

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
федеральное государственное бюджетное учреждение
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

С.Г. Перминова

кандидат медицинских наук

Л.В. Кречетова

Москва 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧ ИМПЛАНТАЦИИ В ПРОГРАММЕ ЭКО (обзор литературы).....	13
1.1. Повторные неудачи имплантации. Определение.	
1.2 Этиологические факторы повторных неудач имплантации.....	15
1.3 Иммунологические аспекты повторных неудач имплантации.....	24
1.4 Иммунотерапия в преодолении повторных неудач имплантации.....	36
1.5 Внутриматочное введение МПК как метод иммунокоррекции повторных неудач имплантации.....	37
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Материал исследования.....	42
2.2. Методы исследования.....	45
2.2.1 Общеклинические методы исследования.....	47
2.2.2 Гормональное обследование.....	48
2.2.4 Исследование эякулята	48
2.3 Специальные методы исследования	51
2.3.1 Протокол стимуляции суперовуляции.....	51
2.3.2 Трансвагинальная пункция яичников.....	52
2.3.3 Эмбриологический этап, перенос эмбрионов и посттрансферный период программы ЭКО.....	53
2.3.4 Криопротокол.....	54
2.4 Иммунологические методы исследования.....	55
2.4.1 Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови.....	56
2.4.2 Методика внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток.....	57
2.5 Статистический анализ полученных результатов.....	60
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	61
3.1 Клинико-anamnestическая и лабораторная характеристика пациенток с RIF...	62

3.2 Сравнительный анализ основных параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа.....	68
3.3 Эффективность программ ВРТ в зависимости от вида иммунотерапии.....	70
3.3.1 Исходы стимулированных циклов в зависимости от вида иммунотерапии.....	70
3.3.2 Исходы криоциклов в зависимости от вида иммунотерапии.....	71
3.3.3 Исходы программ ВРТ с использованием иммунотерапии аутологичными МПК у пациенток с субоптимальным эндометрием.....	73
3.3.4 Исходы программ ВРТ с использованием иммунотерапии аутологичными МПК в зависимости от количества неудач имплантации в анамнезе.....	74
3.4 Результаты иммунологического обследования женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.....	75
3.4.1 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.....	75
3.4.2 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в стимулированном протоколе с учетом вида иммунотерапии.....	77
3.4.3 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с учетом вида иммунотерапии.....	82
3.5 Анализ цитокинового профиля супернатантов культур МПК, предназначенных для внутриматочного введения.....	90
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	91
ВЫВОДЫ.....	107
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	130

ВВЕДЕНИЕ

АКТУЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на значительные достижения в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), существенному проценту супружеских пар, прибегающим к ВРТ, не удается достичь наступления беременности после повторных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Повторные неудачи имплантации - отсутствие клинической беременности после двух и более программ ВРТ при переносе эмбрионов хорошего качества у женщин в возрасте до 40 лет. Повторные неудачи имплантации – серьезная проблема, решению которой посвящено большое количество как клинических, так и фундаментальных исследований в области репродукции человека. После повторных неудачных попыток ЭКО принято проводить гистероскопию для выяснения состояния эндометрия и хирургической коррекции выявленной патологии, сальпингэктомии при выявлении гидросальпинксов, вспомогательный хэтчинг эмбрионов, преимплантационный генетический скрининг эмбрионов и другое, однако, не всегда удается верифицировать причины повторных неудач имплантации в программе ЭКО.

Наименее изученными являются иммунологические аспекты неудач имплантации. Имеются лишь единичные данные о повышении соотношения Th1/Th2 и снижении супрессивной способности Т-регуляторных клеток (Treg) в периферической крови [82] [76] у пациенток с повторными неудачами имплантации, не изучены особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у этих женщин.

Степень разработанности темы исследования

Отсутствует единая точка зрения на целесообразность проведения иммунологических исследований и использования различных видов иммунотерапии у женщин с неудачами имплантации в анамнезе. С целью повышения вероятности имплантации в программе ЭКО предпринимаются

попытки воздействия на эндометрий путем его локального «повреждения» при гистероскопии или пайпель-биопсии в цикле, предшествующем очередной попытке ЭКО; введение в полость матки гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; прием различных препаратов с иммуносупрессивным эффектом (глюкокортикоиды, такролимус) [101] [97].

Относительно новым и малоизученным методом преодоления неудач имплантации в программе ЭКО является внутриматочное введение за 3 дня до переноса бластоцисты аутологичных мононуклеаров периферической крови (МПК), полученных в день забора ооцитов, активированных хорионическим гонадотропином человека (ХГч) [162]. О позитивном влиянии метода на исходы программ ЭКО у женщин с повторными неудачами имплантации свидетельствуют результаты исследования Okitsu и соавторов, в котором было показано, что даже при введении неактивированных МПК в криопротоколах существенно повышалась частота наступления клинической беременности [106].

Роль периферических мононуклеарных клеток в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с тех пор, как было показано, что клетки селезенки беременных мышей могут регулировать рецептивность эндометрия [143], а МПК, полученные от женщин с беременностью ранних сроков, могут усиливать инвазию эмбрионов мышей *in vitro* [198], а мононуклеарные клетки, введенные в полость матки, повышают вероятность имплантации [78] [161] [49].

Механизм, посредством которого МПК могут улучшать исходы ЭКО, не ясен и, по мнению исследователей, может реализовываться за счет поддержки децидуализации эндометрия, за счет формирования провоспалительного профиля цитокинов, за счет способности инфильтрировать строму эндометрия в качестве предшественников инвазивного трофобласта [48] [121].

Основанием для использования активаторов МПК явились данные о том, что ХГч усиливает продукцию цитокинов МПК, повышая имплантационные свойства эндометрия [73] [47].

Таким образом, несмотря на положительные результаты единичных исследований о влиянии иммуномодулирующей терапии МПК на эффективность

программы ВРТ, не изучена эффективность и механизм действия данного метода преодоления повторных неудач имплантации.

Цель исследования:

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

Задачи исследования

1. Оценить анамнестические, клинико-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 моноклеарных 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 мононуклеарных 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⁺NK-лимфоцитов >12,4% и Treg (CD4⁺CD25^{high} CD127^{low}) ≤6,6%), так и в криоцикле (CD56⁺ ≤16,3 %, CD56⁺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 персонифицированный подход к проведению иммунотерапии МПК в программах ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Материал и методы исследования

Проведено обследование 129 пациенток с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО в анамнезе, обратившихся для проведения программы ЭКО и ПЭ, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Далее пациентки были стратифицированы путем простой рандомизации в 3 группы в зависимости от вида проводимой иммунотерапии.

Перед началом программы ВРТ всем пациенткам проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н.

Процедура выделения и внутриматочного введения МПК осуществлялась в соответствии с протоколом «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток», утвержденным на Ученом совете ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (выписка из протокола № 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 Treg 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 (δ), 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.

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 мононуклеарными клетками зависит от типа протокола вспомогательных репродуктивных технологий и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В «свежем» цикле при уровне НК-клеток более 12,4% и Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/}$ не более 7% целесообразно использование внутриматочного введения неактивированных аутологичных мононуклеарных клеток. В криопротоколе – при уровне НК-клеток более 16% и Т-регуляторных клеток с фенотипом $TCR\gamma\delta$ менее 12% - использование внутриматочного введения мононуклеарных 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 методом ЭКО и переноса эмбрионов (ПЭ), включая формирование базы данных о пациентах, внутриматочное введение аутологичных МПК, а также анализ клинично-лабораторных показателей и научную интерпретацию результатов исследования.

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 на основании результатов исследования 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.

По теме диссертации разработан протокол «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток», утвержденный на Ученом совете ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (22.12.2015). Результаты исследования изложены в 7 печатных работах, из них 5 - в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Результаты диссертационной работы представлены на XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), 35 ежегодной конференции ESHRE (Вена, 2019).

Структура и объем диссертации

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

Глава 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧ ИМПЛАНТАЦИИ В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ (обзор литературы)

1.1 Повторные неудачи имплантации. Определение.

Результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в последние годы несомненно растет, однако у 60% женщин по - прежнему не наступает клиническая беременность в одном лечебном цикле, а у 20% - после трех циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [84].

Известно, что даже перенос морфологически качественного эмбриона в полость матки с эндометрием, структурно соответствующим фазе менструального цикла, не всегда приводит к наступлению беременности, а наступившая беременность в ряде случаев останавливается в развитии на ранних сроках [41].

Процесс имплантации зависит от синхронизации различных факторов, таких, как качество эмбриона, оптимальные условия культивирования *эмбриона*, рецептивность эндометрия и адекватное состояние материнской иммунной системы [38]. При этом приблизительно за две трети неудач имплантации ответственна неадекватная рецептивность эндометрия, тогда как состояние эмбриона - только за одну треть. Значительный процент прекращения развития эмбрионов связан с наличием у них хромосомных аномалий [11].

Исследователи уделяют большое внимание изучению роли различных факторов в генезе повторных имплантационных потерь.

Повторные неудачи имплантации (*repeated implantation failure - RIF*) в программе экстракорпорального оплодотворения – клиническая ситуация, когда неоднократно не удается достичь стадии визуализации плодного яйца в полости матки при ультразвуковом исследовании (УЗИ) после переноса эмбриона (ов). По мнению Coughlan, возможны два варианта данной ситуации: в первом из них отсутствуют доказательства имплантации (отрицательные уровни β -субъединицы хорионического гонадотропина (β ХГ)), а во втором имеются доказательства

имплантации (положительные уровни β ХГ), но по данным УЗИ, плодное яйцо отсутствует [28].

Определение RIF на разных этапах изучения данной проблемы трактовали по-разному. Первоначально RIF диагностировали при переносе 12 эмбрионов в нескольких циклах ВРТ, не учитывая количество последних [35]. Позже другая группа исследователей определила повторные неудачи имплантации как неспособность достижения беременности после переноса 10 или более эмбрионов в 2-6 циклах ВРТ [144]. В 2005 г. на Европейском обществе репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) RIF определили, как отсутствие беременности при переносе 3-х и более эмбрионов в 10 и более циклах ЭКО [149]. В 2006 году Margalioth et al. полагали, что RIF определяется как отсутствие наступления беременности после переноса 3-х эмбрионов в 3-х циклах ЭКО/ПЭ [92]. Немного позднее определение повторных неудач имплантации описали как неспособность достижения беременности после переноса 5 эмбрионов на стадии бластоцисты вне зависимости от количества циклов ВРТ [119].

Некоторые авторы при установлении RIF основываются только на количестве перенесенных эмбрионов, другие - на количестве неудачных циклов. Так, Aletebi F. полагает, что RIF – это отсутствие клинической беременности после переноса 3 или более эмбрионов [12]. Huang и соавторы верифицируют RIF после двух неудачных циклов, Sacks и соавторы – после трех попыток ЭКО [59][124]. Другие исследователи учитывают оба фактора и считают, что о RIF свидетельствует отсутствие беременности после переноса от 2 до 10 и более эмбрионов в минимум двух или трех циклах ВРТ [112][118]. Polansky полагает, что для определения RIF общее число перенесенных эмбрионов должно быть не менее 4-х на стадии дробления или 2-х бластоцист [112]. Большинство авторов учитывают эмбрионы только хорошего качества, имеющие количество клеток, соответствующее дню развития, а в случае переноса бластоцисты - качество внутренней клеточной массы и трофобластической оболочки [12] [59] [112] [151]. Другие критерии включают наличие бластомеров одинакового размера, равномерность их распределения, а также наличие менее 10% фрагментации [37].

Тан и соавторы исключают из определения RIF криопротоколы, основываясь на том, что частота имплантации размороженных после криоконсервации эмбрионов ниже, чем в «свежих» циклах [144]. Однако систематический обзор и мета-анализ 3-х рандомизированных клинических исследований показал более высокую частоту клинической и прогрессирующей беременности в криопротоколах [121]. По данным Shapiro частота родов живым плодом в криоциклах существенно выше в сравнении со свежими циклами (OR 3.8, 95% CI 2,1-7,2; $p < 0,0001$) [134]. Следовательно, при определении RIF необходимо учитывать как свежие циклы ЭКО, так и криопротоколы.

Последнее предлагаемое определение RIF от Coughlan включает в себя не только количество эмбрионов и количество программ вспомогательных репродуктивных технологий (BPT), но и возраст пациентки. RIF они определяли как неспособность достижения клинической беременности после переноса, по крайней мере, четырех эмбрионов хорошего качества, как минимум, в трех лечебных циклах ЭКО или криопротоколах у женщин в возрасте до 40 лет [28].

Следует отметить, что термин «повторные неудачи имплантации» не является эквивалентом повторных неудач ЭКО, к которым следует относить невозможность достижения беременности после нескольких попыток у пациенток старшего репродуктивного возраста, при «бедном» овариальном ответе и субоптимальном качестве эмбрионов [28].

Таким образом, основываясь на приведенных данных литературы можно сделать заключение, что RIF – отсутствие клинической беременности у пациенток в возрасте до 40 лет после двух последовательных попыток ЭКО/ИКСИ или криоциклов, в которых общее число перенесенных эмбрионов не менее чем 4 на стадии дробления или 2-х хорошего качества на стадии бластоцисты [4].

1.2 Этиологические факторы повторных неудач имплантации

Повторные неудачи в программе ЭКО могут быть обусловлены дефектами гамет, эмбрионов, а также патологией матки и эндометрия. В отечественной и зарубежной литературе обсуждается роль врожденных тромбофилий,

антифосфолипидного синдрома, эндометриоза, синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), иммунологических факторов, воспалительных заболеваний маточных труб и миомы матки в генезе повторных неэффективных программ ЭКО. Отдельного внимания заслуживают идиопатические RIF – неспособность к достижению беременности после переноса эмбрионов хорошего качества при исключении патологических изменений матки и эндометрия, а также любых других нарушений у женщины и отсутствие патозооспермии у мужчины [151]. По данным Yang X. и соавторов частота встречаемости идиопатических RIF составляет 8% [160].

1.2.1 Качество ооцитов

Важным фактором, определяющим исход цикла ЭКО, является качество полученных эмбрионов, которое во многом зависит от морфологической и структурной зрелости гамет [30]. В исследованиях на животных было показано, что качество ооцитов играет более важную роль, чем качество сперматозоидов, что можно объяснить различиями между гаметогенезом у мужчин и женщин [3]. Качество яйцеклеток отражают морфологические, генетические, метаболические и эпигенетические характеристики. Однако в рутинной практике клиник ВРТ применяется оценка клеток преимущественно по их морфологическим параметрам. В литературе обсуждается связь между качеством полученных при стимуляции функции яичников ооцитов и неудачами имплантации в программе ЭКО [118] [2].

Аномалии строения ооцитов (дисморфизмы) могут быть обусловлены возрастом женщины, генетическими дефектами, наличием метаболических нарушений, гинекологическими заболеваниями (наружный генитальный эндометриоз, СПКЯ), а также влиянием стимуляции суперовуляции и ответом яичников [2] [45]. Valaban и соавторами было показано, что 60%-70% аспирированных ооцитов имеют различные аномальные морфологические характеристики [16]. Ряд авторов объясняют это тем, что стимуляция функции яичников приводит к созреванию когорты фолликулов, которые в естественном цикле должны были подвергнуться атрезии [45][16]. Существует доказательства

того, что чрезмерный ответ яичников на стимуляцию суперовуляции, высокая суммарная доза гонадотропинов приводит к появлению дисморфизмов ооцитов и высокой частоте неудачи оплодотворения [28][2][45]. Среди различных видов аномалий строения ооцитов наиболее значимой в этиологии RIF является уплотнение *zona pellucida*, и как результат, ее неспособность к разрыву и нарушение естественного хэтчинга [38].

Figueira R. и соавторы полагают, что возраст женщины не влияет на морфологические параметры ооцитов. Авторы объясняют это тем, что качество ооцитов у пациенток старшего возраста не может оцениваться по морфологическим критериям, поскольку связано с повышенной вероятностью хромосомных аномалий [28][45]. Частота встречаемости анеуплоидии в ооцитах, полученных в естественных циклах, составляет около 20 %, тогда как в стимулированных циклах варьирует от 20 до 70 %, и напрямую зависит от возраста женщины [57]. При этом у пациенток с RIF анеуплоидии ооцитов наблюдаются в 65,5 % случаев [46]. Возрастное снижение качества ооцитов связано не только с повышенной вероятностью хромосомных аномалий, но и со снижением митохондриального потенциала мембраны и увеличением повреждений митохондриальной ДНК яйцеклеток [130].

В настоящее время признано, что в процессе имплантации важную роль играют кумулюсные клетки, которые связаны с ооцитом от стадии антрального фолликула до этапа оплодотворения [28][15]. Кумулюсные клетки являются источником простагландинов и ангиогенных факторов (например, сосудистого эндотелиального фактора роста), которые имеют значение в ангиогенезе при имплантации. Исследование Assou показали, что экспрессия генов клетками кумулюсного окружения ооцита коррелирует с качеством ооцитов и эмбрионов [15]. Benkhalifa M. И соавторы в проспективном рандомизированном исследовании отметили улучшение исходов программы ЭКО при совместном культивировании эмбрионов с кумулюсными клетками у пациенток с RIF [28][20].

В ряде работ была показана взаимосвязь гинекологических заболеваний с качеством ооцитов, полученных в программе ЭКО. Так, экспериментальные

исследования на модели мыши доказали, что развитие перитонеального эндометриоза ассоциировано со снижением качества ооцитов и количества эмбрионов [29]. Díaz I. при анализе циклов донации ооцитов выявили значительно более низкую частоту имплантации у реципиентов, которые получали ооциты от доноров с эндометриозом, в то время как использование ооцитов от здоровых доноров не снижало частоту наступления беременности у реципиентов с эндометриозом [40]. Таким образом, эндометриоз, вероятно, в большей степени затрагивает качество яйцеклеток, а не рецептивность эндометрия [4]. Однако существует мнение, что *эндометриоидные кисты яичников* не оказывают неблагоприятного воздействия на качество ооцитов, эмбрионов и исход программ ВРТ. В недавнем мета-анализе и систематическом обзоре было показано, что при эндометриоидных кистах яичников наблюдается существенно меньшее количество полученных ооцитов, зрелых ооцитов и эмбрионов, а число эмбрионов хорошего качества, частота имплантации, клинической беременности и родов живым плодом сопоставимы с аналогичным показателем в группе здоровых женщин бластоцисты [4]. Более того, анализ фолликуло- и оогенеза в яичнике с эндометриоидной кистой в сравнении с интактным яичником не показал статистически значимых различий в количестве полученных ооцитов, эмбрионов хорошего качества, частоте оплодотворения и дробления [160].

1.2.2 Качество сперматозоидов

В литературе имеются данные, что RIF могут быть обусловлены увеличением в эякуляте доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Однако единого мнения о влиянии нарушения структурной организации хроматина сперматозоидов на исход цикла ЭКО/ИКСИ не существует, а взаимосвязь с RIF до конца не установлена. Так, Seli E. И соавторы считают, что нарушение целостности ДНК сперматозоидов не влияет на исход цикла ЭКО, а играет важную роль в генезе невынашивания беременности [133]. Другие исследователи полагают, что повреждение ДНК в сперматозоидах часто не оказывает негативного воздействия на оплодотворение ооцита и начальные стадии

дробления эмбрионов, но имеет важное значение для формирования бластоцисты и имплантации эмбриона, снижая тем самым частоту наступления беременности в программе ЭКО [30]. При этом следует обратить внимание, что при высоком уровне фрагментации ДНК спермы, вероятность развития нормального и жизнеспособного эмбриона частично зависит от способности ооцита восстанавливать повреждение хроматина сперматозоидов [128].

Большинство опубликованных статей отмечают увеличение числа анеуплоидий сперматозоидов в группах с патозооспермией в супружеских парах с неудачными попытками ЭКО/ИКСИ [120][123]. Rodrigo L. и соавторы оценивали влияние различных видов анеуплоидий в сперматозоидах на хромосомный набор предимплантационных эмбрионов. Авторы делают вывод, что супружеские пары с мужским фактором бесплодия и увеличением доли сперматозоидов с диплоидией составляют группу риска по неудачам имплантации при проведении программы ЭКО, а также спонтанному прерыванию беременности на ранних сроках [120]. Другие исследователи наблюдали увеличение случаев дисомий по половым хромосомам в сперме в парах с RIF после ИКСИ [38] [123].

Курение, половые инфекции, ожирение, а также химио- и радиотерапия способствуют повреждению ДНК сперматозоидов [28].

1.2.3 Маточный фактор и роль эндометрия в повторных неудачах имплантации

Имплантационный потенциал эндометрия и синхронизация с развитием эмбриона является ключевым моментом эффективности программ ВРТ. Известно, что имплантация эмбриона возможна только в течение ограниченного периода времени максимальной рецептивности эндометрия. Это так называемое «окно имплантации», период которого составляет несколько дней – примерно с 20-го по 24-й день нормального менструального цикла, на 6-10-й день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) [41][80]. В этот момент происходят генотипические и фенотипические изменения клеток эндометрия. Результатом является двусторонний «диалог» эндометрия с эмбрионом, который возможно приведет к успешной аппозиции, адгезии, инвазии и имплантации эмбриона [151].

При воздействии повреждающих факторов потеря эндометрием рецептивности означает утрату способности к взаимодействию *с эмбрионом*, что влечет за собой срыв имплантации или развитие ее патологических вариантов [10]. В качестве факторов, повреждающих рецептивность и имплантационный потенциал эндометрия, могут выступать гинекологические заболевания, которые нередко выявляются у пациенток с RIF. Так, по данным ряда авторов, у женщин с неудачными попытками ЭКО и ПЭ в анамнезе частота встречаемости хронического эндометрита составляет 30 % - 83,3 %, полипов эндометрия – 13 %, гиперплазии эндометрия – 10 % [9].

Роль хронического эндометрита в этиологии повторных неудач имплантации в программе ЭКО остается спорной и до конца неясной, что может быть связано с отсутствием четких диагностических критериев данного заболевания и возможностью установления диагноза только при морфологическом исследовании биоптата эндометрия. Хронический эндометрит, по мнению одних авторов, часто ассоциируется с бесплодием и неудачными попытками ЭКО, а, по мнению других авторов, не влияет на репродуктивную систему и исходы программ ВРТ blastocysts [4]. Так, по данным Kasius J. не выявлена связь между RIF и хроническим эндометритом [70]. J. MacAnanny и соавторы напротив, при ретроспективном исследовании в 30,3 % случаев у пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО диагностировали хронический эндометрит [86].

Полипы эндометрия могут вызывать локальные воспалительные изменения, обусловленные увеличением числа тучных клеток и уровня матриксных металлопротеиназ. Кроме этого, наблюдается уменьшение экспрессии мРНК генов HOXA 10, HOXA 11 и увеличение продукции гликоделина, который ингибирует активность естественных клеток-киллеров. Несмотря на то, что эти изменения приводят к нарушению рецептивности и имплантационного потенциала эндометрия, выявление полипа размерами до 20 мм при проведении овариальной стимуляции не снижает частоту имплантации, клинической беременности и родов живым плодом [110].

Спорным остается и значение *аденомиоза в генезе RIF*. Одни исследования показывают отсутствие негативного влияния данного заболевания на исход цикла ВРТ [33], другие же подтверждают существенное снижение частоты наступления беременности в программе ЭКО [152].

Ретроспективный анализ результатов иммуногистохимического исследования эндометрия, полученного в позднюю лютеиновую фазу цикла у пациенток с неудачами имплантации и аденомиозом, показал значимое ($p=0,004$) увеличение макрофагов в железах поверхностного эпителия и естественных клеток-киллеров в строме. Авторы полагают, что накопление макрофагов в железах поверхностного эпителия эндометрия может создавать негативную для имплантации эмбрионов среду, поскольку макрофаги, как известно, имеют способность секретировать цитокины, такие как $TNF\alpha$ и $IL-1$, а также активные формы кислорода и азота, которые потенциально токсичны для эмбрионов [152]. Полученные данные позволили Tremellen К. и соавторам сделать вывод об иммунологических механизмах неудачи имплантации при аденомиозе [152].

Одним из механизмов нарушения рецептивности у пациенток с *эндометриозом* является существенное уменьшение экспрессии НОХА 10 в клетках стромы эндометрия, и, как результат, снижение $\alpha_v\beta_3$ интегрин. Кроме этого, повышенные уровни фермента ароматазы в эндометрии приводят к изменению экспрессии ЭР α , что подавляет уровни $\alpha_v\beta_3$ интегрин и ухудшает имплантацию эмбриона [41]. De Ziegler D. и соавторы обсуждают роль нарушений экспрессии генов и воспаления в возникновении резистентности к прогестерону, как факторов, снижающих рецептивность эндометрия у пациенток с эндометриозом [166].

Высокие уровни ЛГ в фолликулярную фазу менструального цикла, гиперандрогения, инсулинорезистентность, повышение концентраций эстрогенов в день введения триггера овуляции при *СПКЯ* были предложены как факторы, оказывающие негативный эффект не только на качество ооцитов, но и рецептивность эндометрия бластоцисты [4]. Повышение концентрации андрогенов в исследованиях *in vitro* подавляет экспрессию НОХА 10 в клетках

эндометрия, как напрямую, так и за счет нивелирования стимулирующего эффекта эстрогенов и прогестерона. Помимо этого, в эндометрии пациенток с СПКЯ наблюдается избыточная экспрессия андрогеновых рецепторов, снижение уровней *avb3* - интегрин, гликоделина, инсулиноподобного фактора роста, связывающего белок 1, нарушение экспрессии генов, что вносит свой вклад в неудачи имплантации в программе ЭКО [41].

Доказано негативное влияние *гидросальпингсов* на исходы программ ВРТ за счет эмбриотоксического воздействия жидкости, поступающей в полость матки, а также снижения рецептивности эндометрия из-за нарушенной экспрессии цитокинов, участвующих в имплантации бластоцисты [4]. В ряде исследований было показано подавление экспрессии LIF, *avb3*-интегринов, *НОХА 10* у пациенток с гидросальпинксами, что отражает снижение имплантационного потенциала эндометрия [28][114].

Врожденные аномалии развития матки также могут быть причиной неудачи имплантации в циклах ЭКО. Неблагоприятное воздействие данной патологии на рецептивность эндометрия связывают с нарушением экспрессии мРНК генов гомеобокса *НОХА 10* и *НОХА 11*, поскольку последние играют важную роль в регуляции развития Мюллеровых каналов, дефект формирования которых приводит к большей части аномалий развития матки [28].

