

*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**

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"

**Научные руководители:**

**Зайнулина Марина Сабировна** – доктор медицинских наук, профессор

**Сельков Сергей Алексеевич** – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Макацария Александр Давидович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Калинина Елена Анатольевна** – доктор медицинских наук, доцент, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В.Леонова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 999.120.02 при ФГБОУ ВО "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова" Минздрава России по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого 6-8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова" Минздрава России и на сайте [www.1spbgmu.ru](http://www.1spbgmu.ru).

Автореферат разослан " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук

Молчанов Олег Леонидович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** 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 [De Geyter C., Calhaz-Jorge C., 2018].

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 [Радзинский В.Е., Димитрова В.И., 2016].

По данным литературы, частота выявления АФА у женщин с многократными неудачами ЭКО колеблется от 8% до 42,1% [Машкова, Т.Я., 2015; Стулева Н.С., Хизроева Д.Х., 2015]. Обнаружение одного или более видов АФА приводит к трехкратному увеличению риска неудач ЭКО [Di Nisio M., Rutjes A.W.S., 2011]. Доказано, что женщины с АФА после проведения ЭКО имеют значимо выше риск невынашивания беременности [Di Nisio M., Ponzano A., 2018; Levine A., Lockshin M., 2014; Zhong Y.P, Ying Y., 2011]. Установлена прямая взаимосвязь между неудачами ЭКО и наличием АФА [Стулева Н.С., Хизроева Д.Х., 2015; Di Nisio M., Rutjes A.W.S., 2011]. Существуют и диаметрально противоположная позиция исследователей, отрицающих эту взаимосвязь и выступающих против необходимости обследования на АФА перед протоколом ЭКО и применения терапии с целью улучшения исходов ЭКО [Hong Y.H., Kim S.J., 2018].

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 (НК-клеток), усиление протромботических механизмов и десинхронизация процессов фибринолиза и

фибринообразования, а также негативное влияние АФА на развитие эмбриона [Макацария А.Д., Бицадзе В.О., 2011; Di Simone N., Di Nicuolo F., 2010].

Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов, что способствует развитию гиперкоагуляции [Beck-Fruchter R., Gavish I., 2018; Gerotziapas G.T., Van Dreden P., 2017] и может привести к артериальным и венозным тромбозам. Эпизоды венозной тромбоэмболии встречаются в 0,08-0,11% случаев женщин, выполняющих ЭКО [Chan W.S., Dixon M.E., 2008], представляя, по крайней мере, 10-кратное увеличение базового риска венозной тромбоэмболии у женщин репродуктивного возраста. Женщины с АФС относятся к группе риска развития ТЭО в протоколе ЭКО, что требует особого подхода к назначению антитромботической терапии [Акиньшина С.В., Макацария А.Д., 2014].

Среди рекомендуемых схем ведения женщин с АФС в протоколе ЭКО наиболее часто встречается комбинация низких доз АСК (75-100 мг) и профилактических доз низкомолекулярных гепаринов (НМГ) [Andreoli L., Bertias G.K., 2017].

Перспективным, но малоизученным является использование иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) при применении ВРТ [Coulam C.V., Acacio V., 2012; Leong H., Stachnik J., 2008]. Применение ВВИГ у женщин с АФС на ранних сроках беременности и во 2 триместре приводило к снижению частоты невынашивания беременности и развития акушерских осложнений [Сельков С.А., Зайнулина М.С., 2012]. Высокая эффективность данной терапии объясняется позитивным влиянием на баланс иммунокомпетентных клеток, в частности на уровень Т-регуляторных лимфоцитов [Чугунова А.А., Зайнулина М.С., 2012]. Использование ВВИГ в протоколе ЭКО у женщин с неудачами ЭКО и бесплодием неясной этиологии увеличивало эффективность ЭКО до 61% [Carp H.J.A., 2007].

В связи со значительной частотой выявления АФА в группе женщин, имеющих множественные неудачные попытки ЭКО в анамнезе, риском развития тромбоэмболических осложнений 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.

**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 клинико-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.** 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  $\beta$ 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 антитромбина-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  $\beta$ -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.** Диссертационная работа выполнена на основании обследования 218 женщин. Для выполнения поставленных целей и задач исследования использованы коагулогический, иммуноферментный, ультразвуковой, морфологический метод и метод проточной цитофлуориметрии, выполнен статистический анализ полученных результатов.

