

АМЯН

Татьяна Сергеевна

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ  
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ  
БЕСПЛОДИЯ У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ  
В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ  
ТЕХНОЛОГИЙ

14.01.01 — Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва, 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук  
доктор медицинских наук

Перминова Светлана Григорьевна  
Кречетова Любовь Валентиновна

Официальные оппоненты:

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, руководитель

Краснопольская Ксения Владиславовна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ГБУЗ Московской области "Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии", отделение репродуктологии, руководитель

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации [http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/AmyanTS\\_diss.pdf](http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/AmyanTS_diss.pdf)

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на современные достижения в области ВРТ, существенной доле супружеских пар не удается достичь наступления беременности после повторных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а также не всегда удается верифицировать причины неудач. Повторные неудачи имплантации - отсутствие клинической беременности после двух и более программ ВРТ при переносе эмбрионов хорошего качества у женщин в возрасте до 40 лет (Cughlan C., 2014). Преодолению повторных неудач имплантации посвящено большое количество как клинических, так и фундаментальных исследований в области репродукции человека (Simon A., 2012, Polanski L, 2014, Bashiri A., 2018 Cughlan C., 2018).

Наименее изученными являются иммунологические аспекты неудач имплантации. Имеются лишь единичные данные о повышении соотношения лимфоцитов Th1/Th2 и снижении супрессивной способности Т-регуляторных клеток в периферической крови у пациенток с повторными неудачами имплантации, не изучены особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у этих женщин (Liang P., 2015, Lashley L., 2015).

Отсутствует единая точка зрения на целесообразность проведения иммунологических исследований и использования различных видов иммунотерапии у женщин с неудачами имплантации в анамнезе (Cochrane Database, 2015, Nastri C., 2015; Nakagawa K., 2015).

Относительно новым и малоизученным методом преодоления неудач имплантации в программе ВРТ является внутриматочное введение перед переносом эмбриона аутологичных моноклеарных клеток периферической крови (МПК). В ряде работ выявлен как позитивный эффект, повышающий вероятность имплантации в «свежих» циклах (Makrigiannakis A., 2015, Yu N., 2016) и в криоциклах (Okitsu O., 2011, Lia S., 2017), так и отсутствие эффекта этого метода в программах ВРТ (Santibañez A., 2014, Volovsky M., 2018).

Механизм повышения вероятности имплантации при использовании внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона не ясен и, по мнению исследователей, может реализовываться за счет поддержки децидуализации эндометрия, формирования оптимального профиля цитокинов и соотношения лимфоцитов Th1/Th2 типа, баланса Т-регуляторных клеток (Okitsu O., 2011, Fujiwara H., 2012, Imakawa K., 2015, Makrigiannakis A., 2015).

В ряде случаев для активации МПК использовали препараты хорионического гонадотропина (ХГч), способствующие повышению продукции мононуклеарными клетками периферической крови цитокинов, необходимых для имплантации (Yu N., 2016, Li S., 2017).

Отсутствие однозначных данных об эффективности данного метода иммунотерапии, персонифицированного подхода к его использованию в зависимости от протокола ВРТ («свежий» цикл или криоцикл) и иммунологических параметров пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ, явилось основанием для проведения настоящего исследования.

#### Цель исследования

Повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации путем внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток перед переносом эмбриона.

#### Задачи исследования

1. Оценить анамнестические, клиничко-лабораторные данные, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.
2. Изучить влияние внутриматочного введения различных видов аутологичных МПК на эффективность программ ВРТ.
3. Изучить зависимость эффективности программ ВРТ от субпопуляционного состава мононуклеарных клеток, предназначенных для внутриматочного введения.

4. Проанализировать зависимость эффективности программ ВРТ от цитокинового профиля супернатантов культур моноклеарных клеток, предназначенных для внутриматочного введения.

5. На основании полученных результатов разработать показания к назначению иммунотерапии МПК и алгоритм ее проведения у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

#### Научная новизна

Получены данные о нарушении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ, характеризующееся высоким уровнем лимфоцитов с естественной киллерной функцией и низким уровнем регуляторных TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов.

Изучено влияние внутриматочного введения перед переносом эмбриона аутологичных МПК, активированных ХГч, так и без активации на эффективность программ ВРТ в «свежих» циклах и криоциклах у пациенток с повторными неудачами имплантации. Обосновано иммуномодулирующее влияние ХГч на МПК.

Доказана зависимость эффективности программ ВРТ с использованием иммунотерапии МПК от субпопуляционного состава моноклеарных клеток периферической крови и цитокинового профиля супернатантов культур МПК.

#### Практическая значимость

Дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови позволяет рекомендовать проведение иммунотерапии МПК в программах ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Выявлены иммунологические предикторы, позволяющие рекомендовать проведение иммунотерапии МПК как в «свежем» цикле (CD16<sup>+</sup> NK-лимфоцитов >12,4% и Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low/</sup>) ≤6,6% ), так и в криоцикле (CD56<sup>+</sup> ≤16,3 %, CD56<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$  ≤ 2,5 % и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов ≤12,5%).

Анализ исходов программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в зависимости от позволил определить персонафицированный подход к проведению иммунотерапии МПК в программах ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

#### Положения, выносимые на защиту

1. У пациенток репродуктивного возраста с нормальным овариальным резервом, с бесплодием трубно-перитонеального генеза, имеющим в анамнезе две и более повторные неудачи имплантации, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови характеризуется высоким уровнем лимфоцитов с естественной киллерной функцией и низким уровнем регуляторных TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов, что позволяет рекомендовать проведение иммунотерапии в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

2. У пациенток с повторными неудачами имплантации проведение внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток повышает эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий в 1,7 раза по сравнению с группой плацебо. Активация моноклеарных клеток хорионическим гонадотропином повышает эффективность криопротоколов в 1,2 раза по сравнению с группой с введением неактивированных моноклеарных клеток, но не влияет на исходы «свежих» циклов.

3. Выбор иммунотерапии моноклеарными клетками зависит от типа протокола вспомогательных репродуктивных технологий и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В «свежем» цикле при уровне NK-клеток более 12,4% и T-регуляторных клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>/не более 7% целесообразно использование внутриматочного введения неактивированных аутологичных моноклеарных клеток. В криопротоколе – при уровне NK-клеток более 16% и T-регуляторных клеток с фенотипом TCR $\gamma\delta$  менее 12% - использование внутриматочного введения моноклеарных клеток, активированных хорионическим гонадотропином.