Описано несколько механизмов, посредством которых *миома матки* отрицательно влияет на имплантацию эмбриона, в том числе увеличение сокращений миометрия, измененный профиль цитокинов, аномальная васкуляризация эндометрия, хронические воспалительные процессы, а также изменение экспрессии белка *НОХА 10* в стромальных клетках во время окна имплантации у 69% больных [28][114]. Известно, что субмукозная и интерстициальная миома матки с центрипитальным ростом и деформацией полости связаны со снижением частоты имплантации в циклах ЭКО, что подтверждается увеличением частоты наступления беременности после оперативных вмешательств [28]. Спорным остается вопрос о влиянии на исход программ ВРТ интерстициальной миомы без деформации полости матки.

Некоторые исследования указывают на негативное влияние интерстициальной миомы матки на имплантацию и частоту наступления беременности в программе ЭКО, в частности, при размерах >4 см, в то время как другие не находят этой взаимосвязи [28]. При этом удаление интерстициальных узлов без деформации полости матки не увеличивает частоту клинической беременности и родов живым плодом, что подтверждает негативное влияние миомы матки на рецептивность эндометрия [28][166].

Нарушение регенерации эндометрия после механической травмы или воспалительного процесса является одной из причин возникновения *внутриматочных синехий*, которые препятствуют успешной имплантации эмбриона к поверхности эндометрия, и встречаются в 8,5 % случаев у пациенток с RIF [28] [43]. В поврежденном эндометрии наблюдается гипоксия, снижение процесса неоангиогенеза, а также изменение экспрессии цитокинов, ассоциированных с процессами адгезии [43].

Одной из возможных причин неудач ВРТ может быть *изменение рецептивности эндометрия в стимулированных циклах*. С одной стороны, в ряде исследований показан антипролиферативный эффект аналогов ГнРГ на эндометрий, поскольку использование как аГнРГ, так и антГнРГ приводит к снижению секреции ЛГ в лютеиновой фазе стимулированного цикла, а значит, к нарушению функции желтого тела и низким уровням прогестерона [147]. С другой стороны, проведение овариальной стимуляции приводит к изменению экспрессии маркеров рецептивности эндометрия. Так, в ряде работ выявлено снижение секреции LIF и интегринов в эндометрии стимулированных циклов, раннее появление зрелых пиноподий, а также изменение экспрессии рецепторов эстрадиола и прогестерона [27] [74].

В литературе обсуждается *роль преждевременной лютеинизации* (ПЛ - повышение уровня прогестерона) в сыворотке крови в день введения триггера овуляции, как одной из причин RIF [84] [28]. Так, Liu L. и соавторы в ретроспективном исследовании 6673 циклов ЭКО/ИКСИ обнаружили, что повышение уровня прогестерона в день введения триггера овуляции более 6

нмоль/л встречалось в два раза чаще у пациенток, имевших в анамнезе 2 и более неудачные программы [84]. В основе негативного влияния преждевременной лютеинизации на исход цикла лежит опережение созревания эндометрия, смещение «окна имплантации» вперед и как результат асинхронное взаимодействие с эмбрионом бластоцисты [4]. Кроме этого, повышенные уровни прогестерона в день назначения триггера овуляции вызывают значительные нарушения в профиле экспрессии генов эндометрия, ответственных за рецептивность [154].

Таким образом, несмотря на достаточное количество публикаций, посвященных проблеме повторных неудач имплантации в программе ЭКО, ряд вопросов остаются нерешенными бластоцисты [4].

1.3 Иммунологические аспекты повторных неудач имплантации

Молекулярные и иммунологические аспекты неудач имплантации - важная область исследований, заслуживающая отдельного внимания [72] [87]. Особый интерес представляет процесс децидуализации, который является определяющим для установления и поддержания беременности. Децидуальные стромальные клетки приобретают способность регулировать инвазию трофобласта и подавлять локальный материнский иммунный ответ) [22] [51]. В литературе существует много противоречивых данных по значимости различных иммунологических исследований и различных видов иммунотерапии у женщин с RIF [140] [137]. Нет консенсуса относительно того, необходимы ли скрининговые иммунологические исследования и приносит ли пользу иммунотерапия [1].

Некоторые аспекты иммунных взаимоотношений матери и эмбриона до сих пор остаются неизвестными, несмотря на то, что последние достижения в области молекулярной биологии позволили выявить некоторые иммунологические параметры, определяющие взаимосвязь между иммунными нарушениями матери и плода во время имплантации [1]. Экспрессия неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA), специфическая роль некоторых гормонов и цитокинов, функциональная активность естественных киллерных клеток в эндометрии и T-reg представляют собой основные параметры, характеризующие

формирование иммунологической толерантности матери к антигенам плода во время имплантации [91]. Доказана связь абберантных иммунных ответов и несбалансированного цитокинового профиля с бесплодием, неудачами имплантациями после ЭКО и повторными выкидышами [88].

В клинической практике имплантацию считают успешной, когда имеется ультразвуковое подтверждение наличия плодного яйца в полости матки. Наоборот, имплантация считается неудачной, если по ультразвуковым данным в полости матки отсутствует плодное яйцо. Неудача имплантации может произойти на ранних этапах адгезии и инвазии эмбриона, в этих случаях не будет объективных доказательств беременности, т.е. тест мочи или анализ крови на уровень ХГч будет отрицательным. Неудача имплантации может произойти позже, после успешной миграции эмбриона через поверхностный эпителий эндометрия, когда продуцируемый эмбрионом ХГч определяется в моче или крови, т.е. процесс имплантации нарушается до формирования плодного яйца. Такая ситуация клинически отражает биохимическую беременность. В программах ВРТ имплантация считается успешной, когда в полости матки визуализируется плодное яйцо через 3 недели после аспирации ооцитов, что соответствует 5 неделям гестации [Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group, 1994].

Успех имплантации зависит от качества эмбриона и его адекватной инвазии в децидуальную строму эндометрия. Под влиянием овариальных стероидов сложная сеть локально действующих пептидов в эндометрии регулирует восприимчивость эндометрия, устанавливает «диалог» между матерью и эмбрионом и постепенно обеспечивает имплантацию бластоцисты [87]. Имплантация бластоцисты сама по себе вызывает асептическую реакцию в эндометрии, подобную воспалению, и определенные цитокины (лейкиминоингибирующий фактор - LIF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор - GM-CSF, колониестимулирующий фактор - CSF1, IL-6, IL-11, фактор некроза опухолей - ФНО- α , интерлейкин-1 β - IL-1 β , IL - 10, IL-15, трансформирующий фактор роста- β - ТФР- β) считаются главными

модуляторами внутриматочных иммунных реакций [88] [93]. Таким образом, эмбрион плохого качества, молекулярные аномалии на эндометриальном уровне и аномальный «диалог» между эмбрионом и эндометрием могут привести к нарушениям имплантации. Несмотря на то, что взаимодействия между эмбрионом и матерью на молекулярном уровне во время адгезии бластоцисты и последующей инвазии к настоящему времени выяснены, этические ограничения в исследовании бластоцисты человека, недостаточность надежной модели имплантации *in vitro* и очевидные различия между механизмами деторождения у различных биологических видов препятствуют формированию четкого понимания причин нарушения имплантации у людей [1].

К настоящему времени в области репродуктивной иммунологии достигнуты значительные успехи, свидетельствующие о том, что нормальное осуществление репродуктивной функции возможно благодаря наличию уникальных врожденных и приобретенных иммунологических механизмов [1].

При наступлении беременности происходит специфическая перестройка материнского организма, заключающаяся в адаптации гормональной и сосудистой систем беременной, которая сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в иммунной системе, индуцирующими толерантность к антигенам плода. Комплекс иммунологических механизмов действует в период гестации, создавая благоприятный иммунологический фон для имплантации эмбриона, роста и созревания плаценты, а также органогенеза плода [47].

1.3.1 Роль естественных киллеров (NK) в имплантации

В процессах инвазии трофобласта важное участие принимают естественные киллерные клетки (NK-клетки). Аккумуляция NK-клеток в матке совпадает с периодом имплантации. NK-клетки эндометрия участвуют в контроле внутрисосудистой инвазии трофобласта, рекрутировании и функционировании других иммунных клеток, таких, как дендритные клетки и Т-лимфоциты [153]. При нормальной беременности NK-клетки функционируют, скорее, как

нецитотоксические, секретируя цитокины, хемокины и ангиогенные факторы. Однако их цитотоксический потенциал против тканей плода и матери может проявляться во время инфекционного воспаления [104]. Известно, что НК-клетки эндометрия продуцируют различные цитокины и факторы роста, ФНО- α , IL-10, ГМ-КСФ, IL-1 β , КСФ, ЛИФ и интерферон- γ [125]. Меньшая часть НК-клеток поверхностного эндометрия с фенотипом CD56^{low}CD16⁺, имеет непосредственную связь с ворсинами хориона в межворсинчатом пространстве. CD56^{low}-клетки продуцируют низкий уровень НК-производных цитокинов, но они являются мощными медиаторами естественной цитотоксичности [32]. Несмотря на то, что количество НК-клеток эндометрия меняется во время менструального цикла, на ранних сроках беременности НК-клетки составляют около 70 % всей популяции лейкоцитов в децидуальной оболочке. Временное и пространственное распределение НК-клеток эндометрия предполагает, что они могут участвовать в процессе имплантации и последующем росте и развитии плаценты. Вероятнее всего, этот процесс происходит за счет взаимодействия между их поверхностными рецепторами и молекулами HLA класса I, включая неклассические антигены С, Е, и G, экспрессированные на поверхности трофобласта. Несмотря на название, НК-клетки эндометрия, возможно, благоприятно влияют на трофобласт путем секреции цитокинов, которые способствуют глубокой инвазии трофобласта [95]. Позже было высказано предложение, что скопление НК-клеток эндометрия вокруг спиральных артерий децидуальной оболочки на ранних сроках беременности может быть связано с их влиянием на развитие и ремоделирование маточных спиральных артерий, количество и качество которых очень важно для успешного пролонгирования беременности [24]. Изменения количества, фенотипа и/или функции НК-клеток эндометрия может способствовать прерыванию беременности на ранних сроках. Используя проточную цитометрию, Лашапель с соавторами сообщили об уменьшении содержания субпопуляции CD56^{bright}CD16⁻ НК-клеток и повышении содержания субпопуляции CD56^{low}CD16⁺ НК-клеток при

одинаковом проценте маточных NK-клеток в предимплантационном эндометрии у женщин с повторными выкидышами [75]. В более позднем исследовании аналогичный анализ не выявил различий в доле NK-клеток эндометрия и в количестве $CD56^+CD16^-$ или $CD56^+CD16^+$ среди NK-клеток эндометрия у 20 женщин с двумя и более выкидышами в анамнезе по сравнению с образцами от женщин из контрольной группы [135]. Возможно, различия в фенотипе NK-клеток эндометрия у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами с превалированием в сторону $CD56^{low}CD16^+$ -клеток может иметь важное функциональное значение. Так как антиген CD16 несет ответственность за антитело-зависимую цитотоксичность и $CD16^+$ -клетки имеют более выраженную цитолитическую активность, чем $CD16^-$ -NK-клетки, то большее число $CD16^+$ -NK-клеток в популяции женщин с повторными самопроизвольными выкидышами может быть связано с потерей беременности. И наоборот, так как известно, что популяция $CD56^{bright}CD16^-$ -клеток продуцирует факторы роста, которые важны для формирования плаценты, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста А и С, фактор роста плаценты и ангиопоэтины 1-го и 2-го типа, то уменьшение этой клеточной популяции у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами может быть связано с созданием неблагоприятной среды для развития плода [81]. Несмотря на то, что влияние NK-клеток эндометрия на повторные самопроизвольные выкидыши было показано в ряде исследований, остается малоизученной их роль у пациенток с низкой частотой имплантации эмбриона после ЭКО. С помощью метода проточной цитометрии Matteo и др. оценили субпопуляционный состав лимфоцитов эндометрия у молодых пациенток с повторными неудачами имплантации после ЭКО в анамнезе. Было показано отсутствие различий в проценте эндометриальных $CD56^+CD16^-$ и $CD56^{bright}CD16^-$ -клеток среди пациенток с RIF по сравнению с долей субпопуляции тех же лимфоцитов эндометрия у пациенток с успешным исходом программы ЭКО [94]. Наоборот, Fukui и др. в своем исследовании показали значительное снижение процента

CD56^{bright}CD16⁻клеток в образцах эндометрия пациенток с неудачной имплантацией после ЭКО по сравнению с контрольной группой [49].

Разноречивые результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований по оценке влияния функциональных нарушений NK-клеток на патогенез повторных неудач имплантации [1].

1.3.2 Цитокиновый профиль и баланс Th1/Th2

T-лимфоциты, экспрессирующие антигенсвязывающий рецептор (TCR γ) являются источниками цитокинов Th1 и Th2 типов. Оптимальное соотношение Th1- и Th2-цитокинов в фетоплацентарной области является важным фактором, обеспечивающим резистентность к развивающемуся эмбриону на этапе его инвазии. Считается, что полноценной инвазии трофобласта способствует преобладание синтеза цитокинов Th2- (ИЛ4, ИЛ10), что ограничивает цитолитическую и апоптогенную активность децидуальных клеток.

Есть данные о том, что мононуклеарные клетки периферической крови женщин с нормальной беременностью в анамнезе продуцируют значительно более высокие уровни цитокинов Th2-типа (ИЛ4 и ИЛ10), в то время как мононуклеарные клетки периферической крови у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами в анамнезе секретировали значительно более высокий уровень цитокинов Th1 (ИЛ2, ИФ- γ и ФНО- α) [115].

Группа авторов исследовала специфические ответы материнских мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* на аутологичные плацентарные клетки и антигены трофобласта и показала сдвиг в сторону продукции цитокинов Th2-типа в периферической крови у женщин с нормальной беременностью в сравнении с пациентками с повторными самопроизвольными выкидышами в анамнезе [115]. И, наоборот, Бэйтс в 2002 году, сравнивая

продукцию цитокинов Th1 и Th2 стимулированных мононуклеарными клетками периферической крови у беременных, которые ранее перенесли повторный самопроизвольный выкидыш, и у фертильных женщин репродуктивного возраста, показали повышение продукции ИЛ4 и ИЛ10 и уменьшение продукции ИФ- γ и ФНО- α у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами [19].

Исследования, в которых оценили внутриклеточную продукцию цитокинов субпопуляциями Т-лимфоцитов периферической крови, показали, что количество ИЛ-10, продуцируемого CD3⁺CD8⁺Т-клетками было значительно ниже, а количество ФНО- α , продуцируемого CD3⁺CD4⁺Т клетками - выше у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами, чем у небеременных женщин контрольной группы. Также показано, что соотношения ИФ- γ /ИЛ4, ФНО- α /ИЛ4 и ФНО- α /ИЛ10 в клетках CD3⁺CD8⁻Т-хелперах у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами были более высокими, чем в аналогичных клетках женщин контрольной группы. Та же группа ученых исследовала экспрессию внутриклеточных цитокинов НК-клетками периферической крови женщин с повторными самопроизвольными выкидышами. Содержание клеток с фенотипом CD56^{bright} ИФ - γ ⁺ ФНО- α ⁺ было существенно выше, а с фенотипом CD56^{bright} ИЛ4⁺ ИЛ10⁺ существенно ниже у пациенток с повторными самопроизвольными выкидышами, чем у женщин из контрольной группы [50].

Беременность определяют как противовоспалительное состояние за счет превалирования Th2-типа иммунного ответа, однако, появились данные, указывающие на то, что для нормального процесса имплантации и инвазии трофобласта необходимо провоспалительное микроокружение [96][117]. Показано, что имплантация бластоцисты в эндометрий ассоциируется с увеличенной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов [96] [158].

Однако высокие уровни провоспалительных цитокинов, связанные с наличием длительно текущих воспалительных заболеваний, могут отрицательно влиять на ранние этапы развития эмбриона [39]. Поэтому важно, чтобы перед наступлением беременности цитокиновая система была сбалансирована.

Несмотря на многочисленные исследования цитокинового профиля у женщин с повторными самопроизвольными выкидышами, недостаточно данных об их роли у пациенток с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО [1].

Показано повышенное содержание ИЛ-10 в периферической крови женщин из контрольной группы по сравнению с содержанием в периферической крови женщин с бесплодием [52].

Ng S.C. с соавторами в своем исследовании показали, что количество в периферической крови $CD3^+CD8^+$ Т-клеток, продуцирующих ИЛ-10, было значительно ниже, а количество $CD3^+CD4^+$ Т-клеток, продуцирующих ФНО- α , было выше у женщин с неудачами имплантации после ЭКО, чем у женщин с успешной имплантацией [103].

Калу и соавторы сравнивали соотношения ИФ- γ /ИЛ4 и ФНО- α /ИЛ4 в периферической крови до лечения женщин с повторными неудачами имплантации с аналогичными показателями в периферической крови у этих пациенток после аспирации ооцитов и показали, что данные соотношения могут быть предикторами неудач в программе ЭКО [68]. Fasouliotis и группой исследователей показана взаимосвязь между содержанием ИФ- γ в периферической крови женщин с бесплодием и безуспешным циклом ЭКО, но отсутствие взаимосвязи между содержанием ФНО- α и исходом беременности после ЭКО [44]. Однако в исследовании другой группы исследователей показано отсутствие взаимосвязи как между содержанием ИФ- γ в периферической крови и бесплодием или ИФ- γ и исходом беременности, так и между содержанием ФНО- α и бесплодием или ФНО- α и исходом беременности у пациенток с бесплодием в программе ЭКО [52].

Результаты более позднего исследования показали, что уровни ФНО- α и ИФ- γ в периферической крови не имеют связи с показателями имплантации или частотой выкидышей у женщин после ЭКО. Однако системные уровни ФНО- α и ИФ- γ были значительно выше у женщин с высоким уровнем активированных НК-

клеток, что позволяет предполагать наличие не прямой связи между содержанием в периферической крови ФНО- α и ИФ- γ и безуспешным циклом ЭКО [150]. На данный момент в литературе имеется единая точка зрения о повышении соотношения Th1/Th2-типа цитокинов в периферической крови пациенток с повторными неудачами имплантации, однако требуются дальнейшие исследования для изучения роли различных цитокинов в генезе RIF бластоцисты [1].

1.3.3 Роль Т-регуляторных клеток в имплантации

В формирование иммуносупрессии большой вклад вносят Т-регуляторные клетки (Treg). У беременных женщин Treg-клетки составляют до 8% в периферической крови и до 20% от всех CD4⁺T-лимфоцитов в децидуальной ткани. Основным методом определения Treg клеток является метод проточной цитометрии с использованием антител к CD4 и CD25-антигенам, а также к внутриклеточному маркеру – транскрипционному фактору Foxp3. Treg являются важной составляющей в регулировании воспалительного иммунного ответа [126]. Многочисленные данные показывают, что Treg необходимы для адекватного функционирования материнской иммунной системы. Фенотипически эти клетки определяются как CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Они способны осуществлять контроль толерантности к собственным антигенам и регулировать аутоиммунитет. Эти клетки влияют на фертильность, что доказывается их увеличением в лимфатических узлах мышей за 2 дня до оплодотворения [13]. Это раннее увеличение Treg в лимфатических узлах сопровождается накоплением FOXP3⁺-клеток и повышением экспрессии мРНК FoxP3 в матке [55]. Действительно, в эндометрии число Treg увеличивается до овуляции и уменьшается во время лютеиновой фазы [14]. Кроме того, в периферической крови уровень Treg увеличивался в период овуляции, указывая на их ключевую роль в периовуляторный период менструального цикла [14]. Бесплодие также связано со снижением экспрессии мРНК FoxP3 в ткани эндометрия и уменьшением CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-клеток в периферической крови в фолликулярной фазе

менструального цикла у женщин после повторных неудачных программ внутриматочной инсеминации по сравнению с контрольной группой пациенток [66] [85]. У женщин с RIF отмечается, в том числе, увеличение продукции цитокинов Th1-направленности по сравнению с контрольной группой женщин репродуктивного возраста [1]. Эта разница в продукции цитокинов отчасти является результатом снижения супрессирующей способности Treg [83].

1.3.4 Экспрессия HLA

Толерантность материнской иммунной системы к антигенам плода отцовского происхождения плода обеспечивается за счет экспрессии неклассических молекул HLA-системы клетками трофобласта. Трофобласт не экспрессирует HLA-антигены II класса, а также классические антигены I класса - HLA-A и HLA-B [61]. Однако установлено, что клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют классические антигены I класса HLA-C и неклассические антигены I класса HLA-E, -F, -G [58].

Неклассические HLA-C антигены отличаются от A-и B- антигенов высоким полиморфизмом. Периферические и маточные NK распознают HLA-C антигены с помощью иммуноглобулин-подобных рецепторов, вариабельная область которых представлена двумя гаплотипами, A и B [107] [18]. Рецепторы, содержащие гаплотип A, обладают ингибиторной активностью (KIR-рецепторы), рецепторы с гаплотипом B способны активировать NK [107]. У женщин с привычными потерями беременности и частыми неудачами ЭКО, как правило, наблюдается низкое соотношение ингибирующих KIR и активирующих KIR на NK-клетках [58]. Результаты данных исследований свидетельствуют о значимости иммуноглобулиновых KIR-рецепторов и системы неклассических HLA - антигенов во взаимодействии и балансе активации и ингибирования активности NK-клеток для успешного осуществления процесса имплантации [155].

HLA-E-комплекс ингибирует NK-активность за счет воздействия на рецепторы CD94/NKG2, а также индуцирует цитотоксичность CD8⁺T-лимфоцитов

за счет взаимодействия с Т-клеточным рецептором [65]. Данные об антиген-презентирующих функциях HLA-F отсутствуют.

HLA-G антигены являются наиболее изученным из неклассических антигенов. HLA-G антигены представлены двумя формами: локализованными на поверхности или растворимыми формами sHLA-G. Растворимая форма sHLA-G определяется в плодово-материнской области и модулирует Т-клеточную активность и активирует апоптоз. sHLA-G обладает иммуносупрессорной активностью, вызывая апоптоз активированных $CD8^+$ Т-клеток определяется в периферической крови и амниотической жидкости матери во время беременности [77]. Иммунорегуляторная роль sHLA-G подтверждается тем, что их высокий уровень характерен для успешной беременности после ВРТ. Культуральная жидкость неимплантировавшихся эмбрионов не содержит sHLA-G. Возможно, sHLA-G контролирует локальную секрецию цитокинов за счет взаимодействия с $CD4^+$ Т-лимфоцитами кумулюсных клеток [111] или рецепторами NK-клеток [77]. Другим возможным механизмом иммуносупрессорной активности sHLA-G является апоптоз цитолитических $CD8^+$ Т-клеток на месте имплантации [77]. Экспрессия HLA - G обеспечивает реализацию широкого спектра иммуносупрессорных механизмов за счет связывания с поверхностными рецепторами материнских иммунокомпетентных клеток: лейкоцитарным Ig-подобным рецептором LILR B1 и B2, KIR2DL4, CD160, CD8 [105] [62]. Возможным непрямым механизмом влияния HLA-G молекул на взаимодействие NK-клеток с цитотрофобластом является ослабление поверхностной экспрессии продуктов HLA-E [108][102]. Однако последние исследования продемонстрировали, что содержание sHLA-G в супернантатах культур эмбрионов не всегда прогнозирует успех имплантации [156] [142].

Важную роль в плодово-материнских взаимоотношениях играют рецепторы KIR2DL4 на поверхности NK-клеток, способные передавать им как активирующие, так и ингибирующие сигналы. Множественность функций взаимодействия KIR2DL4 с HLA-G играет важную роль при беременности. Подтверждением этого могут служить высокие уровни экспрессии KIR2DL4

маточными NK-клетками женщин с нормальным течением беременности по сравнению с уровнем экспрессии NK-клеток женщин с привычным выкидышем. В ранних исследованиях 60-70-х годов было установлено, что плод, унаследовавший от отца HLA-антигены, отличные от материнских (гистонесовместимая беременность), обладают селективным преимуществом перед плодом, несущим одинаковые HLA -антигены родителей [71]. Подтверждением значимости иммунокомпетентности репродуктивных механизмов явились исследования на мышах с определенным МНС (histocompatibility complex)-гаплотипом [113] Согласно иммунологической гипотезе, предложенной Thomas et al. в 1985 году, HLA-совместимость может вызывать неадекватный ответ материнской иммунной системы, приводящий к нарушениям репродуктивной функции [148]. Согласно генетической гипотезе Thomas, репродуктивные неудачи могут быть связаны с появлением рецессивных летальных аллелей, сцепленных с определенным HLA-гаплотипом, в гомозиготном состоянии [148]. Beydoun и Saftlas, проанализировав более 40 исследований, посвященных соотношению материнских и отцовских HLA- гаплотипов, являющихся потенциальными факторами риска для привычного выкидыша, сделали вывод о недостаточности доказательств значимости совпадений HLA-генов для прогноза беременности [21].

В недавних исследованиях не было установлено взаимосвязи совпадений супружеских аллелей HLA-антигенов у пациенток с повторными спонтанными выкидышами и повторными неудачами имплантации после ЭКО с исходами беременностями и исходами программ ЭКО, соответственно [155]. Однако в более ранних исследованиях Greus была обнаружена ассоциация частоты повторных неудач имплантации после ЭКО с наличием у партнеров двух или более аналогичных генов HLA [36].

Таким образом, для оценки роли совпадений супружеских аллелей HLA-антигенов как риска репродуктивных потерь также необходимо проведение дальнейших исследований [1].

1.4 Иммуноterapia в преодолении повторных неудач имплантации

Отсутствует единая точка зрения на целесообразность использования различных видов иммунотерапии у женщин с неудачами имплантации в анамнезе (Амян,2017) [132].