#### **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 антитромбина-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 г.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 печатных работ, в том числе 5 статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

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 "Родильный дом № 6 им. проф. В.Ф. Снегирева".

**Личный вклад автора в исследование.** Соискателем проведено 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Для решения поставленных задач в период с 2012 по 2014 г. проведено обследование 280 женщин репродуктивного возраста на базе ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта". Из обследованных женщин в анализируемые группы были включены 191, которые соответствовали критериям включения в исследование.

*Критериями включения в исследование являлись:* возраст от 18 до 38 лет; наличие отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза (невынашивание беременности, многократные неудачные попытки ЭКО (3 и более), преэклампсия, плацентарная недостаточность, антенатальная гибель плода); лечение бесплодия с использованием методов ЭКО (ЭКО/ИКСИ); стимуляция яичников в протоколе с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ); согласие женщины на участие в программе исследования.

*Критериями не включения:* возраст младше 18 лет и старше 38 лет; наличие острых и обострение хронических инфекционных заболеваний, наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии (почечной, печеночной недостаточности, сахарный диабет 1 и 2 типа, тяжелых заболеваний печени, свертывающей системы крови); тяжелые нарушения сперматогенеза: аспермия, азооспермия, астенотератозооспермия тяжелой степени; гипер- и гипогонадотропная недостаточность яичников; отказ женщины от участия в программе исследования.

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

Среди 191 женщины, включенной в исследование, у 128 были выявлены превышающие нормы значения антифосфолипидных аутоантител. С целью профилактики тромбоэмболических осложнений 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 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 ВВИГ 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 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, третья инфузия на 13-15 день КСО.

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

**Лабораторный метод.** Перед включением в исследование всем женщинам были выполнены однократно анализы на наличие в сыворотке крови волчаночного антикоагулянта, антител (IgG, IgM) к отрицательно заряженным фосфолипидам (кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте), антител к  $\beta 2$ -гликопротеину-1, к аннексину-5, протромбину.

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). Исследования проводили в лаборатории биохимии с клинико-диагностическим отделением (рук. – з.д.н. РФ, д.б.н., проф. Арутюнян А.В.).

Каждой пациентке в процессе исследования 3 раза выполняли анализ показателей коагулограммы, содержания Д-димеров и оценку АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. 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.

**Исследование иммунологического статуса.** Взятие крови для выполнения анализа иммунологических параметров проводилось до начала включения в исследование и включило в себя: оценку субпопуляционного состава лимфоцитов (лимфоцитов CD3+, Т-хелперов CD3+CD4+, цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+, В-лимфоцитов CD19+, НК-клеток CD3-16+56+, иммунорегуляторный индекс CD3+CD4+/CD3+CD8+), определение Т-регуляторных лимфоцитов и их индексных показателей (Т-reg, Т-reg/NK, Т-reg/CD19+), а также содержания НКТ-клеток (CD3+CD56+) и активированных НК-клеток (НК-клеток, экспрессирующих CD107 и CD107a).

Исследование показателей иммунологического статуса и уровня АФА выполнялось в отделе иммунологии с группой по диагностике СПИД (руководитель отделения – з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Сельков С.А.).

**Ультразвуковой метод.** Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проводили при первичном и каждом последующем приеме пациенток в ходе проведения протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) в отделении ВРТ ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" (рук. – д.м.н. Гзгзян А.М.).

Стимуляцию яичников в цикле ЭКО (ЭКО/ИКСИ) проводили, начиная со 2-3 дня менструального цикла, с использованием препаратов антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона и гонадотропинов. В дальнейшем с помощью УЗИ выполнялся УЗ-мониторинг роста фолликулов и эндометрия.

При достижении трех и более фолликулов размера 17 мм, вводили триггер овуляции, после чего под контролем УЗИ через 35-37 ч проводили трансвагинальную пункцию фолликулов.

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

**Морфологический метод.** 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 Van Steiterghem A., на 4 сутки по Тао J., на 5 день по критериям оценки, предложенным Gardner D.K.

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 морфологические исследования осуществляли на отделении ВРТ ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта".