4. Активация мононуклеарных клеток хорионическим гонадотропином приводит к высокому уровню продукции про- и противовоспалительных цитокинов в криопротоколе, что обуславливает более высокую эффективность данного вида иммунотерапии по сравнению с иммунотерапией неактивированными клетками. Супернатанты активированных и неактивированных мононуклеарных клеток, вводимые в стимулированном цикле, не отличались по цитокиновому профилю, что объясняет отсутствие влияния активации мононуклеарных клеток на эффективность «свежего» цикла.

#### Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе научного направления исследования, разработке цели и задач исследования, аналитической и статистической обработке полученных данных. Автор лично проводил обследование и ведение пациенток на всех этапах лечения бесплодия в программах ВРТ с использованием иммунотерапии МПК.

#### Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1-го гинекологического отделения (21.09.2018) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (22.10.2018, протокол № 11).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Разработанная тактика персонифицированного подхода к проведению иммунотерапии МПК с учетом иммунологических предикторов в программах ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе внедрена в практическую деятельность 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы представлены на XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), 35 ежегодной конференции ESHRE (Вена, 2019). Результаты исследования изложены в 5 печатных работах, из них 5 - в ведущих рецензируемых научных журналах.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах, состоит из введения и 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 17 рисунками. Использованная литература включает 10 работ отечественных и 155 зарубежных авторов.

#### Материал и методы исследования

Проведено рандомизированное контролируемое исследование 129 пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе, обратившихся для проведения программы ЭКО и ПЭ, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании (основная группа). Пациентки путем простой рандомизации были стратифицированы в 3 группы в зависимости от вида проводимой иммунотерапии: группа 1 – 42 пациентки, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологичных МПК, активированных ХГч, группа 2 – 42 пациентки, которым проводилось внутриматочное введение аутологичных МПК без активации ХГч, группа 3 (плацебо) – 45 пациенток, которым проводилось внутриматочное введение физиологического раствора.

В зависимости от протокола ВРТ («свежий» цикл и криоцикл), были выделены подгруппы в каждой из трех групп: подгруппа 1а (n=17) – пациентки, которым внутриматочно вводили ХГч-активированные аутологичные МПК в «свежем» цикле, подгруппа 1б (n=25) - пациентки, которым внутриматочно вводили ХГч-активированные аутологичные МПК в криоцикле; подгруппа 2а (n=21) - пациентки, которым внутриматочно вводили не активированные ХГч МПК в «свежем» цикле, подгруппа 2б (n=21) - пациентки, которым



внутриматочно вводили не активированные ХГч МПК в криоцикле; подгруппа 3а (n=22) - пациентки группы плацебо в «свежем» цикле и подгруппа 3б (n=23) - пациентки группы плацебо в криоцикле. Среди пациенток основной группы, как в «свежем» цикле, так и в криоцикле была выделена группа с субоптимальным эндометрием в день переноса эмбриона (М-эхо-7-8 мм), n=60.

Контрольную группу для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови составили 45 фертильных женщин, имеющих в анамнезе беременность, закончившуюся своевременными родами и рождением здорового ребенка, возраст которого на момент исследования не превышал 2-х лет.

Критерии включения: более 2-х неудачных программ ВРТ при переносе эмбрионов хорошего качества; трубно-перитонеальный фактор бесплодия; возраст пациенток до 37 лет включительно; нормальный овариальный резерв; умеренная патозооспермия у супруга; наличие информированного согласия.

Критерии невключения: наличие системных аутоиммунных заболеваний; выраженная патозооспермия; хронический эндометрит, верифицированный при гистологическом и иммуногистохимическом исследовании; врожденные аномалии матки, внутриматочные синехии; интерстициальная или субсерозная миома матки более 4 см, субмукозная миома матки любого размера; полип эндометрия; наружный и внутренний генитальный эндометриоз III-IV степени; «тонкий» эндометрий (толщина эндометрия менее 7 мм); гидросальпинкс и/или тубоовариальное образование с одной или обеих сторон; хромосомные аномалии супругов.

Критерии исключения: причины и осложнения, требующие отмены переноса эмбрионов в данном цикле ЭКО.

Перед началом программы ВРТ всем пациенткам проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Стимуляцию функции яичников проводили по стандартному фиксированному протоколу с антагонистом ГнРГ (антГнРГ) и препаратами рекомбинатного ФСГ (рФСГ) со 2–3-го дня менструального цикла. Стартовая доза индуктора подбиралась с учетом овариального резерва и данных об овариальном ответе на предшествующие стимуляции суперовуляции. После проведения УЗ - мониторинга при необходимости производилась коррекция дозы препаратов гонадотропинов. С 6-го дня стимуляции функции яичников для предотвращения преждевременного пика ЛГ пациенткам вводился антагонист ГнРГ (цетрореликс 0,25 мг подкожно) до дня введения триггера овуляции включительно.

Триггер овуляции (ХГч -10000 МЕ) вводился при наличии лидирующих фолликулов диаметром 17 мм и более. Трансвагинальную пункцию (ТВП) яичников производили в асептических условиях через 35–36 часов после введения препарата ХГч под кратковременным внутривенным наркозом. Перенос эмбрионов в полость матки производили в асептических условиях на 5-е сутки культивирования. Количество переносимых эмбрионов не превышало двух. Оставшиеся эмбрионы хорошего качества были криоконсервированы. Для поддержки лютеиновой фазы использовали микронизированный прогестерон в дозе 600 мг/сутки вагинально со следующего дня после трансвагинальной пункции.

Проведение криоцикла осуществляли на фоне подготовки эндометрия с использованием препаратов эстрогенов и микронизированного прогестерона под контролем УЗИ. Перенос размороженных после витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 5-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона под ультразвуковым контролем.

Эффективность программы оценивали путем исследования концентрации  $\beta$ ХГч в сыворотке крови через 12-14 дней после переноса эмбриона. При уровне  $\beta$ ХГч  $\geq 20$  МЕ/л констатировали положительный результат. При условии положительного  $\beta$ ХГч осуществляли ультразвуковое исследование через 21 день после переноса эмбриона для визуализации плодного яйца. Частоту имплантации

оценивали как отношение числа плодных яиц по данным УЗИ к числу перенесенных эмбрионов. Клиническую беременность диагностировали при наличии живого эмбриона по данным УЗИ через 4-5 недель после переноса эмбриона. Прогрессирующую беременность фиксировали при пролонгировании беременности больше 12 недель.

