0,46	p=0,62
АПТВ, индекс	0,92	0,9-0,95	0,10	0,92	0,89-0,95	0,07	0,91	0,86-0,95	0,10	F=0,27	p=0,76
Тромбиновое время, с	14,93	14,55-15,3	1,41	15,89	14,96-16,82	2,25	15,64	15,06-16,21	1,29	F=3,53 p _{1,2} =0,09 p _{2,3} =0,86	p=0,033 p _{1,3} =0,32
Д-димеры*	298,71	152,15-445,27	504,74	82,08	35,26-128,9	115,92	135,39	32,82-237,95	206,25	H=12,05 p _{1,2} =0,001 p _{2,3} =0,35	p=0,024 p _{1,3} =0,034
	117,5 (48,5; 295,5)			47,5 (18; 99)			50,5 (29; 130)				
АТ-III	95,53	91,54-99,5	14,60	86,76	81,75-91,78	11,87	81,93	71,67-92,19	22,53	F=6,3 p _{1,2} =0,15 p _{2,3} =0,59	p=0,003 p _{1,3} =0,019

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова и Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%)).

При межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Уровень Д-димеров был достоверно выше в основной группе А, по сравнению с группой сравнения (ДИ 95% 152,15-445,27 и 32,82-237,95, $p=0,034$) и с основной группой Б (ДИ 95% 152,15-445,27 и 35,26-128,9, $p=0,001$), при этом верхняя граница значения Д-димеров у основной группы А выходила за пределы референсных значений.

Уровень АТ-III достоверно выше в основной группе А по сравнению с группой сравнения ($95,53\pm 14,6$ и $81,93\pm 22,53$, $p=0,019$), но значения его находились в пределах нормативных значений.

После подсадки эмбрионов отмечались различия между группами в отношении протромбинового индекса, МНО и фибриногена, что представлено в таблице 18.

Значение Д-димеров не имело тенденций к различию между сравниваемыми группами, но во всех группах выходило за пределы референсных значений, что можно объяснить влиянием КСО на супрафизиологическое повышение уровня эстрогенов, сопровождающееся нарастанием коагуляционного потенциала и внутрисосудистого свертывания.

Максимальный уровень фибриногена отмечен в основной группе Б, средний показатель составил $4,24\pm 0,86$ г/л, что выходило за пределы референсных значений. Данный показатель был достоверно выше в основной группе Б относительно группы сравнения ($4,24\pm 0,86$ г/л и $3,7\pm 0,51$ г/л, $p=0,02$), а также относительно основной группы А ($4,24\pm 0,86$ г/л и $3,61\pm 0,6$ г/л, $p=0,008$).

Таблица 18 – Сравнение показателей системы гемостаза на 4-5 день после переноса эмбриона в полость матки в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин из обследуемых групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) (n=77)			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) (n=51)			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) (n=63)			Значения статистики, значение p	
	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б	М	ДИ 95%	Б		
ПТИ по Квику	100,93	95,72-106,15	14,95	108,20	101,55-114,86	14,61	113,29	107,37-119,21	13,70	F=5,17 p _{1,2} =0,24 p _{2,3} =0,49	p=0,008 p _{1,3} =0,013
МНО	1,01	0,98-1,03	0,08	0,98	0,95-1,01	0,07	0,95	0,93-0,98	0,05	F=4,98 p _{1,2} =0,29 p _{2,3} =0,48	p=0,009 p _{1,3} =0,016
Фибриноген, г/л	3,61	3,41-3,82	0,60	4,24	3,84-4,63	0,86	3,70	3,47-3,92	0,51	F=6,37 p _{1,2} =0,008 p _{2,3} =0,02	p=0,003 p _{1,3} =0,9
АПТВ, индекс	0,90	0,87-0,94	0,11	0,90	0,86-0,94	0,09	0,88	0,84-0,92	0,10	F=0,35	p=0,69
Тромбиновое время, с	14,88	14,45-15,31	1,24	14,94	14,06-15,82	1,93	15,62	15,07-16,16	1,26	F=1,94	p=0,15
Д-димеры*	646,53	419,21-873,85	630,49	874,16	546,15-1202,16	680,53	626,48	349,65-903,3	608,15	H=1,97	p=0,37
	512 (105; 1081)			765 (317; 1485)			352 (102; 1002)				
АТ-III	99,01	94,64-103,39	12,54	100,29	91,66-108,91	18,42	92,35	84,74-99,95	16,26	F=1,61	p=0,2

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова и Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%)).

При межгрупповых сравнениях обозначение p_{1,2} использовано для сравнения основных групп А и Б, p_{1,3} для сравнения основной группы А и группы сравнения, и p_{2,3} для сравнения основной группы Б и группы сравнения

Таким образом, можно сделать вывод о том, что у пациенток с наличием АФА по сравнению с женщинами без АФА не было выявлено значимого влияния АФА на показатели гемостаза на протяжении программы ЭКО, что может быть объяснено применением НМГ и низких доз ацетилсалициловой кислоты. На фоне данной терапии значения показателей коагулограммы находились в пределах допустимых значений и не представляли угрозу развития ТЭО.

3.3.2 Результаты сравнительного анализа показателей системы гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Ввиду отсутствия убедительных данных о прямом влиянии ВВИГ на систему гемостаза, все женщины с циркуляцией АФА были объединены в одну группу и выполнялось сравнение их показателей коагулограммы с женщинами без АФА на разных этапах протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

На этапе начала протокола (до 3 дня КСО) значимые различия были выявлены в показателях ПТИ, тромбинового времени, МНО и уровне фибриногена. Подробные результаты сравнения представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Сравнение показателей коагулограммы у женщин с наличием и отсутствием АФА на этапе начала протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Показатель	АФА+ (n=128)			АФА- (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
ПТИ по Квику, %	101,4	98,3-104,4	14,77	109,2	105,4-112,9	11,38	t=-2,9 p=0,004
Фибриноген, г/л	3,38	3,23-3,44	0,08	3,13	2,95-3,31	0,55	t=1,99 p=0,04
МНО	1,01	0,99-1,02	0,08	0,96	0,94-0,98	0,06	t=3,16 p=0,2
АПТВ, индекс	0,93	0,92-0,95	0,09	0,96	0,86-1,06	0,3	t=-0,79 p=0,42
Тромбиновое время, с	15,5	15,25-15,76	1,26	16	15,59-16,48	1,36	t=-0,79 p=0,036
Д-димеры	110,3	60,3-160,4	227,9	60,73	33,35-88,1	67,7	U=849 p=0,12
	57,5 (10; 104)			48 (16; 77)			
АТ-III, %	101,8	99,08-104,69	13,65	99,84	94,7-104,98	13,77	t=0,71 p=0,47

Как видно из таблицы 19, даже в самом начале протокола до начала выраженного влияния стимуляции на организм, женщины с циркуляцией АФА имели значимые различия относительно женщин без АФА. У женщин с АФА значимо меньший показатель протромбинового индекса по Квику ($101,4 \pm 1,54$ и $109,12 \pm 1,12$, $p=0,004$), тромбинового времени ($15,5 \pm 0,13$ и $16,19 \pm 1,42$, $p=0,036$) и значимо выше содержание фибриногена ($3,38 \pm 0,08$ и $3,13 \pm 0,55$, $p=0,04$), по сравнению с женщинами без АФА.

На завершающем этапе КСО (10-14 день протокола) значимые различия были выявлены только в уровне АТ-III. Подробные результаты сравнения представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Сравнение показателей коагулограммы у женщин с наличием и отсутствием АФА на завершающем этапе КСО.

Показатель	АФА+ (n=128)			АФА- (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
ПТИ по Квику, %	106,36	103-109,7	14,89	112,9	106,68- 119,2	13,86	t=-0,93 p=0,35
Фибриноген, г/л	3,64	3,5-3,79	0,67	3,66	3,42-3,9	0,52	t=0,74 p=0,45
МНО	0,98	0,96-0,99	0,07	0,95	0,93-0,98	0,05	t=1,35 p=1,18
АПТВ, индекс	0,92	0,9-0,94	0,08	0,89	0,84-0,93	0,1	t=0,2 p=0,83
Тромбиновое время, с	15,23	14,84-15,61	1,75	15,63	15,03-16,23	1,31	t=-0,92 p=0,35
Д-димеры	222,3	124,4-320,7	423,6	560	279,3-840,7	564,45	U=492 p=0,29
	85 (38; 219)			50,5 (29; 100)			
АТ-III, %	92,8	89,6-96	14,32	82,7	71,4-94,1	23,5	t=2,38 p=0,019

Как видно из таблицы 20, у женщин с циркуляцией АФА в ответ на КСО наблюдалось большее содержание АТ-III, по сравнению с женщинами без АФА ($92,8 \pm 14,32$ и $82,7 \pm 23,5$, $p=0,019$), что может быть объяснено применением НМГ у женщин с АФА с начала КСО в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

После переноса эмбрионов в полость матки значимые различия были выявлены в показателях ПТИ, тромбинового времени и уровне АТ-III. Подробные результаты сравнения представлены в таблице 21.

Как видно из таблицы 21, женщины с циркулирующей АФА после переноса эмбрионов в полость матки имели похожие различия с началом протокола (ЭКО/ИКСИ) и имели значимо меньший показатель протромбинового индекса по Квику ($104,26 \pm 15,54$ и $109,97 \pm 16,1$, $p=0,027$) и тромбинового времени ($14,89 \pm 1,5$ и $15,61 \pm 1,35$, $p=0,05$) по сравнению с женщинами без АФА.

Таблица 21 – Сравнение показателей коагулограммы у женщин с наличием и отсутствием АФА после переноса эмбрионов в полость матки

Показатель	АФА+ (n=128)			АФА- (n=63)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
ПТИ по Квику, %	104,26	100,1-108,4	15,54	109,97	102,2-117,7	16,1	t=-2,25 p=0,027
Фибриноген, г/л	3,85	3,65-4,05	0,76	3,52	3,22-3,81	0,63	t=1,04 p=0,29
МНО	0,99	0,97-1,02	0,07	0,95	0,92-0,99	0,08	t=2,33 p=0,22
АПТВ, индекс	0,89	0,87-0,93	0,1	0,92	0,87-0,96	0,09	t=0,45 p=0,64
Тромбиновое время, с	14,89	14,49-15,29	1,5	15,61	14,98-16,24	1,35	t=-1,98 p=0,05
Д-димеры	732,5	552,6-912,6	645,9	140,3	24,5-256,1	217,3	U=390 p=0,3
	605 (158,5; 1153)			310 (83; 1002)			
АТ-III, %	99,4	95,4-103,4	14,7	82,77	71,4-94,1	23,57	t=1,96 p=0,05

Как и на завершающем этапе стимуляции у женщин с АФА также было выявлено значимо большее содержание АТ-III ($99,4 \pm 14,7$ и $82,77 \pm 23,57$, $p=0,05$), что также объясняется приемом НМГ с начала КСО.

3.3.3 Динамика изменений показателей системы гемостаза при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

При изучении динамики изменения показателей системы гемостаза в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) во всех группах обследованных женщин обнаружено, что общую динамику изменений имели все изучаемые показатели, кроме протромбинового индекса и АПТВ. Наиболее выраженную динамику имели значения концентрации фибриногена ($F=22,289$, $p<0,001$), уровень Д-димеров ($F=22,242$, $p<0,001$) и уровень естественного антикоагулянта АТ-III ($F=17,096$, $p<0,001$). Менее выраженная динамика изменений наблюдалась у показателей тромбинового времени ($F=7,04$, $p=0,0015$) и МНО ($F=4,156$, $p=0,0137$). Данные значений межгрупповой динамики показателей системы гемостаза проиллюстрированы в приложении (рисунки 1-9).

Наибольший интерес представляло сравнение динамики изменений показателей системы гемостаза среди женщин с наличием и отсутствием АФА, так как в исследуемых показателях на различных этапах программы ЭКО были выявлены значимые различия в количественных показателях. Однако женщины с наличием и отсутствием АФА имели схожую тенденцию в динамических изменениях показателях системы гемостаза, что проиллюстрировано на рисунках 19-25.

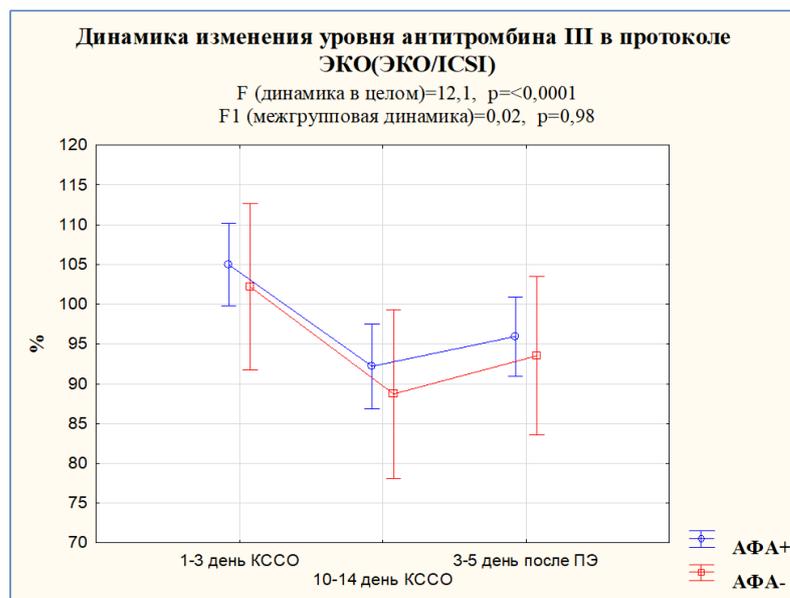


Рисунок 19 – Динамика содержания уровня естественного антикоагулянта АТ-III у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

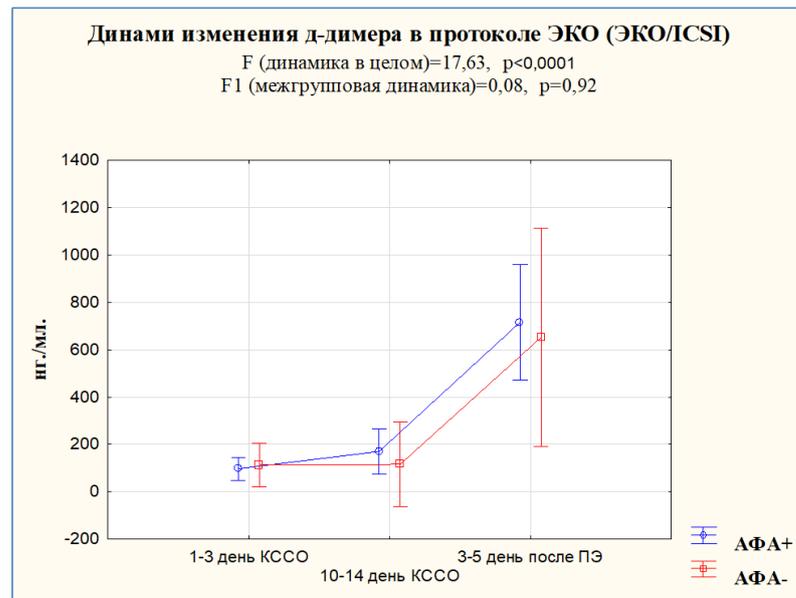


Рисунок 20 – Динамика содержания уровня Д-димеров у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

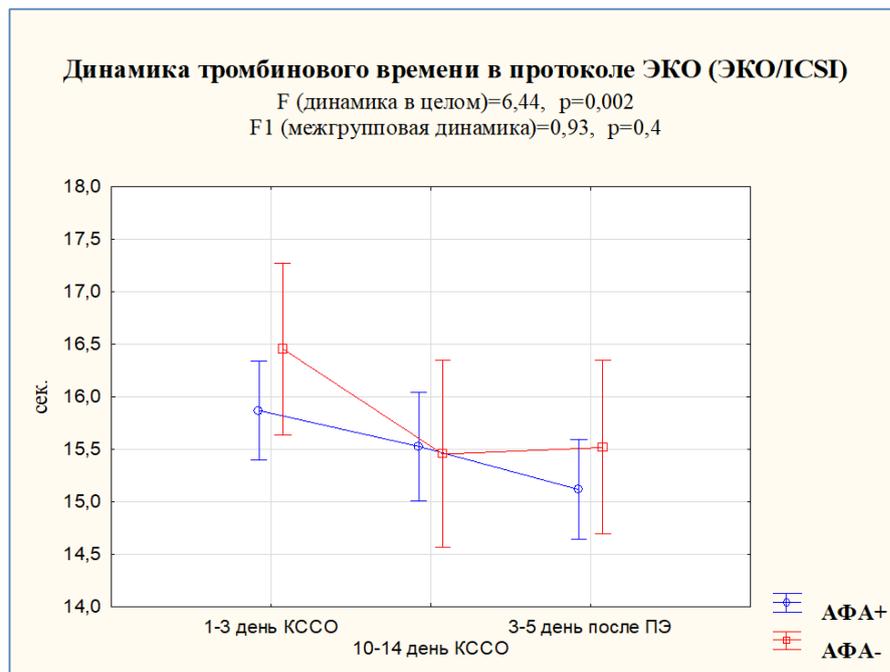


Рисунок 21 – Динамика изменений тромбинового времени у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

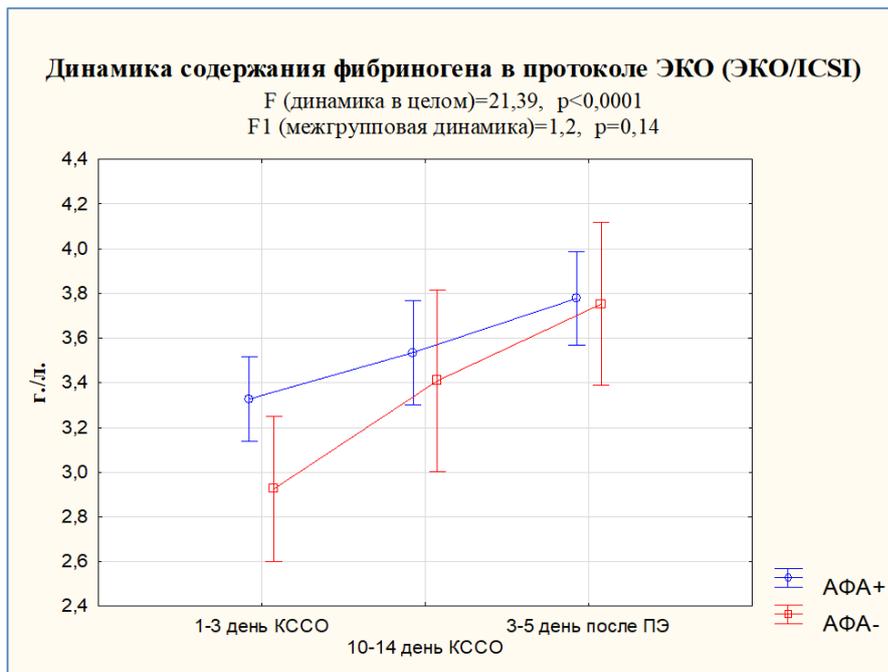


Рисунок 22 – Динамика изменений концентрации фибриногена у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

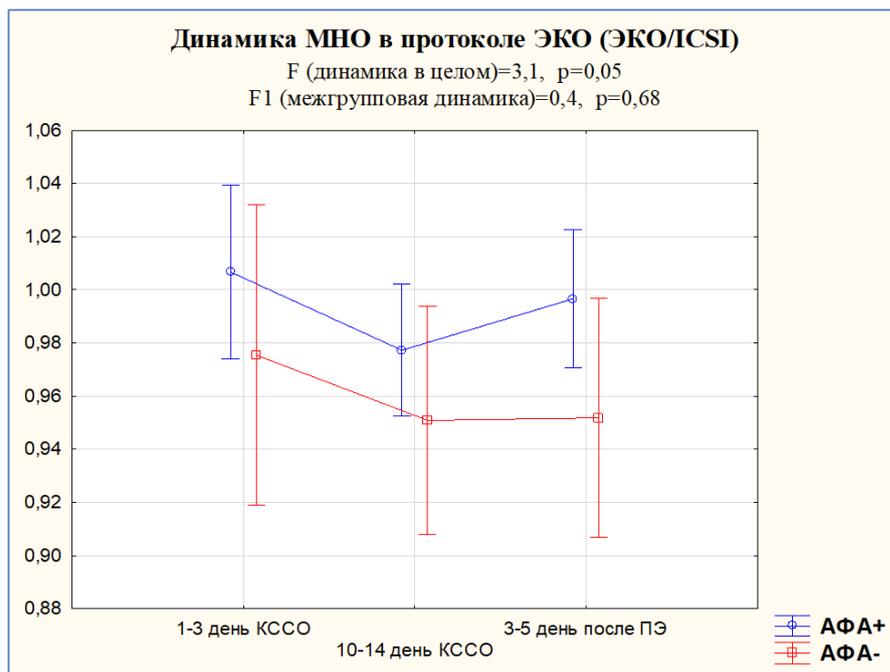


Рисунок 23 – Динамика изменений МНО у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