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**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  $32,13 \pm 3,44$  года (ДИ95% 31,6-32,62). Наибольшее число всех обследованных женщин находилось в возрастном интервале 30-34 года. Пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по возрастным характеристикам.

Не было выявлено статистически значимых различий в параметрах репродуктивной и менструальной функции, частоте применения методов ВРТ и виду бесплодия. Среди женщин с циркуляцией АФА у 32,8% (42/128) в анамнезе было невынашивание

беременности. Среди женщин с циркуляцией АФА у 36,7% (47/128) женщин в анамнезе были многократные неудачные попытки ЭКО (ЭКО/ИКСИ). У каждой десятой пациентки с АФА причина бесплодия не была установлена.

Анализ структуры сопутствующей гинекологической и соматической патологии не выявил различий в сравниваемых группах. Не было выявлено также значимых различий по сывороточным уровням гормонов и показателей спермиологического исследования супругов.

При оценке параметров стимуляции 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.

Таким образом, пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по клинико-анамнестическим, исходным лабораторным данным и основным параметрам стимуляции и стало возможным проведение дальнейшего сравнения результативности их программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

**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 (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение результатов программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с наличием или отсутствием АФА в расчете на перенос эмбрионов

| Показатель результативности  | Основная группа<br>Б (АФА+ВВИГ-) | Группа<br>сравнения<br>(АФА-ВВИГ-) | p                    |
|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Частота регистрации положительного анализа на $\beta$ -ХГЧ   | 32,65% (35,71%)                  | 32% (32,79%)                       | p>0,05               |
| Процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на $\beta$ -ХГЧ | 62,5% (60%)                      | 90% (93,75%)                       | p=0,046<br>(p=0,033) |
| Частота клинической беременности   | 20,41% (21,43%)                  | 29,5% (32%)                        | p>0,05               |
| Частота невынашивания беременности до 10 недель  | 50% (46,67%)                     | 25% (25%)                          | p>0,05               |
| Частота невынашивания беременности после 10 недель   | 0                                | 5% (0)                             | p>0,05               |
| Частота родов  | 15,59% (19,05%)                  | 22,22% (24%)                       | p>0,05               |

Примечание: Первым указано значение показателей результативности, определенные у всех женщин, которым выполнялся перенос эмбрионов в полость матки. В скобках указаны значения показателей результативности после исключения из анализа женщин, которым были перенесены эмбрионы низкого качества.

У женщин с циркуляцией АФА был значимо ниже процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на  $\beta$ -ХГЧ, по сравнению с женщинами без АФА (60% и 93,75%,  $p=0,033$ ), что говорит об увеличении доклинических потерь беременности и может указывать на роль АФА в прерывании беременности на самых ранних этапах инвазии эмбриона.

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.

**Сравнение данных иммунологического обследования у женщин с наличием АФА и здоровых женщин.** Женщины с циркуляцией АФА имели множественные значимые отличия в результатах иммунологического обследования, по сравнению со здоровыми небеременными женщинами (таблица 2).

Таблица 2 – 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) | p       |
|----------------------------------|-----------------------------------|--|---------|
| Лимфоциты (CD3+), тыс./мкл       | 1,29±0,46                         | 1,59±0,49                                      | p=0,01  |
| Лимфоциты (CD3+), %              | 74,71±4,79                        | 73,39±8,98                                     | p>0,05  |
| Т-хелперы (CD3+CD4+), тыс./мкл   | 0,79±0,29                         | 0,95±0,33                                      | p=0,03  |
| Т-хелперы (CD3+CD4+), %          | 46,12±7,32                        | 43,49±7,73                                     | p>0,05  |
| ЦТЛ (CD3+CD8+), тыс./мкл         | 0,46±0,19                         | 0,55±0,18                                      | p=0,043 |
| ЦТЛ (CD3+CD8+), %                | 26,38±6,14                        | 25,70±5,83                                     | p>0,05  |
| НК-клетки (CD3-16+56+), %        | 12,01±3,87                        | 14,74±9,69                                     | p>0,05  |
| НК-клетки (CD3-16+56+), тыс./мкл | 0,2±0,08                          | 0,34±0,28                                      | p=0,005 |
| В-лимфоциты (CD19+), тыс./мкл    | 0,21±0,11                         | 0,22±0,08                                      | p>0,05  |
| В-лимфоциты (CD19+), %           | 12,24±3,74<br>11,6 (9,7;13,78)    | 10,22±2,83<br>9,85 (8,43;11,78)                | p=0,029 |
| ИРИ (CD3+CD4+/CD3+CD8+)          | 1,86±0,59                         | 1,79±0,58                                      | p>0,05  |