Иммунизация отцовскими лимфоцитами – лимфоцитоиммунотерапия (ЛИТ) по мнению ряда авторов не является оптимальным методом коррекции RIF из-за возможных побочных эффектов для матери и плода в связи с непредсказуемым иммунным ответом как к аутологичным, так и к аллогенным компонентам крови [25] [146]. С точки зрения Elram T высокие дозы иммуноглобулина IVIg (intravenous immunoglobulin) несут меньший риск и более благоприятны для пациенток с RIF, имеющих общие HLA-аллели с партнерами. И хотя число общих аллелей, при которых показано назначение терапии IVIg, не определено, авторы исследования успешно лечили пациентов с всего лишь одним общим аллелем, назначая 30 г IVIg перед переносом эмбриона и 30 г при наличии сердцебиения плода по данным УЗИ [42]. Преимущества такого лечебного подхода все еще не определены, т.к. имеющиеся данные противоречивы. Но по мнению авторов, из-за высокой стоимости как HLA-тестирования, так и терапии IVIg, оценка вклада иммунной системы в генез RIF должна проводиться только после исключения других причин.

Другим препаратом, используемым для преодоления RIF, является интралипид. Инфузия 20 % р-ра интралипида улучшает исходы программы ЭКО у женщин с повторными неудачами имплантации [1]. Рутинно используемый интралипид – это жировая эмульсия, которая подавляет аномальную активность в периферических NK-клетках женщин с RIF как *in vitro*, так и *in vivo*. Roussev R. с соавторами показали, что внутривенная инфузия 2–4 мл 20 % раствора интралипида, разведенного в 250 мл хлорида натрия, эффективно подавляет патологическую NK–цитолитическую активность, превышающую нормативы на 11 % [122]. Эта модуляция иммунной системы, достигнутая однократным введением интралипида и продолжающаяся в течение нескольких недель, является основанием для терапии интралипидом пациенток с RIF, у которых

обнаружена повышенная цитотоксичность НК-клеток. Точный механизм модуляции иммунной системы интралипидом не ясен. Тем не менее, предполагается, что жирные кислоты в эмульсии служат лигандами для активации пролиферирующих активирующих рецепторов (PPARs), экспрессируемых НК-клетками. Активация этих ядерных рецепторов, как было показано, снижает НК-цитотоксичную активность, что приводит к повышению частоты имплантации и пролонгированию беременности. Возможность интралипида модулировать иммунную систему и позитивно влиять на имплантацию и пролонгирование беременности является многообещающим. Однако после анализа имеющихся в литературе данных, пришли к выводу, что эти результаты следует воспринимать с осторожностью. Необходимо провести крупномасштабные исследования по этому вопросу прежде, чем терапию интралипидом вводить в рутинную практику [137].

В литературе описаны данные о положительном эффекте локального повреждения эндометрия на имплантацию [17]. В исследование были включены пациентки с одной или двумя неудачами программы ЭКО, которым проводилась пайпель-биопсия эндометрия, по крайней мере, 4 раза в течение менструального цикла, предшествующего программе ЭКО/ПЭ. Результаты исследования показали, что после повреждения эндометрия частота наступления беременности достигла 66,7 % по сравнению с 30,3 % в группе пациенток, у которых беременность наступила в первой попытке ЭКО [17]. Эти первоначальные результаты были подтверждены в ряде исследований, которые также демонстрируют положительный эффект локального повреждения эндометрия [69][164][116]. Первоначально манипуляция в виде так называемого «scratches» (царапины) применялась четырехкратно [17]. Позже другие группы исследователей предпочли проводить биопсию эндометрия дважды: в пролиферативную фазу (7-10 день менструального цикла) и секреторную фазу (24-25 день менструального цикла) перед планируемой программой ЭКО [100]. В 2012 году группа авторов показала, что уже однократное проведение биопсии эндометрия на 5-7 день менструального цикла перед программой переноса

эмбриона приводит к значительному увеличению частоты наступления клинической беременности [136].

С целью повышения вероятности имплантации в программе ЭКО предпринимаются попытки воздействия на эндометрий путем введения в полость матки гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, приема различных препаратов с иммуносупрессивным эффектом (глюкокортикоидов, такролимуса) и т.д. [101] [97]. Была определена прогностическая роль уровня ряда различных цитокинов и факторов роста в фолликулярной жидкости пациенток, проходивших ЭКО в естественном цикле. Выяснилось, что высокий уровень Г-КСФ (G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор роста) является важным и достоверным прогностическим фактором наступления беременности и родов [79].

В недавнем опубликованном сообщении, в котором были исследованы KIR-рецепторы у пациенток с многочисленными неудачами ЭКО, было выявлено отсутствие от 3 до 7 типов рецепторов у 78% пациенток. Все пациентки получали препараты Г-КСФ каждые 3 дня в дополнение к обычной поддержке лютеиновой фазы цикла. Была получена частота наступления беременности 63,9 % (39 на 61 цикл) при частоте выкидыша 38,5 % (15 из 39) [159]. В исследовании Stamenov K. у 149 пациенток с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО на пятый день после овуляции полость матки была промыта раствором Г-КСФ. Наблюдалось статистически достоверное увеличение экспрессии LIF, важного маркера имплантации, и уменьшение соотношения $CD16^+CD56^{dim}/CD16^+CD56^{bright}$ [6].

1.5 Внутриматочное введение МПК как метод иммунокоррекции повторных неудач имплантации

Одним из новых и малоизученных методов иммунокоррекции при RIF является внутриматочное введение аутологичных мононуклеарных клеток перед переносом эмбриона в программе ЭКО. Роль периферических мононуклеарных клеток (МПК) в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с тех пор,

как было выявлено, что клетки селезенки беременных мышей могут регулировать рецептивность эндометрия [143]. Также в ряде исследований было показано, что МПК, полученные от женщин с беременностью ранних сроков, могут индуцировать продукцию прогестерона, усиливать инвазию эмбрионов мышей *in vitro* [98], а МПК, введенные в полость матки, повышают вероятность имплантации [78] [48].

Суть метода заключается в том, что МПК изолируют из периферической крови пациентки в день трансвагинальной пункции и инкубируют с ХГч, чтобы активировать их в течение 2-х дней. После этого активированные МПК вводят в полость матки для индукции дифференциации эндометрия. Через три дня производят перенос эмбриона на стадии бластоцисты в полость матки. Использование этого метода у пациенток с 4 и более неудачами имплантации в анамнезе повышало частоту имплантации и частоту клинической беременности [162]. Позднее было показано, что внутриматочное введение МПК без инкубации с ХГч также улучшает частоту имплантации в криоциклах как с гормональной подготовкой, так и в естественном цикле у женщин, имеющих до 3 - х неудач имплантации в анамнезе [106]. Однако эта терапия не улучшала исходы у женщин без повторных неудач имплантации [63]. С другой стороны, подобный подход применяли у мышей и было показано повышение частоты имплантации у мышей с предшествующими неудачами имплантации [163].

Обсуждаются несколько механизмов действия данного вида лечения. Во-первых, МПК могут индуцировать дифференциацию эндометрия, что повышает вероятность имплантации эмбриона [47]. Во-вторых, хотя МПК и являются аутологичными клетками, они индуцируют воспалительные реакции в полости матки *in vivo* [47]. В третьих, МПК могут секретировать протеазы, которые эффективно влияют на функцию и структуру поверхностных молекул, экспрессируемых на люминальных эпителиальных клетках эндометрия [64]. В четвертых, МПК, мигрируя из полости матки по направлению к строме, могут «указывать» путь для последующего прикрепления эмбриона и инвазии [64]. Наконец, МПК, активированные ХГч, могут вносить вклад в создание

благоприятного иммунного микроокружения для имплантации за счет повышения иммунной толерантности, которая таким образом может быть индуцирована к наполовину чужеродному эмбриону [132]. Основанием для использования активаторов МПК явились данные о том, что ХГч усиливает продукцию цитокинов МПК, повышая имплантационные свойства эндометрия [73].

Также было показано, что для активации МПК может использоваться кортикотопин-рилизинг гормон (КтРГ), который играет ключевую роль в стимуляции децидуализации эндометрия и формировании иммунологической толерантности иммунной системы матери к отцовским антигенам плода, индуцирует экспрессию Fas-лиганда (FasL), запуская апоптоз активированных Fas-позитивных Т-клеток [67] [91] [88]. Стимулирующее влияние МПК, активированных КтРГ, может быть обусловлено тем, что КтРГ является провоспалительным медиатором с максимальной экспрессией в период имплантации [90]. Поскольку имплантация характеризуется асептическим воспалением, КтРГ путем локального воздействия на эндометрий повышает способность к имплантации через асептическое воспаление, индуцируя децидуализацию эндометриальных стромальных клеток и усиливая эффекты прогестерона [96] [54].

Результаты различных исследователей подтверждают целесообразность использования аутологичных МПК для внутриматочного введения при лечении женщин с повторными неудачными имплантациями. Однако требуется дальнейшее проведение рандомизированных контролируемых испытаний для объективной оценки данного вмешательства [1].

Таким образом, несмотря на положительные результаты единичных исследований о влиянии иммуномодулирующей терапии МПК на эффективность программы ЭКО, не изучена эффективность и механизм действия данного метода преодоления повторных неудач имплантации. Сложный процесс имплантации бластоцисты включает в себя скоординированные во времени и пространстве эффекты многочисленных эндокринных и иммунных факторов. Имеются существенные доказательства, что нарушение экспрессии неклассических

молекул HLA, дисбаланс цитокинов, а также изменение в количестве и активности NK-клеток, возможно, вносят свой вклад в нарушения репродуктивной функции. Более полное представление о гормональной модуляции иммунного микроокружения эндометрия позволит разработать новые персонализированные терапевтические подходы для предотвращения повторных неудач имплантации [1].

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Рандомизированное контролируемое исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении сохранения и восстановления репродуктивной функции (заведующий - к.м.н. А.Н. Абубакиров). Иммунологические исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии (руководитель лаборатории - к.м.н. Л.В. Кречетова). Для достижения цели и поставленных задач исследования было обследовано 236 пациенток. В связи с несоответствием критериям включения из исследования выбыло 107 пациенток.

В конечном итоге в исследование было включено 129 женщин с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО (основная группа).

В зависимости от вида проводимой иммунотерапии основная группа путем простой рандомизации была разделена на 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.

На следующем этапе, в зависимости от протоколов ВРТ (стимулированный цикл и криоцикл), были выделены следующие подгруппы в каждой из трех групп: подгруппа 1а (n=17) – пациентки, которым внутриматочно вводили ХГч-активированных аутологичных МПК в стимулированном цикле, подгруппа 1б (n=25) - пациентки, которым внутриматочно вводили ХГч-активированных аутологичных МПК в криоцикле; подгруппа 2а (n=21) - пациентки, которым

внутриматочно вводили не активированные ХГч МПК в стимулированном цикле, подгруппа 2б (n=21) - пациентки, которым внутриматочно вводили не активированные ХГч и МПК в криоцикле; подгруппа 3а (n=22) - пациентки группы плацебо в стимулированном цикле и подгруппа 3б (n=23) - пациентки группы плацебо в криоцикле. Среди пациенток основной группы, как в стимулированном цикле, так и в криоцикле была выделена группа с субоптимальным эндометрием (толщина эндометрия в день переноса эмбриона от 7-8 мм, n=60).

Критерии включения:

1. Более 2-х неудачных программ ВРТ при переносе эмбрионов хорошего качества;
2. Трубно-перитонеальный фактор бесплодия;
3. Возраст пациенток до 37 лет включительно;
4. Нормальный овариальный резерв.
5. Умеренная патозооспермия у супруга
6. Наличие информированного согласия.

Критерии невключения:

1. Наличие системных аутоиммунных заболеваний;
2. Наличие мужского фактора (выраженная патозооспермия: концентрация сперматозоидов менее $6 * 10^6$ /мл, наличие менее 4 % морфологически нормальных сперматозоидов по строгим критериям Крюгера, а также наличие азооспермии);
3. Хронический эндометрит, верифицированный при гистологическом исследовании;
4. Врожденные аномалии матки, внутриматочные синехии;
5. Интерстициальная или субсерозная миома матки более 4 см, субмукозная миома матки любого размера, полип эндометрия;
6. Наружный и внутренний генитальный эндометриоз III-IV степени;

7. «Тонкий» эндометрий (толщина эндометрия менее 7 мм);
8. Гидросальпинкс и/или тубоовариальное образование с одной или обеих сторон;
9. Хромосомные аномалии супругов.

Критерии исключения:

1. Причины и осложнения, требующие отмены переноса эмбрионов в данном цикле ЭКО

Контрольную группу для сравнительной 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.

Все пациентки, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие в настоящем исследовании. Данная работа была одобрена комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» (выписка протокол №13 от 10.12.2015). Дизайн исследования отражен на рисунке 1.

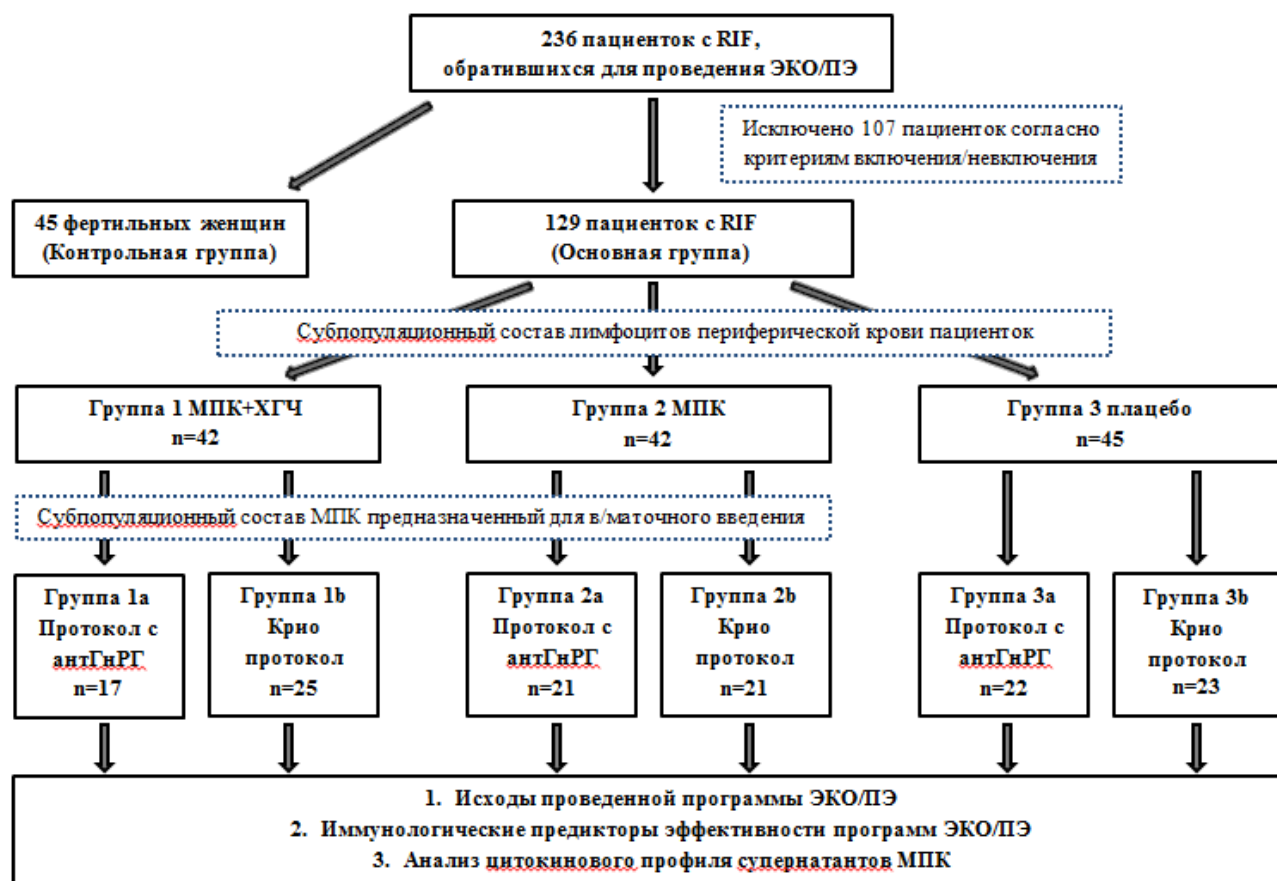


Рисунок 1. Дизайн исследования

2.2. Методы исследования

В соответствии с приказом № 107н Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 августа 2012 года “О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению” перед вступлением в программу ЭКО все пациентки были обследованы в амбулаторных условиях. Обследование включало общеклинические и специальные методы исследования.

Общеклинические исследования для обоих супругов включали:

- анализ крови на наличие антител к бледной трепонеме в крови (RW), антител класса М, G к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1,2), к антигену вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV);

- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода кандиды, паразитологическое исследование на атрофозоиты трихомонад;
- исследование соскоба из цервикального канала на хламидии, микоплазму и уреаплазму методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- исследование соскоба из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2, цитомегаловирус методом ПЦР;
- определение кариотипа супругов, медико-генетическое консультирование.
- клинический анализ крови;
- гемостазиограмму;
- биохимический анализ крови;
- определение группы крови и резус-фактора;
- общий анализ мочи;
- количественный анализ антител класса М, G к вирусу краснухи в сыворотке крови;
- гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т4 св), дегидроэпиандростерон-сульфат, пролактин, соматотропный гормон, кортизол, тестостерон, АМГ;
- ультразвуковое исследование органов малого таза на 5-7 день менструального цикла;
- цитологическое исследование мазков шейки матки, кольпоскопия;
- флюорографию;
- электрокардиографию (ЭКГ);
- заключение терапевта об отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО/ПЭ;
- УЗИ молочных желез (до 35 лет) или маммографию (после 35 лет);
- УЗИ щитовидной железы;

- консультации смежных специалистов по показаниям.

Обязательные исследования для мужчины включали:

- анализ крови на наличие антител к бледной трепонеме в крови (RW), антител класса М, G к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1,2), к антигену вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV);
- анализ эякулята;
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода кандида, паразитологическое исследование на атрофозоиты трихомонад;
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на хламидии, микоплазму и уреоплазму методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- флюорографию.

2.2.1 Общеклинические методы исследования

При первичной консультации производили сбор анамнестических данных у пациенток, который включал возраст, наличие профессиональных вредностей, курения и других «вредных привычек», семейное положение. При первичном осмотре измеряли рост, вес пациентки, оценивали ИМТ, артериальное давление (АД) и пульс. При сборе анамнеза обращали внимание на наследственность, аллергоанамнез, перенесенные инфекционные и хронические соматические заболевания. Полученные данные вносили в индивидуальную карту пациента. Подробно оценивали характер менструального цикла и особенности его становления (возраст менархе, регулярность и продолжительность цикла, характер менструации, дисменорею), а также репродуктивный анамнез пациенток (количество беременностей, наступивших естественным путем и с помощью ВРТ, срочных и преждевременных родов, абортов, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся, внематочных беременностей, наличие осложненных беременностей и родов, наличие живых детей и их развитие), уточнялось, наступали беременности с настоящим или иным половым партнером. Также

выясняли перенесенные гинекологические заболевания, объем перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза. Оценивали наличие перенесенных инфекционных и соматических заболеваний, оперативных вмешательств. У каждой женщины уточняли данные о продолжительности бесплодия, а также о проведенных диагностических и лечебных мероприятиях. Особое внимание уделяли изучению предшествующих попыток ЭКО, а именно: дата и время проведения ВРТ, протокол стимуляции суперовуляции, количество полученных ооцитов, количество полученных эмбрионов и их качество, качество эмбрионов при переносе в полость матки, исход программы.

Гинекологический статус оценивали путем проведения бимануального исследования, осмотра наружных половых органов, осмотра влагалища и шейки матки в зеркалах, определения состояния тела матки, придатков.

2.2.2 Гормональное обследование

Гормональное исследование осуществлялось в период ранней фолликулярной фазы (2-3 день менструального цикла). Гормональное исследование перед программой ЭКО выполнялось с целью оценки овариального резерва и функционального состояния эндокринной системы, нормативные значения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Нормативные показатели концентрации гормонов в сыворотке крови у женщин репродуктивного возраста

Гормональное исследование (единицы измерения)	Нормативные показатели
ЛГ (МЕ/л)	2,3–15,0
ФСГ (МЕ/л)	2,0–10,0
E ₂ (пкмоль/л)	150–480
Прл (мМЕ/л)	100–500

АМГ(нГ/мл)	1,0–2,5
ТТГ (мМЕ/л)	1,0–3,8

2.2.3 Ультразвуковое исследование органов малого таза

УЗИ органов малого таза выполняли на аппарате «Flex Focus 400» («BK Medical», Дания) с использованием трансвагинального датчика с частотой 6,5 МГц. Впервые УЗИ проводили в первую фазу (5-8 день) менструального цикла, предшествующего циклу стимуляции функции яичников. Оценивали размер и структуру тела матки, толщину и структуру эндометрия, размеры и объем яичников, количество антральных фолликулов в обоих яичников, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза. Впоследствии УЗ-мониторинг проводили на 2-3 день менструального цикла, в день начала стимуляции функции яичников, на 6-й день стимуляции функции яичников, в день введения триггера овуляции, в день трансвагинальной пункции и в день переноса эмбриона. Во время УЗ-мониторинга проводили оценку динамики фолликулогенеза и ответа эндометрия на стимуляцию функции яичников для своевременной возможности коррекции дозы вводимых гонадотропинов, а также с целью определения даты введения антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и даты введения триггера овуляции, а, следовательно, и даты трансвагинальной пункции яичников. При наличии положительного результата β -хорионического гонадотропина (β -ХГ) УЗИ органов малого таза выполняли на 21 день после ПЭ в полость матки с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Следующее УЗИ органов малого таза проводили через 5-6 недель после ПЭ в полость матки с целью определения сердцебиения эмбриона.

2.2.4 Исследование эякулята

Оценка параметров спермограммы производилась дважды: при предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ЭКО и в день ТВП. Перед проведением ТВП супругу пациентки был рекомендован

соответствующий половой режим. Сбор материала производился в стерильный контейнер путем мастурбации после 3-4 дней полового воздержания в стерильный пластмассовый контейнер для сбора эякулята. При анализе эякулята определяли характеристики клеточных элементов: концентрацию сперматозоидов, их подвижность, наличие морфологических изменений сперматозоидов, количество лейкоцитов, а также количество и типы незрелых клеток сперматогенеза [Сокур С. А. Оптимизация исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с повышенным уровнем анеуплоидии в сперматозоидах: дисс. канд. мед. наук: 14.01.01/ С. А. Сокур. М., 2012. - 146 с.] [114] Также эмбриолог оценивал объем спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, рН.

Оценка параметров спермограммы производилась в соответствии с нормативами ВОЗ (2010) (таблица 2) [Cooper T. G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H. W., Behre H. M., Haugen T. B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M. T., Vogelsong K. M. World Health Organization reference values for human semen characteristics // Hum Reprod Update 2010. - Vol. 16. - №3. - P. 231-245].

Таблица 2. Нормативные показатели спермограммы

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	>1,5 мл
рН	$\geq 7,2$
Вязкость	0,1 – 2,0 см
Время разжижения	<60 мин
Концентрация лейкоцитов	<1 млн/мл
Концентрация сперматозоидов	>20 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	>40 млн
Подвижность сперматозоидов	Общая подвижность сперматозоидов ≥ 40 % Сперматозоиды с прогрессивным движением ≥ 32 %
Морфология	≥ 4 % нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	≥ 58 % живых сперматозоидов

Агглютинация	Отсутствует
Клетки сперматогенеза	2 – 4 кл/100

Для оценки патологии эякулята руководствовались следующими критериями:

- аспермия – отсутствие эякулята;
- азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте;
- олигозооспермия – снижение концентрации сперматозоидов ниже <15 млн/мл;
- астенозооспермия – снижение подвижности сперматозоидов ниже нормальных значений (общая подвижность <40%, сперматозоиды с прогрессивным движением <32 %);
- тератозооспермия – повышение количества сперматозоидов с аномальной морфологией (>96 %);
- олигоастенотератозооспермия — сочетание олигозооспермии, астенозооспермии и тератозооспермии;
- астентератозооспермия (АТ) – сочетание астенозооспермии и тератозооспермии;
- олиготератозооспермия (ОТ) – сочетание олигозооспермии и тератозооспермии;
- олигоастенозооспермия (ОА) – сочетание олигозооспермии и астенозооспермии.

2.3 Специальные методы исследования

2.3.1 Протокол стимуляции суперовуляции

Стимуляцию функции яичников проводили по стандартному фиксированному протоколу с применением препаратов рекомбинатного ФСГ (рФСГ) со 2–4-го дня менструального цикла и назначением антагониста ГнРГ (антГнРГ). Стартовая доза индуктора подбиралась, исходя из параметров овариального резерва пациенток (возраст, уровень ФСГ, АМГ, количество антральных фолликулов и овариальный ответ на предыдущую стимуляцию). 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 вводился при наличии лидирующих фолликулов диаметром 17 мм и более. В качестве триггера использовался человеческий хорионический гонадотропин (ХГч) в дозе 7500-10000 МЕ.