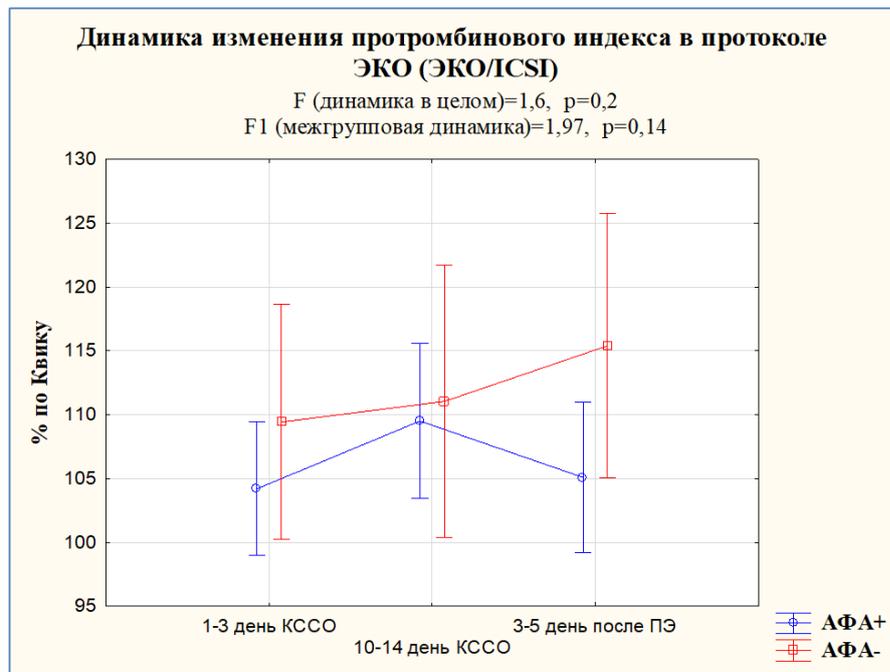


Рисунок 24 – Динамика изменений протромбинового индекса у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

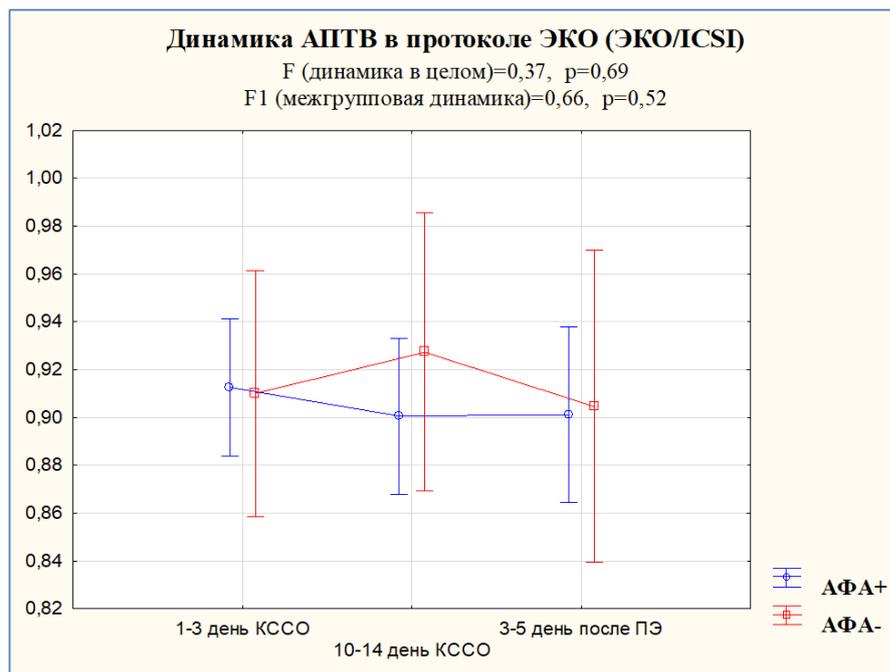


Рисунок 25 – Динамика изменений индекса АПТВ у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов [81, 109, 110], что

способствует развитию гиперкоагуляции и может привести к артериальным и венозным тромбозам.

Как видно из графиков, представленных на рисунках 19-25, в данном исследовании наблюдаются изменения, сопровождающиеся нарастанием коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активацией внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшением активности антикоагулянтной системы (снижение содержания естественного антикоагулянта – АТ-III).

Все показатели, кроме ПТИ и АПТВ имели значимую динамику различий, однако ни в одном исследуемом показателе не было выявлено значимой внутригрупповой динамики, то есть независимо от наличия или отсутствия АФА в крови пациенток и получаемой ими терапии, у всех наблюдаются одинаковые изменения в системе гемостаза на проведение стимуляции в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что у женщин с АФА, получавших терапию НМГ, показатели гемостаза в динамике отражали общую тенденцию к увеличению коагуляционного потенциала и уменьшения активности антикоагулянтной системы, не имея отличий от женщин без АФА, не получавших антикоагулянтную терапию.

3.3.4 Показатели агрегационной активности тромбоцитов в динамике при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Исследование агрегационной активности тромбоцитов включало определение степени и скорость агрегации с АДФ. Значения степени и скорости агрегации тромбоцитов для женщин обследованных групп представлены в таблице 22.

Как видно из таблицы 22, при исследовании агрегационной активности тромбоцитов не было выявлено значимых различий в скорости и степени агрегации.

Таблица 22 – Сравнение степени и скорости агрегации тромбоцитов при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин обследованных групп

Показатель	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) (n=77)			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) (n=51)			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) (n=63)			Значение статистики, уровень p
	М	ДИ95%	б	М	ДИ95%	б	М	ДИ95%	б	
Степень агрегации 1	77,39	73,6-81,11	1,86	77,99	72,96-83,01	2,49	73,10	66,99-79,21	3,01	F=1,08, p=0,34
Скорость агрегации 1	74,77	71,45-78,08	1,66	75,32	70,63-80,02	2,33	73,35	68,46-78,24	2,41	F=0,2, p=0,81
Степень агрегации 2	77,76	74,1-81,43	1,83	73,59	69,11-78,07	2,19	80,15	73,88-86,42	3,06	F=1,62, p=0,2
Скорость агрегации 2	74,38	71,33-77,42	1,52	74,85	71,32-78,38	1,73	76,33	69,21-83,46	3,48	F=0,21, p=0,8
Степень агрегации 3	73,12	69,67-76,57	1,71	69,09	63,12-75,06	2,91	68,94	63,42-74,45	2,63	F=1,2, p=0,3
Скорость агрегации 3	73,12	70,2-76,05	1,46	71,95	67,58-76,33	2,13	72,13	67,26-77	2,32	F=0,13, 0,88

Примечание: 1 – агрегационная активность тромбоцитов на этапе начала стимуляции;
2 – агрегационная активность тромбоцитов на завершающем этапе КСО;
3 – агрегационная активность тромбоцитов после ПЭ в полость матки

Сравнение показателей агрегационной активности тромбоцитов среди женщин с наличием и отсутствием АФА представлено в таблице 23.

Таблица 23 – Сравнение степени и скорости агрегации тромбоцитов при проведении протокола ЭКО у женщин с наличием и отсутствием АФА

Показатель	АФА+ (n=128)			АФА- (n=63)			Значение статистики, уровень p
	М	ДИ95%	б	М	ДИ95%	б	
Степень агрегации 1	77,86	74,8-80,92	16,1	73,1	66,99-79,21	18,33	t=1,49, p=0,13
Скорость агрегации 1	74,98	72,29-77,67	14,14	73,34	68,46-78,2	14,7	t=0,6, p=0,54
Степень агрегации 2	76,37	73,52-79,21	13,57	80,15	73,88-86,42	16,48	t=-1,23, p=0,22
Скорость агрегации 2	74,53	72,22-76,84	11,0	76,33	69,2-83,46	18,73	t=-0,64, p=0,53
Степень агрегации 3	71,63	68,59-74,67	13,31	68,9	63,42-74,45	11,78	t=0,82, p=0,41
Скорость агрегации 3	72,69	70,29-75,09	10,48	72,13	67,26-77,0	10,4	t=0,21, p=0,83

Сравнение значений агрегационной активности тромбоцитов на разных этапах протокола ЭКО у женщин с наличием и отсутствием АФА не выявило значимых различий.

При исследовании динамических изменений агрегационной активности тромбоцитов среди женщин обследуемых групп, была обнаружена общая динамика скорости агрегации тромбоцитов ($F=5,75$, $p=0,0037$), однако отсутствовала динамика внутригрупповых различий ($F=2,04$, $p=0,09$). В отношении степени агрегации тромбоцитов не было выявлено различий как в общей динамике показателей ($F=1,0$, $p=0,36$), так внутригрупповой динамики ($F=0,22$, $p=0,92$), что проиллюстрировано в приложении на рисунках 8 и 9.

Результаты сравнения динамики изменений в агрегационной активности тромбоцитов среди женщин с наличием и отсутствием АФА представлены на рисунках 30-31.

Как видно из рисунка 26, отсутствовала как общая динамика скорости агрегации тромбоцитов ($F=1,0$, $p=0,37$), так и внутригрупповая динамика ($F=0,86$, $p=0,43$).

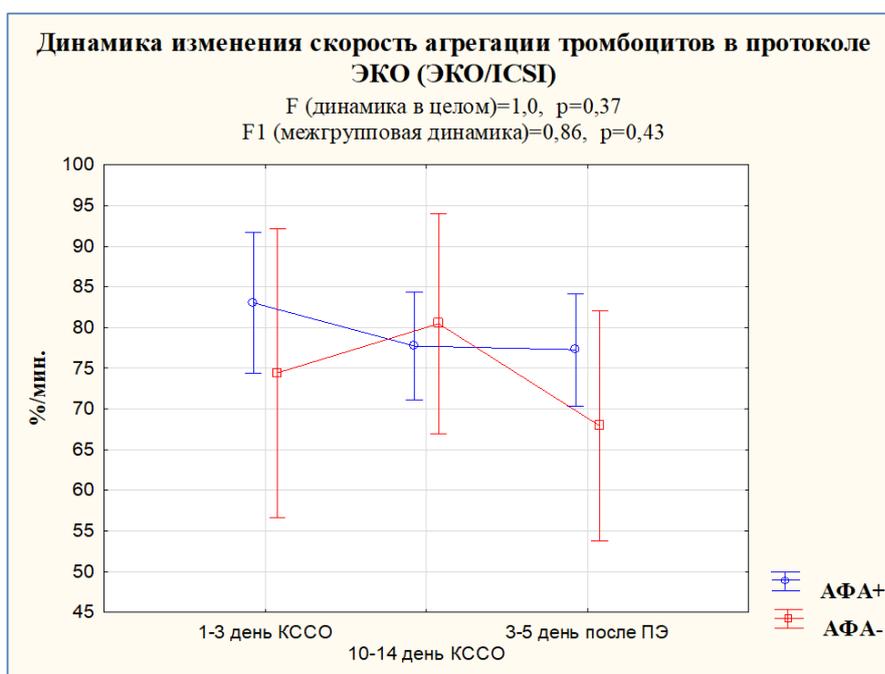


Рисунок 26 – Динамика скорости агрегации тромбоцитов у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Как видно из графика на рисунке 27, в отношении степени агрегации тромбоцитов не было выявлено различий как в общей динамике показателей ($F=1,58$, $p=0,22$), так внутригрупповой динамики ($F=0,65$, $p=0,53$).

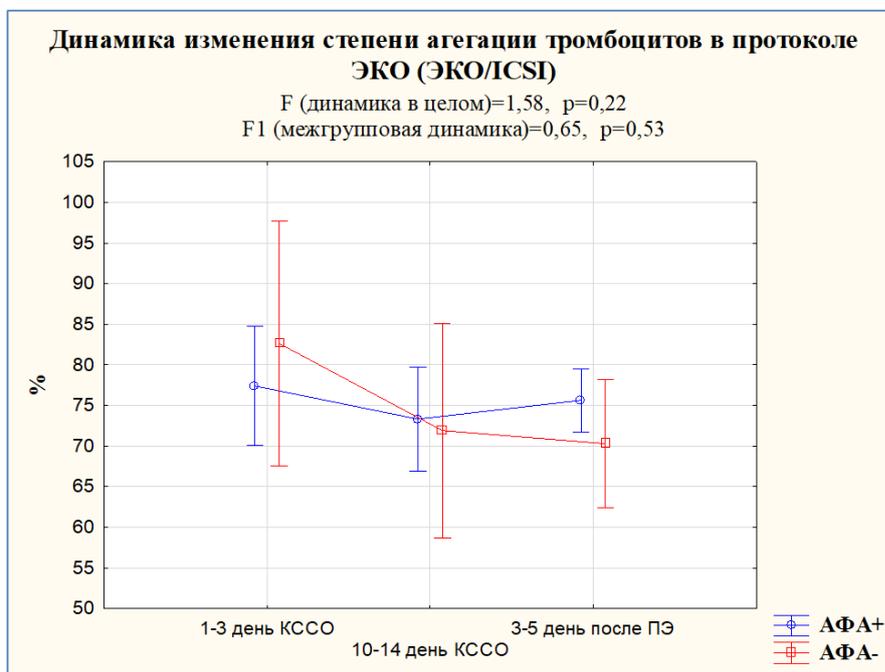


Рисунок 27 – Динамика степени агрегации тромбоцитов у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Таким образом, не выявлено значимых динамических изменений в показателях агрегационной активности тромбоцитов среди женщин с наличием и отсутствием АФА на протяжении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ), что может быть объяснено применением ацетилсалициловой кислоты у женщин с наличием АФА.

3.4 Оценка результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

Оценку результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) осуществляли по показателям частоты биохимической беременности в расчете на цикл (ЧББц) и перенос эмбрионов (ЧББпэ), по показателям частоты клинической беременности (КБ) в расчете на проведенный цикл (ЧКБц) и на перенос эмбрионов в полость матки (ЧКБпэ); частоты родов (ЧР) – в расчете на проведенный цикл. КБ устанавливалась по наличию сердцебиения плода.

С целью определения частоты ранних репродуктивных потерь проводили вычисление частоты регистрации КБ среди женщин с положительным результатом анализа на β ХГЧ. По отношению к диагностированной клинической беременности определяли частоту невынашивания беременности до 10 недель и после 10 недель. Частоту неудачных попыток рассчитывали, как отношение числа всех циклов ЭКО (ЭКО/ИКСИ), не завершившихся родами, к общему количеству проведенных программ, выраженное в процентах.

Процедуру переноса эмбрионов в полость матки провели 178 обследованным женщинам из 191. 40 женщинам был выполнен перенос в матку 1 эмбриона, 132 женщинам перенос 2 эмбрионов и 6 женщинам был выполнен перенос 3 эмбрионов в связи с их неудовлетворительным качеством. Таким образом, общее число перенесенных эмбрионов составило 322.

Положительный тест на β ХГЧ был зарегистрирован у 68 женщин (ЧББЦ=35,6% ЧББПЭ=38,2%). Клиническую беременность диагностировали у 59 женщин (ЧБц=30,89%, ЧБПЭ=33,14%). У 22 женщин произошло прерывание беременности до 10 недель (32,35%). У 2 женщин (5,88%) прерывание беременности произошло после 10 недель (на сроке 17 и 20 недель).

Наступившая после программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) беременность завершилась родами у 43 женщин (ЧР=24,15%). В результате 9 преждевременных (20,93%) и 34 срочных родов (79,07%) родился 51 живой ребенок весом 3240 (2860; 3560) г. У 4 женщин во время беременности произошла спонтанная редукция 2 плода. Больше половины женщин (65,12%) были родоразрешены путем операции кесарева сечения в нижнем сегменте матки (28/43). У 135 из 178 больных (75,84%), которые были включены в программу ЭКО (ЭКО/ИКСИ), лечение не завершилось рождением ребенка.

Данные результативности, описанные выше, приведены для всех женщин, включенных в исследование, без учета качества переносимых эмбрионов.

Определенная в настоящем исследовании результативность программ ЭКО и ЭКО/ИКСИ у обследованных пациенток с бесплодием сопоставима с мировыми показателями [47].

3.4.1 Сравнение результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с наличием и отсутствием АФА

С целью оценки влияния АФА на результативность применения программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) был выполнен сравнительный анализ данных показателей для женщин с наличием и отсутствием АФА. Учитывая, что на показатели результативности (ЭКО/ИКСИ) оказывает важное значение качество эмбрионов, при расчете данных показателей были исключены из анализа пациентки, которым переносили эмбрион низкого качества. Результаты представлены в таблице 24.

Как видно из таблицы 24, у женщин с циркуляцией АФА был значимо ниже процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на β ХГЧ, по сравнению с женщинами без АФА (60% и 93,75%, $p=0,033$). Полученные данные говорят о возможном участии АФА в прерывании беременности на самых ранних этапах инвазии эмбриона. Данные о высокой частоте бесплодия неясной этиологии у женщин с АФА основаны на том, что в данной группе женщин беременности могут прерываться также на самых ранних этапах, когда женщины не предполагают ее наличие [52].

В отношении остальных показателей результативности значимых различий выявлено не было.

Таблица 24 – Сравнение результатов программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с наличием или отсутствием АФА (исключены женщины, которым были перенесены эмбрионы низкого качества)

Группа	N	отн., % (абс.)	Значение статистики, уровень p (ст.св.=1)
Частота регистрации положительного анализа на β ХГЧ (на цикл)			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	35,71% (15)	$\chi^2=0,14$ $p=0,7$
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	32% (16)	
Частота регистрации положительного анализа на β ХГЧ (на перенос эмбриона)			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	35,71% (15)	$\chi^2=0,14$ $p=0,7$
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	32% (16)	
Процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на β ХГЧ			

Продолжение таблицы 24

Группа	N	отн., % (абс.)	Значение статистики, уровень p (ст.св.=1)
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	60% (9)	F-Fisher sd p=0,033
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	16	93,75% (15)	
Частота клинической беременности (на цикл)			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	21,43% (9)	$\chi^2=0,64$ p=0,42
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	32% (15)	
Частота клинической беременности (на перенос эмбрионов)			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	21,43% (9)	$\chi^2=0,64$ p=0,42
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	32% (15)	
Частота невынашивания беременности до 10 недель			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	46,67% (7)	F-Fisher 2sdp=0,18
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	16	25% (4)	
Частота невынашивания беременности после 10 недель			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	–	
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	16	–	
Частота родов			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	19,05% (8)	χ^2 -Yates=0,1 p=0,75
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	24% (12)	
Частота неудачных попыток ЭКО (ЭКО/ИКСИ)			
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	80,95% (34)	χ^2 -Yates=0,1 p=0,75
Группа сравнения (АФА-ВВИГ-)	50	76% (38)	

Таким образом, анализ результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) показал значимо большую частоту ранних репродуктивных потерь у женщин с циркуляцией АФА по сравнению с женщинами с отсутствием АФА.

Отсутствие значимых различий в частоте имплантации у женщин с АФА, не получавших ВВИГ, по сравнению с женщинами без АФА может быть объяснено применением антитромботической терапии, назначенной с целью профилактики ТЭО в программе ЭКО. Результаты меньшей эффективности ВРТ у женщин с АФА, представленные в литературе, описаны для женщин, получавших в протоколах ЭКО только терапию, необходимую для проведения КСО. Применение НМГ,

нефракционированного гепарина и низких доз АСК ассоциировано с улучшением результативности ВРТ [97, 113]. Тем не менее, несмотря на антитромботическую терапию, у женщин с циркуляцией АФА наблюдалась большая частота ранних репродуктивных потерь.