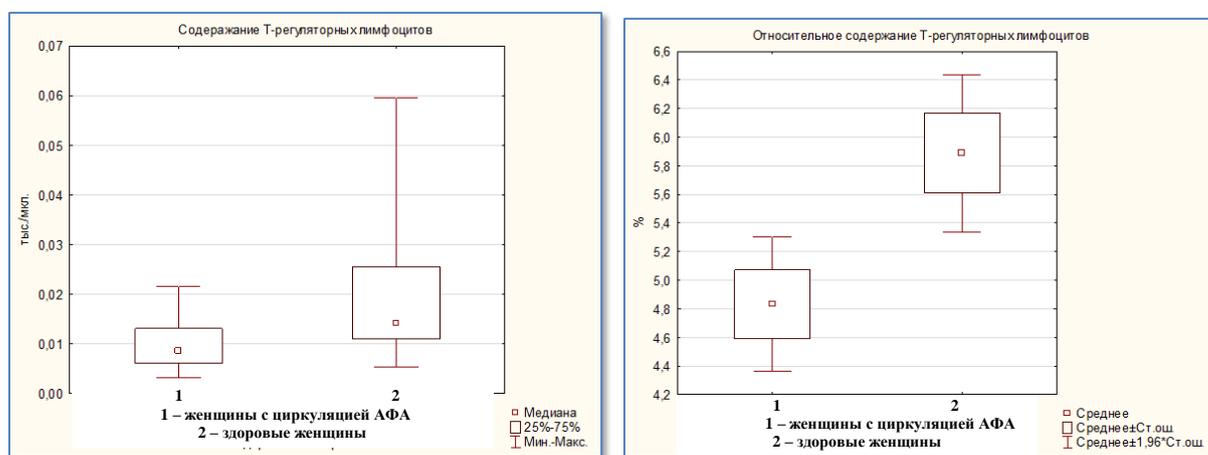
Одним из наиболее значимых различий в субпопуляционном составе лимфоцитов у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА в сравнении со здоровыми женщинами явилось значимо большее относительное содержание В-лимфоцитов CD19+ (11,6 (9,7;13,78) и 9,85 (8,43;11,78),  $p=0,029$ ), соответственно. Более высокий уровень В-лимфоцитов CD19+ может отражать присутствие аутоиммунного процесса.

У женщин с циркуляцией АФА также достоверно ниже абсолютное содержание CD3+ лимфоцитов (1,29±0,46 и 1,59±0,49,  $p=0,010$ ), абсолютное содержание цитотоксических

лимфоцитов CD3+CD8+ ( $0,46 \pm 0,19$  и  $0,55 \pm 0,18$ ,  $p=0,043$ ) и абсолютное содержание Т-хелперов CD3+CD4+ ( $0,79 \pm 0,29$  и  $0,95 \pm 0,33$ ,  $p=0,030$ ).

Наибольший интерес в популяции CD4+ лимфоцитов представляют Т-регуляторные лимфоциты, в связи с чем было выполнено сравнение их абсолютного и относительного содержания у женщин с циркуляцией АФА и здоровых женщин без репродуктивной патологии (рисунки 1, 2).

У женщин с циркуляцией АФА значимо ниже показатели абсолютного ( $0,008$  ( $0,006$ ;  $0,013$ ) и  $0,014$  ( $0,01$ ;  $0,025$ ),  $p < 0,001$ ) и относительного ( $4,83 \pm 1,63$  и  $5,89 \pm 1,46$ ,  $p=0,007$ ) содержания Т-регуляторных лимфоцитов, по сравнению со здоровыми женщинами. У женщин с циркуляцией АФА также достоверно ниже отношение абсолютного содержания Т-регуляторных клеток к NK-клеткам ( $0,05 \pm 0,02$  и  $0,06 \pm 0,01$ ,  $p=0,007$ ).



Рисунки 1, 2 – Сравнение абсолютного и относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов у женщин с циркуляцией АФА и здоровых небеременных женщин.