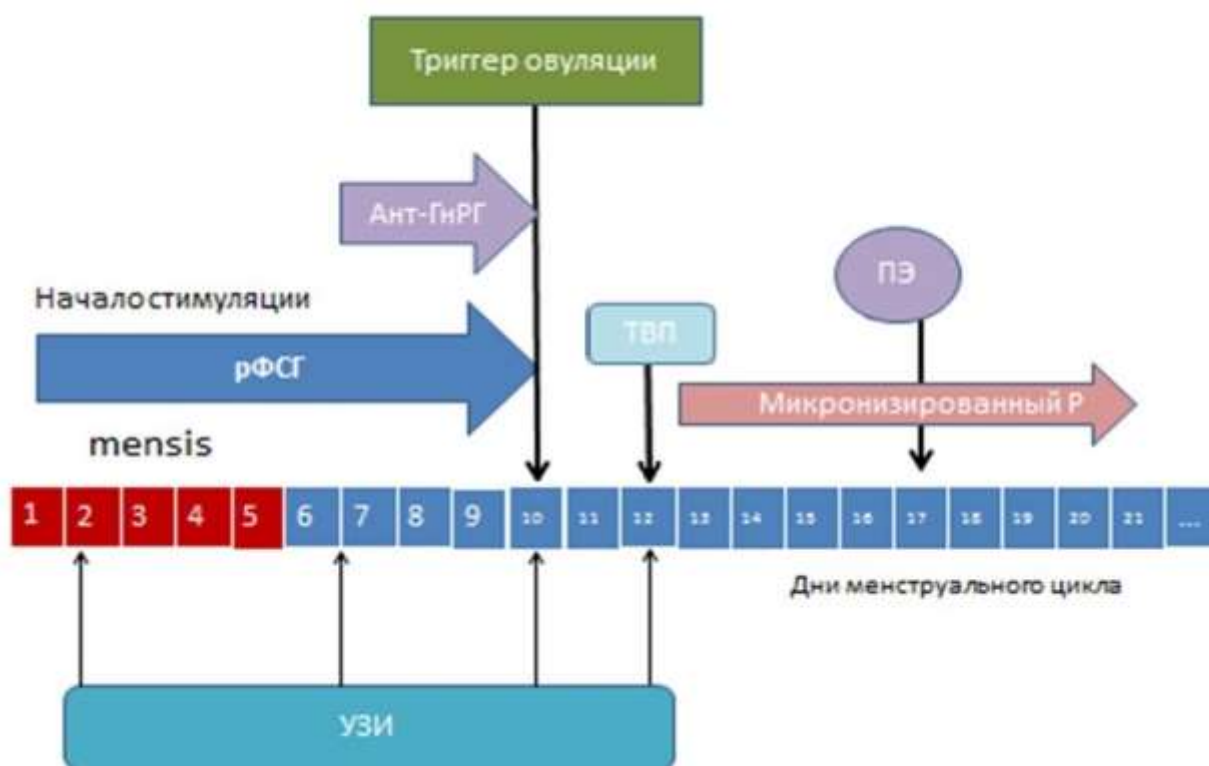


Рисунок 2. Стандартный протокол с ант – ГнРГ

2.3.2 Трансвагинальная пункция яичников

Трансвагинальную пункцию (ТВП) яичников производили в асептических условиях через 35–36 часов после введения препарата ХГч под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под трансвагинальным ультразвуковым контролем с использованием одноразовых игл (Vitrolife IVF Media) (рисунок 2).

2.3.3 Эмбриологический этап, перенос эмбрионов и посттрансферный период программы ЭКО

На эмбриологическом этапе ооциты идентифицировались сразу же после аспирации фолликулов при помощи диссекционного микроскопа на нагретой поверхности. Клетки преинкубировались *in vitro* в течение 2–3 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5 % CO₂. Учитывая безуспешные попытки ЭКО в анамнезе, оплодотворение выполнялось методом ICSI.

На эмбриологическом этапе оценивали количество и качество полученных ооцитов, количество полученных эмбрионов (морул, бластоцист) и качество полученных эмбрионов (класс А, В, С). Нормальное оплодотворение регистрировали при наличии двух симметричных по размеру пронуклеусов в цитоплазме через 16-18 часов после проведения ICSI. В случае наличия одного или трех и более пронуклеусов в цитоплазме оплодотворение расценивали как аномальное. Ооцит считали неоплодотворившимся при отсутствии пронуклеусов в его цитоплазме.

Оценку качества полученных эмбрионов осуществляли по морфологическим критериям в соответствии с классификацией, принятой Istanbul consensus workshop on embryo assessment (ESHRE, 2011) («модифицированная» классификация D. Gardner) [Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting // *Reprod Biomed Online* 2011. - Vol. 22. - №6. - P. 632-646].

Классификация внутренней клеточной массы:

- I класс (А) – хорошо различима, содержит много компактно расположенных, плотно упакованных клеток;
- II класс (В) – хорошо различима, но имеет незначительные дефекты (небольшой объем, неплотно упакована, мало клеток);
- III класс (С) – трудно различима, содержит всего несколько клеток.

Классификация трофэктодермы:

- I класс (А) – хорошо организована, многоклеточная, формирует плотный эпителий;

– II класс (B) – содержит малое количество неравномерно распределенных клеток;

– III класс (C) – незначительное количество клеток.

Перенос эмбрионов в полость матки производили в асептических условиях на 5-е сутки культивирования с использованием катетера Wallace. 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.

2.3.4 Криопрокол

Проведение криоцикла осуществляли на фоне подготовки эндометрия с использованием препаратов эстрогенов (прогинова в дозе 6 мг/сут или дивигель в дозе 3 гр/сут) и микронизированного прогестерона (утрожестан в дозе 600 мг/сут) под контролем УЗИ. Перенос размороженных после витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 6-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона под ультразвуковым контролем (рисунок 3).

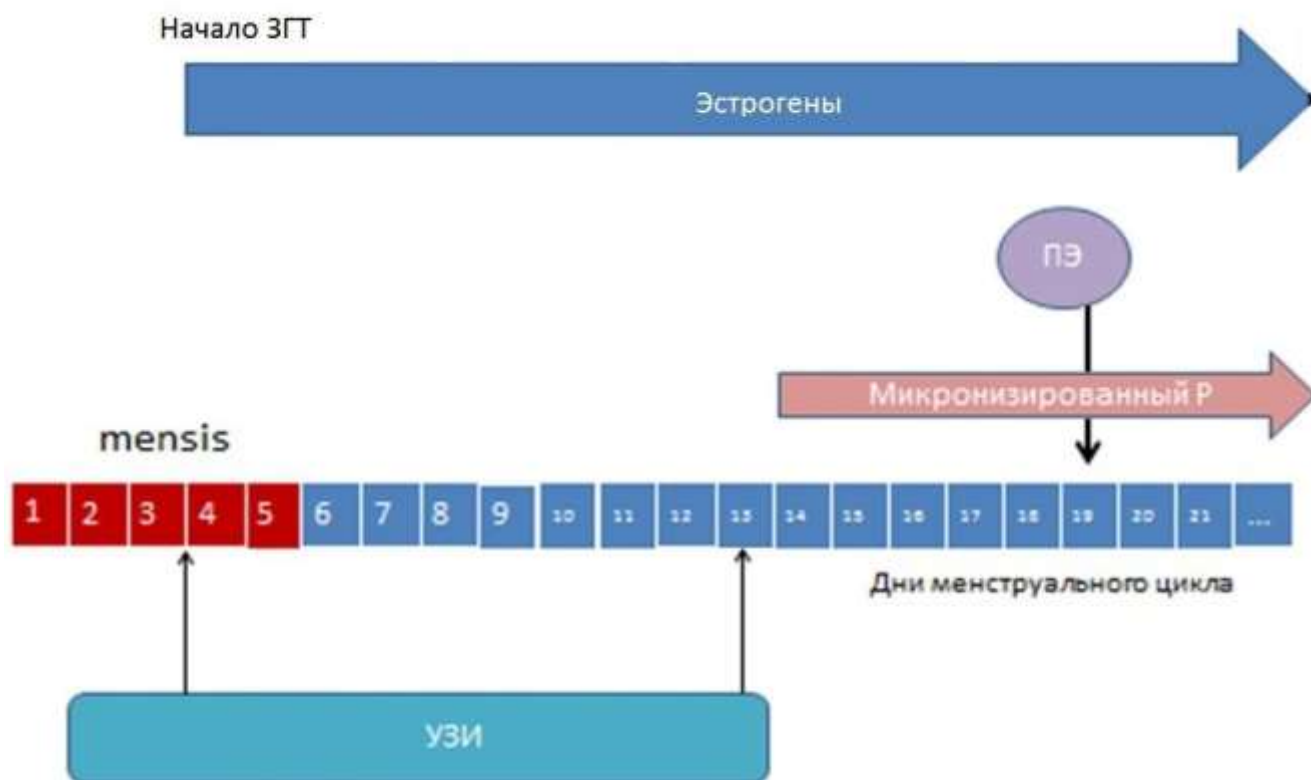


Рисунок 3. Схема криопротокола

Эффективность программы оценивали путем исследования концентрации β ХГч в сыворотке крови через 12-14 дней после переноса эмбриона. При уровне β ХГч ≥ 20 МЕ/л констатировали положительный результат. При условии положительного β 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.

2.4 Иммунологические методы исследования

Анализ иммунного статуса пациенток производился в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель лаборатории – к.м.н. Кречетова Л.В.).

2.4.1 Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови

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 Treg как субпопуляцию с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$. Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью мАт к CD45, меченных перидинин-хлорофилл протеином (Per-CP), (Dako, Дания). Для оценки позитивно-окрашенных субпопуляций использовали соответствующие ФИТЦ или ФЭ-меченые изотипические IgG. Для оценки процентного содержания Treg использовали набор, содержащий моноклональные антитела к антигенам CD4, меченые Per-CP (eBioscience, США), CD25, меченые ФИТЦ (Becton Dickinson, США) и CD127, меченые ФЭ (eBioscience, США). Оценивали долю Treg среди CD4⁺-клеток. Моноклональные антитела добавляли непосредственно к цельной крови, затем лизировали с помощью раствора FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest.

Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводилось мультиплексным методом с использованием стандартной 9-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine Th1/Th2 Assay (Bio-Rad, США) для определения GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, (p70), IL-13, TNF- α и Bio-Plex Pro™ TGF- β 3-plex Assay для определения TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) и последующей обработкой полученных результатов с использованием приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США).

2.4.2 Методика внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток

Методика утверждена на Ученом совете ФГБУ «НЦ АГиП им.ак. В.И. Кулакова» Минздрава России. Методика состоит из этапа выделения клеток, культивирования клеток и внутриматочного введения.

1. Выделение и подготовка клеток к процедуре введения

1.1. У пациенток, которым процедура назначена согласно критериям включения, осуществляли забор периферической крови для получения фракции мононуклеарных клеток до вступления в протокол ВРТ на 2-4 день менструального цикла, в день трансвагинальной пункции в группе пациенток с протоколом с антГнРГ и в день начала введения микринизированного прогестерона – в группе с криопротоколом.

1.2. Забор крови из локтевой вены осуществляли в процедурном кабинете в стерильные пробирки общим объемом 18 мл, содержащей в качестве консерванта гепарин (вакутейнер Sarstedt Monovette LH/9мл кат № 5033611).

1.3. Выделение мононуклеаров.

1.3.1. Процедуру выделения осуществлял врач клинической лабораторной диагностики.

1.3.2. Выделение мононуклеаров осуществлялся в ламинарном шкафу, оснащенном необходимым лабораторным оборудованием для выделения мононуклеарных клеток в стерильных условиях.

1.3.3. Этапы выделения.

Кровь тщательно перемешивали, разводили в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:2 и выделяли мононуклеарные клетки на градиенте фиколл-пак с плотностью 1,077.

После центрифугирования в течение 30 минут при 1500 об/мин отбирали кольцо, содержащее мононуклеары, и переносили в другую пробирку для отмывания культуральной средой путем центрифугирования в течение 10 минут при 1500 об/мин.

Процедуру отмывки повторяли 3 раза.

В полученной взвеси определяли количество клеток путем визуального подсчета в камере Горяева. Окончательная концентрация мононуклеаров составляла не менее 20-25 млн в 1мл.

1.3.4 Осадок МПК в 1 мл культуральной среды (RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10% фетальной сыворотки и гентамицина) инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C либо в присутствии ХГч (10мкл «Прегнил» 5000МЕ/мл на 1*10⁶кл) в течение 48 часов, либо без него в зависимости от принадлежности пациентки к исследуемой группе.

1.3.5 Через 48 часов инкубирования мононуклеары ресуспендировали и в объеме 200 мкл в стерильной пробирке передавали для внутриматочного введения. Избыточный объем супернатанта замораживали и хранили до анализа при -80°C.

2. Внутриматочное введение выделенных мононуклеров

2.1. Процедура введения является врачебной манипуляцией.

2.2. Процедура введения осуществлялась на базе блока ЭКО 1-го гинекологического (отделения сохранения и восстановления репродуктивной функции)

2.3. Все манипуляции осуществлялись с учетом правил асептики и антисептики.

2.4. Перенос МПК в полость матки выполнялся через 48 часов после забора аутологичной крови в день трансвагинальной пункции в группе пациенток с протоколом с антГнРГ, и в день начала введения микринизированного прогестерона – в группе с криопротоколом. После обработки наружных половых органов шейка матки обнажалась в зеркалах. В цервикальный канал под контролем УЗИ вводился катетер для переноса эмбрионов, заполненный суспензией МПК, которую медленно вводили в полость матки.

2.5. После внутриматочного введения пациентка находилась на кресле не менее 10-15 минут под наблюдением среднего медицинского персонала. (рисунки 4, 5).



Рисунок 4. Внутриматочное введение в протоколе с антГнРГ

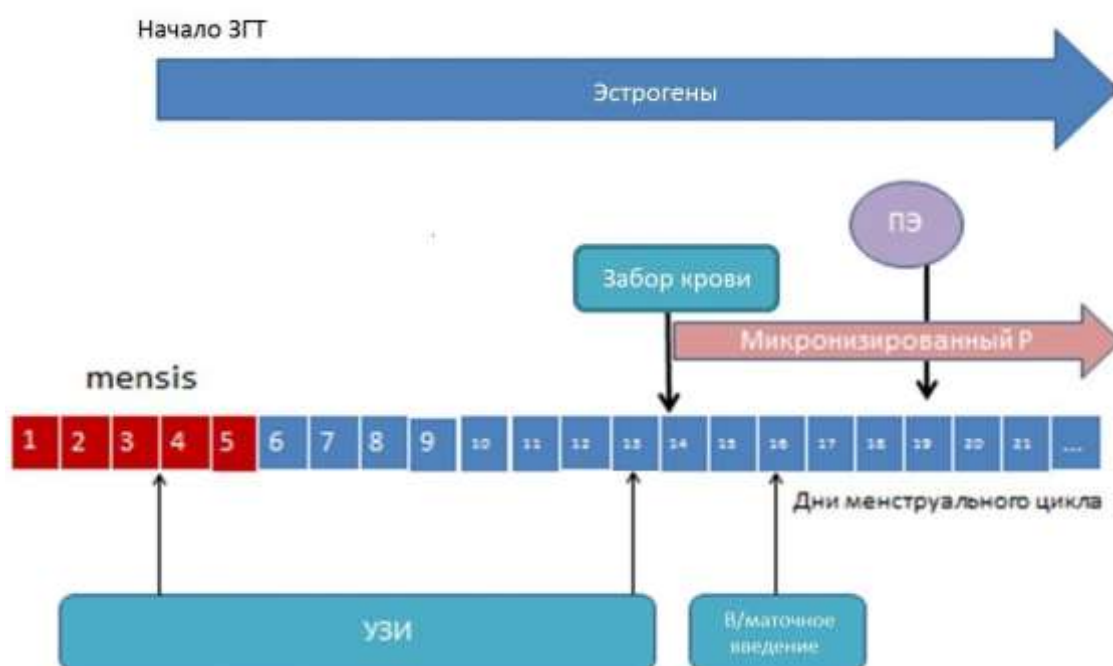


Рисунок 5. Внутриматочное введение в криопротоколе

Эффективность методики внутриматочного введения оценивали как клиническую беременность при наличии живого эмбриона по данным УЗИ через 4-5 недель после переноса эмбриона.

2.5 Статистический анализ полученных результатов

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 (δ), 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 перцентили (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.

Глава 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с целью и задачами исследования, согласно критериям включения и невключения, основную группу составили 129 пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе, которая была разделена на 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 программы ВРТ (стимулированный цикл или криоцикл), были выделены следующие подгруппы в каждой из трех групп: подгруппа 1а (n=17) – пациентки, которым внутриматочно вводили аутологичные МПК, активированные ХГч, в стимулированном цикле, подгруппа 1б (n=25) – пациентки, которым внутриматочно вводили аутологичные МПК, активированные ХГч, в криоцикле; подгруппа 2а (n=21) – пациентки, которым внутриматочно вводили МПК, не активированные ХГч, в стимулированном цикле, подгруппа 2б (n=21) – пациентки, которым внутриматочно вводили МПК не активированные ХГч в криоцикле; подгруппа 3а (n=22) – пациентки группы плацебо в стимулированном цикле и подгруппа 3б (n=22) – пациентки группы плацебо в криоцикле. Среди пациенток основной группы, как в стимулированном цикле, так и в криоцикле, была выделена группа пациенток с субоптимальным эндометрием (толщина эндометрия в день переноса эмбриона составляла 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.

3.1 Клинико-anamнестическая и лабораторная характеристика пациенток с RIF

Проведен анализ клинико–anamнестических и лабораторных характеристик пациенток с повторными неудачами ВРТ, включенных в исследование. Результаты анализа показали, что женщины всех групп были сопоставимы по возрасту. Медиана возраста женщин, включенных в исследование, в группе 1 составила 34 года (интерквартильный интервал 30–35 лет), в группе 2 – 32 года (интерквартильный интервал 30–35 лет), в группе 3 – 34 года (интерквартильный интервал 31–36 лет) ($p>0,05$).

Анализ менструальной функции пациенток исследуемых групп показал, что возраст менархе в трех группах был в пределах от 10 до 18 лет ($13,0\pm 0,1$), продолжительность менструального цикла в среднем составила в группе 1- $30,1\pm 0,3$ дней, группе 2- $29,0\pm 0,3$ дней, группе 3- $32,0\pm 0,7$ дней ($p >0,05$). Нарушений становления и характера менструального цикла среди обследованных женщин выявлено не было. Статистически значимых различий по всем перечисленным показателям в трех исследуемых группах не выявлено ($p>0,05$).

Перенесенные заболевания

Данные о хронических экстрагенитальных заболеваниях пациенток с бесплодием представлены в таблице 3.

Таблица 3. Структура и частота экстрагенитальных заболеваний пациенток, включенных в исследование

Нозологические формы хронических экстрагенитальных заболеваний	Группа 1 МПК+ХГч (n=42)	Группа 2 МПК (n=42)	Группа 3 плацебо (n=45)	p
Детские инфекции	87,5% (35)	88,9% (24)	83,9% (26)	$p_1= 0,985$ $p_2= 0,927$ $p_3= 0,864$

Заболевания желудочно- кишечного тракта	2,5% (1)	14,8% (4)	6,5% (2)	p ₁ = 0,159 p ₂ = 0,821 p ₃ = 0,541
Заболевания мочевыделительной системы	5,0% (2)	7,4% (2)	3,2% (1)	p ₁ = 0,987 p ₂ = 0,965 p ₃ = 0,902
Заболевания сердечно- сосудистой системы	2,5% (1)	0,0% (0)	3,2% (1)	p ₁ = 0,987 p ₂ = 0,974 p ₃ = 0,945
Заболевания органов дыхания	2,5% (1)	7,4% (2)	3,2% (1)	p ₁ = 0,726 p ₂ = 0,965 p ₃ = 0,902
Заболевания эндокринной системы	7,5% (3)	11,1% (3)	19,4% (6)	p ₁ = 0,943 p ₂ = 0,259 p ₃ = 0,616
Миопия различной степени	5,0% (2)	0,0% (0)	3,2% (1)	p ₁ = 0,654 p ₂ = 0,982 p ₃ = 0,963

Примечание. p - частота встречаемости. p₁- сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 2, p₂ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2 и 3, p₃ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 3.

Большинство пациенток отмечали детские инфекции в анамнезе. В структуре хронических заболеваний преобладали заболевания эндокринной системы (гипотиреоз в исходе аутоиммунного тиреоидита), заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастродуоденит).

Имеющиеся соматические заболевания у пациенток трёх групп на момент включения в программу ЭКО были в стадии ремиссии и не являлись противопоказанием для проведения программы ЭКО/ПЭ, наступления и вынашивания беременности. При анализе встречаемости хронической соматической патологии не было выявлено значимых различий между исследуемыми группами.

Данные о перенесенных гинекологических заболеваниях представлены в таблице 4.

Таблица 4. Структура и частота перенесенных гинекологических заболеваний пациенток, включенных в исследование

Нозологические формы гинекологических заболеваний	Группа 1 МПК+чХГ (n=42)	Группа 2 МПК (n=42)	Группа 3 плацебо (n=45)	p
Хронический сальпингоофорит	77,5% (31)	48,1% (13)	83,9% (26)	p ₁ = 0,678 p ₂ = 0,713 p ₃ = 0,428
Инфекции, передающиеся половым путем	22,5% (9)	22,2% (6)	19,4% (6)	p ₁ = 0,1 p ₂ = 0,977 p ₃ = 0,1
Миома матки	15% (6)	7,4% (2)	12,9% (4)	p ₁ = 0,578 p ₂ = 0,126 p ₃ = 0,858
Наружный генитальный эндометриоз I-II степени	35,7% (15)	23,8% (10)	24,4% (11)	p ₁ = 0,478 p ₂ = 0,215 p ₃ = 0,408
Патология шейки матки	22,5% (9)	7,4% (2)	16,1% (5)	p ₁ = 0,194 p ₂ = 0,713 p ₃ = 0,540
Полип эндометрия	5,0% (2)	22,2% (6)	6,5% (2)	p ₁ = 0,802 p ₂ = 0,215 p ₃ = 0,175

Примечание. p - частота встречаемости. p₁- сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 2, p₂ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2 и 3, p₃ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 3.

В структуре гинекологических заболеваний, перенесенных пациентками основной группы, преобладал хронический сальпингоофорит – 77,5% в 1-ой группе, 48,1% во 2-ой группе и 83,9% в группе плацебо. При сравнительной оценке структуры и частоты гинекологических заболеваний у пациенток трех групп не было выявлено статистически значимых различий.

Также не выявлено статистически значимых различий в структуре и частоте перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза у пациенток трех групп (p>0,05).

Длительность бесплодия колебалась от 3 до 14 лет и в среднем составила в группе 1 - 6,0±0,3 лет, в группе 2 и 3 - 5,0±0,2 лет. Первичное бесплодие было выявлено у 28 (66,7 %) пациенток 1-ой группы, 26 (61,9 %) пациенток 2-ой

группы и у 26 (57,8 %) пациенток 3-й группы. Вторичное бесплодие было выявлено у 14 (33,3 %), 16 (38,1 %), 19 (42,2 %) пациенток трех групп, соответственно ($p > 0,05$) (рис. 6).

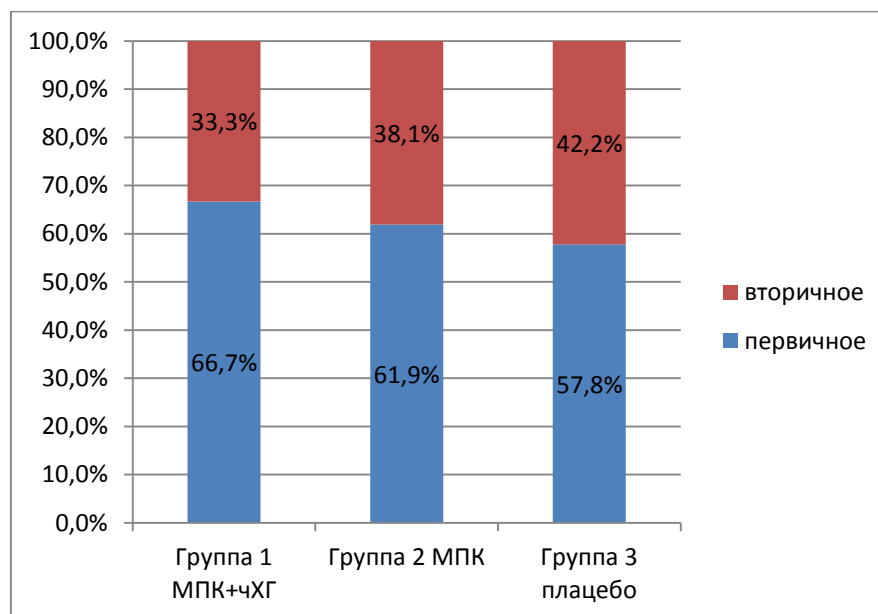


Рисунок 6. Характер бесплодия обследованных пациенток

Бесплодие было обусловлено трубно – перитонеальным фактором у 18 (42,9 %) женщин 1-ой группы, у 19 (45,2 %) женщин 2-ой группы и у 13 (28,9 %) женщин 3-й группы ($p > 0,05$). Мужской фактор был выявлен у 24 (57,2 %), 22 (52,4 %) и 31 (68,9 %) супружеских пар трех групп соответственно, характеризующийся умеренными нарушениями сперматогенеза, которые наиболее часто проявлялись в виде астенозооспермии I–II степени (49,8 %) и астенотератозооспермии I–II степени (26,9 %). Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) I–II степени распространенности диагностирован у 10 пациенток: в 9,5 % и 14,3 % случаев в группе 1 и 2, соответственно. Сочетание факторов наблюдалось у 24 (18 %) женщин. Идиопатическое бесплодие отмечено у 28 (17,6 %) пациенток (рисунок 7). Значимых различий по характеру бесплодия среди пациенток исследуемых групп не выявлено.

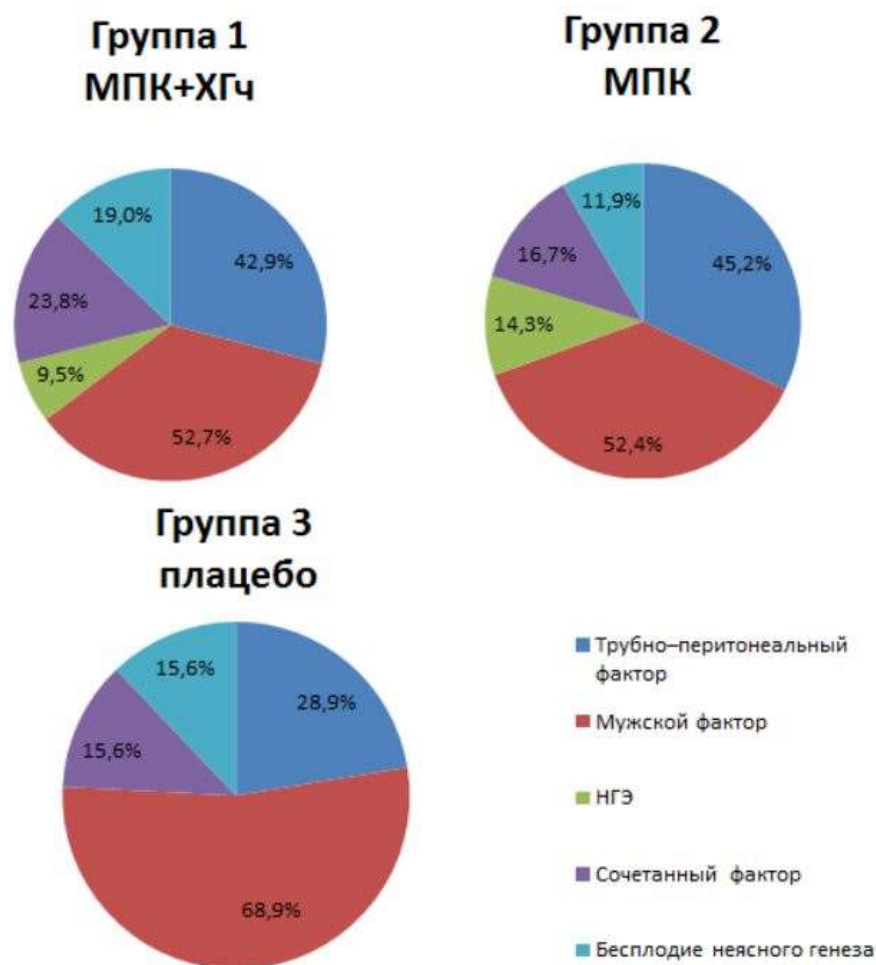


Рисунок 7. Структура причин бесплодия пациенток, включенных в исследование.