Методика выделения и внутриматочного введения МПК осуществлялась в соответствии с протоколом «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток», утвержденным на Ученом совете ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 22.12.2015 г.).

Поверхностный фенотип клеток периферической крови определяли с помощью стандартного набора моноклональных антител (мАт), меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) или фикоэритрином (ФЭ), против антигенов CD3(ФИТЦ), CD8(ФЭ), CD16(ФЭ), CD56(ФЭ), CD56(ФИТЦ),  $\gamma\delta$ ТКР (ФЭ) (Becton Dickinson и eBioscience, США). Оценивали содержание регуляторных  $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов, а также содержание субпопуляции естественных Трег как субпопуляцию с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ .

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с использованием программы IPM SPSS Statistics, версия 22. Обработку данных производили общепринятыми методами вариационной статистики. Для количественного параметра были определены: среднее значение (M), среднеквадратичное отклонение ( $\delta$ ), ошибка среднего (m), медиана (Me), 95% доверительный интервал, для качественных данных – частоты (%). Соответствие расчетных выборок показателей нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка с использованием пакета MedCalc12 для Windows 7. Значимость наблюдаемых отклонений средних значений измеренных параметров оценивали с помощью двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента с различными дисперсиями для средних значений с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007. В случае отклонения распределения от нормального представлена медиана (Me) 5 - 95 процентиля (5-

95 P). В этом случае для оценки различий применяли U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Достоверными различия считали при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для оценки диагностической значимости тестов фенотипирования лимфоцитов периферической крови женщин с бесплодием использовали ROC-анализ с применением индекса Юдена пакета MedCalc12 для Windows 7.

### Результаты собственных исследований и их обсуждение

Проведенный анализ клинико–анамнестических и лабораторных данных показал, что исследуемые пациентки с повторными неудачами имплантации были представлены соматически здоровыми женщинами репродуктивного возраста с регулярным менструальным циклом, бесплодием преимущественно трубно-перинеального генеза, и нормальными параметрами овариального резерва. Большинство пациенток имели 3 - 4 неудачные программы ВРТ в анамнезе. Анализ параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа не выявил существенных различий в суммарной дозе гонадотропинов, продолжительности гонадотропной стимуляции, количестве полученных ооцитов и зрелых ооцитов, количестве зигот и бластоцист у пациенток 3-х групп в «свежем» цикле ( $p > 0,05$ ).

Принимая во внимание данные литературы о важной роли субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (в т.ч. уровня НК-клеток и регуляторные Т-лимфоцитов) для прогноза наступления беременности (Li R., 2009, Сухих Г., Ванько Л., 2012, Lu Y., 2013, Lisa E., 2015), нами была проведена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток основной группы, результаты которой выявили, что у женщин с повторными неудачами имплантации имел место значимо более высокий уровень лимфоцитов с естественной киллерной функцией ( $CD16^+$  и  $CD56^+$ ) и значимо более низкий уровень регуляторных Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором типа  $\gamma\delta$  ( $TCR\gamma\delta$ ) и активированных НК-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор  $TCR\gamma\delta$  ( $CD56^+TCR\gamma\delta$ ), что свидетельствует о выраженном дисбалансе субпопуляционного состава лимфоцитов

периферической крови у пациенток с повторными неудачами имплантации (таблица 1).

Таблица 1 - Содержание лимфоцитов с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией в периферической крови женщин с RIF до вступления в программу ЭКО

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов (%) в обследуемых группах	
	основная (n=129)	контрольная (n=45)
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,6 ± 1,7	27,0 ± 1,7
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,4 ± 1,4	3,20 ± 0,3
CD16 <sup>+</sup>	12,9 ± 1,8 *	9,1 ± 0,8
CD56 <sup>+</sup>	17,6 ± 1,7 *	12,2 ± 0,9
CD56 <sup>+</sup> TCRγδ	1,5 ± 0,3 *	2,8 ± 0,5
TCRγδ	7,8 ± 1,0 *	16,0 ± 2,1
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>low/-</sup>	8,2 ± 0,6	7,5 ± 0,3

Примечание. \* - различия со значениями в основной группе до вступления в программу ЭКО по сравнению с контрольной группой значимы при  $p \leq 0,05$ .

Сниженные уровни субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором типа  $\gamma\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ) наряду с низким уровнем активированных НК-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор TCR $\gamma\delta$  (CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ ), несмотря на высокое содержание субпопуляций лимфоцитов с киллерной активностью, могут отражать снижение потенциала к развитию адекватного воспалительного ответа, необходимого для успешной имплантации (Simon A., 2012, Coughlan C, 2014, Makrigiannakis A., 2011), что является основанием для проведения иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

На следующем этапе работы была проведена оценка эффективности внутриматочного введения аутологичных МПК, как активированных ХГч, так и без активации в «свежих» циклах и криоциклах у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Анализ исходов «свежих» циклов показал (Таблица 2), что эффективность программ ВРТ при проведении внутриматочного введения МПК как

активированных ХГч, так и без активации ХГч была существенно выше по сравнению с группой плацебо, о чем свидетельствует более высокая частота биохимической беременности ( $p_3=0,034$ ;  $p_2=0,006$ ), клинической беременности ( $p_3=0,009$ ;  $p_2=0,035$ ), частота имплантации ( $p_3=0,001$ ;  $p_2=0,01$ ), частота прогрессирующей беременности ( $p_3=0,025$ ;  $p_2=0,011$ ) и частота родов ( $p_3=0,024$ ;  $p_2=0,035$ ). Вместе с тем, не выявлено существенных различий в анализируемых показателях у пациенток с иммунотерапией МПК в зависимости от активации ХГч ( $p>0,05$ ).