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.

Т-регуляторные клетки – центральные регуляторы иммунного ответа. Снижение их количества может негативно сказаться на реализации репродуктивной функции из-за ухудшения контроля ими силы и продолжительности иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторных клеток (Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов).

У женщин с циркуляцией АФА также проводилось сравнение показателей активности NK-клеток и содержания НКТ-клеток с результатами обследования женщин

без репродуктивной патологии (таблица 3).

Таблица 3 – 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) | p       |
|---|-----------------------------------|--|---------|
| НКТ-клетки, %   | 4,9 (3,25; 7,9)                   | 6,1 (3,4; 8,1)                                 | p>0,05  |
| НКТ-клетки, тыс./мкл  | 0,089 (0,036; 0,133)              | 0,13 (0,08; 0,17)                              | p=0,009 |
| Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), %                       | 0,9 (0,7; 1,25)                   | 1,1 (0,8; 1,3)                                 | p>0,05  |
| Активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107a), тыс./мкл                | 0,015(0,01; 0,02)                 | 0,02 (0,014; 0,03)                             | p=0,036 |
| Индукцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), %        | 27,7 (22,5; 30,3)                 | 24,9 (20,5; 29,1)                              | p>0,05  |
| Индукцированная активность НК-клеток (НК-клетки, экспрессирующие CD107), тыс./мкл | 0,49 (0,4-0,62)                   | 0,49 (0,39; 0,67)                              | p>0,05  |

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 с женщинами без репродуктивной патологии. Снижение количества НК-клеток в периферической крови может быть следствием их перераспределения в сторону эндометрия, где они и могут оказывать цитотоксический эффект.

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, НКТ-клеток, а также НК-клеток и их индуцированной активности.

**Частота выявления АФА в обследуемых группах.** Основная группа А (с иммунотерапией) и основная группа Б (без иммунотерапии) были сопоставимы по частоте выявления различных видов АФА. (таблица 4).

Наиболее часто в обеих группах выявлялся волчаночный антикоагулянт (ВА) (51,94% и 62,74%, p=0,31), что может быть объяснено тем, что скрининговый тест на ВА входит в перечень показателей коагулограммы, выполняемой в ФГБНУ "НИИАГиР им.Д.О.Отта". У каждой третьей женщины из основной группы А (31,16%) и у каждой четвертой женщины из основной группы Б (19,6%) были выявлены антитела к  $\beta$ 2гликопротеину-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%,  $p=1,0$ ).

Таблица 4 – Частота выявления повышенного уровня аутоантител и их сочетаний в основной группе А и Б

| Вид АФА                           | Основная группа А<br>(n=77) | Основная группа Б<br>(n=51) | p        |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|
|                                   | отн., %                     | отн., %                     |          |
| Антитела к кардиолипину           | 22,07                       | 15,69                       | $p>0,05$ |
| Антитела к фосфатидилсерину       | 11,68                       | 7,8                         | $p>0,05$ |
| Антитела к фосфатидилинозитолу    | 9,0                         | 5,89                        | $p>0,05$ |
| Антитела к фосфатидиловой кислоте | 9,0                         | 3,92                        | $p>0,05$ |
| Антитела $\beta 2$ гп-1           | 31,16                       | 19,6                        | $p>0,05$ |
| Антитела к аннексину V            | 11,69                       | 15,69                       | $p>0,05$ |
| Антитела к протромбину            | 3,89                        | 9,8                         | $p>0,05$ |
| ВА                                | 51,94                       | 62,74                       | $p>0,05$ |

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. 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 ( $p=0,4$ ).

**Оценка взаимосвязи между показателями субпопуляционного состава лимфоцитов и уровнем АФА и анализ корреляционной взаимосвязи между АФА различных видов.** При оценке взаимосвязи между АФА и показателями субпопуляционного состава лимфоцитов были выявлены корреляции слабой силы. 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 ( $r=-0,39$ ). 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.

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 (таблица 5).

Таблица 5 – 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 | –       |

Наиболее значимая 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.

**Динамика изменений показателей системы гемостаза при проведении протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).** Процесс стимуляции в протоколе ЭКО характеризуется значительным супрафизиологическим повышением уровня эстрогенов, что способствует развитию гиперкоагуляции и может привести к артериальным и венозным тромбозам, в связи с чем важным представляется оценка изменений показателей системы гемостаза в динамике (рисунки 4-7).