3.4.2 Сравнение результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА, получавших ВВИГ и не получавших ВВИГ

С целью оценки эффективности применения ВВИГ был выполнен сравнительный анализ результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА, получавших его в дополнение к стандартной антитромботической терапии, по сравнению с женщинами с циркуляцией АФА, получавших только стандартную антитромботическую терапию. Учитывая, что на показатели результативности (ЭКО/ИКСИ) оказывает важное значение качество эмбрионов, при расчете данных показателей были исключены из анализа пациентки, которым переносили эмбрионы низкого качества. Результаты представлены в таблице 25.

Как видно из таблицы 25, частота наступления клинической беременности на проведенный цикл ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в группе женщин с АФА, получивших ВВИГ (основной группе А), составила 44,44%, что выше в 2 раза, по сравнению с женщинами с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ (основной группе Б), где клиническая беременность была зарегистрирована лишь у 21,43% женщин (χ^2 -Yates =5,04, p=0,025).

Таблица 25 – Сравнение результатов программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА, получавших ВВИГ и женщин с АФА, не получавших ВВИГ (исключены женщины, которым были перенесены эмбрионы неудовлетворительного качества)

Группа	n	отн., % (абс.)	Значение статистики, значение p
Частота регистрации положительного анализа на β ХГЧ (на цикл)			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	63	47,62% (30)	$\chi^2=1,46$, p=0,23
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	35,71% (15)	

Продолжение таблицы 25			
Группа	n	отн., % (абс.)	Значение статистики, значение p
Частота регистрации положительного анализа на β ХГЧ (на перенос эмбриона)			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	62	48,39% (30)	$\chi^2=1,64, p=0,2$
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	35,71% (15)	
Процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на β ХГЧ			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	30	93,33% (28)	χ^2 -Yates=5,42 p=0,019
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	60% (9)	
Частота клинической беременности (на цикл)			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	63	44,44% (28)	χ^2 -Yates=5,04 p=0,025
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	21,43% (9)	
Частота клинической беременности (на перенос эмбрионов)			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	62	45,16% (28)	χ^2 -Yates=5,31 p=0,021
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	21,43% (9)	
Частота невынашивания беременности до 10 недель			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	30	26,67% (8)	χ^2 -Yates=1,01 p=0,31
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	46,67% (7)	
Частота невынашивания после 10 недель			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	30	3,33% (1)	F-Fisher 2sd
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	15	–	
Частота родов			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	63	33,33% (21)	χ^2 -Yates=1,91 p=0,17
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	19,05% (8)	
Частота неудачных попыток ЭКО (ЭКО/ИКСИ)			
Основная группа А (АФА+ВВИГ+)	63	66,67% (42)	χ^2 -Yates=1,91 p=0,17
Основная группа Б (АФА+ВВИГ-)	42	80,95% (34)	

Значимые отличия также отмечены в частоте наступления клинической беременности на ПЭ (χ^2 -Yates=5,31, p=0,021). В группе женщин с циркуляцией АФА, получивших ВВИГ (основной группе А), клиническая беременность зарегистрирована у 28 из 62 женщин (45,16%), что достоверно выше, чем в группе женщин с АФА, не получавших ВВИГ (основной группе Б), где беременность

была зарегистрирована лишь у 21,43% женщин, то есть у 9 из 42 женщин (χ^2 -Yates=5,31, $p=0,021$).

Частота ранних репродуктивных потерь, определяемая по проценту регистрации клинической беременности от женщин с положительным β ХГЧ, также была значимо ниже у женщин с АФА, получивших ВВИГ (основная группа А), по сравнению с женщинами с АФА не получившими ВВИГ (основной группы Б) (93,33 и 60%, χ^2 -Yates=5,42, $p=0,019$).

В частоте имплантации как на цикл ЭКО, так и на ПЭ, достоверных различий также выявлено не было ($\chi^2=1,46$, $p=0,23$ и $\chi^2=1,64$, $p=0,2$, соответственно). Данные показатели для основной группы А составили 47,62% и 48,39%, для основной группы Б – 35,71% и 35,71%, соответственно.

Частота невынашивания беременности до 10 недель также значимо не различалась в данных группах, однако была ниже у женщин основной группы А, получивших ВВИГ, по сравнению с основной группой Б (26,66% и 46,66%, χ^2 -Yates=1,01 $p=0,31$). Отсутствие различий в частоте невынашивания может быть объяснено тем, что большая часть женщин из основной группы А получали ВВИГ только в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ). В исследованиях, посвященных применению ВВИГ у женщин с бесплодием применялись различные схемы и дозы введения ВВИГ, но в большинстве случаев введение иммуноглобулинов продолжалось после окончания протокола ЭКО [76, 118, 122].

Невынашивание после 10 недель наблюдалось в 1 случае в основной группе А. Прерывание беременности произошло в 20 недель в связи с антенатальной гибелью плода на фоне хронической плацентарной недостаточности.

Беременность закончилась родами у 21 из 63 женщин основной группы А (33,33%), у 8 из 42 женщин основной группы Б (19,05%) и у 12 из 50 женщин группы сравнения (24%). Достоверных различий в отношении данного показателя выявлено не было (χ^2 -Yates=1,91 $p=0,17$).

Таким образом, на основании анализа результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин обследуемых групп можно сделать вывод о том, что женщины с циркуляцией АФА имеют значимо большую частоту ранних

репродуктивных потерь (биохимических беременностей, не завершившихся регистрацией клинической беременности по УЗИ). В литературе имеются исследования, подтверждающие увеличение частоты выявления АФА среди женщин с положительным результатом на β ХГЧ, но с отсутствием подтверждения клинической беременности [74]. Причиной развития ранних потерь беременности при наличии АФА может быть нарушение процессов ангиогенеза [36, 94, 156] в эндометрии.

Применение иммунотерапии ВВИГ снижает процент ранних репродуктивных потерь у женщин с циркулирующей АФА и увеличивает частоту регистрации клинической беременности как в пересчете на цикл ЭКО, так и на ПЭ. В литературе имеются схожие данные об эффективности применения ВВИГ у женщин с циркулирующей АФА [155].

Учитывая выявленные различия в частоте регистрации клинической беременности у женщин сравниваемых групп выполнен расчет данного показателя в зависимости от наличия АФА. Результаты представлены на рисунке 28.

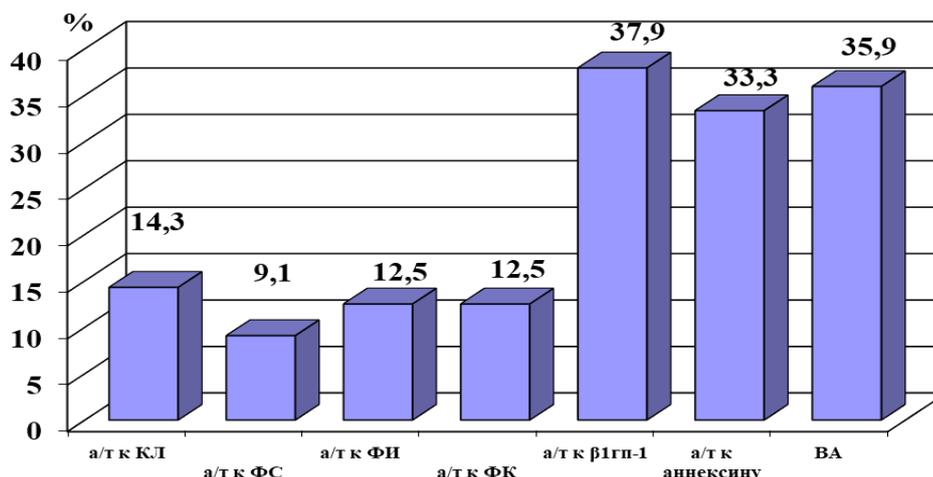


Рисунок 28 – Частота регистрации клинической беременности у женщин с циркулирующей АФА различных видов

Наименьшая частота регистрации клинической беременности наблюдалась у женщин с антителами к фосфатидилсерину (9,1%), фосфатидилинозитолу (12,5%), фосфатидиловой кислоте (12,5%) и кардиолипину (14,3%).

Показатели частоты клинической беременности при наличии других видов антител (антител к β 2-гликопротеину, аннексину, ВА) соотносились со средними значениями результативности протоколов ЭКО.

Полученные данные соотносятся с результатами, представленными в научной литературе. По данным исследователей, среди наиболее часто выявляемых у пациенток с многократными неудачами ЭКО можно назвать антитела к ФС [32, 33, 172], антитела к ФЭ [33, 35], антитела к ФИ [32, 172], антитела к КЛ [51, 105] и ВА [51, 172].

3.5 Анализ взаимосвязи между показателями системы гемостаза на разных этапах программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) с показателями результативности у обследованных пациенток

Учитывая, что высокие частоты ранних репродуктивных потерь у пациенток данного исследования могли быть связаны с антифосфолипидными аутоантителами, оказывающими выраженное влияние на систему гемостаза, мы выполнили анализ взаимосвязи между исходами протокола и показателями коагулограммы, значимо отличавшиеся на протяжении программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

На частоту КБ оказали влияние концентрация фибриногена и уровень ВА, что проиллюстрировано на рисунках 29-30.

В группе женщин, получавших ВВИГ содержание фибриногена на этапе после ПЭ было значимо ниже, по сравнению с женщинами, не получившими ВВИГ, что описано в таблице 21 ($3,61 \pm 0,6$ и $4,24 \pm 0,86$, $p=0,008$). Влияние концентрации фибриногена на исход протокола представлено на рисунке 29.

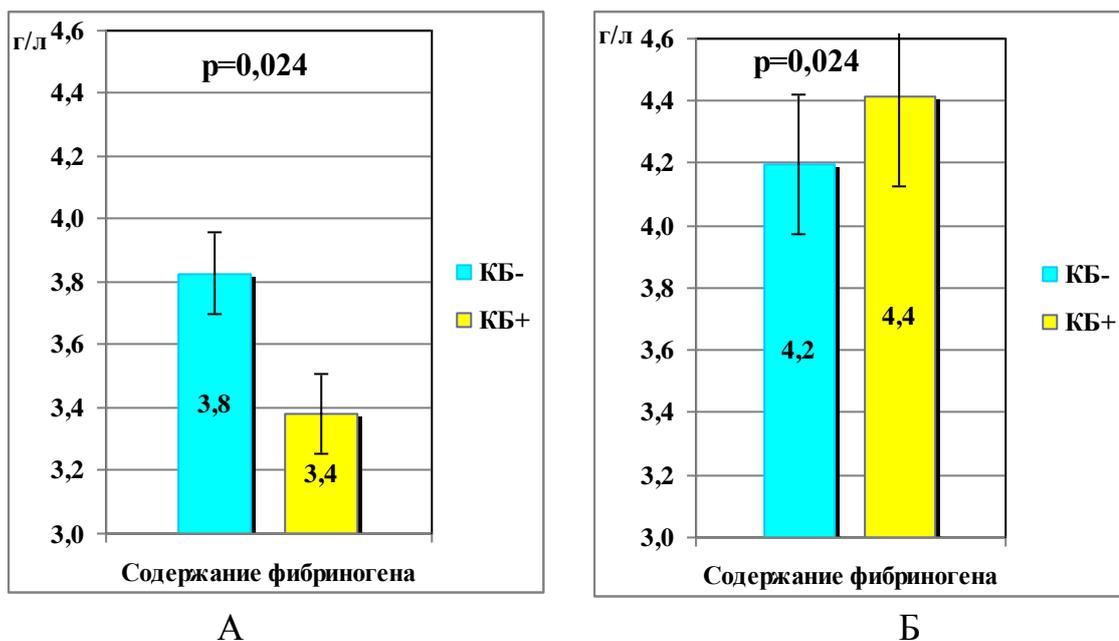


Рисунок 29 – Влияние содержания фибриногена, определенного после ПЭ на регистрацию клинической беременности. А – у женщин с АФА, получивших ВВИГ, Б – у женщин с АФА, не получивших ВВИГ

Влияние концентрации фибриногена на частоту наступления клинической беременности было показано в группе женщин, получивших ВВИГ. У женщин с подтвержденной клинической беременностью уровень фибриногена был достоверно ниже, чем у тех, у кого она не была подтверждена ($3,38 \pm 0,51$ и $3,82 \pm 0,6$, $p=0,02$).

Уровень волчаночного антикоагулянта на 4-5 день после переноса был значимо ниже в группе женщин, получивших ВВИГ, по сравнению с женщинами с АФА не получившими ВВИГ ($1,24 \pm 0,03$ и $1,35 \pm 0,04$, $p=0,03$). Влияние ВА на частоту подтверждения клинической беременности представлен на рисунке 30.

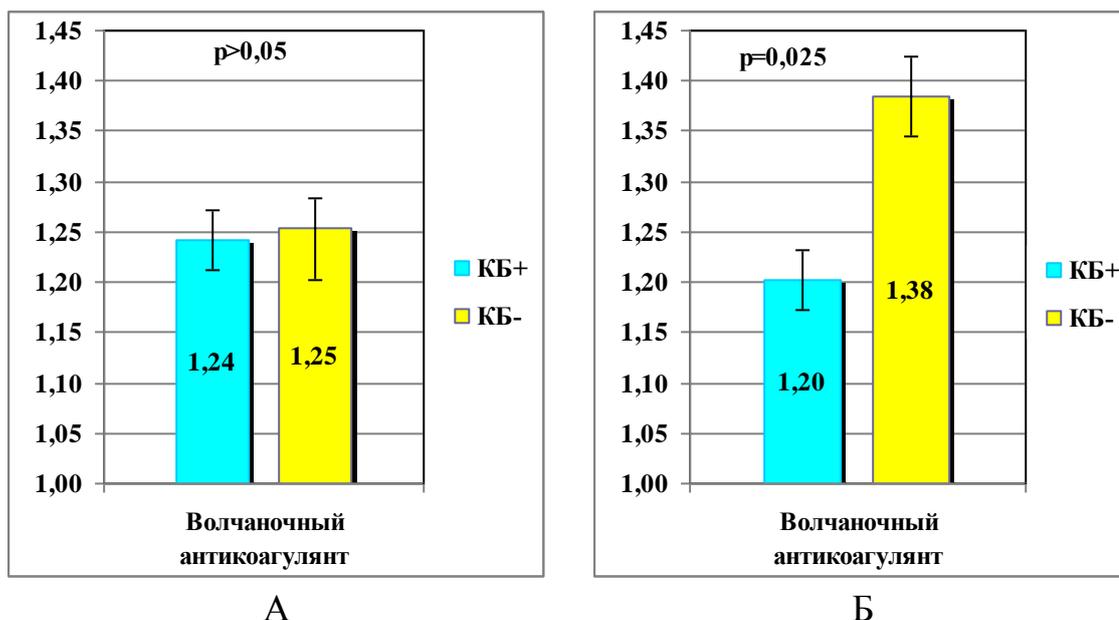


Рисунок 30 – Влияние уровня ВА после ПЭ на регистрацию КБ: А – у женщин с АФА, получивших ВВИГ, Б – у женщин с АФА, не получивших ВВИГ

У женщин, получивших ВВИГ отсутствует влияние ВА на результат протокола. У женщин, не получивших ВВИГ благоприятный исход протокола в виде регистрации клинической беременности отмечен у женщин с меньшим содержанием ВА ($1,20 \pm 0,06$ и $1,38 \pm 0,14$, $p = 0,023$). По результатам данного исследования, описанным выше, ВА имел множественную корреляционную взаимосвязь как с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов, так и показателей системы гемостаза, что объясняет его негативную роль в отношении исходов ЭКО. Отсутствие влияния ВА на исход протокола ЭКО у женщин, получивших ВВИГ говорит о протективном эффекте препарата в отношении негативного воздействия ВА на иммунную систему и гемостаз.

3.6 Сравнение качественных показателей развития эмбрионов

На эмбриологическом этапе программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) оценивали развитие эмбрионов со 2 по 4 день культивирования. Для каждого дня определялось общее количество эмбрионов и доля эмбрионов хорошего качества, выраженная в %.

3.6.1 Сравнение показателей развития эмбрионов среди пациенток всех обследованных групп

Ввиду того, что на качественные показатели развития эмбрионов могло оказать применение ВВИГ был выполнен сравнительный анализ качественных показателей эмбрионального развития для всех обследованных женщин.

При оценке эмбрионального развития на 2 сутки из анализа исключили две пациентки по причине отсутствия дробления зигот; одна пациентка из контрольной группы была исключена по причине отсутствия у нее ооцитов при ТВП фолликулов. Оценку эмбрионов на 2 сутки после оплодотворения проводили у 75 из 77 женщин основной группы А, у всех женщин основной группы Б и у 62 из 63 женщин группы сравнения. Как видно из результатов таблицы 27, женщины обследованных групп были сопоставимы по количеству эмбрионов и их качеству на 2 день культивирования.

Отсутствие развития эмбрионов на 3 сутки наблюдали у трех женщин из группы сравнения. Оценку развития эмбрионального развития проводили у 75 из 77 женщин основной группы А, у 51 из 51 женщин основной группы Б и у 59 из 63 женщин группы сравнения. У пациенток с наличием антифосфолипидных антител и получавших ВВИГ количество и доля эмбрионов хорошего качества на 3 день после оплодотворения были сопоставимы с этими показателями у женщин с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ и женщин без АФА из группы сравнения.

Развитие эмбрионов на 4 день культивирования оценивали у 62 женщин основной группы А, у 42 женщин из основной группы Б и у 52 женщин из группы сравнения в связи с тем, что некоторым пациенткам ПЭ был проведен на 3 сутки после оплодотворения.

Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Характеристика показателей развития эмбрионов на 2-4 сутки культивирования у пациенток обследованных групп

Параметр	Основная группа А (АФА+ВВИГ+) n=77			Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) n=51			Группа сравнения (АФА-ВВИГ-) n=63			Значение статистики, значение p
	М	ДИ95 %	б	М	ДИ95 %	б	М	ДИ95 %	б	
2 день после оплодотворения*										
Кол-во эмбрионов	5,1	3,98- 6,2	0,55	4,62	3,54- 5,71	0,54	4,47	3,55- 5,4	0,46	H=0,21 p=0,9
Доля эмбрионов хорошего качества, %	72,1	65,4- 78,8	3,4	70,24	60,3- 80,2	4,95	70,33	61,5- 79,1	4,38	H=0,64 p=0,72
3 день после оплодотворения**										
Кол-во эмбрионов	5	4-5,9	0,5	4,47	3,46- 5,47	0,5	4,61	3,8- 5,41	0,4	H=0,39 p=0,82
Доля эмбрионов хорошего качества, %	71,4	64- 78,8	3,72	70,78	60,5- 81	5,12	81,07	73,8- 88,3	3,61	H=4,58 p=0,1
4 день после оплодотворения										
Кол-во эмбрионов	5,09	3,74- 6,4	0,67	4,09	3,08- 5,1	0,5	4,25	3,35- 5,14	0,45	H=0,3 p=0,86
Доля эмбрионов хорошего качества, %	53,19	44,67- 61,7	4,27	55,5	41,36- 69,7	7,01	62,9	55,2- 70,49	3,79	H=2,3 p=0,31

Примечание: * – для 75 из 77 женщин 1 группы, 51 из 51 пациенток 2 группы, и 61 из 62 женщин 3 группы; ** – для 75/77, 51/51 и 59/62 больных, соответственно; *** – для 62/77, 42/51 и 52/62 пациенток, соответственно (объяснение в тексте)

Как видно, из таблицы 26, доля эмбрионов хорошего качества и их количество не отличалась между пациентками обследованных групп. Таким образом, пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по данным показателям.

3.6.2 Сравнение показателей развития эмбрионов у женщин с наличием и отсутствием АФА

Для оценки влияния АФА на рост и развитие эмбрионов обследуемых женщин было выполнено сравнение данных показателей у женщин с наличием и отсутствием АФА, что представлено в таблице 27.