Число безуспешных попыток ЭКО в анамнезе было сопоставимо в 3-х группах: в 1-ой группе 2 неудачи имели 14 (33,3 %) пациенток, 3 или 4 неудачи – 27 (64,3 %) пациенток и 5 неудач имела одна пациентка (2,4 %). Среди пациенток 2-ой группы 2 неудачи имели 12 (28,6 %) пациенток, 3 или 4 неудачи - 28 (66,7 %) пациенток и более 5-ти неудач имели две пациентки (4,8 %). Среди пациенток 3-ой группы 2 неудачи имели 7 (15,6 %) пациенток, 3 или 4 неудачи - 31 (68,9 %) пациентка и 5 неудач имели две пациентки (4,4 %) ($p > 0,05$) (рисунок 8).

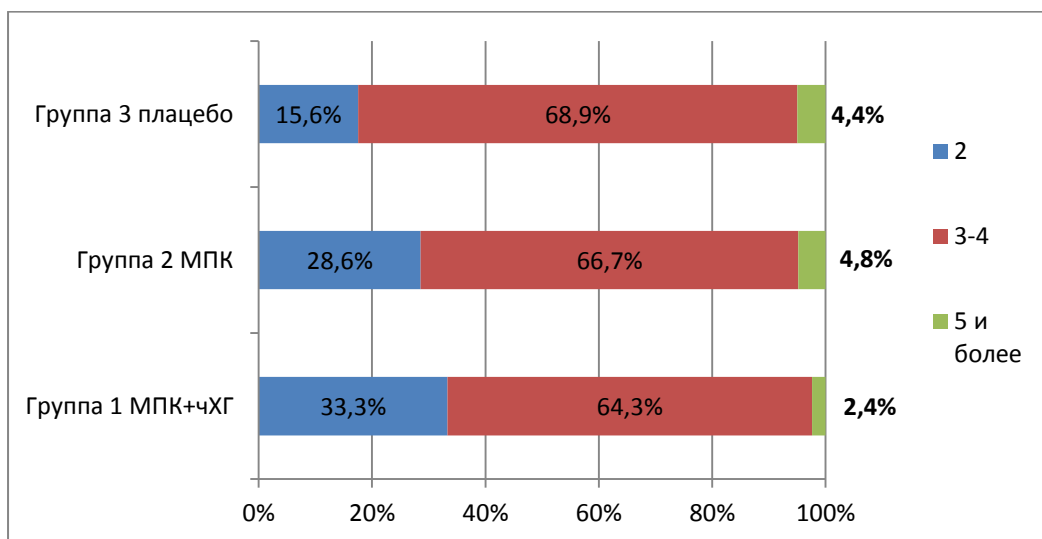


Рисунок 8. Число неудачных попыток ЭКО в анамнезе обследованных пациенток.

Гормональный статус исследуемых пациенток

Концентрация гормонов в плазме крови пациенток оценивали в раннюю фолликулярную фазу цикла (на 2-3 день менструального цикла). Данные гормональных параметров пациенток представлены в таблице 5.

Таблица 5. Базальные уровни гормонов пациенток исследуемых групп

Параметры	Группа 1 МПК+чХГ (n=42)	Группа 2 МПК (n=42)	Группа 3 плацебо (n=45)	p
ФСГ, МЕ/л	6,5± 1,3	6,3± 1,6	6,4± 1,5	p ₁ = 0,496 p ₂ = 0,652 p ₃ = 0,813
ЛГ, МЕ/л	5,3± 1,6	5,0± 2,3	5,9± 2,6	p ₁ = 0,476 p ₂ = 0,247 p ₃ = 0,153
E ₂ , пмоль/л	132,03± 20,24	140,13± 33,10	128,13± 19,71	p ₁ = 0,218 p ₂ = 0,419 p ₃ = 0,709
Прл, мМЕ/л	207,93± 53,68	229,37± 61,83	235,26 ±57,79	p ₁ = 0,136 p ₂ = 0,458 p ₃ = 0,208
АМГ, нг/мл	2,4 ±1,9	2,2± 1,2	2,3± 1,8	p ₁ = 0,656 p ₂ = 0,240 p ₃ = 0,149
ТТГ, мМЕ/л	2,07± 0,62	2,20± 0,61	1,96± 0,61	p ₁ = 0,401 p ₂ = 0,480 p ₃ = 0,165

Примечание. p_1 - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 2, p_2 - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2 и 3, p_3 - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 3.

Как видно из данных таблицы, концентрации гормонов в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла и параметры овариального резерва у пациенток трех групп на момент вступления в программу ЭКО находились в пределах нормативных значений, статистически значимых различий между исследуемыми группами не выявлено.

Таким образом, анализ клинико – анамнестических и лабораторных данных показал, что исследуемые пациентки с повторными неудачами имплантации находились в репродуктивном возрасте, имели регулярный характер менструального цикла, а также сопоставимые факторы бесплодия и показатели овариального резерва.

3.2 Сравнительный анализ основных параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа

Стимуляция суперовуляции проводилась по фиксированному протоколу с антагонистом ГнРГ (антГнРГ) и стимуляцией яичников препаратами рекомбинатного ФСГ (рФСГ) со 2–4-го дня менструального цикла. Параметры стимулированного цикла и эмбриогенеза в обеих группах представлены в таблице 6.

Таблица 6. Сравнительные характеристики основных параметров стимулированного цикла и эмбриологического этапа

Параметры	Группа 1а МПК+ХГч (n=17)	Группа 2а МПК (n=21)	Группа 3а плацебо (n=22)	p
Стартовая доза гонадотропина, МЕ, (M±m)	184± 35	185± 40	177± 36	$p_1= 0,878$ $p_2= 0,432$ $p_3= 0,414$
Суммарная доза гонадотропина, МЕ, (M±m)	1707± 436	1745± 423	1593± 442	$p_1= 0,719$ $p_2= 0,284$ $p_3= 0,188$

Продолжительность стимуляции, дни, (M±m)	9± 1	10± 1	9 ±1	p ₁ = 0,182 p ₂ = 0,405 p ₃ = 0,523
Получено ооцитов Из них на стадии метафазы II (MII), M±m	9,3±0,2 7,4±0,2	8,6±0,3 7,5±0,3	10,4±0,5 8,5±0,5	p ₁ = 0,469 p ₂ = 0,907 p ₃ = 0,488
Количество зигот (2PN), M±m	7,3±0,3	6,8±0,3	6,0±0,2	p ₁ = 0,478 p ₂ = 0,215 p ₃ = 0,408
Количество дробящихся эмбрионов, M±m	5,6±0,2	5,9±0,2	5,6±0,2	p ₁ = 0,072 p ₂ = 0,905 p ₃ = 0,065
Количество бластоцист, M±m	4,5±0,3	4,3±0,3	4,3±0,3	p ₁ = 0,689 p ₂ = 0,958 p ₃ = 0,054
Перенесено эмбрионов, M±m	1,85±0,038	1,83±0,035	1,83±0,035	p ₁ = 0,247 p ₂ = 0,792 p ₃ = 0,549
Перенесено эмбрионов хорошего качества, M±m	1,04±0,08	0,8±0,07	0,8±0,07	p ₁ = 0,062 p ₂ = 0,967 p ₃ = 0,074

Примечание. p - частота встречаемости. p₁- сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 2, p₂ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 2 и 3, p₃ - сравнение частот встречаемости признаков в группах 1 и 3.

Анализ параметров стимулированного цикла не выявил существенных различий в суммарной дозе гонадотропинов, продолжительности стимуляции, количестве полученных ооцитов и ооцитов хорошего качества, количестве зигот и бластоцист (p>0,05). Анализ эмбриологических показателей также продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов (1,85±0,038, 1,83±0,035, 1,83±0,035, p₁= 0,247, p₂= 0,792, p₃= 0,549) и количестве эмбрионов хорошего качества (1,04±0,08, 0,8±0,07, 0,8±0,07, p₁= 0,062, p₂= 0,967, p₃= 0,074).

3.3 Эффективность программ ВРТ в зависимости от вида иммунотерапии

3.3.1 Исходы стимулированных циклов в зависимости от вида иммунотерапии.

Оценка клинических исходов программ ВРТ у пациенток в стимулированном цикле показала, что частота биохимической беременности составила 23,3% (14 случаев), клиническая беременность наступила у 11 (18,3%) пациенток, частота имплантации составила 23,2%. Было диагностировано 5 (8,3%) случаев самопроизвольных выкидышей. Беременность закончилась родами у 6 (10%) пациенток. Далее была проведена сравнительная оценка исходов программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК, как активированных ХГч, так и без активации перед переносом эмбриона в стимулированном цикле у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Таблица 7. Исходы стимулированных циклов программы ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации

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.

Как видно из данных таблицы 7, эффективность стимулированных циклов 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 (35,3% и 18,2%, $p_3 = 0,034$; 33,3% и 18,2%; $p_2 = 0,006$), частота наступления клинической беременности (29,4% и 13,7%, $p_3 = 0,009$; 23,8 % и 13,7%, $p_2 = 0,035$), частота имплантации (33,3% и 7,7%, $p_3 = 0,001$; 28,6% и 7,7%, $p_2 = 0,01$), частота прогрессирующей беременности (17,6% и 9%, $p_3 = 0,025$; 14,3% и 9%, $p_2 = 0,011$) и частота родов (17,6% и 9%, $p_3 = 0,024$; 14,3% и 9%, $p_2 = 0,035$). Вместе с тем, не выявлено существенных различий в анализируемых показателях в группе пациенток с введением МПК, активированных ХГч и в группе без активации ХГч ($p > 0,05$). При анализе частоты выкидышей не было выявлено статистически значимых различий у пациенток исследуемых групп.

3.3.2 Исходы криоциклов в зависимости от вида иммунотерапии.

Аналогичный анализ у пациенток в криоцикле показал, что частота биохимической беременности составила 34,8% (24 случая), клиническая беременность наступила у 20 (29%) пациенток, частота имплантации составила 25,2%. Было диагностировано 3 (4,3%) случая самопроизвольных выкидышей. Беременность закончилась родами у 15 (21,7%) пациенток. Данные сравнительной оценки исходов программ ВРТ при проведении

внутриматочного введения аутологичных МПК, как активированных ХГч, так и без активации перед переносом эмбриона в криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации представлены в таблице 8.

Таблица 8. Сравнительная характеристика исходов программы ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона в криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации

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.

В криоцикле частота частота биохимической беременности, частота имплантации, частота наступления клинической беременности, частота прогрессирующей беременности и частота родов живым плодом была

существенно выше в группе пациенток, которым проводили внутриматочное введение МПК, как активированных ХГч, так и в группе женщин с введением МПК без активации ХГч в сравнении с аналогичными показателями в группе плацебо (40% и 25%, $p_3 = 0,001$; 36% и 20,8%, $p_3 = 0,005$; 35,4 и 9,8%, $p_3 = 0,034$. 28 % и 17,4%, $p_3 = 0,032$; 28 % и 8,7%, $p_3 = 0,033$; 38,1% и 25%, $p_2 = 0,006$; 33,3% и 20,8%, $p_2 = 0,025$; 30,3% и 9,8%, $p_2 = 0,026$, 28,6% и 17,4%, $p_2 = 0,017$, 28,6% и 8,7%, $p_2 = 0,024$). При этом в группе пациенток с введением МПК, активированных ХГч, частота анализируемых показателей была выше по сравнению с группой женщин с введением МПК без активации ХГч, хотя достоверно значимых отличий не зафиксировано (40% и 38,1%, $p_1 = 0,097$; 36% и 33,3%, $p_1 = 0,095$; 35,4% и 30,3%, $p_1 = 0,084$; 28% и 28,6%, $p_1 = 0,134$, 28% и 28,6%, $p_1 = 0,134$). При анализе частоты выкидышей не зафиксировано статистически значимых различий у пациенток исследуемых групп. (Таб.8).

3.3.3 Исходы программ ВРТ с использованием иммунотерапии аутологичными МПК у пациенток с субоптимальным эндометрием.

Анализ исходов программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона у пациенток с субоптимальным эндометрием с повторными неудачами имплантации как в стимулированном цикле, так и в криоцикле показал, что частота биохимической беременности, частота клинической беременности, частота имплантации, частота прогрессирующей беременности и частота родов живым плодом в группе пациенток с субоптимальным эндометрием 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) (Рис.9)

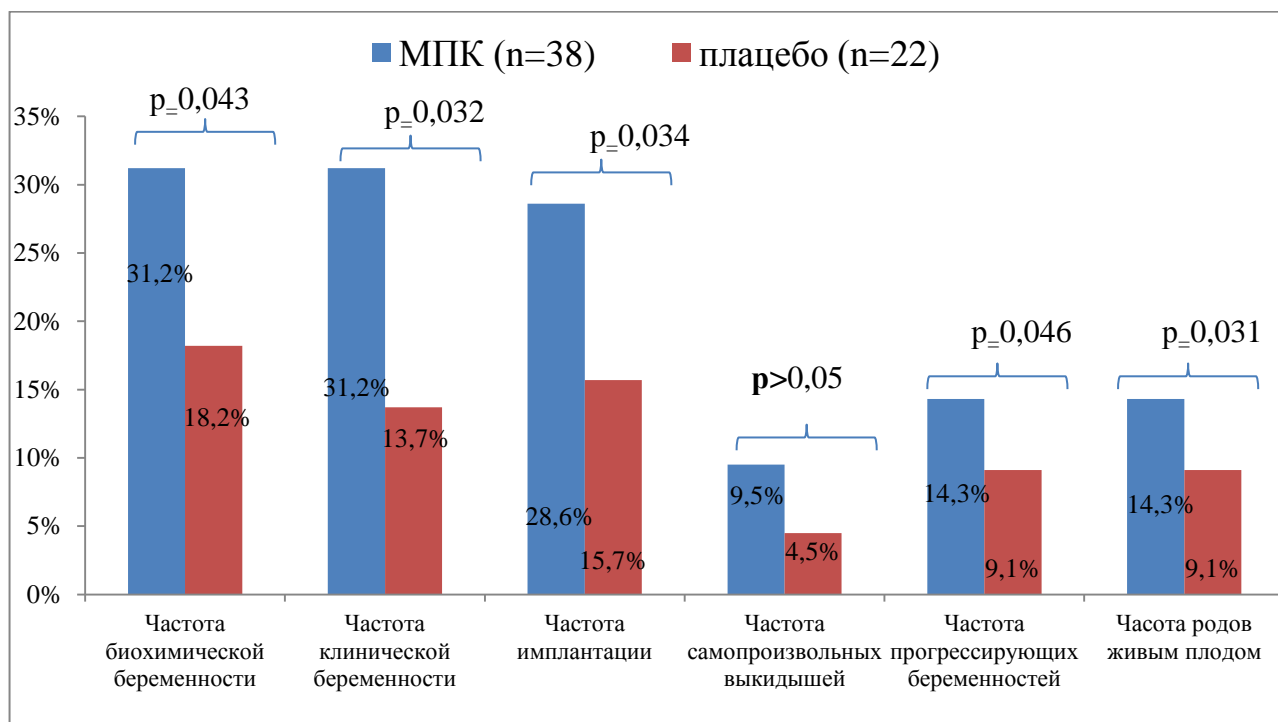


Рисунок 9. Исходы программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона у пациенток с субоптимальным эндометрием.

3.3.4 Исходы программ ВРТ с использованием иммунотерапии аутологичными МПК в зависимости от количества неудач имплантации в анамнезе.

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 (Рис.10).

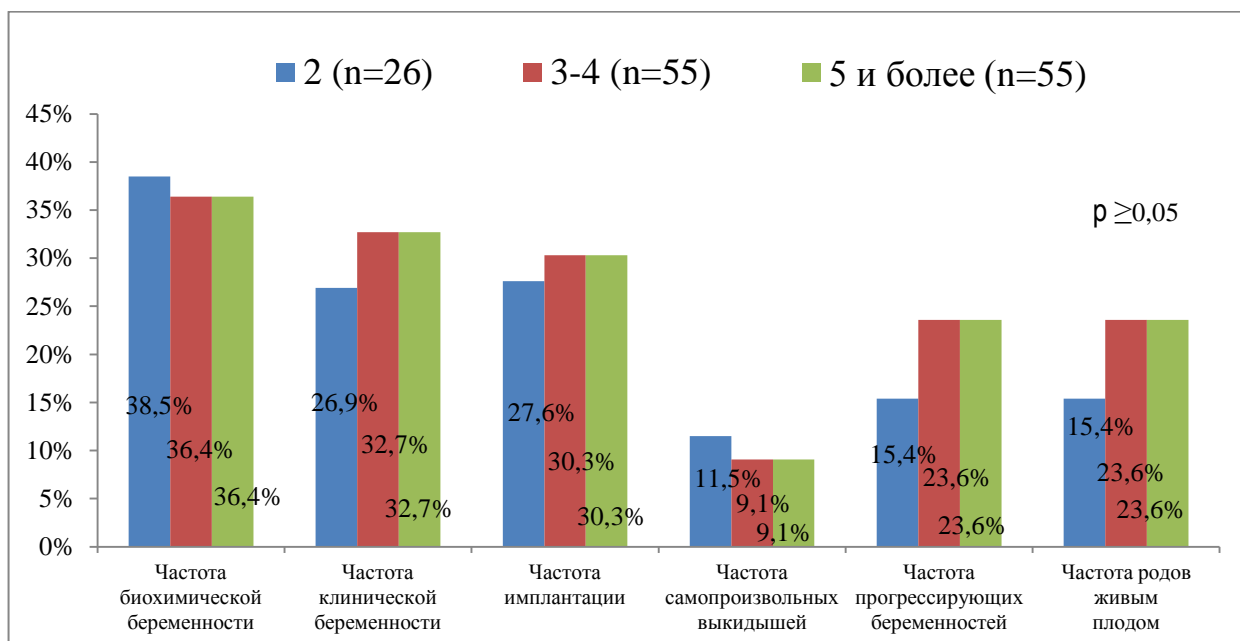


Рисунок 10. Исходы программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона у пациенток с 2-мя, 3-4, 5 и более неудачами имлантации в анамнезе.

Исходя из данных рисунка 10, 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.

3.4 Результаты иммунологического обследования женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе

3.4.1 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе

Для понимания механизма влияния введения аутологичных мононуклеарных клеток на эффективность имплантации у женщин с RIF были проведена оценка содержания субпопуляций лимфоцитов с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией в периферической крови женщин с RIF до вступления в программу ЭКО (таблица 9).

Таблица 9. 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 ⁺ CD8 ⁺	25,6 ± 1,7	27,0 ± 1,7
CD3 ⁻ CD8 ⁺	5,4 ± 1,4	3,20 ± 0,3
CD16 ⁺	12,9 ± 1,8 *	9,1 ± 0,8
CD56 ⁺	17,6 ± 1,7 *	12,2 ± 0,9
CD56 ⁺ TCR $\gamma\delta$	1,5 ± 0,3 *	2,8 ± 0,5
TCR $\gamma\delta$	7,8 ± 1,0 *	16,0 ± 2,1
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	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 $p \leq 0,05$.

Из представленных данных следует, что у женщин с RIF до вступления в программу ВРТ был выше уровень лимфоцитов с естественной киллерной функцией (CD16⁺ и CD56⁺) и ниже 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 $\gamma\delta$) по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. Отмечается также тенденция к увеличению уровня цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD3⁻CD8⁺ ($p=0,07$). Выявленные изменения свидетельствуют о дисбалансе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с RIF, и, следовательно, о возможности применения в лечении данных пациентов методов иммуномодулирующей терапии.

3.4.2 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в стимулированном протоколе с учетом вида иммунотерапии

Забор периферической крови для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов в стимулированных циклах производили в день трансвагинальной пункции.

Результаты оценки субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в стимулированном цикле с различными видами иммунотерапии аутологичными МПК представлен в таблице 10.

Таблица 10. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в протоколе с антГнРГ

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов (%) в группах		
	МПК + ХГч	МПК	плацебо
	Беременность + (n=5)	Беременность + (n=5)	Беременность + (n=1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24,1 ± 1,9	21,7 ± 3,4	24,3 ± 3,3
CD3 ⁻ CD8 ⁺	5,3 ± 0,8 **	12,0 ± 2,7 *	5,6 ± 1,4
CD16 ⁺	9,8 ± 1,4 **	18,3 ± 2,7 *	9,9 ± 1,5
CD56 ⁺	15,6 ± 1,1	25,2 ± 5,9	17,0 ± 1,9
CD56 ⁺ TCRγδ	1,8 ± 0,4	3,3 ± 1,2	2,4 ± 0,6
TCRγδ	9,7 ± 3,0	11,9 ± 3,5	11,2 ± 1,7
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	7,4 ± 0,4	6,4 ± 0,5 *	8,8 ± 0,6

Примечание. * - различия со значениями женщин в группе плацебо значимы при $p \leq 0,05$. ** - различия между подгруппами МПК и МПК+ХГч значимы при $p \leq 0,05$.

Как следует из данных таблицы 10, у пациенток с наступившей беременностью в протоколе с антГнРГ с внутриматочным введением

неактивированных аутологичных МПК, уровень цитотоксических CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов и CD16⁺-NK-лимфоцитов был значимо выше, чем в подгруппе плацебо и у пациенток с внутриматочным введением аутологичных МПК, активированных ХГч, а также значимо ниже уровень Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией. Субпопуляционный состав периферических лимфоцитов у женщин в подгруппе плацебо и в подгруппе с МПК+ХГч не отличался.

Были рассчитаны характеристики диагностической значимости определения содержания периферических CD3⁻CD8⁺ - лимфоцитов, Treg с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} и CD16⁺NK-лимфоцитов у женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с внутриматочным введением неактивированных аутологичных МПК, для прогноза наступления беременности (таблица 12 и рисунок 14).

Таблица 11. Параметры диагностической значимости определения содержания CD3⁻CD8⁺, Treg с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} и CD16⁺NK-лимфоцитов в периферической крови женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с внутриматочным ведением неактивированных аутологичных МПК для прогноза наступления беременности

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение, %	Ценность позитивного прогноза, %	Ценность негативного прогноза, %	AUC, площадь под ROC-кривой
CD3 ⁻ CD8 ⁺	66,7	83,3	> 5,8	55,5	88,9	0,764 (<i>p</i> =0,084)
CD16 ⁺	75	100	> 12,4	62,5	100	0,867 (<i>p</i> <0,0001)
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	83,3	83,3	≤ 6,6	71,4	90,9	0,840 (0,158) (<i>p</i> =0,0005)

Примечание. * - превышение площади под ROC-кривой (AUC) над спорной линией значимы при *p*≤0,05.

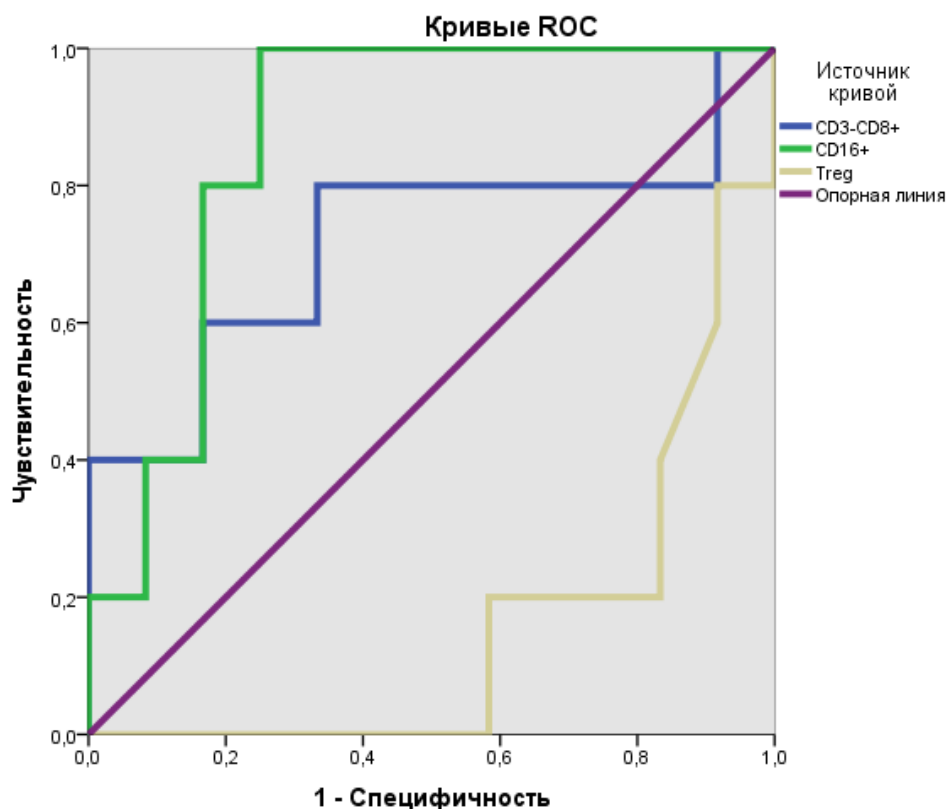


Рисунок 11. ROC-кривая в оценке содержания $CD3^+CD8^+$, $CD16^+NK$ -лимфоцитов и Treg с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ в периферической крови женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с внутриматочным ведением неактивированных аутологичных МПК для прогноза наступления беременности

Результаты ROC-анализа показали, что содержание $CD16^+NK$ -лимфоцитов $> 12,4$ и Treg с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-} \leq 6,6$ у пациенток в стимулированном протоколе с использованием неактивированных аутологичных МПК, может быть прогностическим маркером наступления беременности.