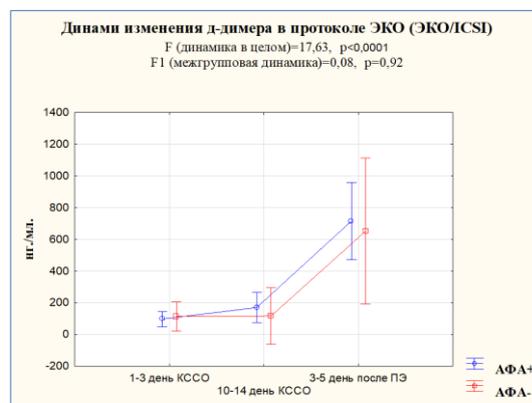
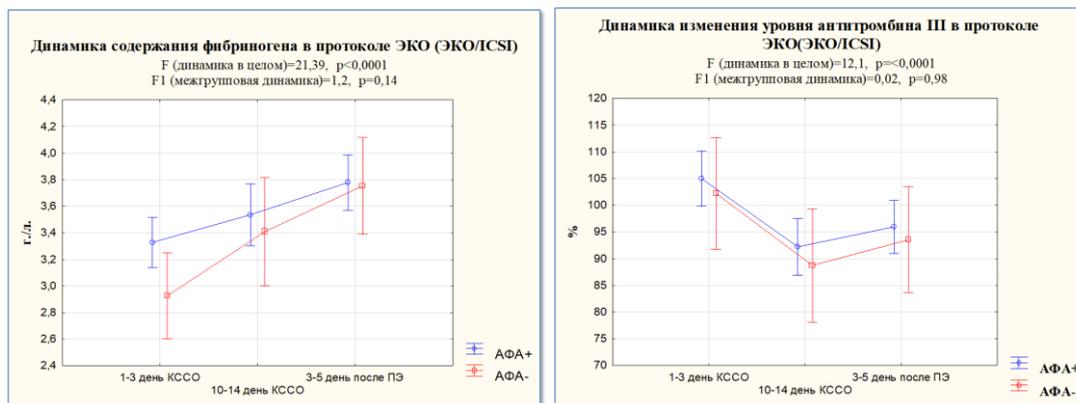
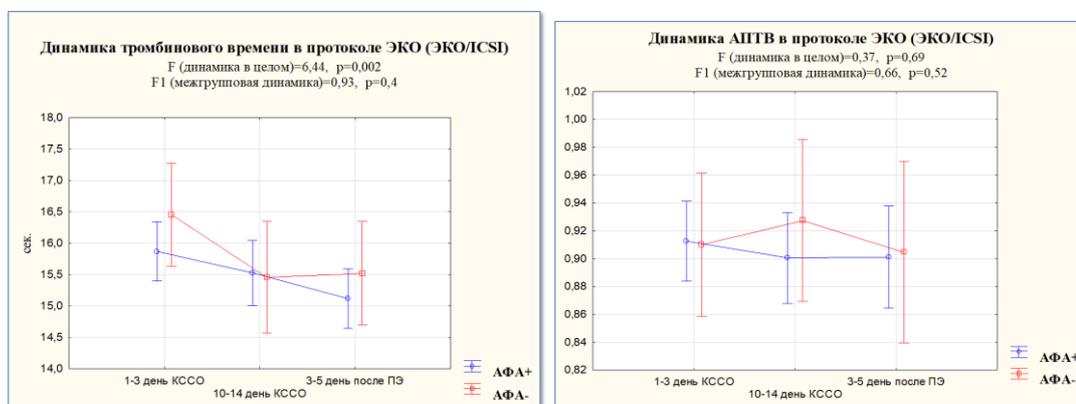


Рисунок 4 – Динамика содержания уровня Д-димеров у пациенток с наличием и отсутствием АФА в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).



Рисунки 5-6 – Динамика содержания уровня фибриногена и естественного антикоагулянта АТ-III у пациенток обследуемых групп в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).



Рисунки 6-7 – Динамика изменений тромбинового времени и АПТВ у пациенток с наличием и отсутствием АФА в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

При изучении динамики изменения показателей системы гемостаза в течение протокола ЭКО (ЭКО/ИКСИ) была выявлена схожая тенденция у женщин с наличием и отсутствием АФА, что проявлялось нарастанием коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена,  $p<0,001$ ), активацией внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров,  $p<0,001$ ) и уменьшением активности антикоагулянтной системы (снижение содержания естественного антикоагулянта – АТ-III,  $p<0,001$ ).

Все показатели, кроме ПТИ и АПТВ имели значимую динамику различий, однако ни в одном исследуемом показателе не было выявлено значимой внутригрупповой динамики.

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.

**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 (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнение результатов программ ЭКО (ЭКО/ИКСИ) у женщин с АФА, получавших ВВИГ и женщин с АФА, не получавших ВВИГ в расчете на перенос эмбрионов

| Показатель результативности  | Основная группа А (АФА+ВВИГ+) | Основная группа Б (АФА+ВВИГ-) | p                    |
|--|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Частота регистрации положительного анализа на $\beta$ -ХГЧ   | 47,06% (48,39%)               | 32,65% (35,71%)               | p>0,05               |
| Процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на $\beta$ -ХГЧ | 90,62% (93,3%)                | 62,5% (60%)                   | p=0,019<br>(p=0,019) |
| Частота клинической беременности   | 42,65 % (45,16%)              | 20,41% (21,43%)               | p=0,012<br>(p=0,021) |
| Частота невынашивания беременности до 10 недель  | 31,25% (26,67%)               | 50% (46,67%)                  | p>0,05               |
| Частота невынашивания беременности после 10 недель   | 3,13% (3,33%)                 | 0                             | p>0,05               |
| Частота родов  | 27,27% (33,33%)               | 15,69% (19,05%)               | p>0,05               |

Примечание: Первым указано значение показателей результативности, определенные у всех женщин, которым выполнялся перенос эмбрионов в полость матки. В скобках указаны значения показателей результативности после исключения из анализа женщин, которым были перенесены эмбрионы низкого качества

Частота наступления клинической беременности в группе женщин с АФА, получивших ВВИГ (основной группе А), составила 42,65%, что значимо выше, по сравнению с женщинами с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ (основной группе Б), где клиническая беременность была зарегистрирована лишь у 20,41% женщин (p=0,012).

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%).

Частота ранних репродуктивных потерь, определяемая по проценту регистрации клинической беременности от женщин с положительным  $\beta$ -ХГЧ, была значимо ниже у женщин с АФА, получивших ВВИГ (основная группа А), по сравнению с женщинами с АФА не получившими ВВИГ (основной группы Б) (90,62 и 62,5%, p=0,019).

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.

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). Необходимо дальнейшее изучение эффективности продолжения терапии ВВИГ при беременности.

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.

Таким образом, применение иммунотерапии ВВИГ снижает процент ранних репродуктивных потерь у женщин с циркуляцией АФА и увеличивает частоту регистрации клинической беременности, что может быть объяснено положительным влиянием ВВИГ на баланс иммунокомпетентных клеток, прежде всего на регуляторное звено иммунной системы.

**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 (таблица 7).

При сравнении показателей развития эмбрионов (ЭКО/ИКСИ) в трех обследуемых группах различий выявлено не было. Однако при увеличении выборки за счет объединения женщин с АФА получавших и не получавших ВВИГ в одну группу было обнаружено, что у женщин с циркуляцией АФА доля эмбрионов хорошего качества на 3 день культивации значимо меньше, по сравнению с женщинами без АФА (77,8 (50; 100) и 100 (66,7; 100),  $p = 0,016$ ). На 4 день после оплодотворения значимых различий выявлено не было (56,3 (20; 80) и 66,7 (44,8; 84),  $p = 0,13$ ).