Таблица 27 – Характеристика показателей развития эмбрионов на 2-4 сутки культивирования у женщин с наличием и отсутствием АФА

Параметр	АФА+ (n=128)			АФА- (n=63)			Значение статистики, значение p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
2 день после оплодотворения*							
Кол-во эмбрионов	4,9	4,1-5,69	0,39	4,47	3,54-5,4	0,46	U=3805 p=0,84
Доля эмбрионов хорошего качества, %	71,36	65,78-76,94	2,82	70,3	61,5-79,1	4,38	U=3709 p=0,64
3 день после оплодотворения**							
Кол-во эмбрионов	4,8	4,1-5,5	0,36	4,61	3,8-5,4	0,4	U=3607 p=0,68
Доля эмбрионов хорошего качества, %	71,17	65,2-77,12	3,02	81,1	73,8-88,32	3,62	U=2926 p=0,016
4 день после оплодотворения***							
Кол-во эмбрионов	4,69	3,79-5,58	0,45	4,25	3,35-5,15	0,45	U=2660 p=0,87
Доля эмбрионов хорошего качества, %	54,1	46,7-61,5	3,73	62,9	55,3-70,5	3,8	U=2533 p=0,13

Примечание: Данные рассчитаны:

* – для 126 женщин для АФА+ женщин, и 61 из 62 АФА- женщин; ** – для 126/128 и 59/62 пациенток, соответственно; *** – для 104/128 и 52/62 пациенток, соответственно

При анализе показателей развития эмбрионов (ЭКО/ИКСИ) в обследуемых группах, представленном в таблице 26, не было выявлено значимых различий. Однако при увеличении выборки за счет объединения женщин с АФА получавших и не получавших ВВИГ в одну группу было выявлено значимое различие в доле эмбрионов хорошего качества на 3 день после оплодотворения. У женщин с циркуляцией АФА данный показатель значимо меньше, по сравнению с женщинами без АФА ($71,17 \pm 3,02$ и $81,1 \pm 3,62$, $p=0,016$). На 4 день после оплодотворения значимых различий выявлено не было ($54,1 \pm 3,73$ и $62,9 \pm 3,8$, $p=0,13$).

Полученные различия на 3 день культивации эмбрионов могут говорить о возможном негативном влиянии АФА на развитие эмбриона, что описано в научной литературе [31, 124], однако отсутствие различий на 4 день после оплодотворения говорит о необходимости дальнейших исследований с

увеличением количества пациенток для оценки взаимосвязи между темпами развития и качеством эмбрионов и циркуляцией АФА.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лечебно-диагностическая тактика ведения пациенток-носительниц антифосфолипидных антител, планирующих применение методов вспомогательных репродуктивных технологий, является весьма актуальной и пока еще далекой от разрешения проблемой как с точки зрения эффективности ЭКО, так и с точки зрения тромбоэмболических осложнений.

В репродуктивном периоде наиболее часто выявление АФС происходит при развитии акушерской патологии. У женщин с бесплодием, особенно с первичным, стойкая циркуляция АФА не может быть расценена как АФС ввиду отсутствия акушерского анамнеза, наиболее часто указывающего на наличие этой патологии в данный возрастной период. По данным литературы, вероятность прерывания беременности после ЭКО у женщин с циркуляцией АФА значимо выше по сравнению с женщинами без АФА [50, 105, 115]. При выявлении АФА в данной группе пациенток, может происходить недооценка рисков развития невынашивания беременности и акушерских осложнений при беременности, наступившей часто после многократных попыток ЭКО, что приводит к глубочайшим психологическим травмам и, в конечном итоге, отсутствию детей в семейных парах.

Женщины с бесплодием и циркуляцией АФА могут попадать в группу риска тромбоэмболических осложнений на фоне контролируемой стимуляции овуляции в протоколах ЭКО, сопровождающихся супрафизиологическим подъемом уровня эстрогенов и значимыми гиперкоагуляционными изменениями [109, 165]. Отсутствие у них акушерского анамнеза ввиду бесплодия не позволяет установить диагноз АФС и полноценно оценить их риски тромбоэмболических осложнений как при применении вспомогательных репродуктивных технологий, так и при беременности.

Кроме того, наличие АФА может быть ассоциировано с более частыми неудачами применения вспомогательных репродуктивных технологий, по сравнению с женщинами, не имеющими АФА. По данным литературы, частота выявления АФА у женщин с многократными неудачами ЭКО достигает от 8% до

42,1% [2, 7, 18, 35]. Обнаружение 1 или более видов АФА приводит к трехкратному увеличению риска неудач ЭКО [124].

Нарушение имплантации и ранних репродуктивных потерь беременности при наличии АФА может быть следствием нарушения процессов ангиогенеза [36, 94, 156] в эндометрии и негативного влияния АФА на развитие эмбриона [31, 124]. АФА могут оказывать неблагоприятное влияние на созревание ооцита, находясь в фолликулярной жидкости [100]. Во время имплантации эмбрион контактирует с межклеточной жидкостью эндометрия, где также содержатся АФА, которые могут оказывать неблагоприятное влияние на данный процесс. Кроме того, контролируемая стимуляция овуляции в протоколе ЭКО приводит к увеличению титра АФА в сыворотке крови [34, 169]. Применение правильной патогенетической терапии у женщин с АФА может повлиять на эффективность методов вспомогательных репродуктивных технологий.

Перспективным с точки зрения улучшения результативности, является применение иммуноглобулинов для внутривенного введения в протоколе ЭКО. Добавление иммуноглобулинов для внутривенного введения к терапии низкомолекулярными гепаринами и низкими дозами ацетилсалициловой кислоты у женщин с наличием АФА приводило к увеличению эффективности ЭКО в 2 раза, по сравнению с группой женщин без АФА, получавших такую же терапию [26].

В целом, анализ данных научной литературы показал возрастание интереса ученых к исследованию механизмов нарушения имплантации в свете развития иммунопатологических сдвигов в организме при наличии АФА. Ряд ученых выдвинули теории о схожести механизмов раннего прерывания беременности (биохимических беременностях, прервавшихся до подтверждения беременности по данным УЗИ) с привычным невынашиванием беременности, связывая это с наличием АФА [28, 35, 40, 63, 74, 113]. Важность исследований в этом направлении обусловлена необходимостью выработки единой концепции для создания патогенетически обоснованной профилактики повторных неудач

имплантации, ранних потерь беременности и невынашивания беременности у женщин с бесплодием и наличием АФА.

В связи с этим целью нашей работы было изучение роли циркуляции АФА в формировании неблагоприятных результатов ВРТ и изучение эффективности применения в протоколе ЭКО иммуноглобулинов для внутривенного введения с целью их профилактики.

Изучение клинико-анамнестических данных обследованных женщин выявило высокую частоту многократных неудач ЭКО (ЭКО/ИКСИ) (36,7%) и невынашивания беременности (32,8%) у женщин с бесплодием и циркулирующей АФА. В научной литературе указывается, что частота прерывания беременности у женщин с АФА после проведения ЭКО в 2 раза выше, по сравнению с женщинами без АФА [50, 105, 115].

При оценке влияния АФА на показатели результативности программы ЭКО (ЭКО/ИКСИ) было выявлено, что наименьшая частота регистрации клинической беременности наблюдалась у женщин с антителами к фосфатидилсерину (9,1%), фосфатидилинозитолу (12,5%), фосфатидиловой кислоте (12,5%) и кардиолипину (14,3%).

Полученные данные соотносятся с литературными данными. Антитела к фосфатидилсерину явились наиболее часто выявляемым видом антител у пациенток с многократными неудачами ЭКО [32, 33, 172]. Другими исследователями наиболее неблагоприятными АФА признаны антитела к фосфатидилэтаноламину [33, 35], антитела к фосфатидилинозитолу [32, 172], антитела к кардиолипину [51, 105] и волчаночный антикоагулянт [51, 172].

Проведение корреляционного анализа показало наличие сильной прямой взаимосвязи между антителами к кардиолипину с неконвенциональными антителами (к фосфатидилсерину ($R=0,77$), фосфатидилинозитолу ($R=0,77$), фосфатидиловой кислоте ($R=0,76$)). Обнаружены умеренные корреляционные связи между антителами к $\beta 2$ гликопротеину-1 и фосфатидиловой кислоте ($R=0,67$), антителами к фосфатидилсерину ($R=0,69$). Данные результаты могут

указывать на важность изучения роли неконвенциональных антител в развитии акушерской патологии.

Следующим этапом было выполнение сравнительной оценки иммунологических параметров для женщин с бесплодием и отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА) и здоровых небеременных женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом. Были выявлены множественные различия в показателях субпопуляционного состава лимфоцитов, содержании Т-регуляторных клеток, индуцированной активности НК-клеток. Наибольший интерес в группе женщин с ОАГА представляли женщины с циркуляцией АФА, где были выявлены наиболее важные различия в иммунологических параметрах. Обнаружено, что у женщин с АФА значимо ниже показатели абсолютного ($0,008 (0,006; 0,013)$ и $0,014(0,01; 0,025)$, $U=293$, $p<0,001$) и относительного ($4,83\pm 1,63$ и $5,89\pm 1,46$, $t=-2,78$, $p=0,007$) содержания Т-регуляторных лимфоцитов, по сравнению со здоровыми женщинами.

Т-регуляторные клетки – центральные регуляторы иммунного ответа. Основная их функция – контролировать силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторных клеток (Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов) [162]. Т-регуляторные клетки могут выполнять важную роль в индукции толерантности к аллоантигенам плода и в ограничении интенсивности иммунного ответа [16, 101, 166]. В литературе обсуждается роль Т-регуляторных клеток в развитии бесплодия неясного генеза, невынашивания и преэклампсии [166, 171]. На экспериментальных моделях на мышах показано, что искусственное снижение уровня Т-регуляторных лимфоцитов приводит к нарушению имплантации эмбрионов [132]. Таким образом, имеются основания для предположения о важнейшей патогенетической роли этих клеток в развитии как ранних репродуктивных потерь, так и невынашивания беременности при АФС.

Одним из наиболее значимых различий у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА в сравнении со здоровыми женщинами явилось значимо большее относительное содержание В-лимфоцитов CD19+ ($11,6 (9,7; 13,78)$ и $9,85$

(8,43; 11,78), $p=0,029$), соответственно. В-лимфоциты – функциональный тип лимфоцитов, играющих важную роль в обеспечении гуморального иммунитета [21]. Аномальная активность В-лимфоцитов, сопровождающаяся выработкой аутоиммунных антител, может быть причиной аутоиммунных и аллергических заболеваний. В нашем исследовании более высокий уровень В-лимфоцитов CD19+ может отражать присутствие аутоиммунного процесса.

Кроме того, у женщин с циркулирующей АФА установлено снижение абсолютного содержания НК-клеток и НКТ-клеток относительно группы здоровых женщин. Мы предполагаем, что снижение количества НК-клеток в периферической крови может быть следствием их перераспределения в сторону эндометрия, где они и могут оказывать цитотоксический эффект.

Сравнение иммунологических параметров у сопоставимых по анамнезу женщин с наличием и отсутствием АФА выявило различия в отношении содержания В-лимфоцитов CD19+. У женщин с циркулирующей АФА было значимо выше относительное (11,6 (9,7; 13,78) и 9,78 (7,74; 12,7), $p=0,013$) и абсолютное содержание В-лимфоцитов CD19+ ($0,21\pm 0,11$ и $0,16\pm 0,06$, $p=0,021$), по отношению с женщинами без АФА, что может говорить об увеличении активности гуморального иммунитета у женщин с АФА.

Таким образом, обследованные женщины с АФА имели значимые различия в субпопуляционном составе лимфоцитов не только по сравнению со здоровыми женщинами без репродуктивной патологии, но и с сопоставимыми по анамнезу женщинами без АФА и с бесплодием, что подтверждает значимость влияния АФА на показатели иммунного статуса пациенток и может объяснять причину различий в результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Корреляционный анализ показал тенденцию к взаимосвязи В-лимфоцитов (CD19+) в относительном и в абсолютном содержании с уровнем волчаночного антикоагулянта ($r=0,34$ и $r=0,39$, соответственно). Женщины с АФА отличались большим содержанием В-лимфоцитов CD19+ по отношению к здоровым женщинам и по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами с

бесплодием без АФА, что может указывать на патогенетическую взаимосвязь данных показателей.

Обнаружены тенденции к взаимосвязи между другими показателями субпопуляционного состава лимфоцитов и уровнем антифосфолипидных антител. Относительное содержание Т-хелперов CD3+CD4+ имело обратную корреляционную связь с титром волчаночного антикоагулянта ($r=-0,34$). Абсолютное содержание CD3+ лимфоцитов имело обратную корреляционную взаимосвязь с содержанием аннексина-V ($r=-0,39$). Относительное содержание CD3+лимфоцитов имело обратную корреляционную взаимосвязь с уровнем волчаночного антикоагулянта ($r=-0,3$).

Следующим этапом было проведение оценки значимости различий в показателях системы гемостаза в динамике на протяжении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) между сравниваемыми группами (на 1-3 день, 10-14 день контролируемой стимуляции овуляции и на 4-5 день после переноса эмбрионов в полость матки).

На этапе начала протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА был значимо меньший показатель протромбинового индекса по Квику ($101,4 \pm 1,54$ и $109,12 \pm 1,12$, $p=0,004$), тромбинового времени ($15,5 \pm 0,13$ и $16,19 \pm 1,42$, $p=0,036$) и значимо выше содержание фибриногена ($3,38 \pm 0,08$ и $3,13 \pm 0,55$, $p=0,04$), по сравнению с женщинами без АФА. На завершающем этапе контролируемой стимуляции овуляции (10-14 день протокола) наблюдалось большее содержание АТ-III, по сравнению с женщинами без АФА ($92,8 \pm 14,32$ и $82,7 \pm 23,5$, $p=0,019$), что может быть объяснено применением низкомолекулярных гепаринов у женщин с АФА с начала протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ). После переноса эмбрионов в полость матки женщины с АФА имели похожие различия с началом протокола (ЭКО/ИКСИ) и имели значимо меньший показатель протромбинового индекса по Квику ($104,26 \pm 15,54$ и $109,97 \pm 16,1$, $p=0,027$) и тромбинового времени ($14,89 \pm 1,5$ и $15,61 \pm 1,35$, $p=0,05$) по сравнению с женщинами без АФА. Как и на завершающем этапе стимуляции у женщин с АФА также было выявлено значимо

большее содержание АТ-III ($99,4 \pm 14,7$ и $82,77 \pm 23,57$, $p=0,05$), что также объясняется приемом НМГ с начала КСО.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что у пациенток с наличием АФА по сравнению с женщинами без АФА были выявлены значимые различия в показателях системы гемостаза, однако на фоне проводимой терапии значения показателей коагулограммы находились в пределах допустимых значений и не представляли угрозу развития тромбоэмболических осложнений.

При оценке общей динамики показателей системы гемостаза в протоколе ЭКО наблюдались изменения, сопровождающиеся нарастанием коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активацией внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшением активности антикоагулянтной системы (снижение содержания естественного антикоагулянта – АТ-III).

Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов [81, 109, 110], что способствует развитию гиперкоагуляции и может привести к артериальным и венозным тромбозам. По данным различных авторов [81, 95, 135, 145, 165], при исследовании отдельных факторов свертывания на этапе стимуляции овуляции отмечается достоверное увеличение в плазме крови коагуляционного потенциала: фактора Виллебранда, фактора VIII, фактора V, фибриногена наряду с уменьшением активности антикоагулянтной системы: снижение уровня АТ-III, протеинов С и S. Во время проведения стимуляции овуляции у женщин без тромбофилии отмечается увеличение общего гемостатического потенциала до 32% и увеличения общего коагуляционного потенциала до 27% [81].

Все исследуемые показатели, кроме ПТИ и АПТВ имели значимую динамику различий на протяжении программы ЭКО(ЭКО/ИКСИ), однако отсутствовала внутригрупповая динамика, то есть независимо от наличия или отсутствия АФА и получаемой ими терапии, у всех женщин наблюдались одинаковая динамика изменений в системе гемостаза на стимуляцию в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ). Таким образом, можно сделать вывод о том, что на фоне

применения низких доз ацетилсалициловой кислоты и профилактических доз низкомолекулярных гепаринов у женщин с наличием и отсутствием АФА показатели гемостаза в динамике отражали общую тенденцию к увеличению коагуляционного потенциала и уменьшения активности антикоагулянтной системы.

С целью оценки влияния АФА на результаты программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) был выполнен сравнительный анализ показателей результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ и женщинами без АФА сопоставимыми акушерско-гинекологическому и соматическому анамнезу.

У женщин с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ (основная группа Б, n=51) был достоверно ниже процент регистрации клинической беременности среди женщин с положительным результатом анализа на β ХГЧ по сравнению с женщинами без АФА (группа сравнения, n=63), (60% и 93,75%, $p=0,033$). В показателях результативности программ ЭКО других различий выявлено не было. Таким образом, по результатам нашего исследования, не было выявлено различий в отношении частоты имплантации, но было выявлено достоверное увеличение ранних репродуктивных потерь, что может говорить о негативном влиянии АФА на самые начальные этапы инвазии эмбриона.

Данные результаты имеют подтверждение в научной литературе. В работе американского исследователя Coulam С.В. подтверждается высокая частота выявления АФА среди женщин с биохимическими беременностями, прервавшимися до регистрации клинической беременности. При этом частота выявления антинуклеарных антител, повышения активности НК-клеток и циркулирующих эмбриотоксинов была сопоставима. Автор связывает прерывание биохимических беременностей с дефектом ангиогенеза [74].

Отсутствие различий в частоте имплантации у женщин с АФА, о чем многократно упоминается в международной литературе [124], может быть объяснено тем, что все пациентки с АФА получали противотромботическую терапию НМГ и низкими дозами ацетилсалициловой кислоты для профилактики тромбоэмболических осложнений, что могло повлиять на данный результат. В

мировой литературе более низкая частота имплантации у пациенток с АФА указывается при отсутствии терапии любыми препаратами, кроме необходимых для проведения программы ЭКО.

Следующим этапом было проведение оценки эффективности ВВИГ в сочетании с антитромботической терапией у женщин с циркуляцией АФА в отношении результативности программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в сравнении с женщинами с АФА сопоставимым по акушерско-гинекологическому и соматическому анамнезу, но получавшими только антитромботическую терапию.

Частота ранних репродуктивных потерь, определяемая по отсутствию клинической беременности у женщин с положительным β ХГЧ, была значимо ниже у женщин с АФА, получивших ВВИГ, по сравнению с женщинами с АФА без ВВИГ ($93,33 \pm 62,5\%$, $p=0,019$).

Частота клинической беременности была значимо выше у женщин, получавших ВВИГ, по сравнению с женщинами, не получавшими ВВИГ (37,66% и 19,61%, $p=0,03$ (на цикл), и 42,65% и 20,41%, $p=0,012$ (на ПЭ)).

Отсутствие существенных различий в регистрации биохимических беременностей при явной тенденции к увеличению частоты клинической беременности может подтверждать наше предположение о цитопротективном эффекте ВВИГ в отношении трофобласта, защищающем его от токсического действия АФА.

В частоте имплантации значимых различий выявлено не было.

Частота невынашивания беременности до 10 недель была на 20% ниже у женщин основной группы А, получивших ВВИГ, по сравнению с основной группой Б, однако не была статистически значима. Частота родов была выше в основной группе А на 14%, по сравнению с основной группой Б, однако различия были также статистически незначимы.

Отсутствие различий в частоте невынашивания и частоте родов может быть объяснено тем, что большая часть женщин из основной группы А получали ВВИГ только в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ). В исследованиях, посвященных применению ВВИГ у женщин с бесплодием применялись различные схемы и

дозы введения ВВИГ, но в большинстве случаев введение иммуноглобулинов продолжалось после окончания протокола ЭКО. В исследовании М. Moragu вводили 400 мг/кг перед переносом эмбрионов и через 15 дней после переноса, затем каждые 3 недели до 13 недель беременности [122]. В работе Michael R. Virgo ВВИГ вводили сразу после переноса эмбриона в дозе 400 мг/кг. И при повышении активности НК-клеток при наступлении беременности вводили по 25 г в 1 триместре беременности [118]. В другом исследовании до переноса вводили 500 мг/кг и затем при положительном ХГЧ продолжали терапию ежемесячно по 500 мг/кг до 28 недель беременности [76].