В таблице 12 представлен субпопуляционный состав периферических лимфоцитов пациенток в протоколе с антГнРГ, которым проводили внутриматочное введение МПК как с активацией ХГч, так и без активации в зависимости от исхода программы ЭКО.

Таблица 12. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с использованием различных видов иммунотерапии, с разными исходами данной попытки

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов (%) в группах			
	МПК+ ХГЧ		МПК	
	Беременность + (n=5)	Беременность - (n=12)	Беременность + (n=5)	Беременность - (n=12)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24,1 ± 1,9	22,6 ± 3,4	21,7 ± 3,4	22,6 ± 3,4
CD3 ⁻ CD8 ⁺	5,3 ± 0,8	6,7 ± 1,1	12,0 ± 2,7	6,7 ± 1,1
CD16 ⁺	9,8 ± 1,4	14,8 ± 1,6 *	18,3 ± 2,7	14,8 ± 1,6 *
CD56 ⁺	15,6 ± 1,1	17,8 ± 2,9	25,2 ± 5,9	17,8 ± 2,9
CD56 ⁺ TCRγδ	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2 **	3,3 ± 1,2	1,7 ± 0,2 **
TCRγδ	9,7 ± 3,0	9,8 ± 1,3	11,9 ± 3,5	9,8 ± 1,3
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	7,4 ± 0,4	6,0 ± 0,7	6,4 ± 0,5	6,0 ± 0,7

Примечание. * - различия со значениями женщин в группе с наступившей беременностью и с отсутствием беременности значимы при $p \leq 0,05$. ** - различия между подгруппами МПК и МПК+ХГЧ значимы при $p \leq 0,05$.

Как следует из данных таблицы 12, у пациенток в протоколе с антГнРГ с отсутствием беременности в данной попытке в случае внутриматочного введения неактивированных аутологичных МПК, был выше уровень CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией. В то время как у пациенток в протоколе с антГнРГ с отсутствием беременности в данной попытке в случае внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГЧ, был выше уровень CD16⁺NK-лимфоцитов. Параметры диагностической значимости определения содержания периферических CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов и CD16⁺NK-лимфоцитов у

женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с использованием методов иммунотерапии, для прогноза наступления беременности, приведены в таблице 13 и на рисунке 12.

Таблица 13. Параметры диагностической значимости определения содержания $CD3^+CD8^+$ и $CD16^+NK$ -лимфоцитов в периферической крови пациенток с RIF в протоколе с антГнРГ с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК перед ПЭ для прогноза наступления беременности

Показатель, вид иммунотерапии	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение, %	Ценность позитивного прогноза, %	Ценность негативного прогноза, %	AUC, площадь под ROC-кривой
$CD3^+CD8^+$ МПК	80	66,7	$\leq 21,8$	80	66,7	0,600 ($p=0,625$)
$CD16^+$ МПК+ХГч	100	50	$\leq 7,8$	100	63,5	0,795 ($p=0,015$)

Примечание. * - превышение площади под ROC-кривой (AUC) над спорной линией значимы при $p \leq 0,05$.

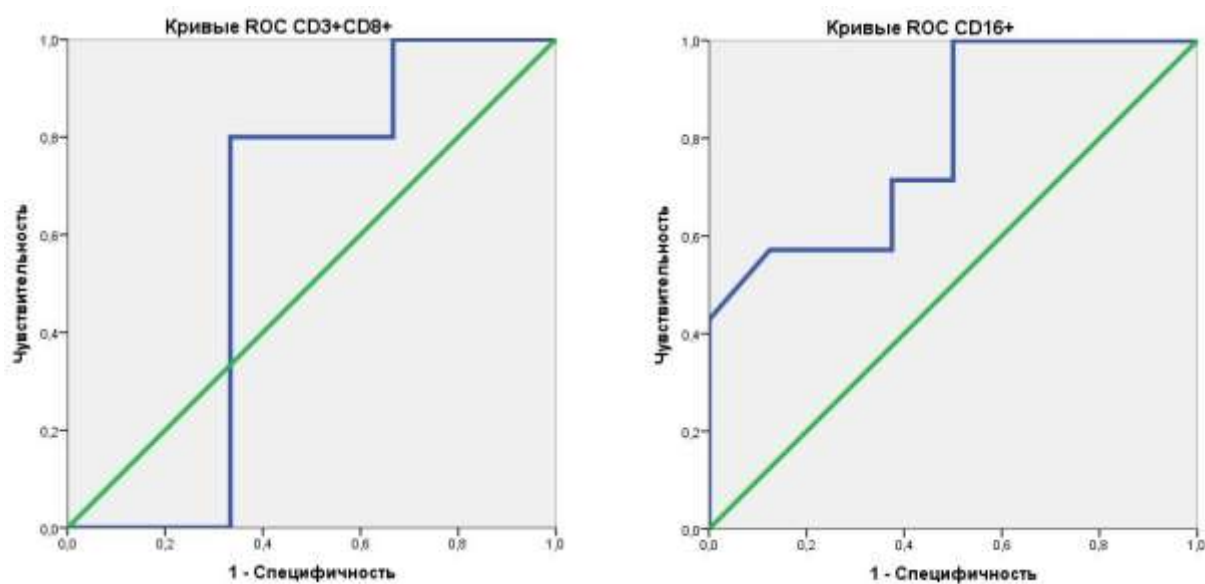


Рисунок 12. ROC-кривая в оценке содержания $CD3^+CD8^+$ и $CD16^+NK$ -лимфоцитов в периферической крови пациенток с RIF в протоколе с

антГнРГ при внутриматочном введении аутологичных МПК перед ПЭ для прогноза наступления беременности.

Данные ROC-анализа демонстрируют, что содержание в периферической крови CD16⁺NK-лимфоцитов $\leq 7,8$ в день трансвагинальной пункции у женщин в протоколе с антГнРГ с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч, может являться прогностическим маркером прогноза наступления беременности.

3.4.3 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с учетом вида иммунотерапии

Забор периферической крови для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов в криоциклах на фоне заместительной гормональной терапии при констатации нормальной толщины и структуры эндометрия, производили в день добавления препаратов микронизированного прогестерона.

Анализ субпопуляционного состава периферических лимфоцитов женщин с RIF, которым в криопротоколе перед переносом эмбриона внутриматочно вводили аутологичные МПК как активированные ХГч, так и без активации, представлен в таблицах 14 и 15.

Таблица 14. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с наступлением беременности

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов (%) у женщин с наступившей беременностью в группах		
	МПК+ХГч (n=8)	МПК (n=7)	плацебо (n=5)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	21,5 ± 2,2	24,3 ± 2,7	29 ± 4,2
CD3 ⁻ CD8 ⁺	4,7 ± 0,9	4,7 ± 0,8	4,2 ± 0,8

CD16 ⁺	11,8 ± 1,8	9,7 ± 1,3	11,1 ± 1,8
CD56 ⁺	15,4 ± 2,4*	16,6 ± 2,0 *	15,2 ± 2,9
CD56 ⁺ TCR $\gamma\delta$	1,9 ± 0,4 **	2,9 ± 0,5 *	1,8 ± 0,3
TCR $\gamma\delta$	10,5 ± 2,9	13,2 ± 2,2 *	9,5 ± 2,5
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	6,7 ± 0,5	8,3 ± 1,0	8,2 ± 1,1

Примечание. * - различия со значениями женщин в группе плацебо значимы при $p \leq 0,05$. ** - различия между подгруппами МПК и МПК+ХГч значимы при $p \leq 0,05$.

В результате проведенного анализа было выявлено, что у женщин в криопротоколе с успешной имплантацией (таблица 14) субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациенток в подгруппе плацебо не отличался от такового у пациенток подгруппы МПК, активированных ХГч, а у пациенток подгруппы МПК уровень активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ NK-лимфоцитов оказался выше, чем в обеих других подгруппах.

В таблице 15 приведены характеристики диагностической значимости определения субпопуляционного состава периферических лимфоцитов как с внутриматочным введением неактивированных аутологичных МПК (CD56⁺, CD56⁺TCR $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$), так и с внутриматочным введением аутологичных МПК, активированных ХГч (CD56⁺) для прогноза наступления беременности в соответствующих группах.

Таблица 15. Параметры диагностической значимости определения показателей субпопуляционного лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК для прогноза наступления беременности

Тип иммуно-терапии	Показатель	Специ-фичность, %	Чувстви-тельность, %	Критери-альное значение	Ценность позитив-ного прогноза, %	Ценность негатив-ного прогноза, %	AUC, площадь под ROC-кривой
МПК	CD56 ⁺	100	50	≤ 15,8%	80	55,6	0,675 (0,325) (<i>p</i> =0,288)
	CD56 ⁺ TCRγδ	100	62,5	> 2,2%	100	62,5	0,825 (<i>p</i> =0,008)
	TCRγδ	100	60	> 5,3%	80	100	0,800 (<i>p</i> =0,037)
МПК+ХГЧ	CD56 ⁺	100	70	≤ 16,3%	100	62,5	0,780 (<i>p</i> =0,035)

Примечание. Превышение площади под ROC-кривой (AUC) над спорной линией значимы при $p \leq 0,05$.

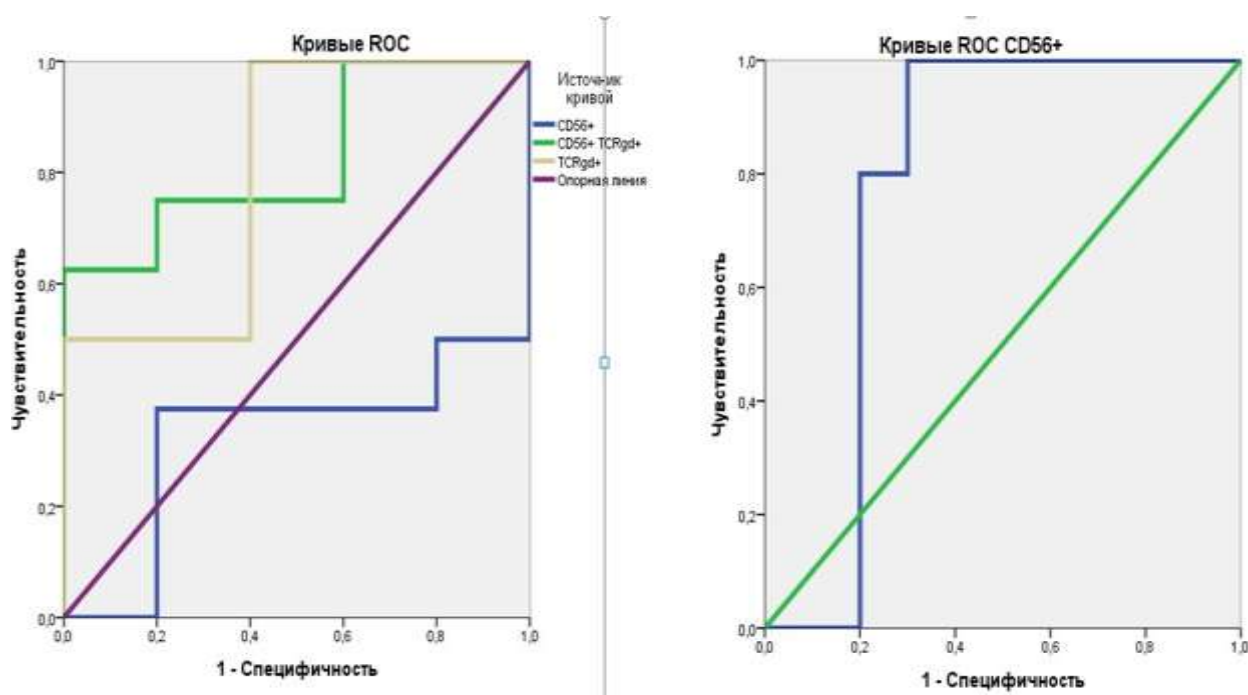


Рисунок 13. ROC-кривая в оценке определения показателей субпопуляционного лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК для прогноза наступления беременности.

Исходя из данных таблицы 15 и рисунка 13, можно сделать вывод, что маркерами наступления беременности в криопротоколе с введением неактивированных аутологичных МПК является уровень $CD56^+TCR\gamma\delta > 2,2\%$ и $TCR\gamma\delta$ -лимфоцитов $> 5,3\%$, а в криопротоколе с введением аутологичных МПК, активированных ХГч, - уровень $CD56^+NK$ -лимфоцитов $\leq 16,3\%$ в периферической крови.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в подгруппе плацебо с разными исходами криопротокола показал, что у пациенток с отсутствием имплантации был выше уровень цитотоксических $CD3^-CD8^+$ -лимфоцитов по сравнению с аналогичным показателем у женщин с успешной имплантацией (таблица 16).

Таблица 16. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF в подгруппе плацебо с разными исходами в криопротоколе

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов в группах плацебо в криопротоколе, %	
	Беременность + (n=5)	Беременность - (n=18)
$CD3^+CD8^+$	$29 \pm 4,2$	$26,8 \pm 4,5$
$CD3^-CD8^+$	$4,2 \pm 0,8$	$6,0 \pm 0,4$ *
$CD16^+$	$11,1 \pm 1,8$	$12,4 \pm 1,5$
$CD56^+$	$15,2 \pm 2,9$	$20,7 \pm 1,2$
$CD56^+TCR\gamma\delta$	$1,8 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,4$
$TCR\gamma\delta$	$9,5 \pm 2,5$	$6,4 \pm 2,0$
$CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$	$8,2 \pm 1,1$	$7,4 \pm 0,7$

Примечание. * - различия со значениями женщин в группе плацебо с разными исходами программы значимы при $p \leq 0,05$.

Параметры диагностической значимости определения содержания периферических CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов у женщин с RIF в криопротоколе для прогноза наступления беременности приведены в таблице 17.

Таблица 17. Параметры диагностической значимости определения содержания CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов в периферической крови женщин с RIF перед переносом эмбриона в криопротоколе без использования внутриматочного введения аутологичных МПК для прогноза наступления беременности

Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Критериальное значение %	Ценность позитивного прогноза, %	Ценность негативного прогноза, %	AUC, площадь под ROC-кривой
CD3 ⁻ CD8 ⁺	100	60	≤ 3,8%	100	71,4	0,840 (<i>p</i> =0,014)

Примечание. Превышение площади под ROC-кривой (AUC) над спорной линией значимы при $p \leq 0,05$.

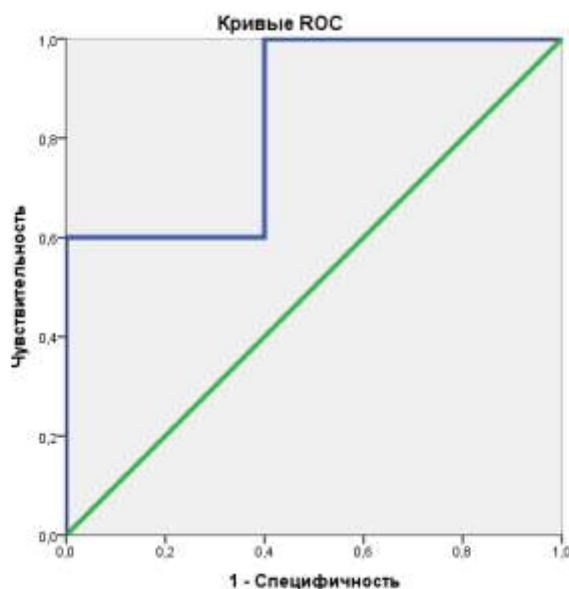


Рисунок 14. ROC-кривая в оценке определения содержания CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов в периферической крови женщин с повторными неудачами имплантации перед переносом эмбриона для прогноза наступления

имплантации в криопротоколе без использования внутриматочного введения МПК.

Результаты ROC-анализа показали, что содержание $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов $\leq 3,8\%$ у пациенток в криопротоколе без использования методов иммунотерапии, может быть маркером для прогноза наступления беременности.

В таблицах 19 и 20 представлены результаты оценки субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК в зависимости от исхода криоцикла.

Таблица 18. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови женщин с RIF при использовании различных видов иммунотерапии аутологичными МПК в зависимости от исхода криоцикла

Фенотип лимфоцитов	Содержание лимфоцитов (%) в группах,			
	МПК+ ХГч		МПК	
	Беременность+ (n=8)	Беременность- (n=7)	Беременность+ (n=7)	Беременность- (n=14)
$CD3^+CD8^+$	$21,5 \pm 2,2$	$23,4 \pm 2,0$	$24,3 \pm 2,7$	$21,8 \pm 3,6$
$CD3^-CD8^+$	$4,7 \pm 0,9$	$7,1 \pm 2,2$	$4,7 \pm 0,8$	$9,4 \pm 4,8$
$CD16^+$	$11,8 \pm 1,8$	$11,8 \pm 2,3$	$9,7 \pm 1,3$	$16,7 \pm 4,5$
$CD56^+$	$15,4 \pm 2,4$	$19,9 \pm 2,6$	$16,6 \pm 2,0$	$20,8 \pm 3,8$
$CD56^+TCR\gamma\delta$	$1,9 \pm 0,4^{**}$	$4,2 \pm 1,0^*$	$2,9 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,9$
$TCR\gamma\delta$	$10,5 \pm 2,9$	$21,3 \pm 4,0^*$	$13,2 \pm 2,2$	$9,2 \pm 1,9$
$CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$	$6,7 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,4$	$8,3 \pm 1,0$	$7,5 \pm 1,2$

Примечание. *- различия со значениями женщин в группах с наступившей беременностью и с отсутствием беременности значимы при $p \leq 0,05$. **-различия между подгруппами МПК и МПК+ХГч значимы при $p \leq 0,05$.

При анализе данных, представленных в таблице 19, обращает на себя внимание отсутствие различий в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у женщин с RIF с разными исходами данной программы ВРТ в криопротоколе с внутриматочным введением неактивированных аутологичных МПК. Однако при использовании аутологичных МПК, активированных ХГч, в субпопуляционном составе лимфоцитов женщин с отсутствием беременности выявлен значимо более высокий уровень TCR $\gamma\delta$ -клеток и активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов. Параметры диагностической значимости определения содержания периферических TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов и активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов для прогноза наступления беременности у женщин с RIF в криопротоколе с использованием аутологичных МПК, активированных ХГч, приведены в таблице 20.

Таблица 19. Параметры диагностической значимости определения содержания TCR $\gamma\delta$ - и активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ NK-лимфоцитов в периферической крови женщин с RIF в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч

Показатель	Специ- фичность, %	Чувстви- тельность, %	Критери- альное значение, %	Ценность позитив- ного прогноза, %	Ценность негатив- ного прогноза, %	AUC, площадь под ROC- кривой
TCR $\gamma\delta$	80	90	$\leq 12,5\%$	75	87,5	0,745 ($p=0,041$)
CD56 ⁺ TCR $\gamma\delta$	70	90	$\leq 2,5\%$	75	87,5	0,765 ($p=0,024$)

Примечание. * - превышение площади под ROC-кривой (AUC) над спорной линией значимы при $p \leq 0,05$.

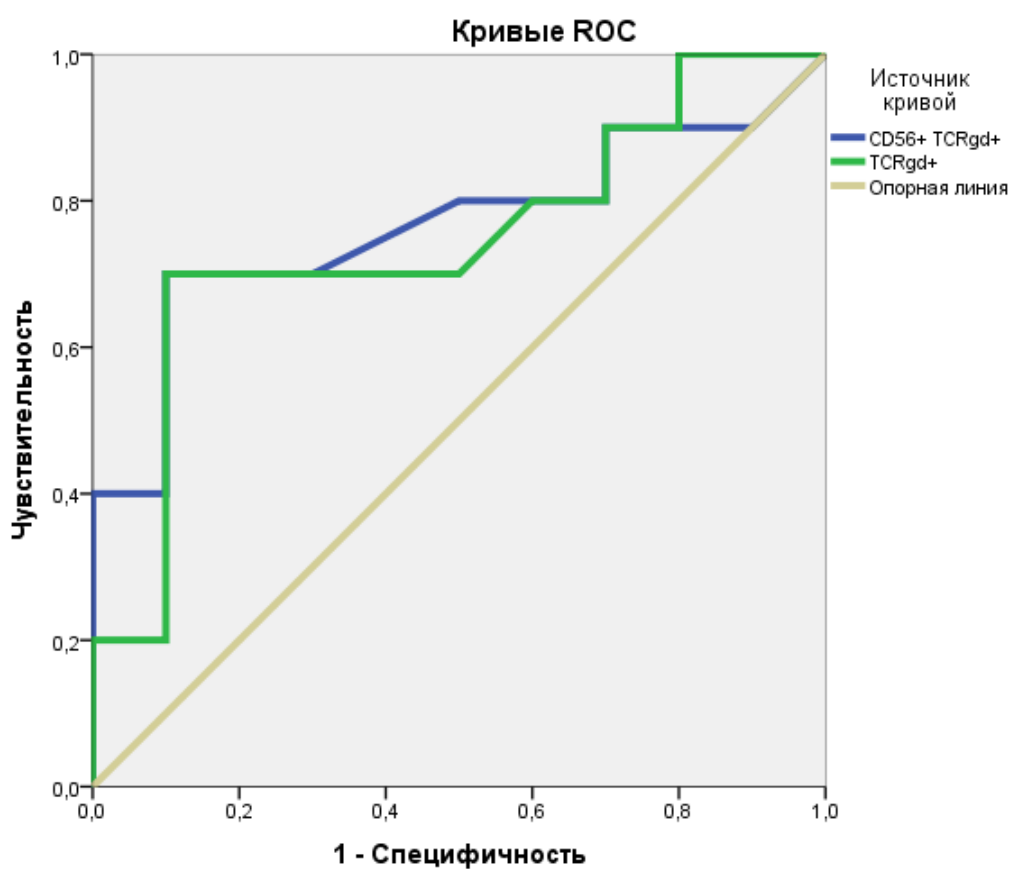


Рисунок 15. ROC-кривая в оценке содержания TCR $\gamma\delta$ - и активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ НК-лимфоцитов в периферической крови женщин с RIF для прогноза наступления беременности в криопротоколе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч.

Исходя из данных таблицы 20 и рисунка 15, можно сделать вывод, что содержание TCR $\gamma\delta \leq 12,5\%$ и активированных CD56⁺TCR $\gamma\delta$ НК-

лимфоцитов $\leq 2,5\%$ можно рекомендовать для использования в качестве маркеров наступления беременности у женщин с RIF в криопротоколе с внутриматочным введением аутологичных МПК, активированных ХГч.

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что в стимулированном цикле с использованием неактивированных МПК, диагностически значимыми маркерами являются $CD16^+$ -NK-лимфоциты и Treg с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$. Результаты ROC-анализа показали, что содержание $CD16^+$ -NK-лимфоцитов $>12,4\%$ с чувствительностью 100% и специфичностью 75% и Treg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) $\leq 6,6\%$ с чувствительностью и специфичностью 83,3% является основанием для назначения внутриматочного введения неактивированных МПК. В криопротоколе с использованием МПК, активированных ХГч, диагностически значимыми маркерами эффективности криоциклов являются $CD56^+$ -NK клетки, $CD56^+TCR\gamma\delta$ и Treg с фенотипом $TCR\gamma\delta$. Результаты ROC-анализа показали, что содержание $CD56^+ \leq 16,3\%$, $CD56^+TCR\gamma\delta \leq 2,5\%$ 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.

3.5 Анализ цитокинового профиля супернатантов культур МПК, предназначенных для внутриматочного введения.

Аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови после культивирования в течение 48 часов (с ХГч или без активации ХГч) вводили в объеме 200 мкл супернатанта. Поэтому интерес представлял анализ состава цитокинов в супернатантах культур вводимых МПК и оценка его влияния на исходы данной программы ВРТ у женщин с RIF как в протоколе с антГнРГ, так и в криопротоколе. Для этого использовали замороженные

образцы избыточного объема супернатанта, которые до анализа хранили при -80°C .

В таблице 20 представлены результаты анализа цитокинового профиля супернатантов МПК у пациенток в разных протоколах ВРТ, вне зависимости от исхода данной попытки.

Таблица 20. Цитокиновый профиль супернатантов мононуклеарных клеток периферической крови женщин с RIF в двух протоколах ВРТ

Показатель		Значение показателя (пг/мл) в подгруппах		
Цитокин	Характеристика	в криопротоколе (n=69)	в протоколе с антГнРГ (n=60)	p
ИЛ-2	Me	39,2	38,4	$p=0,197$
	5-95 P	2,8 – 163,1	9,5 – 171,1	
ИЛ-4	Me	0,33	0,39	$p=0,651$
	5-95 P	0,06 – 1,60	0,09 – 2,12	
ИЛ-5	Me	2,9	3,0	$p=0,193$
	5-95 P	1,2 – 13,1	1,3 – 19,5	
ИЛ-10	Me	29	58	$p=0,608$
	5-95 P	4 - 1462	7 - 434	
ИЛ-12p70	Me	0,76	0,76	$p=0,388$
	5-95 P	0,45 – 5,39	0,45 – 23,96	
ИЛ-13	Me	1,4	1,2	$p=0,531$
	5-95 P	0,1 – 90,2	0,9 – 1,95	
ГМКСФ	Me	3,2	1,1	$p=0,354$
	5-95 P	0,2 – 206,8	0,3 – 373,9	
ИФ- γ	Me	0,8	0,9	$p=0,165$
	5-95 P	0,4 – 554,4	0,4 – 100,4	
ФНО- α	Me	1752	2041	$p=0,423$
	5-95 P	144 - 24243	539 – 22930	
ТФР β -1	Me	422	439	$p=0,642$
	5-95 P	69 - 1550	61 - 1535	
ТФР β -2	Me	169	157	$p=0,536$
	5-95 P	19 - 330	36 - 306	
ТФР β -3	Me	17,3	20,0	$p=0,635$
	5-95 P	4,8 – 80,7	6,1 – 108,1	

Как следует из данных таблицы 20, различий в цитокиновом профиле женщин как в стимулированном цикле, так и в криоцикле не выявлено. Также не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов культур мононуклеарных клеток женщин в двух типах протоколов в зависимости от исхода данного цикла ВРТ ($p > 0,05$).

Далее мы провели анализ состава цитокинов в супернатантах вводимых МПК в каждом типе протокола ВРТ в зависимости от наличия активации МПК исхода данного цикла.