Таблица 2. Исходы программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона в «свежем» цикле

Параметры	Группа 1а МПК+ХГч (n=17)	Группа 2а МПК (n=21)	Группа 3а плацебо (n=22)	Р
Частота биохимической беременности	6 (35,3%)	7 (33,3%)	4 (18,2%)	$p_1=0,988$ $p_2=0,006^*$ $p_3=0,034^*$
Частота клинической беременности	5 (29,4%)	5 (23,8%)	3 (13,7%)	$p_1=0,956$ $p_2=0,035^*$ $p_3=0,009^*$
Частота имплантации	33,3%	28,6%	7,7%	$p_1=0,873$ $p_2=0,01^*$ $p_3=0,001^*$
Частота выкидышей	2 (11,8%)	2 (9,5%)	1(4,5%)	$p_1=0,873$ $p_2=0,165$ $p_3=0,324$
Частота прогрессирующих беременностей	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	$p_1=0,435$ $p_2=0,011^*$ $p_3=0,025^*$
Частота родов живым плодом	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	$p_1=0,367$ $p_2=0,035^*$ $p_3=0,024^*$

Примечание.  $p_1$ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1а и 2а,  $p_2$  - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2а и 3а,  $p_3$  - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1а и 3а; \*- показатель, достоверно отличающийся в исследуемых группах.

Аналогичный анализ исходов криоциклов при использовании иммунотерапии МПК также выявил позитивное влияние данной методики (таблица 3), о чем свидетельствуют существенно более высокие частота биохимической беременности, частота имплантации, частота наступления клинической беременности, частота прогрессирующей беременности и частота родов живым плодом у пациенток, которым перед переносом эмбриона проводили внутриматочное введение МПК, как активированных ХГч, так и без активации ХГч в сравнении с аналогичными показателями в группе плацебо ( $p_{3=0,001}$ ;  $p_{3=0,005}$ ;  $p_{3=0,034}$ ,  $p_{3=0,032}$ ;  $p_{3=0,033}$ ;  $p_{2=0,006}$ ;  $p_{2=0,025}$ ;  $p_{2=0,026}$ ,  $p_{2=0,017}$ ,  $p_{2=0,024}$ ). Частота анализируемых показателей в группе пациенток с введением МПК, активированных ХГч, была несколько выше по сравнению с группой женщин с введением МПК без активации ХГч, хотя значимых различий не было выявлено ( $p>0,05$ ).

Таблица 3 - Сравнительная характеристика исходов программы ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона в криоцикле

Параметры	Группа 1б МПК+ХГч (n=25)	Группа 2б МПК (n=21)	Группа 3б плацебо (n=23)	Р
Частота биохимической беременности	10(40%)	8 (38,1%)	6 (25%)	$p_{1=0,097}$ $p_{2=0,006}^*$ $p_{3=0,001}^*$
Частота клинической беременности	8 (36%)	7 (33,3%)	5 (20,8%)	$p_{1=0,095}$ $p_{2=0,025}^*$ $p_{3=0,005}^*$
Частота имплантации	35,4%	30,3%	9,8%	$p_{1=0,084}$ $p_{2=0,026}^*$ $p_{3=0,034}^*$
Частота выкидышей	1( 4%)	1 (4,8%)	1 (4,3%)	$p_{1=0,073}$ $p_{2=0,146}$ $p_{3=0,878}$
Частота прогрессирующих беременностей	7 (28%)	6 (28,6%)	4 (17,4%)	$p_{1=0,134}$ $p_{2=0,017}^*$ $p_{3=0,032}^*$

Частота родов живым плодом	7 (28%)	6 (28,6%)	2 (8,7%)	$p_1= 0,134$ $p_2= 0,024^*$ $p_3= 0,033^*$
----------------------------	---------	-----------	----------	--

Примечание.  $p_1$ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1б и 2б,  $p_2$  - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2б и 3б,  $p_3$ -сравнение частот встречаемости признаков в группах 1б и 3б, \*- показатель, достоверно отличающийся в исследуемых группах.

Полученные данные показали, что проведение внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток перед переносом эмбриона повышает эффективность программ ВРТ в 1,7 раза по сравнению с группой плацебо, т.е. о позитивном влиянии данного вида иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации, что согласуется с результатами зарубежных исследований (Makrigiannakis A., 2015, Yu N., 2016, Okitsu O., 2011, Lia S. , 2017).

В литературе обсуждаются несколько механизмов действия МПК. Во-первых, МПК могут индуцировать локальные воспалительные реакции в эндометрии, что повышает вероятность имплантации эмбриона. Во-вторых, хотя МПК и являются аутологичными клетками, они индуцируют асептические воспалительные реакции в полости матки *in vivo* (Lea R. , Sandra, O., 2007). В-третьих, МПК могут секретировать протеазы, которые эффективно влияют на функцию и структуру поверхностных молекул, экспрессируемых на люминальных эпителиальных клетках эндометрия (Hammer A., 2011). Непосредственно участвуя в регуляции имплантации эмбриона ХГч потенцирует эти множественные эффекты, путем стимуляции секреции цитокинов и хемокинов в МПК, таких как LIF и IL-1, MMP-2, MMP-9 и VEGF, способствующих инвазии трофобласта (Saito S, 2010). Следовательно, можно предположить, что МПК, активированные ХГч, повышают частоту имплантации и частоту наступления клинической беременности за счет создания адекватного баланса лимфоцитов Th2/Th1-типа и адекватного уровня и функции Т - регуляторных клеток, как благоприятного иммунного микроокружения для имплантации эмбриона.

В результате проведения сравнительной оценки эффективности данного



метода иммунотерапии в зависимости от типа протокола ВРТ, было выявлено, что частота наступления клинической беременности и частота имплантации были выше в криоцикле по сравнению с аналогичными показателями в «свежем» цикле, что согласуется с данными литературы о снижении частоты клинической беременности в «свежих» циклах по сравнению с криоциклами (Imakawa K, 2015). Действительно, в «свежих» циклах эндометрий подвергается влиянию высоких уровней гормонов вследствие гонадотропной стимуляции, что может приводить к нарушению созревания эндометрия, негативно влияя на его рецептивность (Fujiwara H, 2009, Volovsky M., 2018). В криоциклах, в отличие от «свежих» циклов, эндометрий не подвергается повышенным гормональным нагрузкам вследствие стимуляции суперовуляции, поэтому в них создаются более оптимальные условия для имплантации, приближенные к естественному циклу.

Сравнительный анализ оценки эффективности данного метода иммунотерапии в зависимости от активации МПК и вида протокола ВРТ показал, что активация МПК хорионическим гонадотропином повышает эффективность криопротоколов в 1,2 раза по сравнению с группой с введением неактивированных МПК, но не влияет на исходы «свежих» циклов, что вероятно связано с эффектами ХГч, используемого в качестве триггера овуляции в «свежих» циклах.

Имеются единичные исследования о позитивном влиянии внутриматочного введения МПК у пациенток с субоптимальным эндометрием в день переноса эмбриона (М-эхо 7-8 мм) (Li S., 2017).