В данном исследовании среди женщин, получивших ВВИГ в протоколе ЭКО, продолжили его применение в I триместре беременности 18 женщин. Второй курс ВВИГ начинался при регистрации плодного яйца по данным УЗИ и проводился в курсовой дозе 300 мл (15 г): по 100 мл (5 г) внутривенно капельно 1 раз в 5-7 дней трижды. Среди женщин, получивших ВВИГ в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) и I триместре беременности, частота родов составила 83,3% (15/18), что было на 33,3% больше ($p > 0,05$) по сравнению с женщинами, получившими ВВИГ только в протоколе ЭКО – 50% (6/12). Необходимы дальнейшие исследования для определения эффективности продолжения терапии ВВИГ при беременности.

Таким образом, применение иммунотерапии ВВИГ снижает частоту ранних репродуктивных потерь до уровня группы сравнения и увеличивает частоту регистрации клинической беременности.

Возможным объяснением эффективности ВВИГ в отношении частоты наступления клинической беременности может быть положительное влияние на баланс иммунокомпетентных клеток, что описано группой авторов под руководством С.А. Селькова [4, 5, 13]. В выполненном ими исследовании проводилось изучение изменений иммунного статуса до и после применения ВВИГ у беременных женщин с АФС и невынашиванием в анамнезе. Перед применением ВВИГ женщины из основной и группы сравнения не различались по лабораторным параметрам. После инфузии ВВИГ было отмечено возрастание

уровня Treg, снижение уровня CD19+, снижение уровня CD3+-CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, возрастание уровня NK-клеток и возрастание уровня активированных NK-клеток CD16+CD56+CD107a, при этом не было выявлено побочных эффектов и ТЭО [13]. Увеличение уровня Treg после инфузии ВВИГ подтверждено группой исследователей под руководством Ahmadi M. [152].

Учитывая, что в данном исследовании женщины с циркуляцией АФА имели значимо ниже уровень Т-регуляторных клеток, выше уровень В-лимфоцитов CD19+ и ниже значение содержания NK-клеток относительно контрольной группы здоровых женщин без репродуктивной патологии, описанные вышеупомянутыми исследователями данные могут объяснить благоприятное влияние ВВИГ на частоту регистрации клинической беременности.

Анализ факторов, оказавших влияние на исходы протоколов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) показал, что значимое влияние на частоту клинической беременности оказывал ВА и концентрация фибриногена, определенные на этапе после ПЭ в полость матки.

Уровень волчаночного антикоагулянта на 4-5 день после переноса был значимо ниже в группе женщин, получивших ВВИГ, по сравнению с женщинами с АФА не получившими ВВИГ ($1,24 \pm 0,03$ и $1,35 \pm 0,04$, $p=0,03$). У женщин, получивших ВВИГ отсутствует влияние уровня ВА на результат протокола. У женщин, не получивших ВВИГ благоприятный исход протокола в виде регистрации клинической беременности отмечен у пациенток с меньшим содержанием ВА ($1,20 \pm 0,06$ и $1,38 \pm 0,14$, $p=0,023$). По результатам данного исследования, описанным выше, ВА имел корреляционные взаимосвязи с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов, что может указывать на его негативную патогенетическую роль в отношении исходов ЭКО. Отсутствие влияния ВА на исход протокола ЭКО у женщин, получивших ВВИГ говорит о возможном протективном эффекте препарата в отношении негативного воздействия ВА на иммунную систему.

В группе женщин, получавших ВВИГ, содержание фибриногена на этапе после ПЭ было значимо ниже, по сравнению с женщинами, не получившими

ВВИГ ($3,61 \pm 0,6$ и $4,24 \pm 0,86$, $p=0,008$). Влияние концентрации фибриногена на частоту клинической беременности было выявлено в группе женщин, получивших ВВИГ. У женщин с клинической беременностью уровень фибриногена был достоверно ниже, чем у тех, у кого беременность не наступила ($3,38 \pm 0,51$ и $3,82 \pm 0,6$, $p=0,02$).

Фибриноген является не только I фактором свертывания крови, но и белком острой фазы воспаления. Концентрация фибриногена может резко возрастать при любом состоянии, вызванном воспалительными процессами или повреждениями тканей, что может наблюдаться в процессе стимуляции овуляции в программе ЭКО. Более низкие значения фибриногена у женщин с АФА, получивших ВВИГ могут говорить о протективном влиянии препарата в отношении воздействия супрафизиологического повышения уровня эстрогенов на гемостаз.

Анализ прямой взаимосвязи между уровнем АФА и показателями субпопуляционного состава лимфоцитов с результативностью программ ВРТ не выявил значимых ассоциаций. Отсутствие данной взаимосвязи может быть следствием того, что показатели эффективности протокола ЭКО – это результат многофакторного влияния различных воздействий, в условии ограниченной выборки пациенток и широком физиологическом разбросе изучаемых параметров возможно снижение значимости данных показателей.

Одной из причин ранних репродуктивных потерь у женщин с циркуляцией АФА может быть нарушение морфологии и качества эмбрионов, описанное в научной литературе [31, 124]. Анализ показателей развития эмбрионов (ЭКО/ИКСИ) среди женщин с наличием и отсутствием АФА показал значимо меньшую долю эмбрионов хорошего качества на 3 день после оплодотворения при наличии АФА по сравнению с женщинами без АФА ($71,17 \pm 3,02$ и $81,1 \pm 3,62$, $p=0,016$). На 4 день после оплодотворения значимых различий выявлено не было ($54,1 \pm 3,73$ и $62,9 \pm 3,8$, $p=0,13$).

Полученные различия на 3 день культивации эмбрионов могут говорить о возможном негативном влиянии АФА на развитие эмбриона, однако отсутствие различий на 4 день после оплодотворения говорит о необходимости дальнейших

исследований для оценки взаимосвязи между темпами развития и качеством эмбрионов, и циркуляцией АФА.

Обобщая вышеизложенные данные можно сделать вывод о том, что циркуляция антифосфолипидных антител у женщин с бесплодием, выполняющих протокол ЭКО (ЭКО/ИКСИ) ассоциирована с риском развития репродуктивных потерь. Причиной появления АФА является нарушение работы регуляторного звена иммунной системы, что проявилось меньшим содержанием Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с АФА, по сравнению со здоровыми женщинами. Кроме того, женщины с АФА характеризовались большим содержанием В-лимфоцитов CD19+, снижением абсолютного содержания НК-клеток и НКТ-клеток, а также наличием корреляционных взаимосвязей между содержанием АФА и иммунологическими показателями.

Местом приложения негативного влияния АФА может быть нарушение процессов ангиогенеза в эндометрии и негативное влияние на морфологию эмбриона, что подтверждается меньшим процентов эмбрионов хорошего качества у женщин с АФА на 3 день культивации эмбрионов.

Наличие общей динамики изменений показателей системы гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) без существенных внутригрупповых различий и корреляционных взаимосвязей между содержанием АФА и показателями системы гемостаза указывает на то, что негативное влияние АФА на результативность лечения бесплодия реализуется прежде всего опосредованно через иммунную систему, в связи с чем наиболее перспективным с точки зрения терапии является применение иммуномодулирующей терапии.

Применение ВВИГ у женщин с наличием АФА показало свою клиническую эффективность в отношении увеличения частоты регистрации клинической беременности, что может быть объяснено положительным влиянием ВВИГ на баланс иммунокомпетентных клеток, прежде всего на регуляторное звено иммунной системы.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что АФА является “маркером” иммунологических нарушений, приводящих к нарушению реализации репродуктивной функции, но, вероятно, есть и прямое действие АФА. Применение иммуномодулирующей терапии может улучшать результаты лечения бесплодия в данной группе женщин.

ВЫВОДЫ

1. Женщины с бесплодием и циркуляцией АФА характеризуются высокой частотой многократных неудач ЭКО (ЭКО/ИКСИ) (36,7%) и невынашивания беременности в анамнезе (32,8%); у каждой десятой пациентки установлено бесплодие неясной этиологии.

2. Циркуляция АФА у женщин с бесплодием ассоциирована с ранними репродуктивными потерями после проведения ЭКО (ЭКО/ИКСИ). У женщин с циркуляцией АФА значимо ниже частота клинической беременности от числа всех женщин с положительным результатом анализа β ХГЧ по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами без АФА (60% и 93,75%, $p=0,033$). Наименьшая частота регистрации клинической беременности наблюдалась у женщин с антителами к фосфатидилсерину (9,1%), фосфатидилинозитолу (12,5%), фосфатидиловой кислоте (12,5%) и кардиолипину (14,3%).

3. Сравнение женщин с бесплодием и циркуляцией АФА со здоровыми фертильными женщинами выявило значимые множественные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов в виде меньшего абсолютного содержания Т-регуляторных лимфоцитов (0,008 (0,006; 0,013) и 0,014 (0,01; 0,025) $p<0,001$), цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+ (0,46 \pm 0,19 и 0,55 \pm 0,18, $p=0,043$), Т-хелперов CD3+CD4+ (0,79 \pm 0,29 и 0,95 \pm 0,33, $p=0,030$), НК-клеток (0,2 \pm 0,08 и 0,34 \pm 0,28, $p=0,002$), и большего относительного содержания В-лимфоцитов CD19+ (11,6 (9,7; 13,78) и 9,85 (8,43; 11,78), $p=0,029$), по сравнению со здоровыми женщинами. Между показателями субпопуляционного состава лимфоцитов и уровнем АФА не было выявлено сильных корреляционных взаимосвязей. Антитела к кардиолипину имели сильную ассоциацию с неконвенциональными антителами (к фосфатидилсерину ($R=0,77$), фосфатидилинозитолу ($R=0,77$), фосфатидиловой кислоте ($R=0,76$)).

4. Во время проведения протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с циркуляцией АФА наблюдалась значимая динамика изменений показателей

системы гемостаза в виде нарастания коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена, $p < 0,001$), активации внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров, $p < 0,001$) и уменьшения активности антикоагулянтной системы (снижение содержания АТ-III, $p < 0,001$). Значимых различий в динамике показателей системы гемостаза у женщин с АФА, получавших профилактические дозы НМГ и низкие дозы ацетилсалициловой кислоты и женщин без АФА, не получавших антикоагулянтную профилактику, не было выявлено.

5. Применение иммуноглобулинов для внутривенного введения в протоколе ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с циркуляцией АФА значимо увеличивало частоту регистрации клинической беременности, по сравнению с женщинами с АФА, не получавшими их (42,65% и 20,41%, $p = 0,012$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В алгоритм обследования женщин с бесплодием при наличии многократных неудач ВРТ следует включить анализ крови на антифосфолипидные аутоантитела (антитела к кардиолипину, β 2гликопротеину-1, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте и волчаночный антикоагулянт).

2. В группу риска по неудачным исходам программ ЭКО следует относить женщин с наличием антифосфолипидных антител с последующей оценкой содержания Т-регуляторных лимфоцитов и наблюдением за состоянием системы гемостаза.

3. Для профилактики ранних репродуктивных потерь при лечении бесплодия с применением ЭКО у женщин с циркуляцией антифосфолипидных антител и многократными неудачами ВРТ необходимо проводить инфузию иммуноглобулинов для внутривенного введения в курсовой дозе 300 мл – 15 г: 100 мл (5 г) внутривенно капельно с интервалом 5-7 дней, начиная с начала контролируемой стимуляции овуляции в протоколе ЭКО.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверченков, В.М. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы действия и возможности клинического применения / В.М. Аверченков, И.С. Плагин // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия. – 2004. – № 3. – С. 273-281.
2. Антифосфолипидные антитела у пациенток с неудачами ЭКО / Н.А. Макацария, Д.Х. Хизроева, В.О. Бицадзе [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2014. – Т.8. - № 4. – С. 93. – (Материалы XII Международной конференции Сибирского института акушерства, гинекологии и перинатологии (г.Томск) и кафедры акушерства и гинекологии медико-профилактического факультета Первого МГМУ им.Сеченова: тез. докл.)
3. Бицадзе, В.О. Вспомогательные репродуктивные технологии и ятрогенные тромботические осложнения / В.О. Бицадзе, С.В. Акиньшина, А.Д. Макацария // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – Т.13. - № 1. – С. 49-59.
4. Влияние иммуномодулирующей терапии на клинико-лабораторные показатели беременных с невынашиванием и антифосфолипидным синдромом/ А.А. Чугунова, М.С. Зайнулина, А.В. Селютин [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2011. – Т.LX. - № 3. С. 152-160.
5. Иммуномодулирующая терапия у беременных с АФС/ А.А. Чугунова, А.В. Селютин, С.А. Сельков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 4-5. – С. 443-444. - (Материалы XIV Всероссийск. науч. форума с междунар. участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» : тез. докл. – СПб., 2011)
6. Клинико-иммунологическое обоснование использования иммуноглобулинов для внутривенного введения в лечении антифосфолипидного синдрома при беременности/ С.А. Сельков, М.С. Зайнулина, А.А. Чугунова [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Вып.2. – С. 5-12.
7. Машкова, Т.Я. Тромбофилии и неудачи ЭКО / Т.Я.Машкова // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2015. – Т.9. - № 3. – С. 17-21.

8. Неразвивающаяся беременность / В.Е. Радзинский, В.И. Димитрова, Е.С. Емельяненко, Майскова И.Ю., Соловьева А.В. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 176 с.
9. Патогенетическое значение антифосфолипидных антител / А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – № 5 (60). – С. 9-21.
10. Рабсон, А. Иммунология/ А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз. – М.: Мир. – 2006. – 320 с.
11. Сельков, С.А. Иммунорегуляторные эффекты иммуноглобулинов для внутривенного введения / С.А. Сельков, Д.И. Соколов, С.В. Чепанов// Медицинская иммунология. – 2013. – Т.5. – №1 С. 5-12.
12. Сидельникова, В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: методические пособия и клинические протоколы. 3-е издание/ В.М. Сидельникова. – М.: МЕДпресс-инфор,2013. – 224 с.
13. Содержание основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток у беременных с невынашиванием и антифосфолипидным синдромом при лечении препаратами иммуноглобулинов / А.А. Чугунова, М.С. Зайнулина, А.В. Селютин [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 2. – С. 30-35.
14. Тромбогеморрагические осложнения в акушерско-гинекологической практике / А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе, Л.М. Смирнова [и др.]. – М.: МИА, 2011. – 1056 с.
15. Тромбофилия и тромбоэмболические осложнения, связанные с использованием вспомогательных репродуктивных технологий / С.В. Акиньшина, А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе В.О., Н.С. Стулева // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2014. – Т.8. - № 2. – С. 89-96.
16. Характеристика естественных цитотоксических клеток и регуляторных Т-лимфоцитов у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией/ Н.В. Селедцова, Н.А. Хонина, А.В. Дударева [и др.] // Иммунология. – 2007. – Т.28. - № 3. – С. 151-155.
17. Хизроева, Д.Х. Вспомогательные репродуктивные технологии и

антифосфолипидный синдром / Д.Х. Хизроева, Т.М. Машкова// *Акушерство гинекология и репродукция*. – 2014. – Т. 8. – № 1. – С. 26-30.

18. Циркуляция антифосфолипидных антител и неудачи ЭКО / Н.С. Стулева, Д.Х. Хизроева, Т.Я. Машкова, Г.Р. Абрамян // *Акушерство гинекология и репродукция*. – 2015. – Т. 9. – № 3. – С. 6-10.

19. Шаповалова, Е.А. Привычное невынашивание беременности при наличии циркулирующих антифосфолипидных антител (клиника, диагностика, лечение): автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.А.Шаповалова. – СПб., 2001. - 21 с.

20. Экспериментальное обоснование эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при акушерской патологии/ С.В. Чепанов, Д.И. Соколов, Т.Н. Шляхтенко [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2016. – № 5. – С. 82-89.

21. Ярилин, А.А. Иммунология/ А.А.Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

22. 36-year-old female with catastrophic antiphospholipid syndrome treated with eculizumab: a case report and review of literature / M. Strakhan, M. Hurtado-Sbordoni, N.Galeas [et al.] // *Case Rep. Hematol.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 7. doi: 10.1155/2014/704371.

23. A case of paradoxical cerebral embolism developed during in vitro fertilization treatment / M. Tomura, K. Satoh, M. Hanaoka [et al.] // *Brain Nerve*. – 2015. – Vol. 67. – № 10. – P. 1261–1267. doi: 10.11477/mf.1416200293.

24. A case of thrombotic microangiopathy associated with antiphospholipid antibody syndrome successfully treated with eculizumab / O. Bakhtar, B. Thajudeen, B.L. Braunhut [et al.] // *Transplantation*. – 2014. – Vol. 98. – № 3. – P. 17-18. doi: 10.1097/TP.0000000000000267.

25. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies / C. Stern, L. Chamley, H. Norris [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 80. – № 2. – P. 376–383.

26. A rational basis for the use of combined heparin/aspirin and IVIG immunotherapy in the treatment of recurrent IVF failure associated with antiphospholipid antibodies / G.

- Sher, C. Zouves, M. Feinman [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1998. – Vol. 39. – № 6. – P. 391–394.
27. A retrospective study on IVF outcome in patients with anticardiolipin antibody: effects of methylprednisolone plus low-dose aspirin adjuvant treatment / Y.P. Ying, Y. Zhong, Y. Zhou [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* - 2012. - Vol. 94. - № 2. - P. 196–201. doi: 10.1016/j.jri.2012.04.002
28. Agenor, A. Infertility and miscarriage: common pathways in manifestation and management / A. Agenor, S. Bhattacharya // *Womens. Health (Lond. Engl).* – 2015. – Vol. 11. – № 4. - P. 527–541. doi: 10.2217/whe.15.19
29. Alijotas-Reig, J. Is obstetric antiphospholipid syndrome a primary nonthrombotic, proinflammatory, complement-mediated disorder related to antiphospholipid antibodies? / J. Alijotas-Reig, M. Vilardell-Tarres // *Obstet. Gynecol. Surv.* – 2010. – Vol. 65. – № 1. – P. 39–45. doi: 10.1097/OGX.0b013e3181c97809
30. Alijotas-Reig, J. Treatment of refractory obstetric antiphospholipid syndrome: the state of the art and new trends in the therapeutic management / J. Alijotas-Reig // *Lupus.* – 2013. – Vol. 22. – № 1. – P. 6–17. Doi:10.1177/0961203312465782.
31. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation / Z.M. Stoeber, E. Mozes, B. Tartakovsky [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1993. – Vol. 90. – № 14. – P. 6464–6467.
32. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only / Z. Ulcova-Gallova, V. Krauz, P. Novakova [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2005. – Vol. 54. – № 2. – P. 112–117. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00294.x.
33. Antibodies to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine are associated with increased natural killer cell activity in non-male factor infertility patients / G. Sher, J.D. Fisch, G. Maassarani [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – № 9. – P. 1932–1936.
34. Anticardiolipin antibody levels in women undergoing first in vitro fertilization/embryo transfer/ D.Caccavo, N.M.Pellegrino, F.Lorusso [et al.] // *Hum. Reprod.* -2007. – Vol. 22. - №9. - P. 2494–2500. doi:10.1093/humrep/dem179
35. Antigenic profile, prevalence, and clinical significance of antiphospholipid

- antibodies in women referred for in vitro fertilization / M. Sanmarco, N. Bardin, L. Camoin [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1108. - P. 457–465.
36. Antiphospholipid Antibodies Affect Human Endometrial Angiogenesis/ N. Di Simone, F. Di Nicuolo, S. D'Ippolito [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2010. – Vol. 83. – № 2. – P. 212–219. doi: 10.1095/biolreprod.110.083410
37. Antiphospholipid antibodies and in vitro fertilization success: a meta-analysis / M.D. Hornstein, O.K. Davis, J.B. Massey [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73. – № 2. – P. 330–333.
38. Antiphospholipid antibodies and infertility: A gene expression study in decidual stromal cells / C.B. Chighizola, F. Pregnolato, E.Raschi [et al.] // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2016. – Vol. 18. – № 3–4. – P. 146–149.
39. Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET/ C.B. Coulam, B.D. Kaider, A.S. Kaider [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 1997. – Vol. 14. – № 10. – P. 603–608.
40. Antiphospholipid antibodies in women undergoing in vitro fertilization treatment: Clinical value of IgA Anti- β 2glycoprotein I antibodies determination / O. Paulmyer-Lacroix, L. Despierres, B. Courbiere [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. - 314704. doi: 10.1155/2014/314704.
41. Antiphospholipid antibodies regulate the expression of trophoblast cell adhesion molecules / N. Di Simone, R. Castellani, D. Caliandro [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77. – № 4. – P. 805–811.
42. Antiphospholipid syndrome / M. Khamashta, M. Taraborelli, S. Sciascia [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 30. – № 1. – P. 133–148. doi: 10.1016/j.berh.2016.04.002.
43. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis / T.Santos, A.Leque, H. de Carvalho [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2017. – Vol. 123. - P. 78–87. doi: 10.1016/j.jri.2017.09.007.
44. Apheresis and intravenous immunoglobulins used in addition to conventional therapy to treat high-risk pregnant antiphospholipid antibody syndrome patients. A prospective study / A. Ruffatti, M. Favaro, A.Hoxha [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* –

2016. – Vol. 115. – P. 14–19. doi: 10.1016/j.jri.2016.03.004.

45. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE / C.De Geyter, C.Calhaz-Jorge [et al.] // Hum. Reprod. - 2018. - Vol. 33. - № 9. - P. 1586–1601. doi: 10.1093/humrep/dey242.

46. Aspirin and heparin as adjuvants during IVF do not improve live birth rates in unexplained implantation failure / M.A. Akhtar, H. Eljabu, J.Hopkisson [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2013. – Vol. 26. – № 6. – P. 586–594. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.02.007.

47. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE/ European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), C. Calhaz-Jorge, C. de Geyter [et al.] // Hum. Reprod. – 2016. – V. 31. – № 8. – P. 1638–1652. doi: 10.1093/humrep/dex264.

48. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE/ European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), C. Calhaz-Jorge, C. de Geyter [et al.] // Hum. Reprod. - 2017. - Vol. 32. - № 10. - P. 1957–1973.

49. Association of serum autoantibodies with pregnancy outcome of patients undergoing first IVF/ICSI treatment: A prospective cohort study / X. Chen, ML. Mo [et al.] // J. Reprod. Immunol. - 2017. - Vol. 122. - P. 14–20. doi: 10.1016/j.jri.2017.08.002.

50. Autoimmune disorders affect the in vitro fertilization outcome in infertile women / S.H. Zou, Z.Z. Yang, P. Zhang [et al.] // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2008. – Vol. 14. – № 4. – P. 343–346.

51. Awadalla, A.M. Relation between Anti-Phospholipid Antibodies and Failed Intra-Cytoplasmic Sperm Injection/ A.M. Awadalla // MOJ Womens Health. - 2015. Vol. 1. - №1. - P. 49-52. doi: 10.15406/mojwh.2015.01.00011

52. Backos, M. Antiphospholipid antibodies and infertility / M. Backos, R. Rai, L. Regan // Hum. Fertil. – 2002. – Vol. 5. – № 1. – P. 30–34.

53. Bellver, J. Ovarian stimulation for ovulation induction and in vitro fertilization in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome / J. Bellver ,

- A. Pellicer // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 92. – № 6. – P. 1803–1810. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.033.
54. Bleeker, W.K. Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy: studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect/ W.K.Bleeker, J.L.Teeling, C.E.Hack // *Blood.* – 2001. – Vol.98.- №10. – P. 3136–3142.
55. Branch, D.W. Antiphospholipid syndrome: obstetric diagnosis, management, and controversies / D.W.Branch, M.A.Khamashta // *Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol.101. – №6. – P. 1333–1344.
56. Branch, D.W. Obstetric antiphospholipid syndrome: current uncertainties should guide our way/ D.W.Branch, R.M.Silver, T.F.Porter // *Lupus.* – 2010. – Vol.19. №4.- P. 446–452. doi: 10.1177/0961203310361490.
57. Buckingham, K.L. A critical assessment of the role of antiphospholipid antibodies in infertility/ K.L.Buckingham, L.W.Chamley // *J. Reprod. Immunol.* – 2009. – Vol.80(1-2). – P.132–145. doi: 10.1016/j.jri.2008.11.005.
58. Carp, H.J.A. Anti-phospholipid antibodies and infertility/ H.J.A.Carp, Y. Shoenfeld // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* -2007. – Vol. 32. – № 2. – P. 159–161.
59. Carp, H.J.A. Intravenous immunoglobulin: effect on infertility and recurrent pregnancy loss / H.J.A.Carp // *The Israel Medical association journal.* – 2007. – Vol.9. – P.877–880.
60. Catastrophic antiphospholipid syndrome after ovulation induction/ E. Chauvet, S.Canet [et al.] // *La Rev. Med. interne.* – 2005. – Vol. 26. – № 12. – P. 956–959. doi:10.1016/j.revmed.2005.07.015.
61. Catastrophic antiphospholipid syndrome related to severe ovarian hyperstimulation / V. Giner, M.R. Oltra, M.J. Esteban [et al.] // *Clin. Rheumatol.* – 2007. – Vol. 26. – № 6. – P. 991–993. doi:10.1007/s10067-006-0231-4.
62. CD3-CD56+CD16+ natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment / L. Heilmann, M. Schorsch, T. Hahn [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 63. – № 3. – P. 263–265. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00790.x.

63. Cervera, R. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction / R. Cervera, J. Balasch // *Human Reproduction Update*. – 2008. – Vol. 1. -№4. - P. 359–366. doi: 10.1093/humupd/dmn013.
64. Chan, W.S. The ART of thromboembolism: a review of assisted reproductive technology and thromboembolic complications / W.S. Chan, M.E. Dixon// *Thromb. Res.* – 2008. – Vol. 121. – № 6. – P. 713–726. doi:10.1016/j.thromres.2007.05.023
65. Clark, D.A. Is intravenous immunoglobulins (IVIg) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF) / D.A. Clark, C.B. Coulam, R.B. Stricker// *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2006. – Vol. 23. – № 1. – P. 1–13. doi:10.1007/s10815-005-9013-1
66. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome / V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 8. – № 2. – P. 237–242. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03674.x.
67. Combination therapy with anticoagulants, corticosteroids and intravenous immunoglobulin for women with severe obstetric antiphospholipid syndrome / N. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Motomura [et al.] // *Clin Exp Rheumatol.* – 2014. – Vol. 32. – № 2. – P. 299-300.
68. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss / V.M. Holers, G. Girardi, L. Moet [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195. – № 2. – P. 211–220.
69. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome / G. Girardi, J. Berman, P. Redecha [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – № 11. – P. 1644–1654. doi:10.1172/JCI18817.
70. Cooper, G.S. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases/ G.S. Cooper, M.L.K. Bynum, E.C. Somers // *J. Autoimmun.* – 2009. – Vol. 33. – № 3–4. – P. 197–207. doi: 10.1016/j.jaut.2009.09.008.
71. Cooper, G.S. The epidemiology of autoimmune diseases / G.S. Cooper, B.C. Stroehla// *Autoimmun. Rev.* – 2003. – Vol. 2. – № 3. – P. 119–25.
72. Correlation between peripheral blood and follicular fluid autoantibodies and impact

- on in vitro fertilization / A. El-Roeiy, N. Gleicher, J. Friberg [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 1987. – Vol. 70. – № 2. – P. 163–170.
73. Costa, M. Treating infertility in autoimmune patients / M.Costa , D.Colia // *Rheumatology.* – 2008. – Vol. 47. – Suppl 3. – P. 38-41.
74. Coulam, C.B. Chemical pregnancies: immunologic and ultrasonographic studies / C.B. Coulam, R. Roussev // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2002. – Vol. 48. – № 5.- P. 323–328.
75. Coulam, C.B. Does Immunotherapy for Treatment of Reproductive Failure Enhance Live Births? / C.B. Coulam C.B., B. Acacio// *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 67. P. 296–303. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01111.x.
76. Coulam, C.B. Increased pregnancy rates after IVF/ET with intravenous immunoglobulin treatment in women with elevated circulating C56+ cells / C.B. Coulam, C. Goodman // *Early Pregnancy.* – 2000. – Vol. 4.- № 2. – P. 90–98.
77. Cumulative pregnancy and live birth rates in women with antiphospholipid antibodies undergoing assisted reproduction / T. Eldar-Geva, C. Wood, N. Lolatgis [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – № 6. – P. 1461–1466.
78. Current trends of reproductive immunology practices in in vitro fertilization (IVF) – a first world survey using IVF-Worldwide.com / J. Kwak-Kim, A.R. Han, A.Gilman-Sachs [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 69. – № 1. – P. 12–20. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01183.x.
79. Defective maternal-fetal interaction in a murine autoimmune model / B. Tartakovsky, B.L. Bermas, Z. Stoeber [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11. – № 11. – P. 2408–2411.
80. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure / G. Sacks, Y. Yang, E. Gowen [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. Vol. 67. – № 5. – P. 434–442. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01105.x.
81. Detection of a procoagulable state during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization with global assays of haemostasis / E. Westerlund, P. Henriksson, H. Wallén [et al.] // *Thromb. Res.* – 2012. – Vol. 130 – № 4. – P. 649–653. doi: 10.1016/j.thromres.2011.11.024

82. Devreese, K.M.J. Is there an association between complement activation and antiphospholipid antibody-related thrombosis? / K.M.J. Devreese, M.F. Hoylaerts // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 104. – № 6. – P. 1279–1281. doi: 10.1160/TH10-06-0410.
83. Eculizumab prevents recurrent antiphospholipid antibody syndrome and enables successful renal transplantation / B.E. Lonze, A.A. Zachary, C.M. Magro [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2014. – Vol. 14. – № 2. – P. 459–665. doi: 10.1111/ajt.12540.
84. Effect of Low Molecular Weight Heparins (LMWHs) on antiphospholipid Antibodies (aPL)-mediated inhibition of endometrial angiogenesis / S.D.Ippolito, R.Marana, F.D.Nicuolo [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. № 1. – P. 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0029660.
85. Effects of multiple inherited and acquired thrombophilia on outcomes of in-vitro fertilization / M. Di Nisio, A.Ponzano [et al.] // *Thromb. Res.* - 2018. - Vol. 167. - P. 26–31. doi: 10.1016/j.thromres.2018.05.006.
86. Enhancement of peripheral blood CD56dim cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or in vitro fertilization failure / N. Karami, M.G., R. Nikbakht [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* 2012. – Vol. 95. – № 1–2. – P. 87–92. doi: 10.1016/j.jri.2012.06.005.
87. Ernest, J. Obstetric Antiphospholipid Syndrome: An Update on Pathophysiology and Management / J. Ernest, P. Marshburn, W. Kutteh // *Semin. Reprod. Med.* – 2011. – Vol. 29. – № 6. – P. 522–539. doi: 10.1055/s-0031-1293206.
88. EULAR recommendations for women’s health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome / L. Andreoli, G.K. Bertias, N. Agmon-Levin [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – Vol. 76. – № 3. – P. 476–485. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209770
89. Female Infertility and Serum Auto-antibodies: a Systematic Review / A. Deroux, C. Dumestre-Perard [et al.] // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* - 2017. - Vol. 53. - № 1. - P. 78–86. doi: 10.1007/s12016-016-8586-z.
90. Fernández-Cruz E. Mechanisms of action of immune globulin/ E. Fernández-Cruz,

- D. Alecsandru, S.S. Ramón // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 1–2. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03955.x.
91. Fiedler, K. Effectivity of heparin in assisted reproduction / K. Fiedler, W. Würfel // *Eur. J. Med. Res.* – 2004. – Vol. 9. – № 4. – P. 207–14.
92. Final ART success rates: a 10 years survey / C. Gnoth, B. Maxrath, T. Skonieczny [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26. – № 8. – P. 2239–2246. doi: 10.1093/humrep/der178.
93. Gardner, D.K. Culture and transfer of human blastocysts / D.K.Gardner, Schoolcraft WB// *Curr. opin. Obstet. Gynec.*-1999. - Vol .11. -№3. - P. 307-311.
94. Girling, J.E. Recent advances in endometrial angiogenesis research / J.E. Girling, P.A.W. Rogers // *Angiogenesis.* – 2005. – Vol. 8. – № 2.- P. 89–99. doi: 10.1007/s10456-005-9006-9.
95. Hemostasis parameters during ovarian stimulation for in vitro fertilization: results of a prospective study/ C.Biron, F.Galtier-Dereure, H. Rabesandratana [et al.] // *Fertil. Steril.* -1997. – Vol. 67. - №1. - P. 104–109.
96. Heparin for assisted reproduction: summary of a Cochrane review/ M.A. Akhtar, H. Eljabu, J.Hopkisson [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. – 103. – № 1. – P. 33–34. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.005
97. High fecundity rates following in-vitro fertilization and embryo transfer in antiphospholipid antibody seropositive women treated with heparin and aspirin / G. Sher, M. Feinman, C. Zouves [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9. – № 12. – P. 2278–2283.
98. High levels of anticardiolipin antibodies in patients with abnormal embryo morphology who attended an in vitro fertilization program / F. Azem, E.Geva, A.Amit [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* - 1998. - Vol. 39. – № 3. – P. 161–163.
99. Hill, J.A. Immunologic tests and IVF: Please, enough already / J.A. Hill, R.T. Scott // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 74. – № 3. – P. 439–442.
100. IgG-antiphospholipid antibodies in follicular fluid of IVF-ET patients are related to low fertilization rate of their oocytes / H. Matsubayashi, T. Sugi, T. Arai [et al.] // *Am.*

J. Reprod. Immunol. – 2006. – Vol. 55. – № 5. – P. 341–348. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00374.x

101. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures / M. Ghaebi, M.Nouri, A.Ghasemzadeh [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2017. – Vol. 88. – P. 61–73. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.016.

102. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid in relation to etiology of infertility and their relevance to IVF outcome / M.E. Hammadeh, A.K.Ertan, A Kubily, M. Zeppezauer [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 47. – № 2. – P. 82–90.

103. Immunoglobulins in the mouse uterus during the oestrous cycle / F. Rachman, V. Casimiri, A. Psychoyos [et al.] // J. Reprod. Fertil. – 1983. – Vol. 69. – № 1. – P. 17–21.

104. Immunomodulatory treatment with intravenous immunoglobulin and prednisone in patients with recurrent miscarriage and implantation failure after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection / K.M.Nyborg, A.M.Kolte, E.C.Larsen [et al.] // Fertil. Steril. – 2014. – Vol. 102. – № 6. – P. 1650–1655. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.029.

105. Impact of Anticardiolipin Antibody on the Outcome of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer / Y.P Zhong, Y.Ying, H-T. Wu [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 66. – № 6. – P. 504–509. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01058.x

106. Impact of blood hypercoagulability on in vitro fertilization outcomes: a prospective longitudinal observational study / G.T. Gerotziafas, P. Van Dreden [et al.] // Thromb. J. - 2017. - Vol. 15. - P. 9. doi: 10.1186/s12959-017-0131-7

107. Impact of presence of antiphospholipid antibodies on in vitro fertilization outcome Y.H. Hong, S.J. Kim [et al.] // Obstet. Gynecol. Sci. - 2018. - Vol. 61. - № 3. - P. 359-366. doi: 10.5468/ogs.2018.61.3.359.

108. In vitro fertilization outcomes in women with antiphospholipid antibodies circulation / J. Khizroeva, A.Makatsaria, V.Bitsadze [et al.] // J. Matern. Neonatal Med. - 2018. - P. 1–6. doi: 10.1080/14767058.2018.1535586.

109. In vitro fertilization-induced alterations in coagulation and fibrinolysis as measured by thromboelastography / M.J.P. Harnett, K. Bhavani-Shankar, S. Datta [et al.] // *Anesth. Analg.* – 2002. – Vol. 95. – № 4. – P. 1063–1066.
110. In vitro fertilization. Do short-term changes in estrogen levels produce increased fibrinolysis? / B. Magnani, L. Tsen, S. Datta [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1999. – Vol. 112. – № 4. – P. 485–491.
111. In vitro fertilization and systemic lupus erythematosus or antiphospholipid syndrome: An update / P. Orquevaux, A. Masseur, V. Le Guern [et al.] // *La Rev. Médecine Interne.* – 2015. – Vol. 36. – № 3. – P. 154–158. doi: 10.1016/j.revmed.2014.08.004.
112. In Vitro Fertilization in 37 Women with Systemic Lupus Erythematosus or Antiphospholipid Syndrome: A Series of 97 Procedures / P. Orquevaux, A.Masseur, V. Le Guern [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2017. - Vol. 44. - № 5. – P. 613-618. doi: 10.3899/jrheum.160462.
113. Incidence of autoimmune antibodies in failed embryo transfer cycles/ A.Birkenfeld, T.Mukaida, L. Minichiello [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1989.- Vol. 31(2-3). – P. 65–68.
114. Increased coagulation index as measured by Thromboelastography during ovarian stimulation for in vitro fertilization: Influence of the final oocyte maturation triggering agent / R. Beck-Fruchter, I. Gavish [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* - 2018. - Vol. 223. - P. 26–29. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.02.005
115. Influence of antiphospholipid antibodies on pregnancy outcome in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer / S.R. Lee, E.J. Park, S.H. Kim [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2007. – Vol. 57. – № 1. – P. 34–39.
116. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S. Miyakis, M.D. Lockshin, T. Atsumi [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4. – № 2. – P. 295–306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.

117. Intracardiac thrombosis and fever possibly triggered by ovulation induction in a patient with antiphospholipid antibodies / S. Andrejevic, B. Bonaci-Nicolik [et al.] // *Scand. J. Rheumatol.* – 2002. – Vol.31. – № 4. – P. 249–251.
118. Intravenous Immunoglobulin for Repeated IVF Failure and Unexplained Infertility / M.R. Virro, E.E. Winger, J.L. Reed [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – VOL. – 68. – № 3. – P. 218–225. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01169.x
119. Intravenous immunoglobulin G in women with reproductive failure: The Korean Society for Reproductive Immunology practice guidelines / N. Sung, A.R. Han, C.W. Park [et al.] // *Clin. Exp. Reprod. Med.* – 2017. – Vol. 44. - №1. – P. 1–7. doi: 10.5653/cerm.2017.44.1.1
120. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function / A. Kessel, H. Ammuri, R. Peri [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – № 8. – P. 5571–5575.
121. Intravenous immunoglobulin treatment for repeated IVF/ICSI failure and unexplained infertility: a systematic review and a meta-analysis / J. Li, Y. Chen, C. Liu [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 70. – № 6. – P. 434–447. doi: 10.1111/aji.12170.
122. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells/ M. Moraru, J. Carbone, D. Alecsandru [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 68. – № 1. – P. 75–84. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01135.x.
123. Intravenous immunoglobulins and antiphospholipid syndrome: How, when and why? A review of the literature /S.C. Tenti, S. Cheleschi, M. Giacomo [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2016. – Vol. 15. – № 3. – P. 226–235. doi: 10.1016/j.autrev.2015.11.009.
124. Kaider, B.D. Murine embryos as a direct target for some human autoantibodies in vitro/ B.D. Kaider, C.B. Coulam, R.G. Roussev // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – № 10. – P. 2556–2561.