При сравнительной оценке цитокинового профиля супернатантов культур МПК женщин в протоколе с антГнРГ, различий между группами в зависимости от типа иммунотерапии и исхода данного цикла не выявлено.

Анализ цитокинового профиля супернатантов мононуклеарных клеток женщин с RIF при отрицательном исходе в криопротоколе был сходным при разных типах иммунотерапии МПК. Цитокиновый профиль супернатантов мононуклеарных клеток женщин с RIF при положительном исходе с использованием внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч, в криопротоколе характеризовался высоким уровнем практически всех исследованных цитокинов, как провоспалительного (ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-12p70, ГМКСФ, ИФ- γ , ФНО- α), так и противовоспалительного типа (ИЛ-4), данные представлены в таблице 21 и на рисунке 16.

Таблица 21. Цитокиновый профиль супернатантов мононуклеарных клеток периферической крови женщин с RIF при положительном исходе данной попытки в криопротоколе 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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =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	<i>p</i> =0,012*
	5-95 P	0,38 – 6,41	0,38 – 0,92	0,32 – 10,0	
ФНО-α	Me	4542	800	317	<i>p</i> =0,021*
	5-95 P	62 - 23911	188 - 1366	29 - 5505	
ТФРβ-1	Me	305	364	591	<i>p</i> =0,531
	5-95 P	82 - 584	176 - 1338	10 - 1023	
ТФРβ-2	Me	134	185	224	<i>p</i> =0,146
	5-95 P	11 - 321	27 - 271	3 - 239	
ТФРβ-3	Me	14,9	19,7	20,5	<i>p</i> =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 $p \leq 0,05$.

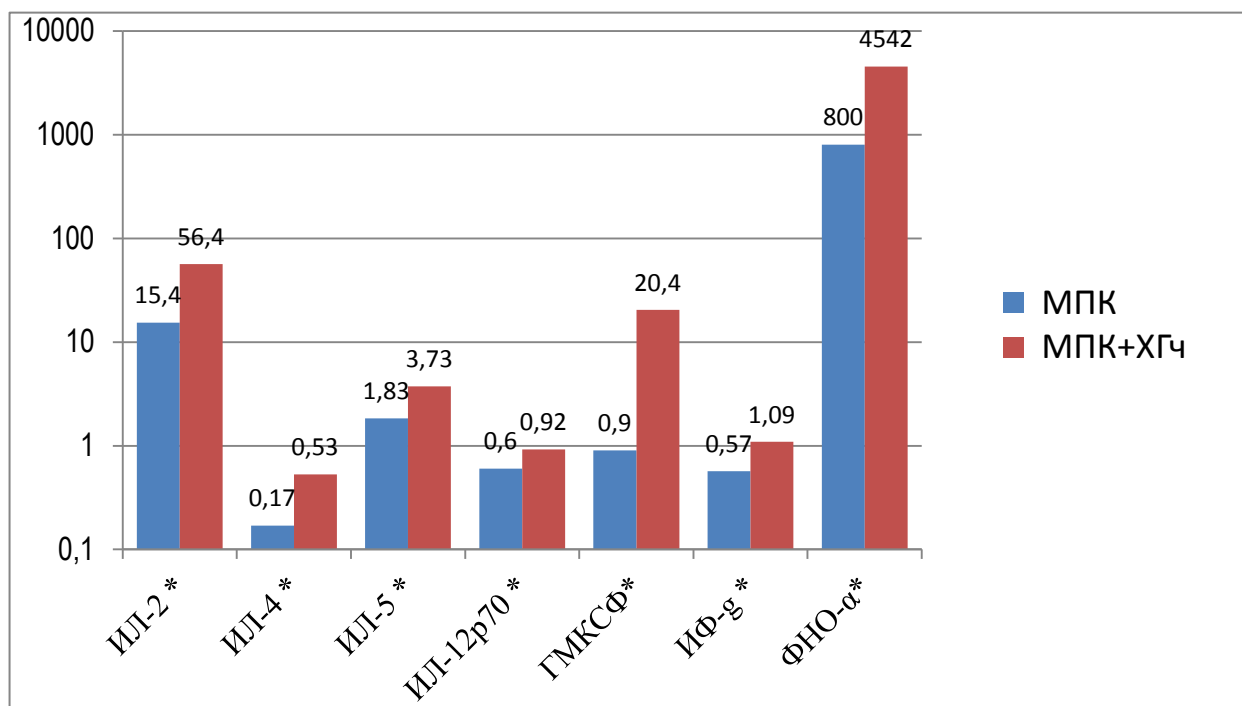


Рисунок 16. Цитокиновый профиль аутологичных МПК в криопротоколе с учетом активации хорионическим гонадотропином

На рисунке 17 представлен сравнительный анализ цитокинового профиля супернатантов клеток женщин с наступившей беременностью с использованием аутологичных МПК, активированных ХГч как в стимулированном циклах, так и в криоциклах. Мы выявили, что в криопротоколе в супернатантах был выше уровень ФНО-α, ГМКСФ и ИЛ-2, по сравнению с аналогичными цитокинами в супернатантах пациенток в стимулированном протоколе.

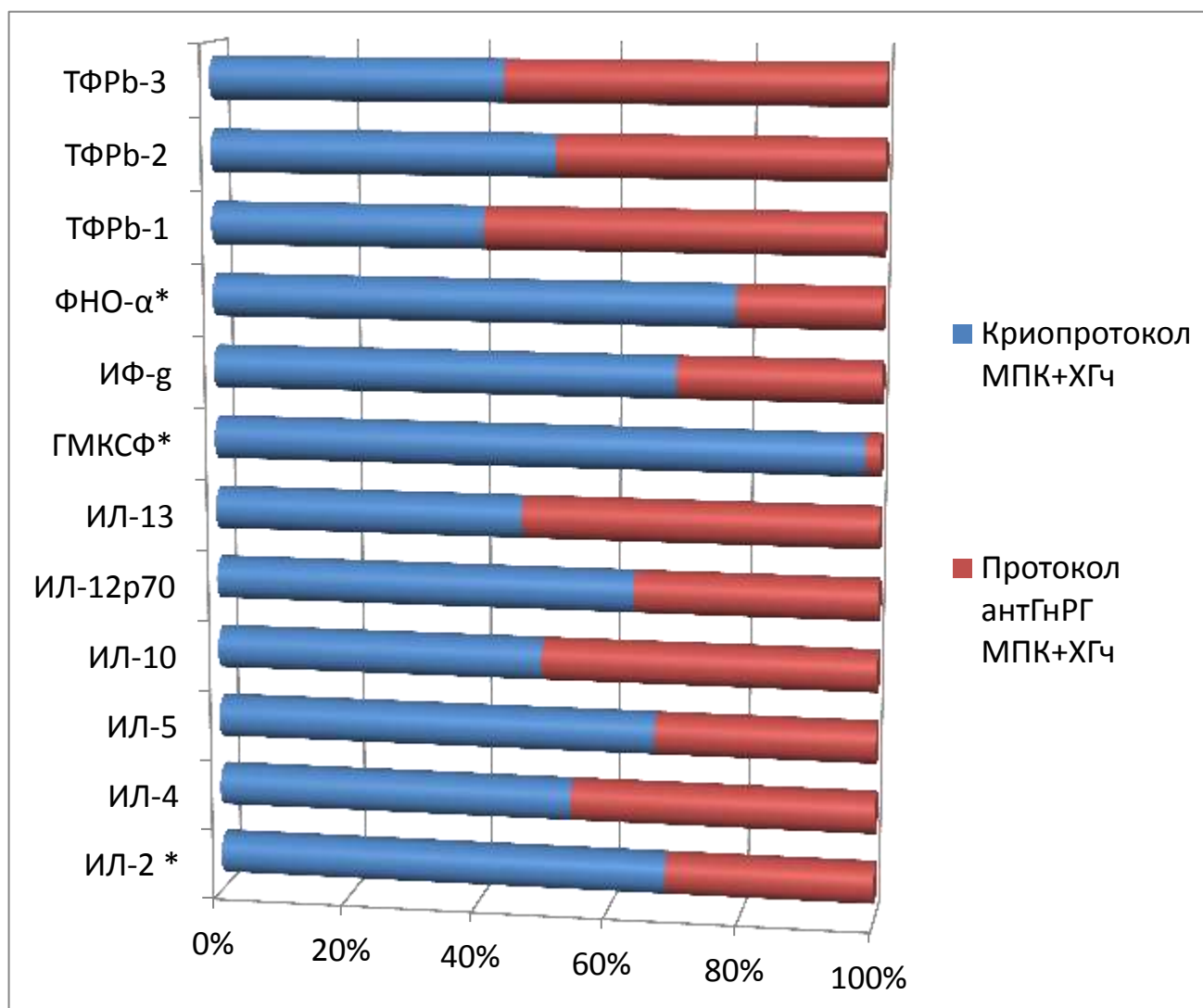


Рисунок 17. Цитокиновый профиль аутологичных МПК, активированных ХГч с учетом протокола ВРТ.

Обращает на себя внимание тот факт, что исследования цитокинового профиля супернатантов, вводимых вместе с суспензией ХГч-активированных аутологичных МПК, показали, что в криопротокколе супернатанты характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов, которые, возможно, и способствуют успешной имплантации и, соответственно, более высокой эффективности данного протокола ВРТ. Полученные результаты свидетельствуют о более активном состоянии культивируемых мононуклеарных клеток, стимулированных ХГч, чем неактивированных клеток и подтверждают неоднократно высказываемое в

научной литературе мнение о необходимости провоспалительного состояния иммунной системы женщины для успешной имплантации.

Таким образом, профиль цитокинов в супернатантах культур МПК отличался только у женщин в криопротоколе с внутриматочным введением аутологичных МПК, активированных ХГч, с положительным исходом данной попытки, а именно: был выше уровень как провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-12p70, ГМКСФ, ИФ- γ , ФНО- α , так и уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-4, что можно объяснить большей интенсивностью процессов активации в МПК женщин с наступившей имплантацией.

Глава 4.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Бесплодие в браке является важной медико-социальной проблемой во всем мире. Распространенность бесплодия неуклонно увеличивается, а вспомогательные репродуктивные технологии приобретают все большую значимость в лечении различных форм бесплодия. Тем не менее, несмотря на непрерывное развитие и совершенствование программ ВРТ, существенной доле супружеских пар не удается достичь наступления беременности после повторных попыток ЭКО и не всегда удается вирифицировать причины неудач. В литературе существует много противоречивых данных по значимости различных иммунологических исследований и различных видов иммунотерапии у женщин с RIF [129] [60]. В связи с этим нами было проведено проспективное исследование, целью которого явилась оценка эффективности программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации с использованием внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток перед переносом эмбриона. Цель исследования основывалась на гипотезе о том, что имплантационный потенциал эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации коррелирует с изменением иммунологических показателей периферической крови, что может являться основанием для проведения пациенткам с RIF иммуномодулирующей терапии. Внутриматочное введение аутологичных моноклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона является одним из таких методов иммунокоррекции при RIF. Поэтому можно предполагать, что в случае обнаружения изменений в состоянии иммунной системы у пациенток с RIF проведение иммунотерапии повысит эффективность программ ВРТ у исследуемой категории пациенток.

Для достижения поставленной цели было обследовано 129 пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе, которые были распределены в 3 группы в зависимости от вида проводимой

иммунотерапии: группа 1 – пациентки, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологичных МПК, активированных ХГч, группа 2 – пациентки, которым проводилось внутриматочное введение аутологичных МПК без активации ХГч, группа плацебо – пациентки, которым проводилось внутриматочное введение физиологического раствора. Анализ клинико – анамнестических и лабораторных данных показал, что исследуемые пациентки с повторными неудачами имплантации были представлены соматически здоровыми женщинами репродуктивного возраста, имели регулярный характер менструального цикла, а также сопоставимые факторы бесплодия, преимущественно трубно-перинеального генеза, и показатели нормального овариального резерва. Большинство пациенток имели 3 - 4 неудачные программы ВРТ в анамнезе. Анализ параметров стимулированного цикла не выявил существенных различий в суммарной дозе гонадотропинов, продолжительности стимуляции, количестве полученных ооцитов и ооцитов хорошего качества, количестве зигот и бластоцист ($p > 0,05$). Анализ параметров эмбриологического этапа также не выявил существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов (табл.6).

Информативными иммунологическими параметрами в оценке прогноза наступления беременности является исследование клеточных субпопуляций лимфоцитов периферической крови. По данным литературы важное участие в инвазии трофобласта принимают НК- клетки и субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов. [81] [8] [85] [83]. Поэтому мы оценили субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток основной группы, результаты которого 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 изменении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с повторными неудачами имплантации. Превалирование субпопуляций клеток с киллерной активностью может указывать на провоспалительный ответ. Однако сниженные уровни субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов, а именно Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором типа $\gamma\delta$ ($TCR\gamma\delta$) наряду с активированными НК-лимфоцитами, экспрессирующими рецептор $TCR\gamma\delta$ ($CD56^+TCR\gamma\delta$), оказывающих супрессивное влияние на НК-клетки, может отражать снижение активности воспалительного ответа. Таким образом, полученные нами данные о субпопуляционном составе периферической крови пациенток с RIF свидетельствуют об отсутствии выраженного воспалительного ответа, что необходимо для успешной имплантации и согласуется с многочисленными данными литературы [138] [28] [87].

Далее мы провели оценку эффективности внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч, перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации. В мировой литературе роль периферических мононуклеарных клеток (МПК) в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с тех пор, как было показано, что клетки селезенки беременных мышей могут регулировать рецептивность эндометрия [87], а МПК, введенные в полость матки перед переносом эмбриона, повышают вероятность имплантации [143]. Также выявлено, что МПК, полученные от женщин с беременностью ранних сроков могут индуцировать продукцию прогестерона [98] и усиливать инвазию трофобласта эмбрионов мышей *in vitro*. [78]. Прямое влияние МПК на имплантацию впервые изучили Yoshioka и соавт. в 2006 году и показали, что внутриматочное введение аутологичных МПК, которые культивировали с хорионическим гонадотропином человека (ХГч) в течение 48 часов, перед переносом эмбрионов значительно повышало

частоту имплантации, частоту клинической беременности и частоту родов у пациенток с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО [149]. Позднее было показано, что внутриматочное введение МПК повышает частоту имплантации в криоциклах как на фоне подготовки эндометрия препаратами эстрогенов и прогестерона, так и в естественном цикле у женщин, имеющих до 3-х неудач имплантации в анамнезе [92]. Подобный подход применяли также в эксперименте на животных и было выявлено повышение частоты имплантации у мышей с предшествующими неудачами имплантации [119]. Более поздние исследования также продемонстрировали положительные эффекты внутриматочного введения ХГч и внутриматочного введения аутологичных МПК, активированных ХГч, перед переносом эмбрионов у пациенток с 2-мя и более неудачами имплантации [38]. Однако в исследованиях Santibañez и Volovsky не выявлено позитивного эффекта внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона на исходы программ ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе [129] [157]. Полученные нами данные показали, что у пациенток с повторными неудачами имплантации проведение внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток повышает эффективность программ ВРТ в 1,7 раза по сравнению с группой плацебо, что свидетельствует о позитивном влиянии внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона на эффективность программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе и согласуется с большинством исследований, приведенных выше.

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* [78]. В-третьих, МПК могут секретировать протеазы, которые эффективно влияют

на функцию и структуру поверхностных молекул, экспрессируемых на люминальных эпителиальных клетках эндометрия [56]. ХГч потенцирует эти множественные эффекты, непосредственно участвуя в регуляции имплантации эмбриона. ХГч - как основной эмбриональный сигнал, стимулирует секрецию цитокинов и хемокинов в МПК, таких как LIF и IL-1, MMP-2, MMP-9 и VEGF, способствующих инвазии трофобласта [126]. Следовательно, можно предположить, что МПК, активированные ХГч, повышают частоту имплантации и частоту наступления клинической беременности за счет создания адекватного баланса цитокинов Th2/Th1-типа и адекватного уровня и функции Т-регуляторных клеток, создавая благоприятное иммунное микроокружение 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 стимулированном цикле, что согласуется с данными литературы о снижении частоты клинической беременности в стимулированных циклах по сравнению с криоциклами [64]. Действительно, в стимулированных циклах эндометрий подвергается влиянию высоких уровней гормонов вследствие гонадотропной стимуляции, что может приводить к нарушению созревания эндометрия, негативно влияя на его рецептивность [48] [157]. В криоциклах, в отличие от стимулированных циклов, эндометрий не подвергается повышенным гормональным нагрузкам вследствие стимуляции суперовуляции, поэтому в них создаются более оптимальные условия для имплантации, приближенные к естественному циклу [19].

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 стимулированных циклов, что вероятно связано с эффектами ХГч, используемого в качестве триггера овуляции в стимулированных циклах.

Принимая во внимание единичные исследования о влиянии данного метода иммунотерапии у пациенток с субоптимальным эндометрием (Мэхо-7-8 мм), мы проанализировали исходы программ ВРТ при проведении внутриматочного введения МПК у этой категории женщин. Результаты нашего исследования показали, что использование внутриматочного введения аутологичных МПК у женщин с субоптимальным эндометрием и повторными неудачами имплантации в анамнезе повышает эффективность программ ВРТ в 1,8 раза по сравнению с группой плацебо, что согласуется с данными литературы [Li, 2017].

Анализ исходов программ ВРТ в зависимости от количества неудачных попыток в анамнезе не выявил значимых различий между группами, т.е. эффективность методики не зависела от числа повторных неудачных программ ВРТ у пациенток основной группы.

С целью выявления иммунологических предикторов эффективности программ ВРТ при использовании различных видов иммунотерапии МПК, мы проанализировали зависимость исходов программ ВРТ от субпопуляционного состава мононуклеарных клеток, как в стимулированном протоколе, так и в криопротоколе. Пациенты распределялись по типу протокола случайно. Поэтому интерес представляла оценка уровня изучаемых субпопуляций лимфоцитов у пациенток основной группы в зависимости от протокола ВРТ. Однако различий в субпопуляционном составе периферических лимфоцитов между группами в разных протоколах ВРТ не обнаружено.

Нами проведен анализ субпопуляционного состава периферических лимфоцитов женщин с RIF в зависимости от принадлежности к группам с использованием методов иммунотерапии: внутриматочное введение

аутологичных МПК, активированных ХГч и неактивированных МПК, как в протоколе с антГнРГ, так и в криопротоколе. Следует отметить, что у женщин с успешной имплантацией в протоколе с антГнРГ с внутриматочным введением неактивированных аутологичных МПК, уровень цитотоксических $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов и $CD16^+$ -NK-лимфоцитов был выше, чем в группе плацебо и в группе женщин с внутриматочным введением МПК, активированных ХГч, а также ниже уровень Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$. Субпопуляцию лимфоцитов с поверхностным фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ определяли как субпопуляцию Treg-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ и внутриклеточной экспрессией транскрипционного фактора Foxp3⁺, являющуюся ведущим звеном в основе реализации механизмов толерантности и обладающую специфической супрессорной активностью, значимое снижение уровня которых может свидетельствовать о нарушении формирования толерантности к аллоантигенам, о снижении супрессорной активности и об активной реакции отторжения трансплантата, что подтверждают полученные нами данные [127] [83]

Большое значение для формирования механизмов толерантности к аллоантигенам плода в процессах наступления и развития беременности принадлежит также $\gamma\delta$ Т-клеткам [109][8] 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 NK-клеток ($CD56^+/TCR\gamma\delta^+$), 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 [7] Нами была рассчитана диагностическая значимость определения содержания периферических $CD16^+$ NK-

лимфоцитов и Treg у женщин с RIF в протоколе с антГнРГ с внутриматочным введением неактивированных МПК для прогноза наступления имплантации. Результаты ROC-анализа показали, что уровни $CD16^+$ NK-лимфоцитов $>12,4\%$ с чувствительностью 100% и специфичностью 75% и Treg ($CD4^+CD25^{high} CD127^{low/-}$) $\leq 6,6\%$ с чувствительностью и специфичностью 83,3% могут являться основанием для назначения внутриматочного введения неактивированных МПК в стимулированном цикле.

Аналогичный анализ в криопротоколе с использованием МПК, активированных ХГч, показал, что диагностически значимыми маркерами эффективности криоциклов являются $CD56^+$ -NK клетки, $CD56^+TCR\gamma\delta$ и Treg с фенотипом TCR $\gamma\delta$.

Проведенный ROC – анализ показал, что содержание $CD56^+ \leq 16,3\%$, $CD56^+TCR\gamma\delta \leq 2,5\%$ 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.

Обобщая полученные данные, мы можем полагать, что выбор иммунотерапии МПК зависит от типа протокола ВРТ и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В стимулированном цикле при уровне NK-клеток более 12,4% и T-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high} CD127^{low/-}$ не более 7% целесообразно использование внутриматочного введения неактивированных аутологичных моноклерных клеток, тогда как, в криопротоколе при уровне NK-клеток более 16% и T-регуляторных клеток с фенотипом TCR $\gamma\delta$ менее 12% - внутриматочное введение моноклерных клеток, активированных хорионическим гонадотропином.

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 изучена зависимость эффективности программ ВРТ от цитокинового профиля супернатантов культур введенных мононуклеарных клеток.

В обоих протоколах ВРТ пациентки были разделены на группу с внутриматочным введением 200 мкл суспензии 20 млн МПК, активированных ХГч, группу с внутриматочным введением 200 мкл суспензии, содержащей 20 млн неактивированных аутологичных МПК и группу плацебо (женщинам с помощью катетера внутриматочно вводили 200 мкл физиологического раствора). Каждая суспензия состояла, как мы предполагаем, из разного профиля биологически активных молекул, в том числе, цитокинов. В связи с этим необходимо было оценить цитокиновый профиль супернатантов мононуклеарных клеток женщин в зависимости не только от типа протокола ВРТ и исхода настоящей попытки, но и в зависимости от вида иммунотерапии.

Цитокиновый профиль супернатантов МПК до активации ХГч пациенток в стимулированном цикле и криоцикле не различался. Также мы не выявили различий в цитокиновом профиле пациенток основной группы в стимулированном цикле в зависимости от активации мононуклеаров ХГч, что, вероятнее всего, объясняет отсутствие влияния ХГч как активатора МПК на эффективность стимулированного цикла.

При анализе результатов обращает на себя внимание тот факт, что выявлены различия только в профиле цитокинов в супернатантах культур клеток пациенток в криопротоколе с введением аутологичных МПК, активированных ХГч с положительным исходом данного криоцикла: ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-12p70, ГМКСФ, ИФ- γ , ФНО- α , при этом был выше и уровень ИЛ-4, что можно связать с интенсивностью процесса активации культивируемых клеток. Полученные результаты свидетельствуют об

активном состоянии культивируемых моноклеарных клеток, активированных ХГч. Таким образом, исследования цитокинового профиля супернатантов, вводимых вместе с суспензией аутологичных моноклеаров, стимулированных ХГч, показали, что в криопротоколе супернатанты характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов, которые, возможно, и способствуют успешной имплантации и, соответственно, более высокой эффективности данного протокола ВРТ. Полученные нами данные подтверждают неоднократно высказываемое в научной литературе мнение о необходимости провоспалительного состояния иммунной системы женщины для успешной имплантации [139] [28] [85].