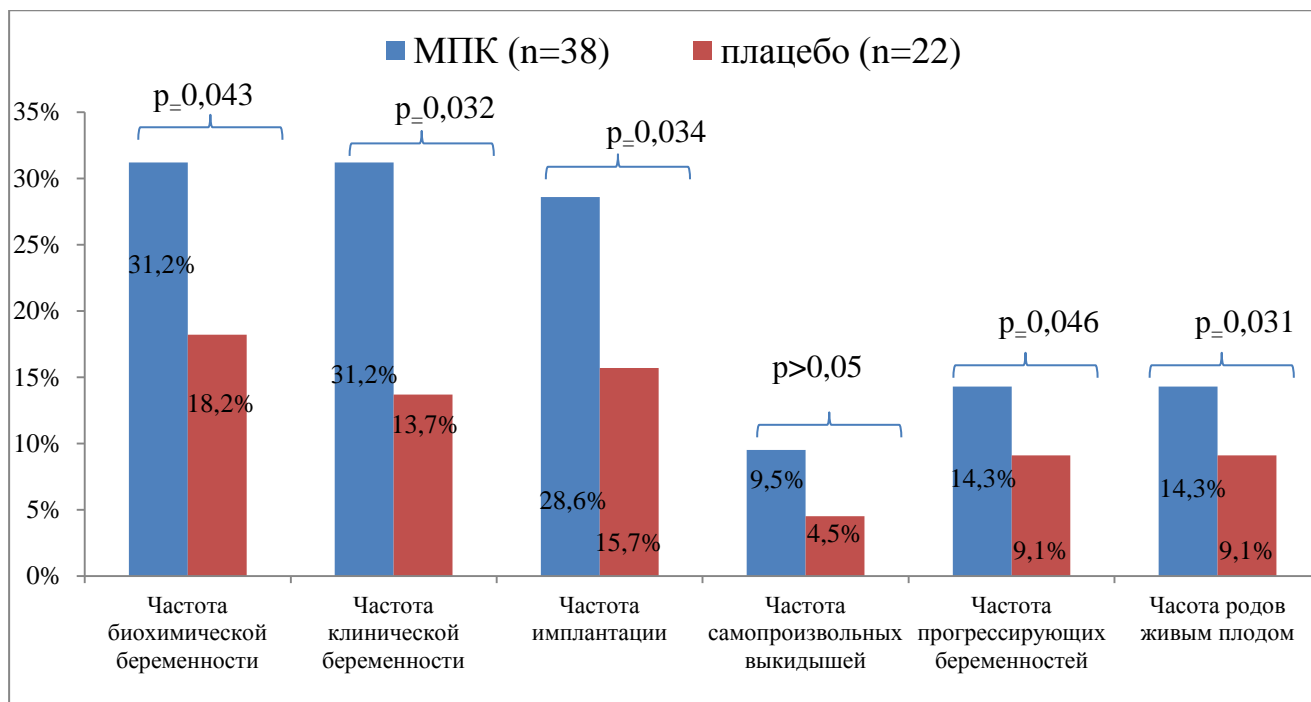


Рисунок 1. Исходы программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона у пациенток с эндометрием 7-8 мм

Результаты исследования показали, что частота биохимической беременности, частота клинической беременности, частота имплантации, частота прогрессирующей беременности и частота родов живым плодом в группе пациенток с эндометрием 7-8 мм в день переноса эмбриона были значимо выше по сравнению с аналогичными показателями в группе плацебо ( $p=0,043$ ,  $p=0,032$ ,  $p=0,034$ ,  $p=0,046$ ,  $p=0,031$  соответственно) (рисунок1), т.е. использование внутриматочного введения аутологичных МПК у женщин с эндометрием 7-8 мм и повторными неудачами имплантации в анамнезе повышает эффективность программ ВРТ в 1,8 раза по сравнению с группой плацебо.

Далее была проведена сравнительная оценка исходов программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона в зависимости от количества неудач имплантации в анамнезе, в результате которой значимых различий по анализируемым параметрам у пациенток исследуемых групп не выявлено ( $p>0,05$ ), следовательно, эффективность методики не ассоциирована с числом повторных безуспешных попыток ВРТ в анамнезе.

С целью выявления иммунологических предикторов эффективности программ ВРТ при использовании различных видов иммунотерапии МПК, нами проведен анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у женщин с повторными неудачами имплантации как в «свежем» цикле, так и в криоцикле. Было выявлено, что у женщин с успешной имплантацией в «свежем» цикле с внутриматочным введением неактивированных аутологичных МПК, уровень  $CD16^+$ -NK-лимфоцитов был значимо выше ( $p=0,0005$ ), а уровень Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  значимо ниже, чем в группе плацебо и в группе женщин с внутриматочным введением МПК, активированных ХГч ( $p<0,0001$ ).

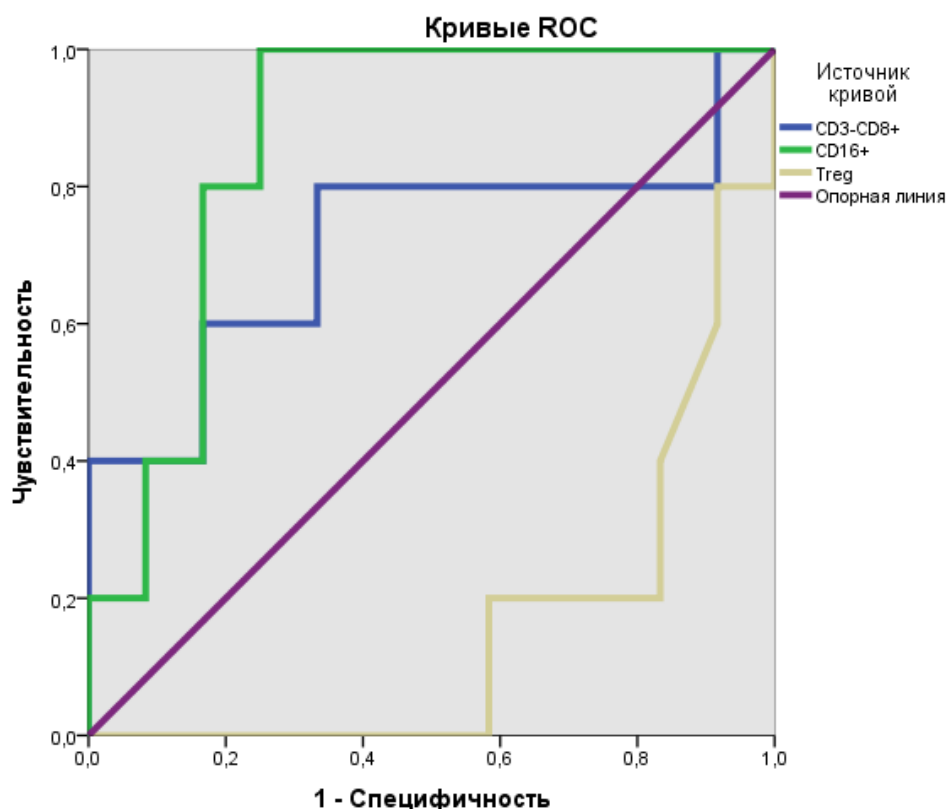


Рисунок 2. ROC-кривая в оценке содержания  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD16^+$  NK-лимфоцитов и Treg с фенотипом  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  в периферической крови женщин с RIF в протоколе с анТГнРГ с внутриматочным ведением неактивированных аутологичных МПК для прогноза наступления беременности

Результаты ROC-анализа показали, что уровни  $CD16^+$  NK-лимфоцитов  $>12,4\%$  с чувствительностью 100% и специфичностью 75% и Treg ( $CD4^+CD25^{high}$

CD127<sup>low/-</sup>) ≤6,6% с чувствительностью и специфичностью 83,3% могут являться основанием для назначения внутриматочного введения неактивированных МПК в «свежем» цикле (Рисунок 2).

Большое значение для формирования механизмов толерантности к аллоантигенам плода в процессах наступления и развития беременности принадлежит также  $\gamma\delta$  Т-клеткам (Liang P., 2015, Сухих Г.Т. Ванько Л.В. 2012). Важной особенностью  $\gamma\delta$ -Т-клеток является способность регулировать работу Treg путем взаимодействия с их рецепторами к интерферону. Было показано, с одной стороны, что  $\gamma\delta$  Т-клетки, несущие маркер НК-клеток (CD56<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>), продуцируют цитокины Th1-типа (провоспалительные), с другой, что они имеют прогестероновые рецепторы и вырабатывают прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (ПИБФ), что способствует переключению Th1-типа иммунного ответа на Th2- тип, необходимый для успешной имплантации (Степанова Е.О., Николаева М.А., 2013).

Нами не выявлено иммунологических предикторов эффективности криоциклов с использованием МПК без активации ХГч.

Напротив, в криоцикле с использованием МПК, активированных ХГч, диагностически значимыми маркерами эффективности явились CD56<sup>+</sup>-НК клетки, CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$  и Treg с фенотипом TCR $\gamma\delta$ .

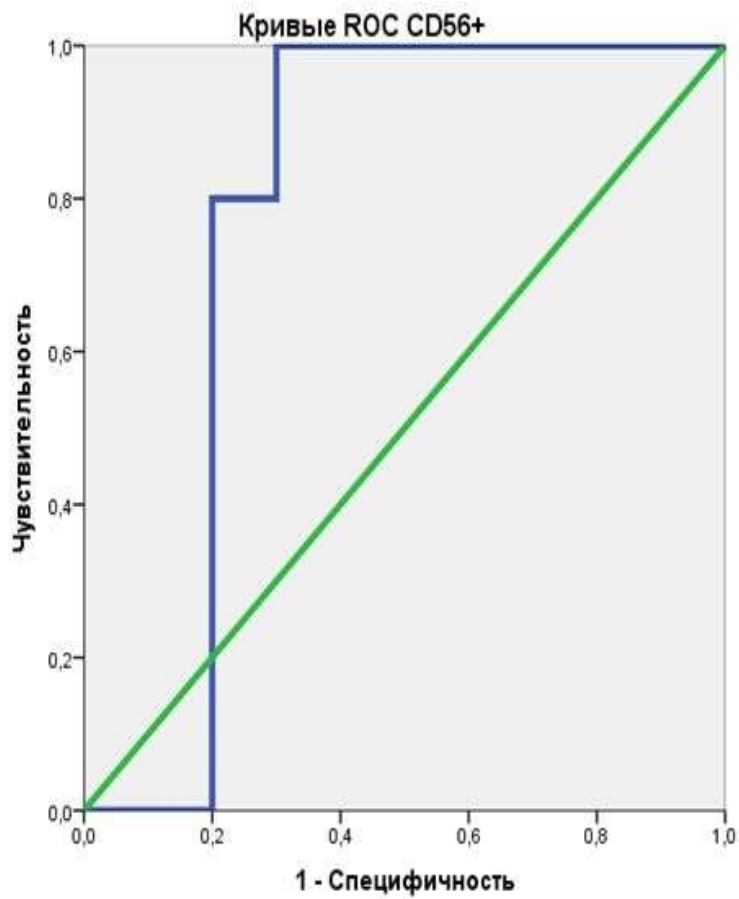


Рисунок 3. ROC-кривая в оценке определения показателей субпопуляционного лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК для прогноза наступления беременности.

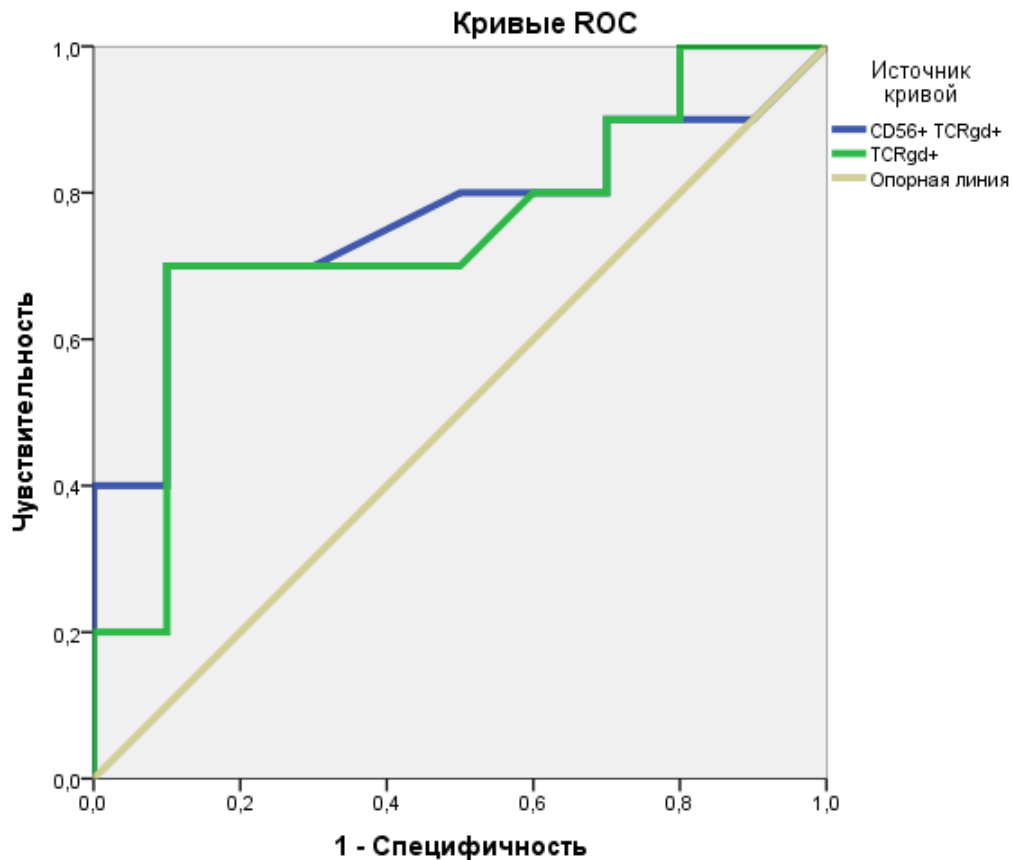


Рисунок 4. ROC-кривая в оценке содержания TCR $\gamma\delta$ - и активированных CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$  NK-лимфоцитов в периферической крови женщин с RIF для прогноза наступления беременности в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч.

Проведенный ROC – анализ показал, что содержание CD56<sup>+</sup>  $\leq 16,3\%$ , CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$   $\leq 2,5\%$  и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов  $\leq 12,5\%$  с чувствительностью 70%, 90%, 90% и специфичностью 100%, 70% и 80% соответственно, позволяет рекомендовать назначение внутриматочного введения МПК, активированных ХГч перед переносом эмбриона в криоцикле ( Рисунок 3,4).

Обобщая полученные данные, мы пришли к заключению, что выбор иммунотерапии МПК зависит от вида протокола ВРТ и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В «свежем» цикле при уровне NK-клеток более 12,4% и Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ не более 7% целесообразно использование внутриматочного введения неактивированных аутологичных МПК, тогда как, в криоцикле при уровне NK-

клеток более 16% и Т-регуляторных клеток с фенотипом TCR $\gamma\delta$  менее 12% - внутриматочное введение МПК, активированных ХГч.

Принимая во внимание полученные нами данные об изменении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с повторными неудачами имплантации и для выяснения механизма действия иммунотерапии МПК, нами была изучен цитокиновый профиль супернатантов культур МПК у пациенток трёх групп в зависимости не только от вида иммунотерапии МПК, но и типа и исхода протокола ВРТ.

Не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов МПК без учета активации МПК у пациенток в «свежем» цикле и криоцикле не различался. Также мы не выявили различий в цитокиновом профиле пациенток группы в «свежем» цикле в зависимости от вида иммунотерапии МПК.

Однако, в эффективных криоциклах с использованием МПК, активированных ХГч были выявлены значимо более высокие уровни цитокинов по сравнению с МПК без активации: ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-12p70, ГМКСФ, ИФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , при этом был выше и уровень ИЛ-4, что можно связать с интенсивностью процесса активации культивируемых клеток (Таблица 4).

Таблица 4. Цитокиновый профиль супернатантов мононуклеарных клеток периферической крови эффективных криоциклов с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК

Показатель		Значение показателя (пг/мл) в подгруппах			
Цитокин	Характеристика	МПК+ХГч (n=10)	МПК (n=8)	Плацебо (n=5)	p
ИЛ-2	Me	56,4	15,4	16,0	p=0,006*
	5-95 P	0,93 – 171,8	3,8 – 26,7	0,24 – 116,6	
ИЛ-4	Me	0,53	0,17	0,09	p=0,012*
	5-95 P	0,04 – 1,57	0,07 – 0,30	0,04 – 1,21	
ИЛ-5	Me	3,73	1,83	1,30	p=0,012*
	5-95 P	1,3 – 13,2	1,30 – 2,63	0,78 – 8,14	
ИЛ-10	Me	102,2	24,4	5,6	p=0,324
	5-95 P	1,26 – 347,7	4,4 – 152,5	4,0 – 446,4	
ИЛ-12p70	Me	0,92	0,6	0,60	p=0,011*
	5-95 P	0,45 – 4,07	0,30 – 0,68	0,45 – 1,96	
ИЛ-13	Me	2,06	0,73	0,93	p=0,763
	5-95 P	0,14 – 4,84	0,14 – 3,59	0,08 – 3,06	

ГМКСФ	Me	20,4	0,9	0,51	$p=0,008^*$
	5-95 P	0,17 – 210,2	0,04 – 3,73	0,21 – 4,60	
ИФ-γ	Me	1,09	0,57	0,60	$p=0,012^*$
	5-95 P	0,38 – 6,41	0,38 – 0,92	0,32 – 10,0	
ФНО-α	Me	4542	800	317	$p=0,021^*$
	5-95 P	62 - 23911	188 - 1366	29 - 5505	
ТФРβ-1	Me	305	364	591	$p=0,531$
	5-95 P	82 - 584	176 - 1338	10 - 1023	
ТФРβ-2	Me	134	185	224	$p=0,146$
	5-95 P	11 - 321	27 - 271	3 - 239	
ТФРβ-3	Me	14,9	19,7	20,5	$p=0,298$
	5-95 P	6,9 – 80,4	6,9 – 66,8	4,5 – 44,9	

Примечание. \* - различия между группами МПК и МПК+ХГч значимы при  $p \leq 0,05$ .

Полученные результаты свидетельствуют, что супернатанты МПК, активированные ХГч в криоцикле характеризуются более уровнем провоспалительных цитокинов, необходимых для успешной имплантации (Simon A., 2012, Coughlan C, 2014, Makrigiannakis A., 2015).

Таким образом, внутриматочное введение аутологичных МПК перед переносом эмбриона повышает эффективность программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе. На основании проведенного исследования разработан персонализированный подход для использования различных видов иммунотерапии МПК ( активированные ХГч и без активации) в «свежих» циклах и криоциклах с учетом иммунологических предикторов.

## ВЫВОДЫ

1. Пациентки с повторными неудачами имплантации и бесплодием преимущественно трубно-перитонеального генеза (45,2%) были представлены соматически здоровыми женщинами репродуктивного возраста (средний возраст -  $32 \pm$  года), имели нормальный овариальный резерв (уровень АМГ составил  $(2,3 \pm 1,8)$  нг/мл) и от 2 и до 5 неудач имплантации в анамнезе. Иммунный статус пациенток с повторными неудачами имплантации по сравнению с фертильными женщинами характеризовался высоким уровнем лимфоцитов с естественной киллерной функцией  $CD16^+$  ( $12,9 \pm 1,8$ ,  $p=0,033$ ) и  $CD56^+$  ( $17,6 \pm 1,7$ ,  $p=0,042$ ) и низким уровнем регуляторных Т-лимфоцитов с Т - клеточным рецептором типа



$\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ ) ( $7,8 \pm 1,0$ ,  $p=0,0014$ ) и активированных NK-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор TCR $\gamma\delta$  (CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ ) ( $1,5 \pm 0,3$ ,  $p=0,018$ ).

2. Внутриматочное введение аутологичных МПК у пациенток с повторными неудачами имплантации способствует улучшению исходов программ ВРТ в стимулированном цикле (частота клинической беременности 23,8% и 13,7%) и в криоцикле (частота клинической беременности 36% и 20,8%) по сравнению с группой плацебо.

3. Проведение внутриматочного введения аутологичных МПК повышает эффективность программ ВРТ (частота клинической беременности 31,2% и 13,7%) по сравнению с группой плацебо у пациенток с эндометрием 7-8 мм.

4. В «свежем» цикле эффективность программ ВРТ не зависит от активации МПК ( $p=0,956$ ). В криоцикле введение МПК, активированных ХГч, повышает частоту клинической беременности (36% и 33,3%) по сравнению с группой введения МПК без активации.

5. У пациенток в «свежем» цикле диагностическими маркерами наступления беременности является содержание CD16<sup>+</sup>NK-лимфоцитов ( $p<0,0001$ ) и Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low/</sup>) ( $p=0,0005$ ), в криоцикле - содержание CD56<sup>+</sup> ( $p=0,009$ ), CD56<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$  ( $p=0,041$ ) и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов ( $p=0,024$ ) в периферической крови.

6. Пациентки с повторными неудачами имплантации в «свежем» цикле и в криоцикле имели сходный цитокиновый профиль супернатантов МПК. Однако в криоцикле супернататы ХГч-активированных аутологичных МПК пациенток с наступившей беременностью характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов ИЛ-2 ( $p=0,006$ ), ИЛ-5 ( $p=0,012$ ), ИЛ-12p70 ( $p=0,011$ ), ИФН- $\gamma$  ( $p=0,012$ ), Г-КСФ ( $p=0,026$ ), ФНО- $\alpha$  ( $p=0,021$ ) и более высоким уровнем противовоспалительного цитокина ИЛ-4 ( $p=0,012$ ) по сравнению с аналогичными параметрами в супернатантах неактивированных аутологичных МПК.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с бесплодием трубно-перитонеального генеза, репродуктивного возраста с нормальным овариальным резервом, имеющим в анамнезе две и более повторные неудачи имплантации показано проведение исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови до вступления в программу ВРТ.

2. Пациенткам, с выявленными высоким уровнем лимфоцитов с естественной киллерной функцией  $CD16^+$  и  $CD56^+$  и низким уровнем регуляторных Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором типа  $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ ) и активированных НК-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор TCR $\gamma\delta$  ( $CD56^+$ TCR $\gamma\delta$ ) необходимо рекомендовать проведение внутриматочного введения аутологичных МПК в программах ВРТ.

3. Пациенткам с эндометрием 7-8 мм в исследуемом цикле ВРТ, с выявленными высоким уровнем лимфоцитов с естественной киллерной функцией  $CD16^+$  и  $CD56^+$  и низким уровнем регуляторных Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором типа  $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ ) и активированных НК-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор TCR $\gamma\delta$  ( $CD56^+$ TCR $\gamma\delta$ ), следует рекомендовать проведение внутриматочного введения аутологичных МПК в программах ВРТ.

3. При выявлении содержания  $CD16^+$ НК-лимфоцитов  $>12,4\%$  и Treg ( $CD4^+CD25^{high} CD127^{low/-}$ ) $\leq 6,6\%$  в периферической крови целесообразно проведение внутриматочного введения неактивированных аутологичных МПК в «свежем» цикле.

4. В «свежем» цикле внутриматочное введение неактивированных МПК в объеме 200 мкл рекомендовано выполнять за 48 часов до переноса бластоцисты.

5. При выявлении содержания  $CD56^+ \leq 16,3\%$ ,  $CD56^+$ TCR $\gamma\delta \leq 2,5\%$  и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов  $\leq 12,5\%$  целесообразно проведение внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч в криоцикле.

6. В криоцикле внутриматочное введение МПК, активированных ХГч в объеме 200 мкл рекомендовано выполнять за 48 часов до переноса бластоцисты.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения / Е.В. Митюрин, С.Г. Перминова, **Т.С. Амян** // **Акушерство и гинекология**. - 2016. - №11. - С.34-40.
2. Иммунологические аспекты повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения / **Т.С. Амян**, С.Г. Перминова, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Е.В. Митюрин // **Акушерство и гинекология**, 2017, №1, с. 5-12.
3. Диагностическая значимость определения лимфоцитов периферической крови для прогноза наступления беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации в группах с разными протоколами программ ВРТ / **Т.С. Амян**, Л.В. Кречетова, С.Г.Перминова, В.В. Вторушина // **Гинекология**.- 2017. -№5. - с. 26-31.
4. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией у женщин с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ / **Т.С. Амян**, Л.В. Кречетова, С.Г. Перминова, В.В. Вторушина // **Акушерство и гинекология**, 2017, №12, с. 78-83.
5. Эффективность внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Т.С. Амян**, С.Г. Перминова, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина // **Гинекология**. 2018. -№ 2. - с.28-33.

**Алгоритм персонализированного проведения программ ВРТ с использованием методов иммунотерапии МПК с учетом иммунологических маркеров для прогноза наступления беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе**