125. Effect of antiphospholipid antibodies in women undergoing in-vitro fertilization: role of heparin and aspirin / W.H. Kutteh, D.L. Yetman, S.J.Chantilis [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12. – № 6. – P. 1171–1175.
126. Levine, A. Assisted reproductive technology in SLE and APS / A. Levine, M. Lockshin // *Lupus.* – 2014. – Vol. 23. – № 12. – P. 1239–1241. doi: 10.1177/0961203314527370.
127. Lockshin, M.D. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody / M.D. Lockshin, M.L. Druzin, T. Qamar // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1989. – Vol. 160. – № 2. – P. 439–443.
128. Low-molecular-weight heparin in women with repeated implantation failure / C. Lodigiani, P. Di Micco, P. Ferrazzi [et al.] // *Women's Heal.* – 2011. – Vol. 7. – № 4. – P. 425–431. doi: 10.2217/whe.11.38.
129. Lu, C. Aspirin or heparin or both in the treatment of recurrent spontaneous abortion in women with antiphospholipid antibody syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials / C. Lu, Y. Liu, H.L.Jiang // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2018. – Vol. 10. - P.1-13. doi: 10.1080/14767058.2017.1404979.
130. Management of the controversial aspects of the antiphospholipid syndrome pregnancies: a guide for clinicians and researchers / D. Erkan, S. Patel, M. Nuzzo [et al.] // *Rheumatology.* – 2008. – Vol.47, suppl.3 – P.23–27. doi: 10.1093/rheumatology/ken181.
131. Mardanian, F. Evaluation of CD56(dim) and CD56(bright) natural killer cells in peripheral blood of women with IVF failures / F. Mardanian, M. Kazeroonizadeh, B. Rashidi // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2015. – Vol. 13. – № 9. – P. 577–82.
132. Maternal T Regulatory Cell Depletion Impairs Embryo Implantation Which Can Be Corrected With Adoptive T Regulatory Cell Transfer / R.J. Heitmann, R.P.Weitzel, Y. Feng [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2016. - Vol. 24. - №. 7. – P. 1014-1024. doi: 10.1177/1933719116675054.
133. Cervera R. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients / R. Cervera, R. Serrano,

- G.J.Pons-Estel [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* 2015. – Vol. 74. – № 6. – P. 1011–1018. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204838.v
134. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients/ R. Cervera, M.A., Khamashta, Y. Shoenfeld [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* 2009. – Vol. 68. – № 9. – P. 1428–1432. doi: 10.1136/ard.2008.093179.
135. Nelson, S.M. Prophylaxis of VTE in women – during assisted reproductive techniques / S.M. Nelson // *Thromb. Res.* – 2009. – Vol. 123, suppl. 3. – P. S8–S15. doi: 10.1016/S0049-3848(09)70127-6.
136. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome / P. Redecha, C.W. Franzke, R. Wolfram [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – № 10. – P. 3453–3461. doi: 10.1172/JCI36089.
137. Obstetric antiphospholipid syndrome: a recent classification for an old defined disorder / S.D.Ippolito, R.Marana, F.D. Nicuoloi [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – Vol. 13. – № 9. – P. 901–908. doi: 10.1016/j.autrev.2014.05.004.
138. Ovulation induction and early pregnancy loss in a woman susceptible to autoimmune diseases: a possible interrelationship / D. Macut, D. Micic, N. Suvajdzic [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 14. – № 3. – P. 153–157.
139. Papadakis, E. Women's Issues in Antiphospholipid Syndrome / E. Papadakis, A. Banti, A. Kioumi // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2016. – Vol. 18. – № 9. – P. 524–529.
140. Parr, M.B. Immunohistochemical localization of immunoglobulins A, G and M in the mouse female genital tract / M.B. Parr, E.L. Parr// *J. Reprod. Fertil.* – 1985. – Vol. 74. – № 2. – P. 361–370.
141. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome / K.Oku, O. Amengual, T. Atsumi [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 42. – № 10. – P. 1126–1135. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02697.x.
142. Percentage of CD3-CD56+dim and of CD3-CD56+dimCD69+ Natural Killer Cells in the Peripheral Blood of Women with In Vitro Fertilization (IVF) Failure / S.H. Elabd, M.S. Nour, A.S. [et al.] // *Egypt. J. Immunol.* – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 39–44.

143. Pierangeli S.S. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia / S.S. Pierangeli, G. Girardi, M. Vega-Ostertag [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005. – Vol. 52. – № 7. – P. 2120–2124. DOI:10.1002/art.21157.
144. Porter, T.F. Antiphospholipid Antibodies and infertility / T.F.Porter // *Clin. Obstet. Gynecol.* - 2001. - Vol. 44. - № 1. -P. 29–35.
145. Prediction of changes in levels of haemostatic variables during natural menstrual cycle and ovarian hyperstimulation / O. Andersson, M Blombäck, K Bremme, H. Wramsby // *Thromb. Haemost.* - 1997. - Vol. 77. - № 5. - P. 901–904.
146. Prednisolone plus low-dose aspirin improves the implantation rate in women with autoimmune conditions who are undergoing in vitro fertilization / I Hasegawa, Y Yamamoto, M. Suzuki [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1998. – Vol. 70. – № 6. – P. 1044–1048.
147. Pregnancy and antiphospholipid syndrome / N. Costedoat-Chalumeau, G.Guettrot-Imbert, V. Leguern [et al.] // *La Rev. Med. interne.* – 2012. – Vol. 33. – № 4. – P. 209–216. doi: 10.1016/j.revmed.2012.01.003
148. Pregnancy outcome is not affected by antiphospholipid antibody status in women referred for in vitro fertilization/ I.T.Chilcott, R. Margara, H.Cohen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73. – № 3. – P. 526–530.
149. Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure / R. Sauer, R. Roussev, S. Rajasingam [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 93. – № 7. – P. 2441–2443. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.062.
150. Recommended Therapeutic INR Range for Patients with Antiphospholipid Syndrome on Warfarin Anticoagulation: Is Moderate-Intensity (INR 2.0 – 3.0) or High-Intensity (INR 3.1 – 4.0) Better for Reducing Risk of Recurrent Thromboembolic Events? / E. Kim, T. Do, K.Peacock [et al.] // *Cureus.* – 2016. – Vol. 8. – № 9. – P. 765. doi:10.7759/cureus.765.
151. Reducing the Risk of Venous Thromboembolism during Pregnancy and the Puerperium Pregnancy and the Puerperium. Green-top Guideline No. 37a/ C.Nelson-Piercy, P. MacCallum, L. Mackillo [et al.]// Royal College of Obstetricians and

Gynaecologists. - 2015.- P.40. URL:
<https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg-37a.pdf> (активна
 18.12.2018)

152. Regulatory T cells improve pregnancy rate in RIF patients after additional IVIG treatment / M. Ahmadi, S. Abdolmohammadi-Vahid [et al.] // Syst. Biol. Reprod. Med. - 2017. - Vol. 63. - № 6. - P. 350–359.

153. Salmon, J.E. Complement activation as a mediator of antiphospholipid antibody induced pregnancy loss and thrombosis / J.E. Salmon, G. Girardi, V.M. Holers // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – Vol. 61. № 2. – P. 46-50.

154. Sewell, W.A.C. Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin / W.A.C. Sewell, S. Jolles // Immunology. – 2002. – Vol. 107. – № 4. – P. 387–393.

155. The selective use of heparin/aspirin therapy, alone or in combination with intravenous immunoglobulin G, in the management of antiphospholipid antibody-positive women undergoing in vitro fertilization / G. Sher, W. Matzner, M. Feinman [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1998. – Vol. 40. – № 2. – P. 74–82.

156. Smith, S.K. Angiogenesis and reproduction / S.K. Smith // BJOG. – 2001. – Vol. 108. – № 8. – P. 777–83.

157. Sperm antibodies, immunoglobulins, and complement in human follicular fluid / G.N. Clarke, C. Hsieh, S.H. Koh [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1984. – Vol. 5. – № 4. – P. 179–181.

158. Staub, H.L. The antiphospholipid syndrome and Tregs / H.L. Staub, E.R.R. Dal Ben, M.E. Bauer // Autoimmun. Rev. – 2014. – Vol. 13. – № 6. – P. 697–698. doi: 10.1016/j.autrev.2013.08.004.

159. Subclavian deep vein thrombosis associated with the use of recombinant follicle-stimulating hormone (Gonal-F) complicating mild ovarian hyperstimulation syndrome / J.R. Loret de Mola, R.Kiwi, C. Austin [et al.] // Fertil. Steril. – 2000. – Vol. 73. – № 6. – P. 1253–1256.

160. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Antiphospholipid antibodies do not affect IVF success / Practice Committee of American

Society for Reproductive Medicine // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90. – № 5 P. 172–173.

161. Successful pregnancy after rituximab in a women with recurrent in vitro fertilisation failures and anti-phospholipid antibody positive / C.T. Ng, M. O'Neil, D. Walsh [et al.] // *Ir. J. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 178. – № 4. – P. 531–533. doi: 10.1007/s11845-008-0265-5.

162. Tang, Q. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation / Q. Tang, J.A. Bluestone // *Nat. Immunol.* - 2008. - Vol. 9. - № 3. - P. 239–244. doi: 10.1038/ni1572.

163. The correlation of autoantibodies and uNK cells in women with reproductive failure / N.G. Mariee, E. Tuckerman, S.Laird [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 95. – № 1–2. – P. 59–66. doi: 10.1016/j.jri.2012.04.003.

164. The cumulative probability of liveborn multiples after in vitro fertilization: a cohort study of more than 10,000 women / B.A. Malizia, L.E. Dodge, A.S. Penzias [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99. – № 2. – P. 393–399. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.10.018.

165. The effect of in vitro fertilization on coagulation parameters as measured by thromboelastogram / S. Orbach-Zinger, L.A. Eidelman, A. Lutsker [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2016. – Vol. 201. - P. 118–120. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.04.010.

166. The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus /C. La Rocca, F. Carbone , S. Longobardi [et al.] // *Immunol. Lett.* – 2014. – Vol. 162. – № 1. – P. 41–48. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.013.

167. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates / Z.P. Nagy, J. Liu, H.Joris [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, № 12. – P. 3171 – 3177.

168. The neglected morula/compact stage embryo transfer / J. Tao, Tamis R., Fink K. [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – №6. – P. 1513 – 1518.

169. The relationship between in vitro fertilization and naturally occurring antibodies: evidence for increased production of antiphospholipid autoantibodies / B. Fisch, Y. Rikover, L. Shohat [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1991. – Vol.56. – № 4. – P. 718–724.
170. The role of heparin in embryo implantation in women with recurrent implantation failure in the cycles of assisted reproductive techniques (without history of thrombophilia) / K. Hamdi, S. Danaii, L. Farzadi [et al.] // *J. Fam. Reprod. Heal.* – 2015. – Vol. 9. – № 2. – P. 59–64.
171. The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets / V. Schlossberger, L. Schober, R. Rehnitz [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28. – № 11. – P. 3062–3073. doi: 10.1093/humrep/det316.
172. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis / M. Di Nisio, A.W.S. Rutjes, N. Ferrante [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – № 10. – P. 2670–2678. doi: 10.1182/blood-2011-03-340216.
173. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF / E.E. Winger, J.L. Reed, S. Ashoush [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2009. – Vol. 61. – № 2. – P. 113–120. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00669.x.
174. Udoff, L.C. Management of Patients with Antiphospholipid Antibodies Undergoing In Vitro Fertilization / L.C. Udoff, D.W. Branch // *J. Autoimmun.* – 2000. – Vol. 15. – № 2. – P. 209–211.
175. Unlabeled uses of intravenous immune globulin / H. Leong, J. Stachnik, M.E. Bonk [et al.] // *Am. J. Heal. Pharm.* – 2008. – Vol. 65. – № 19. – P. 1815–1824. doi: 10.2146/ajhp070582.
176. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF / E. Tuckerman, N. Mariee, A. Prakash [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 87. – № 1–2. – P. 60–66. doi: 10.1016/j.jri.2010.07.001.
177. Viall, C.A. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: A systematic review of the literature / C.A. Viall, L.W. Chamley //

Autoimmun. Rev. – 2015. – Vol. 14. – № 5. – P. 446–471. doi: 10.1016/j.autrev.2015.01.008.

178. Vreede, A.P. Antiphospholipid syndrome: an update for clinicians and scientists/ Vreede A.P., Bockenstedt P.L., Knight J.S. // Curr. Opin. Rheumatol. 2017. – Vol. 29. – № 5. - P. 458–466. doi: 10.1097/BOR.0000000000000410.

179. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines/ S.M. Bates, I.A.Greer, S. Middeldorp // Chest. – 2012. – Vol. 141. – № 2 Suppl. C. – P. 691–736. doi: 10.1378/chest.11-2300.

180. What exactly do we mean by "recurrent implantation failure"? A systematic review and opinion / L.T.Polanski, M.N.Baumgarten, S.Quenby [et al.] // Reprod. Biomed. Online. - 2014. - Vol. 28. - № 4. - P. 409–423.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1 – Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с циркуляцией АФА (n=128)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Лимфоциты (CD3+), тыс./мкл	1,29	1,15-1,42	0,46	1,59	1,4-1,78	0,49	t=-2,66 p=0,010
Лимфоциты (CD3+), %	74,71	73,32-76,1	4,79	73,39	69,83-76,94	8,98	t=0,83 p=0,408
CD 45, тыс./мкл	1,72	1,55-1,88	0,56	2,18	1,92-2,43	0,64	t=-3,23 p=0,002
Т-хелперы (CD3+CD4+), тыс./мкл	0,79	0,70-0,87	0,29	0,95	0,82-1,08	0,33	t=-2,21 p=0,030
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	46,12	43,99-48,25	7,32	43,49	40,43-46,55	7,73	t=1,46 p=0,147
ЦТЛ (CD3+CD8+), тыс./мкл	0,46	0,40-0,51	0,19	0,55	0,48-0,62	0,18	t=-2,06 p=0,043
ЦТЛ (CD3+CD8+), %	26,38	24,6-28,17	6,14	25,70	23,39-28,0	5,83	t=0,47 p=0,638
NK-клетки, %*	12,01	10,87-13,15	3,87	14,74	9,14-20,33	9,69	U=274 p=0,350
	11,6 (9,5; 13,96)			14,65 (10,2; 15,4)			
NK-клетки, тыс./мкл	0,2	0,18-0,22	0,01	0,35	0,16-0,54	0,09	t=-2,9 p=0,005
	0,49 (0,4-0,62)			0,49 (0,39; 0,67)			
В-лимфоциты (CD19+), тыс./мкл	0,21	0,18-0,25	0,11	0,22	0,19-0,25	0,08	t=-0,18 p=0,856
В-лимфоциты (CD19+), %*	12,24	11,15-13,22	3,74	10,22	9,10-11,34	2,83	U=449,5 p=0,029
	11,6 (9,7; 13,78)			9,85 (8,43; 11,78)			
ИРИ (CD3+CD4+/CD3+CD8+)	1,86	1,69-2,03	0,59	1,79	1,56-2,02	0,58	t=0,48 p=0,635

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1. Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

Таблица 2 – Сравнение содержания Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии

Показатель	Женщины с циркуляцией АФА (n=128)			Контроль (здоровые небеременные женщины, n=27)			Значения статистики, значение p
	М	ДИ 95%	б	М	ДИ 95%	б	
Treg, %	4,83	4,35-5,32	1,63	5,89	5,31-6,47	1,46	t=-2,78 p=0,007
Treg, тыс./мкл	0,01	0,008-0,01	0,00	0,02	0,014-0,02	0,01	U=293 p<0,001
	0,008 (0,006; 0,013)			0,014(0,01; 0,025)			
Treg/NK, %*	0,47	0,38-0,57	0,32	0,54	0,4-0,68	0,35	U=525 p=0,275
	0,42 (0,29; 0,53)			0,47 (0,34; 0,68)			
Treg/NK, тыс./мкл	0,05	0,04-0,05	0,02	0,06	0,05-0,06	0,01	t=-2,78 p=0,007
Treg/CD19+, %	0,42	0,37-0,47	0,17	0,6	0,53-0,68	0,19	t=-4,28 p=0,00005
Treg/CD19+, тыс./мкл	0,049	0,04-0,06	0,02	0,09	0,064-0,1	0,06	t=-3,94 p=0,0002

Примечание: * – Для всех сравниваемых групп значения p для критерия Комарова-Смирнова Лилиефорса – менее 0,1.
Для данных показателей указаны значения медианы и верхних и нижних квартилей (Me (25%; 75%))

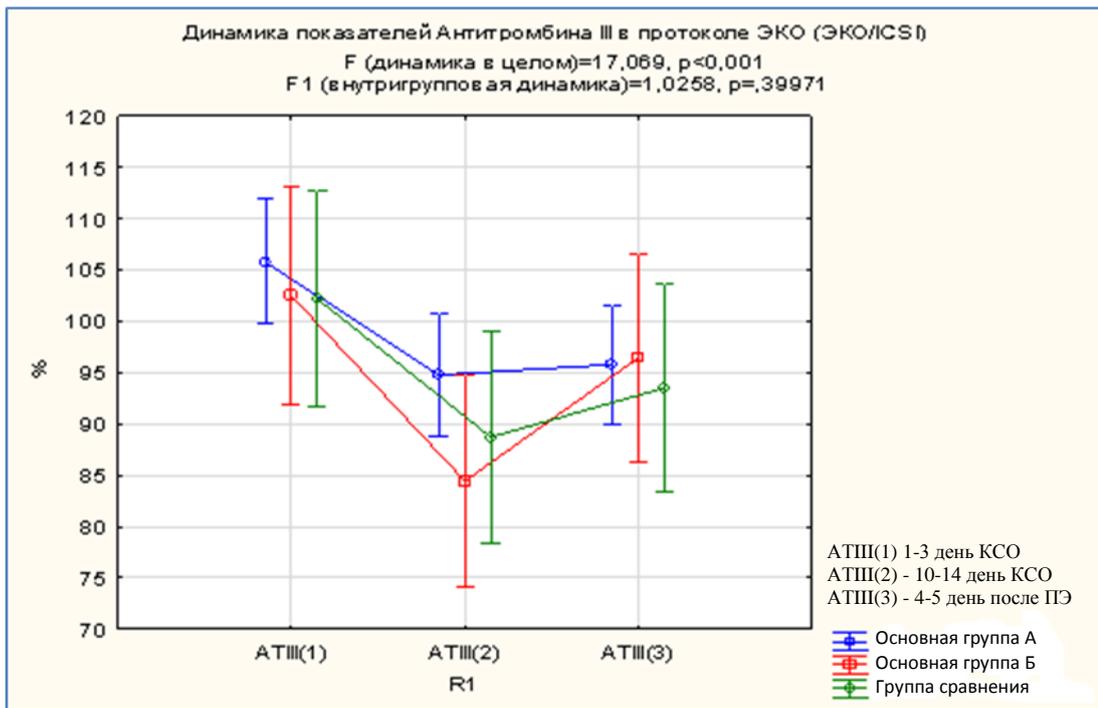


Рисунок 1 – Динамика содержания уровня естественного антикоагулянта АТ-III у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

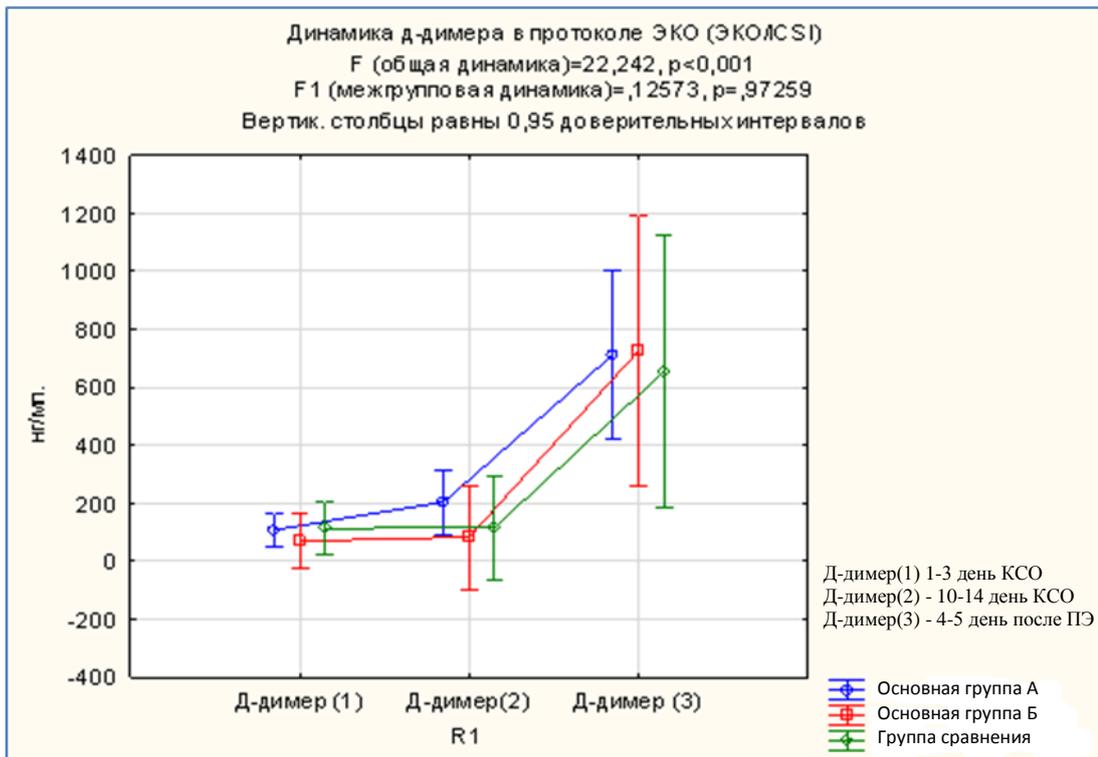


Рисунок 2 – Динамика содержания уровня Д-димеров у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