Таким образом, проведение внутриматочного введения аутологичных МПК перед переносом эмбриона повышает эффективность программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе, что позволяет рекомендовать проведение данного метода иммунотерапии у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе в программах ВРТ. Проведенное иммунологическое исследование позволило выделить наиболее информативные иммунологические маркеры, позволяющие рекомендовать различные виды иммунотерапии МПК как в стимулированных циклах, так и в криоциклах, что позволяет персонафицировать подход к проведению программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

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 имлантации 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 НК-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор TCR $\gamma\delta$ ($CD56^+TCR\gamma\delta$) ($1,5 \pm 0,3$, $p=0,018$).
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 $CD16^+$ НК-лимфоцитов ($p<0,0001$) и Treg ($CD4^+CD25^{high} CD127^{low/-}$) ($p=0,0005$), в криоцикле - содержание $CD56^+$ ($p=0,009$), $CD56^+TCR\gamma\delta$ ($p=0,041$) 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- γ ($p=0,012$), Г-КСФ ($p=0,026$), ФНО- α ($p=0,021$) 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 СОКРАЩЕНИЙ

- аГнРГ – агонист гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ – антимюллеров гормон
антГнРГ – антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон
E₂ - эстрадиол
ИФ – интерферон
КтРГ - кортикотропин-рилизинг гормон
ЛГ - лютеинизирующий гормон
ЛИТ - лимфоцитоиммунотерапия
мАт – моноклональные антитела
ПЛ – преждевременная лютеинизация
МПК – моноклеарные клетки периферической крови
Прл – пролактин
ПИБФ – прогестерониндуцированный блокирующий фактор
ПТИ – протромбиновый индекс
ПЭ – перенос эмбриона
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РАРЧ - Российская ассоциация репродукции человека
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СПКЯ – синдром поликистозных яичников
ТВП – трансвагинальная пункция яичников
ТТГ – тиреотропный гормон
ТФР-β - трансформирующий фактор роста β
Т4 св - свободный тироксин
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФИТЦ - флуоресцеин-изотиоцианат
ФНО-α - фактор некроза опухоли α
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФЭ – фикоэритрин

ХГч – хорионический гонадотропин человека

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

β ХГ - β -субъединицы хорионического гонадотропина

GM-CSF(ГМ-КСФ)-гранулоцитарно-макрофагальный-колониестимулирующий фактор

CSF1 – КСФ - колониестимулирующий фактор

HLA (ГКГС) – human leucocyte antigen (главный комплекс гистосовместимости)

ICSI (ИКСИ) – intracytoplasmic sperm injection (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит)

IL – интерлейкин

IVIg - intravenous immunoglobulin – внутривенный иммуноглобулин

KIR – killer inhibitory receptor (рецепторы подавления цитотоксичности)

LIF – leukemia inhibitory factor (лейкемия-ингибирующий фактор)

НК-клетки – natural killer (натуральные киллерные клетки)

Per-CP - перидинин-хлорофилл протеин

PPARs - пролиферирующих активирующих рецепторов

RIF - repeated implantation failure (повторные неудачи имплантации)

SNP - single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

Th1- Т хелперы I класса

Th2- Т хелперы II класса

TNF α – фактор некроза опухоли

Treg - Т-регуляторные клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амян Т.С., Перминова С.Г., Кречетова Л.В. Вторушина В.В., Митюрин Е.В. Иммунологические аспекты повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения *Акушерство и гинекология*, 2017, №1, с. 5-12
2. Горшкова А.Г., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. Дисморфизмы ооцитов в циклах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2014;6:27–32.
3. Долгушина Н.В., Ратушняк С.С., Сокур С.А., Глинкина Ж.И. Риск анеуплоидии эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у мужчин с патозооспермией (мета-анализ). *Акушерство и гинекология*. 2012;7:4–13.
4. Митюрин Е.В., Перминова С.Г., Амян Т.С. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения *Акушерство и гинекология*.-2016.-№11.-С.34-40
5. Сокур С. А. Оптимизация исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с повышенным уровнем анеуплоидии в сперматозоидах: дисс. канд. мед. наук: 14.01.01/ С. А. Сокур. М., 2012. - 146 с.
6. Стаменов К. с соавт. «Введение Г-КСФ в полость матки – возможное лечение при повторяющихся неудачах имплантации», *Fertil. Steril.*, т. 96, Прил. 1, стр.S93, 2011
7. Степанова Е.О., Николаева М.А., Бабаян А.А., Смольникова В.Ю., Ванько Л.В., Кречетова Л.В. Роль регуляторных клеток в формировании иммунной толерантности при беременности. *Акушерство и гинекология* 2013; 2:24-28.
8. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунные факторы в этиологии и патогенезе осложнений беременности. *Акушерство и Гинекология*, 2012 №1
9. Таболова В.К., Корнеева И.Е. Влияние хронического эндометрита на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий: морфо-

- функциональные и молекулярно-генетические особенности (обзор литературы). *Акушерство и гинекология*. 2013;10:17–22.
10. Шуршалина А.В., Демура Т.А. Морфо – функциональные перестройки эндометрия в «окно имплантации». *Акушерство и гинекология*. 2011;7 (2):9-13.
 11. Achache H., Revel A. Endometrium receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):731-46
 12. Aletebi F. Hysteroscopy in women with implantation failures after in vitro fertilization: Findings and effect on subsequent pregnancy rates. *Middle East Fertility Society Journal*. 2010;15:288–91.
 13. Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol*. 2004; 5(3): 266-71.
 14. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J. Immunol*. 2007; 178(4): 2572-8.
 15. Assou S., Haouzi D., De Vos J., Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes// *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.8 pp. 531–538, 2010
 16. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;12:608–15.
 17. Barash A., Dekel N., Fieldust S., Segal I., Schechtman E., Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril*. 2003; 79(6): 1317-22.
 18. Bashirova A.A., Martin M.P., McVicar D.W., Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2006; 7: 277-300.
 19. Bates, M.D., Quenby, S., Takakuwa, K., et al., 2002. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Hum. Reprod*. 17, 2439–2444.
 20. Benkhalifa M., Demiroglu A., Sari T., Balashova E., Tsouroupani M, Giakoumakis

- Y. et al. Autologous embryo–cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote*.2012; 20 (2): 173-80.
21. Beydoun H, Saftlas AF. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens*. 2005 Feb;65(2):123-35.
 22. Blois S., Klapp B.F., Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *Reprod. Immunol*. 2011; 88(2): 86-92.
 23. Boomsma C.M., Kavelaars A., Eijkemans M.J., Lentjes E.G., Fauser B.C., Heijnen C.J., Macklon N.S. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum. Reprod*. 2012; 24(6): 1427-35.
 24. Bulmer J.N., Lash G.E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol. Immunol*. 2005; 42(4): 511-21.
 25. Carp HJ, Toder V, Mashiach S. Efficacy of immunotherapy preceding in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1992 Aug;58(2):453-5. No abstract available.
 26. Cavalcante M.B., Costa Fda S., Barini R., Araujo Júnior E. Granulocyte colony-stimulating factor and reproductive medicine: a review. *Iran. J. Reprod. Med*. 2015; 13(4): 195-202.
 27. Chen Q.J., Sun X.X., Gao X.H. Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin beta 3 and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase. *Fertil Steril*.2008;89(5):1357-63.
 28. Cughlan C., Ledger W., Wang Q., Liu F., Demirel A., Gurgun T. et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 28: 14-38.
 29. Cohen J., Ziyat A., Naoura I., Chabbert-Buffel N., Aractingi S., Darai E. et al. Effect of induced peritoneal endometriosis on oocyte and embryo quality in a mouse model. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(2):263-70.
 30. Collins J. Mild stimulation for in vitro fertilization: making progress downward. *Hum. Reprod. Update*.2009;15:1–3.

31. Collins J.A., Barnhart K.T., Schlegel P.N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil. Steril.* 2008;89(4):823-31.
32. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22(11): 633-40.
33. Costello M.F., Lindsay K., McNally G. The effect of adenomyosis on in vitro fertilisation and intra-cytoplasmic sperm injection treatment outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;158(2):229-34.
34. Coulam C.B., Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births. *J. Reprod. Immunol.* 2012; 67(4): 296-304.
35. Coulam CB. Implantation failure and immunotherapy. *Hum Reprod.* 1995; 10(6):1338-40.
36. Creus M¹, Balasch J, Fábregues F, Martorell J, Boada M, Peñarrubia J, Barri PN, Vanrell JA. Parental human leukocyte antigens and implantation failure after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998 Jan;13(1):39-43.
37. Cutting R., Morroll D., Roberts S.A., Pickering S., Rutherford A. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum. Fertil. (Camb.)*.2008;11:31-146.
38. Das M., Holzer H.E. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil. Steril.* 2012; 97:1021-27
39. Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 2004; 25(3): 341-73.
40. Díaz I., Navarro J., Blasco L., Simón C., Pellicer A., Remohí J. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril.* 2000;74(1):31-4.
41. Donaghy M., Lessey B.A. Uterine receptivity: alteration associated with benign gynecological disease. *Semin. Reprod. Med.* 2007;25:461-75
42. Elram T, Simon A, Israel S, Revel A, Shveiky D, Laufer N. Treatment of recurrent IVF failure and human leukocyte antigen similarity by intravenous immunoglobulin. *Reprod Biomed Online.* 2005 Dec;11(6):745-9.
43. Evans-Hoeker E.A., Young S.L. Endometrial Receptivity and Intrauterine

- Adhesive Disease. *Semin Reprod Med.* 2014; 32(05): 392-401.
44. Fasouliotis, S.J., Spandorfer, S.D., Witkin, S.S., Schattman, G., Liu, H.C., Roberts, J.E., Rosenwaks, Z., 2004. Maternal serum levels of interferon-gamma and interleukin-2 soluble receptor-alpha predict the outcome of early IVF pregnancies. *Hum. Reprod.* 19, 1357–1363
45. Figueira R., Braga D., Francisco L., Madaschi C., Assumpto Iaconelli Jr., Edson Borges Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertility and Sterility.* 2010;94(3): 1115-17.
46. Fragouli E., Katz-Jaffe M., Alfarawati S., Stevens J., Colls P., Goodall N. et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 875–87.
47. Fujiwara H., Sato Y., Ideta A., Aoyagi Y., Araki Y., Imakawa K. Immune regulation of human embryo implantation by circulating blood cells. In: Yamada S., ed. *The human embryo.* Croatia: InTech; 2012: 61-72.
48. Fujiwara H: Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? *Mol Hum Reprod* 2009; 15:335-343
49. Fukui A., Fujii S., Yamaguchi E., Kimura H., Sato S., Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1999; 41(6): 413-22.
50. Fukui, A., Kwak-Kim, J., Ntrivalas, E., Gilman-Sachs, A., Lee, S.K., Beaman K., 2008. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *Fertil. Steril.* 89, 157–165
51. Gellersen B., Brosens I.A., Brosens J.J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* 2007; 25(6): 445-53.

52. Ginsburg, E.S., Xiao, L., Gargiulo, A.R., Kung, F.T., Politch, J.A., Schust, D.J., Hill, J.A., 2005. T-helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro fertilization-embryotransfer. *Fertil. Steril.* 83, 1659–1664
53. Gleicher N., Vidali A., Barad D.H. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil. Steril.* 2011; 95(6): 2123. e13-7.
54. Gnainsky Y., Granot I., Aldo P.B., Barash A., Or Y., Schechtman E. et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil. Steril.* 2010; 94(6): 2030-6.
55. Guerin LR¹, Moldenhauer LM, Prins JR, Bromfield JJ, Hayball JD, Robertson SA. Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment. *Biol Reprod.* 2011 Aug;85(2):397-408.
56. Hammer, A., 2011. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* 90, 21–28
57. Hassold T., Hall H., Hunt P. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(2):203–208.
58. Hiby S.E., Regan L., Lo W., Farrell L., Carrington M., Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 2008; 23(4): 972-6.
59. Huang C.C., Wang C.J., Soong Y.K., Wang H.s., Wang M.L., Lin C.Y. et al. Chang C.L. Site – specific endometrial injury improves implantation and pregnancy in patients with repeated implantation failure. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:140.
60. Huang P. Effects of intrauterine perfusion of human chorionic gonadotropin in women with different implantation failure numbers. *Am J Reprod Immunol.* 2018 Feb;79(2).
61. Hunt J.S., Andrews G.K., Wood G.W. Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. *J. Immunol.* 1987; 138(8): 2481-7.
62. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 2005 May;19(7):681-93.

63. Ideta A¹, Sakai S, Nakamura Y, Urakawa M, Hayama K, Tsuchiya K, Fujiwara H, Aoyagi Y. Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve pregnancy rate following bovine embryo transfer. *Anim Reprod Sci.* 2010 Jan;117(1-2):18-23.
64. Imakawa K., Bai R., Fujiwara H., Kusama K. Conceptus implantation and placentation: molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reprod. Med. Biol.* 2015; 14: 1-11.
65. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1376-84.
66. Jasper M.J., Tremellen K.P., Robertson S.A. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12(5): 301-8.
67. Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Lavasidis LG, Vrekoussis T, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *J Reprod Immunol.* 2010 May;85(1):33-9.
68. Kalu E., Bhaskaran S., Thum M.Y., Vishwanatha R., Croucher C., Sherriff E. et al. Serial estimation of Th1:th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59(3): 206-11.
69. Karimzadeh M.A., Ayazi Rozbahani M., Tabibnejad N. Endometrial local injury improves the pregnancy rate among recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a randomised clinical trial. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynecol.* 2009; 49(6): 677-80.
70. Kasius J.C., Fatemi H.M., Bourgain C., Sie-Go D.M., Eijkemans R.G., Fauser B.C. et al. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. *Fertil. Steril.* 2011;96(6):1451-56.
71. KIRBY DR, BILLINGTON WD, BRADBURY S, GOLDSTEIN DJ. ANTIGEN BARRIER OF THE MOUSE PLACENTA. *Nature.* 1964 Nov 7;204:548-9.

72. Koot YE, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1822(12):1943-50.
73. Kosaka K., Fujiwara H., Tatsumi K., Yoshioka S., Higuchi T., Sato Y. et al. Human peripheral blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BeWo-cell spheroids. *Hum. Reprod*. 2003; 18: 19-25.
74. Kyrou D., Kolibianakis E.M., Venetis C.A., Miliaras D., Theodoridis T., Tzevelekis F. et al. Steroid receptor expression in human endometrium during the follicular phase of stimulated cycles. *Hum. Reprod*. 2009;24(11): 2931–35.
75. Lachapelle, M.H., Miron, P., Hemmings, R., Roy, D.C., 1996. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J. Immunol*. 156, 4027–4034.
76. Lashley L.E., van der Keur C., van Beelen E., Schaap R., van der Westerlaken L.A., Scherjon S.A., Claas F.H. Stronger T – cell alloreactivity and diminished suppressive capacity of peripheral regulatory T cells in infertile women undergoing in vitro fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2015; 74(3): 268-78.
77. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Hilgert I, Mami-Chouaib F, Tabiasco J, Boumsell L, Bensussan A. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26)
78. Lea, R.G., Sandra, O., 2007. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 134, 389–404
79. Ledee N., Munaut C., Aubert J., Serazin V., Rahmati M., Chaouat G., Sandra O., Foidart J.M. Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failures (IF) or recurrent miscarriages. *J. Pathol*. 2011; 225(4): 554-64.
80. Lessey B.A. The role of the endometrium during embryo implantation. *ZHum.Reprod*. 2006;15(6):39-50.
81. Li R., Hao G. Local injury to the endometrium: its effect on implantation. *Curr*.

- Opin. Obstet. Gynecol. 2009; 21(3): 236-9.
82. Liang PY, Diao LH, Huang CY, Lian RC, Chen X, Li GG, Zhao J, Li YY, He XB, Zeng Y. The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2015 Dec;31(6):823-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.009. Epub 2015 Aug 21
83. Lisa E.E.L.O. Lashley¹, Carin van der Keur, Els van Beelen, Rowena Schaap, Lucette A.J. van derWesterlaken¹, Sicco A. Scherjon, Frans H.J. Claas- Stronger T-Cell Alloreactivity and Diminished Suppressive Capacity of Peripheral Regulatory T Cells in Infertile Women Undergoing In Vitro Fertilization, *American Journal of Reproductive Immunology* 74 (2015) 268–278
84. Liu L., Zhou F., Lin X., Li T., Tong X., Zhu H. et al. Recurrent IVF failure with elevated progesterone on the day of hCG administration. *Europ. Journal of Obstet. Gynecol. and Reprod. Biology*. 2013;171:78-83
85. Lu Y., Zhang F., Zhang Y., Zeng B., Hu L., Liao A. Quantitative reduction of peripheral CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in reproductive failure after artificial insemination by donor sperm. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2013; 69(2): 188-93.
86. MacAnanny J., Hartnett J., Engmann L., Nulsen J. C., Sanders M. M., Benadiva C. A. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil. Steril*. 2010;93(2):437-41.
87. Makrigiannakis A, BenKhalifa M, Vrekoussis T, Mahjub S, Kalantaridou SN: Gurgan: repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur J Clin Invest* 2011; 45:380-384
88. Makrigiannakis A., BenKhalifa M., Vrekoussis T., Mahjub S., Kalantaridou S.N., Gurgan T. repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur. J. Clin. Invest*. 2015; 45(4): 380-4.
89. Makrigiannakis A., Margioris A.N., Chatzaki E., Zoumakis E., Chrousos G.P., Gravanis A. The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human

- endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5(9): 789-96.
90. Makrigiannakis A., Margioris A.N., Le Goascogne C., Zoumakis E., Nikas G., Stournaras C. et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed at the implantation sites of early pregnant rat uterus. *Life Sci.* 1995; 57(20): 1869-75.
91. Makrigiannakis A., Zoumakis E., Kalantaridou S., Coutifaris C., Margioris A.N., Coukos G. et al. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat. Immunol.* 2001; 2(11): 1018-24.
92. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod.* 2006; 21(12):3036-43.
93. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, et al. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica.* 2003;88:789–93.
94. Matteo M.G., Greco P., Rosenberg P., Mestice A., Baldini D., Falagario T. et al. Normal percentage of CD56bright natural killer cells young patients with a history of repeated unexplained implantation failure after in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 2007; 88(4): 990-3.
95. Moffett A., Regan L., Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ.* 2004; 329(7477): 1283-5.
96. Mor G., Romero R., Aldo P.B., Abrahams V.M. Is the trophoblast an immune regulator? The role of Toll-like receptors during pregnancy. *Crit. Rev. Immunol.* 2005; 25(5): 375-88.
97. Nakagawa K¹, Kwak-Kim J, Ota K, Kuroda K, Hisano M, Sugiyama R, Yamaguchi K. Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios. *Am J Reprod Immunol.* 2015 Apr;73(4):353-61. doi: 10.1111/aji.12338. Epub 2014 Nov 14.
98. Nakayama T, Fujiwara H, Maeda M, et al. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: hCG enhances the effects of PBMC. *Hum Reprod.* 2002;17: 207–212

99. Nakayama T., Fujiwara H., Maeda M., Inoue T., Yoshioka S., Mori T., Fujii S. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC. *Hum. Reprod.* 2015; 17(1): 207-12.
100. Narvekar S.A., Gupta N., Shetty N., Kottur A., Srinivas M., Rao K.A. Does local endometrial injury in the nontransfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF? A randomized con-trolled pilot study. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2010; 3(1): 15-9.
101. Nastri CO, Lensen SF, Gibreel A, Raine-Fenning N, Ferriani RA, Bhattacharya S, Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Mar 22;(3)
102. Navarro F, Llano M, Bellón T, Colonna M, Geraghty DE, López-Botet M. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):277-83.
103. Ng, S.C., Gilman-Sachs, A., Thaker, P., Beaman, K.D., Beer, A.E., Kwak-Kim, J., 2002. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am.J.Reprod.Immunol*48,77–86
104. Nowak I., Malinowski A., Tchórzewski H., Barcz E., Wilczynski J. R., Grybos M. et al. Frequencies of killer immunoglobulin-like receptor genotypes influence susceptibility to spontaneous abortion. *J. Appl. Genet.* 2009; 50(4): 391-8.
105. O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev.* 1998 Jun;163:129-38.
106. Okitsu O., Kiyokawa M., Oda T., Miyake K., Sato Y., Fujiwara H. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 92: 82-7.

107. Parham, P., 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 201–214
108. Pazmany L, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science.* 1996 Nov 1;274(5288):792-5.
109. Pei-Yan Liang, Liang-Hui Diao, Chun-Yu Huang, Ruo-Chun Lian, Xian Chen, Guan-Gui Li, Jin Zhao, Yu-Ye Li, Xue-bing He Yong Zeng The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure. *American Journal of Reproductive Immunology* 73 (2015) 12–21
110. Pereira N., Petrini A.C., Lekovich J.P., Elias R.T., Spandorfer S.D. Surgical Management of Endometrial Polyps in Infertile Women: A Comprehensive Review. *Surgery Research and Practice.* 2015
111. Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2001 Oct-Nov;52(1-2):35-43.
112. Polanski L.T., Baumgarten M.N., Quenby S., Brosens J., Campbell B.K., Raine-Fenning N.J. What exactly do we mean by “recurrent implantation failure”? A systematic review and opinion. *Reprod. BioMedicine Online.* 2014; 28:409-23.
113. Potts WK¹, Manning CJ, Wakeland EK. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype *Nature.* 1991 Aug 15;352(6336):619-21.
114. Rackow B.W., Taylor H.S. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2010; 93(6): 2027–34.
115. Raghupathy R., Makhseed M., Azizieh F., Omu A., Gupta M., Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* 2000; 15(3):

- 713-8.
116. Raziel A., Schachter M., Strassburger D., Bern O., Ron-El R., Friedler S. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil. Steril.* 2007; 87(1): 198-201.
117. Richani K., Soto E., Romero R. et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complementsystem//*J.Matern.FetalNeonatalMed.*—2005.—Vol.17.—P.239–245
118. Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelli M., Minasi M.G., Romano S., Ferrero S. et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online.*2005; 10: 669–81.
119. Rinehart J. Recurrent implantation failure: definition. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24(7):284-7.
120. Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remoh J., Pellicer A, Simon C. et al. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil. Steril.*2010; 94(4):1380-6.
121. Roque M., Lattes K., Serra S., Solà I., Geber S., Carreras R. et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;99(1):156-62.
122. Roussev RG, Acacio B, Ng SC, Coulam CB. Duration of intralipid's suppressive effect on NK cell's functional activity. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Sep;60(3):258-63.
123. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084–92.
124. Sacks G., Yang Y., Gowen E., Smith S., Fay L., Chapman M. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012;67:434–42.

125. Saito S, Morii T, Enomoto M, Sakakura S, Nishikawa K, Narita N, Ichijo M. The effect of interleukin 2 and transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2) on the proliferation and natural killer activity of decidual CD16- CD56bright natural killer cells. *Cell Immunol.* 1993 Dec;152(2):605-13
126. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(6): 601-10.
127. Saito, S. & Y. Sasaki. 2006. Th1/Th2 balance at implantation stage. In *Immunology of Pregnancy*. Mor, G. Ed.: 37–48. Springer. New York, New York.
128. Sakkas D., Alvarez J. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.* 2010;93(4): 1027-35.
129. Santibañez A, García J, Pashkova O, Colín O, Castellanos G, Sánchez AP, et al. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on clinical pregnancy rates from in vitro fertilisation cycles: a prospective study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12(1):9.
130. Schatten H., Qing-Yuan Sun and Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reproduct. Biol. and Endocrinol.* 2014;12:111.
131. Schlahsa L., Jaimes Y., Blasczyk R., Figueiredo C. Granulocyte colony-stimulatory factor: a strong inhibitor of natural killer cell function. *Transfusion.* 2011; 51(2): 293-305.
132. Schumacher A., Heinze K., Witte J., Poloski E., Linzke N., Woidacki K., Zenclussen A.C. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J. Immunol.* 2013; 190(6): 2650-8.
133. Seli E., Gargner D.K., Schoolcraft W.B., Moffatt O., Sakkas D. et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82(2):378–83.
134. Shapiro B.S., Daneshmand S.T., Garner F.C., Aguirre M., Hudson C. Freeze – all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod. BioMedicine Online.* 2014; 29 (3): 286 – 90.

135. Shimada, S., Kato, E.H., Morikawa, M., Iwabuchi, K., Nishida, R., Kishi, R., et al., 2004. No difference in natural killer or natural killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum. Reprod.* 19, 1018–1024.
136. Shohayeb A., El-Khayat W. Does a single endometrial biopsy regimen (S-EBR) improve ICSI outcome in patients with repeated implantation failure? A randomised controlled trial. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2012; 164(2): 176-9.
137. Shreeve N., Sadek K. Intralipid therapy for recurrent implantation failure: new hope or false dawn. *J. Reprod. Immunol.* 2012; 93: 38-40.
138. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1039-43
139. Simon A., Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil. Steril.* 2012; 97(5): 1039-43.
140. Stephenson M.D., Fluker M.R. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo controlled Canadian trial. *Fertil. Steril.* 2000; 74(6): 1108-13.
141. Stephenson M.D., Kutteh W.H., Purkiss S., Librach C., Schultz P., Houlihan E. et al. Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebocontrolled trial. *Hum. Reprod.* 2010; 25(9): 2203-9.
142. Tabiasco J, Perrier d'Hauterive S, Thonon F, Parinaud J, Léandri R, Foidart JM, Chaouat G, Munaut C, Lombroso R, Selva J, Bergère M, Hammoud I, Kozma N, Aguerre-Girr M, Swales AK, Sargent IL, Le Bouteiller P, Lédée N. Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. *Reprod Biomed Online.* 2009 Mar;18(3):374-81.
143. Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T: Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation

- by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum Reprod* 1997; 12:2102-2107.
144. Tan B.K., Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG*. 2005;112(6):773-80.
145. Tanaka T., Umesaki N., Nishio J., Maeda K., Kawamura T., Araki N. et al. Neonatal thrombocytopenia induced by maternal anti-HLA antibodies: a potential side effect of allogenic leukocyte immunization for unexplained recurrent aborters. *J. Reprod. Immunol.* 2000; 46: 51-7.
146. Tarlatiz B.C., Fauser B.C., Tournaye H. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:333-340.
147. Thomas ML, Harger JH, Wagener DK, Rabin BS, Gill TJ 3rd. HLA sharing and spontaneous abortion in humans. *Am J Obstet Gynecol*. 1985 Apr 15;151(8):1053-8.
148. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod*. 2005;20(1):35-48.
149. Thum, M.Y., Abdalla, H.I., Bhaskaran, S., Harden, E.L., Ford, B., Sumar, N., et al., 2007. The relationship of systemic TNF_ and IFN_ with IVF treatment outcome and peripheral blood NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57, 210–217.
150. Timeva T., Shterev A., Kyurkchiev S. Recurrent Implantation Failure: The Role of the Endometrium. *J Reprod Infertil*. 2014;15(4):173-83.
151. Tremellen K., Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *J Reprod Immunol*. 2012;93(1):58-63.
152. Trowsdale J., Moffett A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin. Immunol*. 2008; 20(6): 317-20.
153. Van Vaerenbergh I., Fatemi H.M., Blockeel C., Van Lommel L., In't Veld P., Schuit F. et al. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH

- stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reprod. Biomed. Online*.2011;22 (3):263-71.
154. Varla-Leftherioti M., Keramitsoglou T., Spyropoulou-Vlachou M., Papadimitropoulos M., Kontopoulou-Antonopoulou V., Tsekoura C. et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report from the reproductive immunology component. *Tissue Antigens*. 2007; Suppl. 1: 297-303.
155. Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P. Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2008 May-Jun;14(3):209-18.
156. Volovsky M., Martin Healey. Should intrauterine human chorionic gonadotropin infusions ever be used prior to embryo transfer? *Assist Reprod Genet* (2018) 35:273–278 DOI 10.1007/s10815-017-1049-5
157. Wira C.R., Grant-Tschudy K.S., Crane-Godreau M.A. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2005; 53(2): 65-76.
158. Würfel W., Santjohanser C., Hirv K., Bühl M., Meri O., Laubert I. et al. High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Hum. Reprod*. 2010; 25(8): 2151-2.
159. Yang C., Geng Y., Li Y., Chen C., Gao Y. Impact of ovarian endometrioma on ovarian responsiveness and IVF: a systematic review and meta – analysis. *Reprod. BioMed. Online*.2015;31:9-19.
160. Yang X., Huang R., Wang Y., Liang X. Pituitary suppression before frozen embryo transfer is beneficial for patients suffering from idiopathic Repeated Implantation Failure. *J Huazhong Univ Sci Technol*.2016;36(1):127-31.
161. Yoshinaga, K. 2008. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin. Cell. Dev. Biol*. 19: 161–169.

162. Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, Kosaka K, Mori T, Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum Reprod.* 2006 Dec;21(12):3290-4.
163. Yu N, Yang J, Guo Y, Fang J, Yin T, Luo J, Li X, Li W, Zhao Q, Zou Y, Xu W. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity in mice with embryonic implantation dysfunction. *Am J Reprod Immunol.* 2014 Jan;71(1):24-33
164. Zhou L., Li R., Wang R., Huang H.X., Zhong K. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil. Steril.* 2008; 89(5): 1166-76.
165. Ziegler D, Pirtea P, Galliano D, Cicinelli E, Meldrum D. Optimal uterine anatomy and physiology necessary for normal implantation and placentation. *Fertil Steril.*2016;105(4):844-54.

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