Таблица 7 – Характеристика показателей развития эмбрионов на 2-4 сутки культивирования у женщин с наличием и отсутствием АФА

| Параметр                            | АФА+ (n=128) |             |      | АФА- (n=63) |            |      | 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 | p>0,05  |
| Доля эмбрионов хорошего качества, % | 71,36        | 65,78-76,94 | 2,82 | 70,3        | 61,5-79,1  | 4,38 | p>0,05  |
| 3 день после оплодотворения         |              |             |      |             |            |      |         |
| Кол-во эмбрионов                    | 4,8          | 4,1-5,5     | 0,36 | 4,61        | 3,8-5,4    | 0,4  | p>0,05  |
| Доля эмбрионов хорошего качества, % | 71,17        | 65,2-77,12  | 3,02 | 81,1        | 73,8-88,32 | 3,62 | 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 | p>0,05  |
| Доля эмбрионов хорошего качества, % | 54,1         | 46,7-61,5   | 3,73 | 62,9        | 55,3-70,5  | 3,8  | p>0,05  |

Полученные различия на 3 день культивации эмбрионов могут говорить о возможном негативном влиянии АФА на развитие эмбриона, однако отсутствие различий на 2 и 4 день после оплодотворения говорит о необходимости дальнейших исследований с увеличением количества пациенток для оценки взаимосвязи между качеством эмбрионов и циркуляцией АФА.

## 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  $\beta$ -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±0,19 и 0,55±0,18,  $p = 0,043$ ), Т-хелперов CD3+CD4+ (0,79±0,29 и 0,95±0,33,  $p = 0,030$ ), NK-клеток (0,2±0,08 и 0,34±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 комплекс обследования женщин с бесплодием при наличии многократных неудач ВРТ необходимо включить анализ крови на антифосфолипидные аутоантитела (антитела к кардиолипину,  $\beta$ 2гликопротеину-1, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте и волчаночный антикоагулянт).

2. Женщин с наличием антифосфолипидных антител следует относить в группу риска по неудачным исходам программ ЭКО 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 циркулирующей антифосфолипидных антител и многократными неудачами ВРТ рекомендуется 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Ведение женщин с тромбофилией на этапе подготовки к экстракорпоральному оплодотворению / М.И. Миравшили, М.С. Зайнулина, И.Ю. Коган [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т.LXI, № 5. – С. 60-67.**

2. **Дискуссионные вопросы ведения женщин с антифосфолипидными антителами при применении ВРТ/ М.И. Миравшили, М.С. Зайнулина, С.А. Сельков [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т.62, № 3. – С. 26-33.**

3. **Клинико-иммунологические аспекты ведения женщин с неудачами ВРТ / М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, С.В. Чепанов [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – Т.63, № 5. – С. 89-95.**

4. **Кривонос, М.И. Антифосфолипидный синдром и ранние репродуктивные потери / М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, С.А. Сельков // Журнал акушерства, гинекологии и репродукции. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 114-122.**

5. **Состояние системы гемостаза у пациенток с наличием антифосфолипидных антител в протоколе ЭКО/ М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, С.А. Сельков [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология: тезисы. – Москва, 2016. – № 3, прил. 1. – С. 224-225.**

6. **Кривонос, М.И. Роль антифосфолипидных антител в формировании неблагоприятных исходов ЭКО (ЭКО/ICSI) и возможности их профилактики при применении внутривенных иммуноглобулинов/ М.И. Кривонос // Национальный конгресс "Дискуссионные вопросы современного акушерства": тезисы. – СПб., 2017. – С. 115-116.**

7. **The use of intravenous immunoglobulin in APA-positive women undergoing in vitro fertilization / M. Krivonos, M. Zainulina, S. Chepanov [et al.] // Thrombosis research. – 2017. – Vol.151, sup.1. – P-091.**

8. **Опыт применения внутривенного иммуноглобулина в протоколе ЭКО (ЭКО/ICSI) у женщин с бесплодием и носительством антифосфолипидных антител**

/ М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, Е.А. Корнюшина [и др.] // Журнал Акушерство, гинекология и репродукция. – 2017. – Т. 11, № 3. – С. 11-19.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время

АСК – ацетилсалициловая кислота

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

КЛ – кардиолипид

КСО – контролируемая стимуляция овуляции

МНО – международное нормализованное отношение

НМГ – низкомолекулярные гепарины

ПТИ – протромбиновый индекс

ТВ – тромбиновое время

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФИ – фосфатидилинозитол

ФК – фосфатидиловая кислота

ФС – фосфатидилсерин

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

$\beta$ -ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

$\beta$ 2гп-1 –  $\beta$ 2гликопротеин-1

CD – кластер дифференцировки

НК – натуральные киллеры