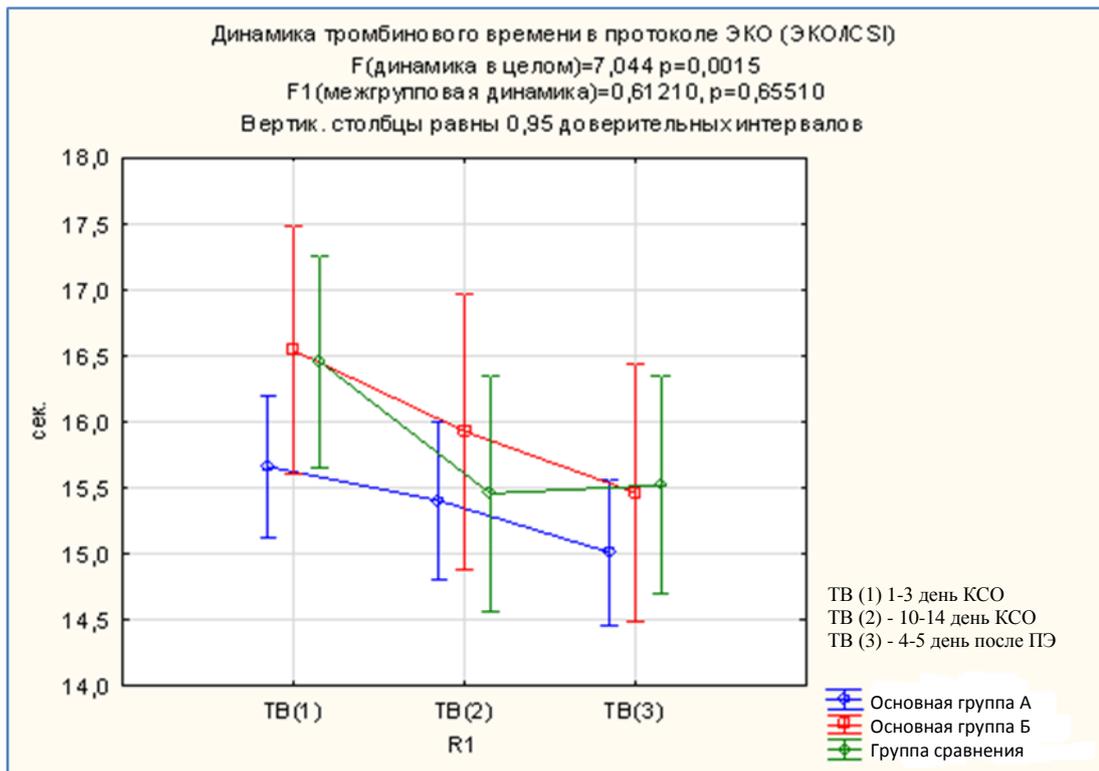


Рисунок 3 – Динамика изменений тромбинового времени у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

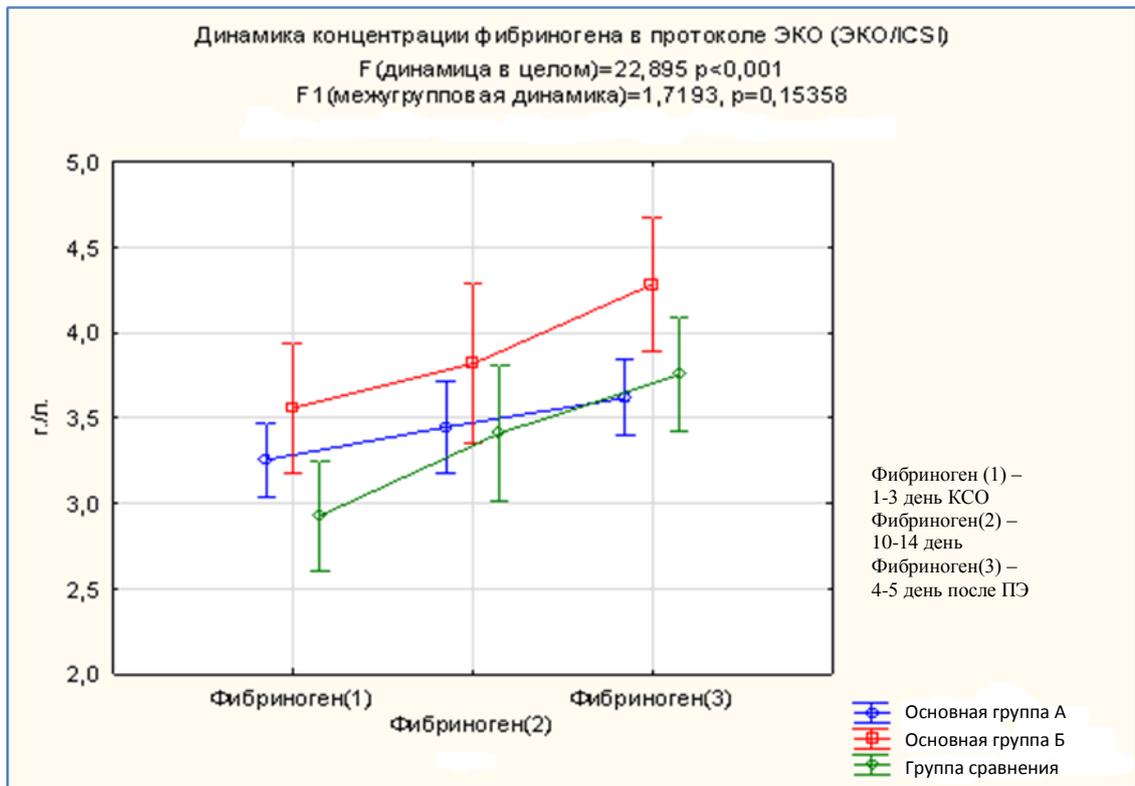


Рисунок 4 – Динамика изменений концентрации фибриногена у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

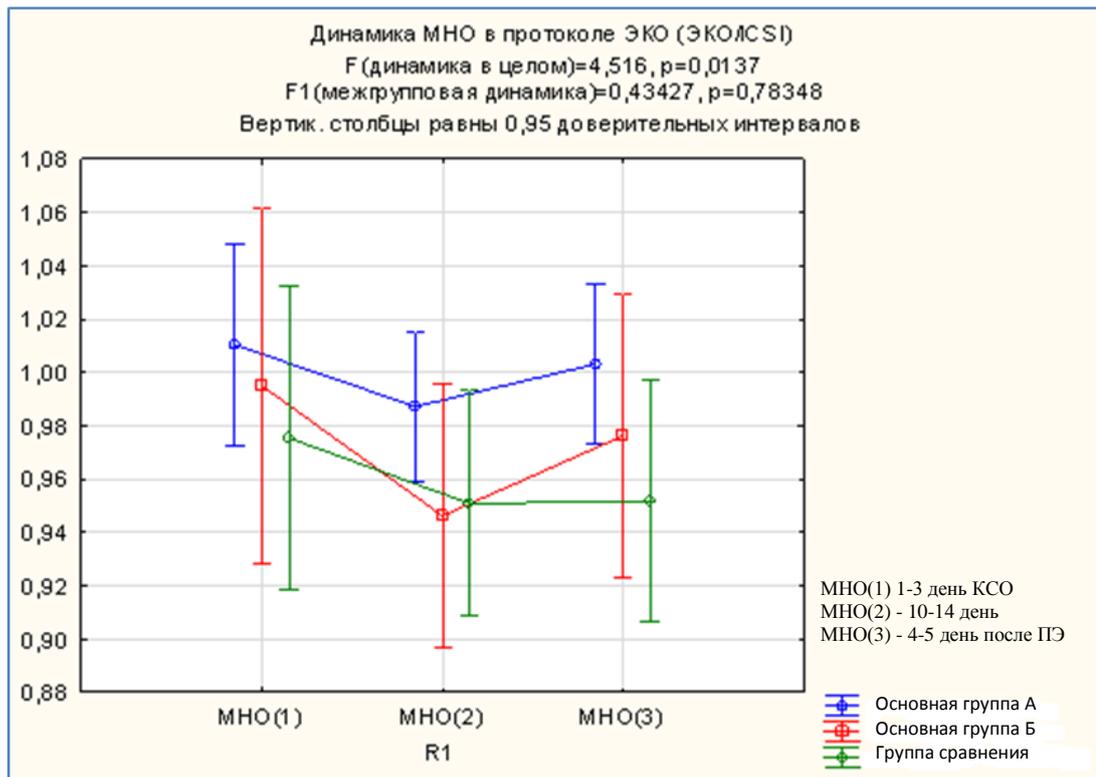


Рисунок 5 – Динамика изменений МНО у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

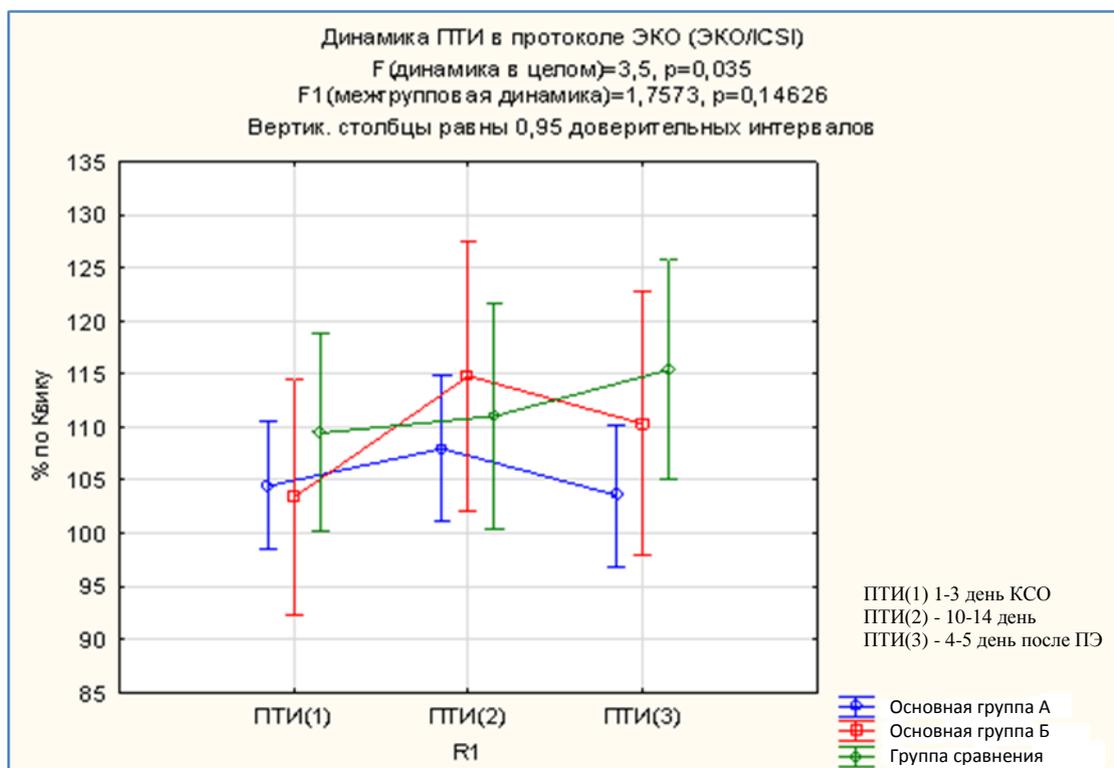


Рисунок 6 – Динамика изменений протромбинового индекса у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

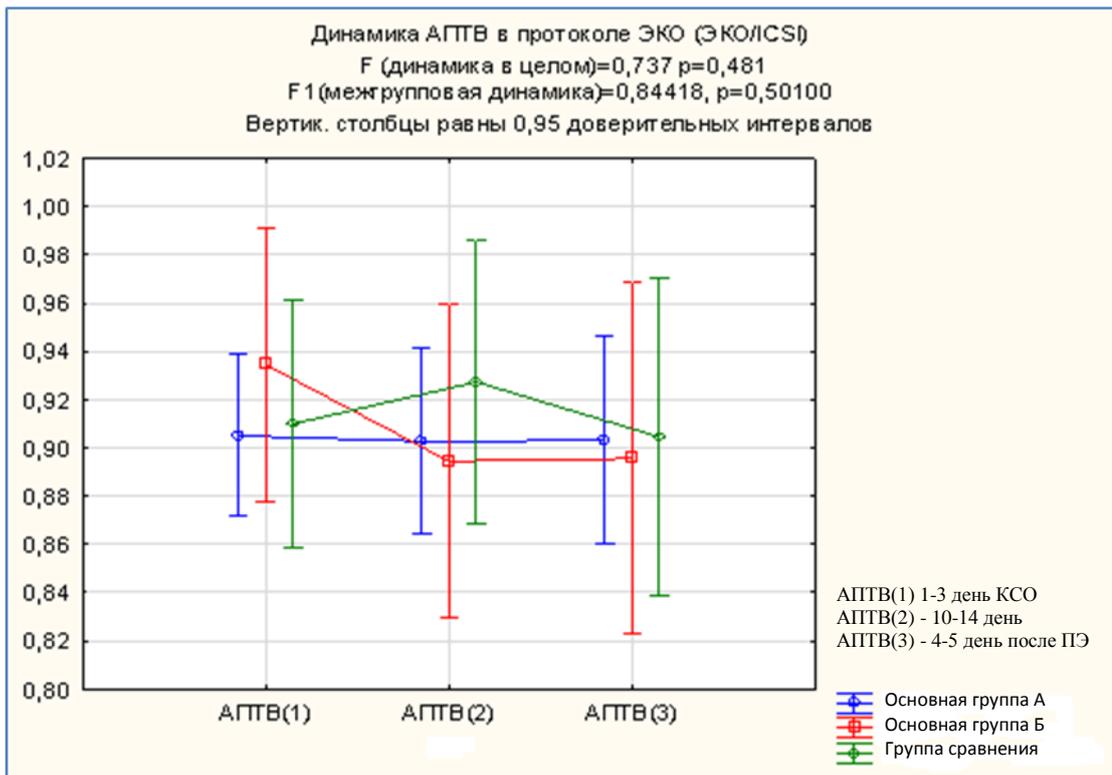


Рисунок 7 – Динамика изменений индекса АПТВ у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

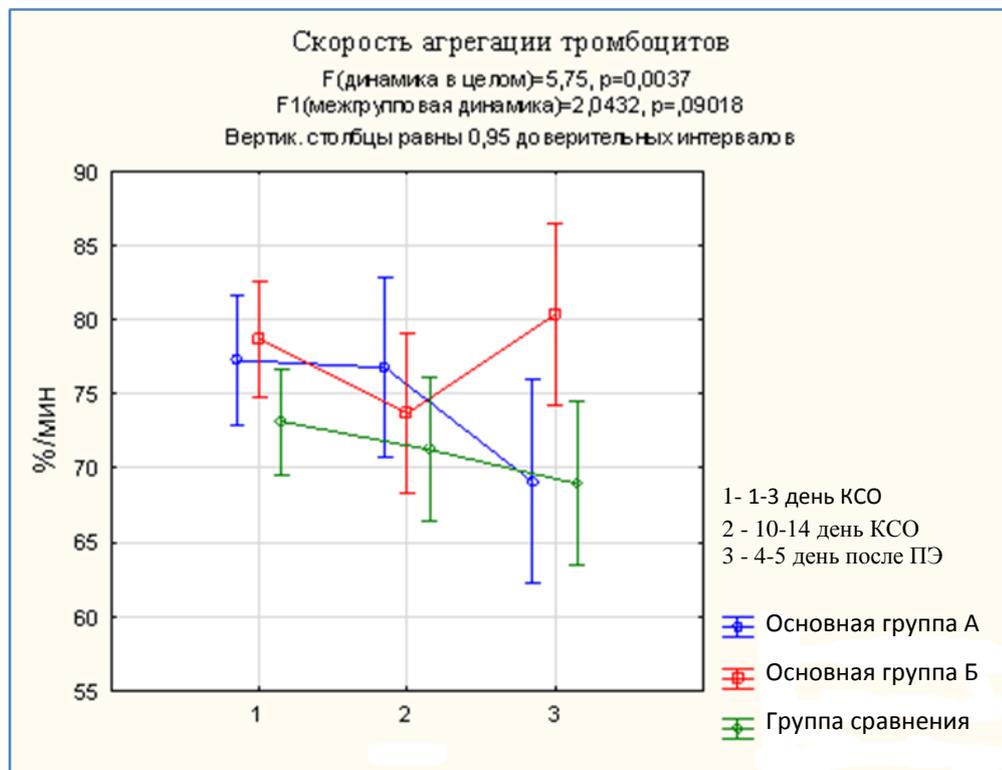


Рисунок 8 – Динамика скорости агрегации тромбоцитов у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)

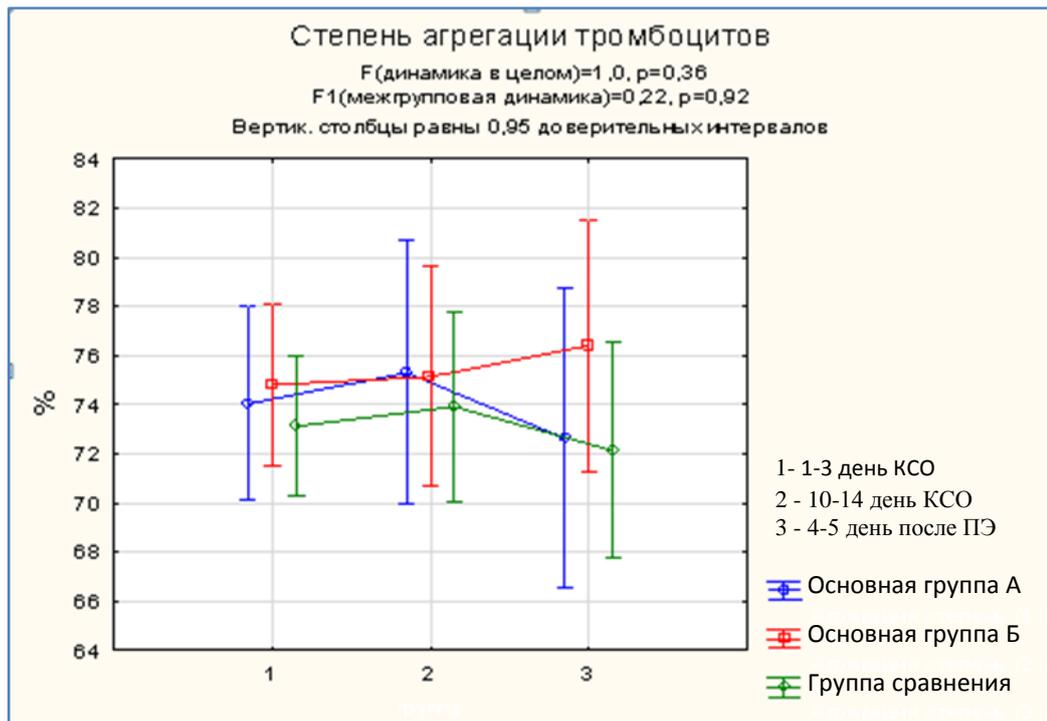


Рисунок 9 – Динамика степени агрегации тромбоцитов
 у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ)