

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

На правах рукописи

ДОНЦОВА
Татьяна Владимировна

**РЕАЛИЗАЦИЯ ПРОГРАММЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С
УЧЕТОМ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА
СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ**

14.01.01- акушерство и гинекология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Калинина Е.А.
доктор биологических наук
Николаева М.А.

Москва 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ВЛИЯНИЕ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ ЖЕНЩИН (обзор литературы)	14
1.1. Введение.....	14
1.2. Влияние семенной плазмы на репродуктивную систему женщины.....	15
1.3. Иммунорегуляторные молекулы семенной плазмы	19
1.4. Семенная плазма и регуляторные Т-клетки	22
1.5. Потенциальные неблагоприятные эффекты семенной плазмы.....	23
1.6. Семенная плазма и современная клиническая практика	26
1.7. Приоритетные направления будущих исследований семенной плазмы.....	34
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Материал исследования.....	38
2.2. Методы исследования.....	41
2.2.1. Общеклинические методы обследования.....	42
2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	43
2.2.3. Гормональное обследование.....	43
2.2.4. Обследование партнера	44
2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и трансвагинальная пункция фолликулов	46
2.2.6. Перенос эмбрионов и ведение посттрансферного периода.....	48
2.3. Специальные методы исследования.....	49
2.3.1. Оценка иммунного статуса	49
2.3.2. Оценка цитокинового профиля семенной плазмы	50
2.3.3. Оценка содержания простагландина E ₂ в семенной плазме.....	51
2.4. Статистический анализ полученных данных	51
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53

3.1. Клиническая характеристика супружеских пар, включенных в исследование	53
3.2. Характеристика показателей спермограммы партнера пациенток, включенных в исследование	60
3.3. Характеристика программы ВРТ	61
3.3.1. Характеристика протокола овариальной стимуляции в исследуемых группах женщин.....	61
3.3.2. Характеристика процессов фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза.....	62
3.4. Сравнительный анализ исходов программы ВРТ	63
3.5. Характеристика содержания цитокинов и простагландина E2 в семенной плазме партнера	65
3.6. Зависимость исходов ВРТ от концентрации цитокинов в семенной плазме партнера в группе с половыми контактами во время лечения	67
3.7. ROC – анализ значимости определения уровня цитокинов в семенной плазме партнера в группе с регулярными половыми контактами в программе ВРТ для прогноза наступления беременности	71
3.8. CART-анализ группы с рекомендованными половыми контактами во время программы ВРТ	75
3.9. Зависимость исходов программы ВРТ от концентрации цитокинов в семенной плазме партнера в группе без половых контактов во время лечения.....	77
3.10. ROC – анализ значимости определения уровня цитокинов в семенной плазме в группе без половых контактов в программе ВРТ для прогноза наступления беременности.....	82
3.11. CART анализ группы без половых контактов во время ВРТ	86
3.12. Оценка вариабельности уровня цитокинов в семенной плазме.....	88

3.13. Персонализированный подход к рекомендациям по половой жизни во время ВРТ.....	91
3.14. Зависимость исхода программы ВРТ от концентрации простагландина E ₂ в семенной плазме партнера во время лечения.....	92
3.15. Зависимость состояния клеточного звена иммунитета пациенток и исходов программы ВРТ.....	94
3.16. Зависимость состояния клеточного звена иммунитета пациенток в день трансвагинальной пункции от цитокинового профиля семенной плазмы.....	97
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	125
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время с появлением успешных методов лечения бесплодия и развитием методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) существенно возросла необходимость внедрения новых способов диагностики, мониторинга, лечения и прогноза исходов процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [119]. Повышение результативности ВРТ невозможно без изучения механизмов регуляции имплантации [63].

Последние несколько лет появились данные о том, что взаимодействие женского репродуктивного тракта с семенной плазмой (СП) – этап, необходимый не только для оплодотворения и имплантации, но и для полноценного протекания беременности [159].

При спонтанной беременности ее иммунорегуляция начинается с момента контакта женского репродуктивного тракта со СП. Известно, что СП содержит различные иммунорегуляторные компоненты, которые влияют на физиологию женского репродуктивного тракта и, тем самым, увеличивают шанс наступления беременности и успешного ее течения, так как имплантация и ранние стадии гестации протекают на благоприятно измененном иммунологическом фоне [159]. Имеются данные о том, что СП содержит цитокины и простагландины, синтезируемые в предстательной железе мужчин. При попадании в женский репродуктивный тракт они взаимодействуют с рецепторами эпителиальных клеток в цервикальном канале и матке, что приводит к их структурным и функциональным изменениям [183]. Особенностью программы ВРТ в отличие от естественного цикла зачатия является отсутствие прямого контакта с СП. Поэтому в зарубежных исследованиях неоднократно предпринимались попытки использовать введение СП

в женские половые пути при проведении программы ВРТ с целью повышения эффективности лечения. Однако имеющиеся данные о влиянии аппликации СП в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП) на результативность лечения бесплодия носят весьма противоречивый характер [201]. Лишь при анализе иммунологических биомаркеров СП, впервые было показано, что СП человека содержит факторы, оказывающие не только благоприятное, но и негативное влияние на имплантацию эмбриона, а эффективность программы ВРТ при интравагинальной аппликации СП зависит от концентрации этих факторов [134; 1].

Очевидно, что половые контакты в цикле овариальной стимуляции также могут программировать успешность имплантации, что может определяться разнонаправленными эффектами множества компонентов СП, поступающих в репродуктивный тракт пациентки. До сих пор в единичных работах, посвященных влиянию половой жизни на результативность программы ВРТ, состав СП не принимался во внимание.

Являясь значимой иммунорегуляторной молекулой СП, трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) выступает и ключевым компонентом развития толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. Усиливая хемотаксис, TGF- β стимулирует развитие посткоитального воспаления, необходимого для имплантации эмбриона, и ограничивает его за счет индукции противовоспалительных реакций. Кроме того, СП содержит целый ряд провоспалительных (IFN γ , IL-1 β , IL-18, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) и противовоспалительных (IL-4, IL-5, IL-10) цитокинов. Поэтому нельзя исключить, что баланс про- и противовоспалительных цитокинов в СП полового партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, в том числе при ВРТ, также может влиять на эффективность имплантации эмбриона. Кроме того, рост уровня простагландина (PG) E₂ отмечается в зонах повышенной

проницаемости сосудов эндометрия, и нельзя исключить, что PG E₂, содержащийся в СП, также может являться фактором иммунорегуляции имплантации [96].

Основным звеном, обеспечивающим формирование и поддержку периферической толерантности к аллоантигенам плода при беременности, являются регуляторные Т клетки [154;155]. Предполагается, что одним из механизмов влияния СП на имплантацию эмбриона является усиление миграции регуляторных Т клеток (Трег) из периферической крови в матку [134]. До сих пор не изучалось влияние цитокинового состава СП, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах в программе ВРТ, на состояние клеточного звена иммунной системы.

Таким образом, представляется актуальным, современным и перспективным изучение роли иммуномодулирующего потенциала СП партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, для предикции эффективности имплантации эмбриона, что может способствовать внедрению в клиническую практику персонифицированного режима половых контактов в цикле ВРТ.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на очевидность воздействия СП, возможность влияния ее компонентов при половых контактах в цикле ВРТ на реализацию репродуктивной функции женщины до сих пор не изучалась. В единичных работах, посвященных влиянию половых контактов на результативность программы ВРТ, состав СП не анализировался [198; 199].

Отсутствуют данные о механизмах реакций клеточного звена иммунитета женщины на введение СП, поэтому выявление роли СП в иммунорегуляции имплантации эмбриона является теоретическим обоснованием усовершенствования

алгоритма обследования супружеских пар, вступающих в программу ВРТ, и разработки критериев прогнозирования успешного наступления беременности на основании комплексного скринингового иммунологического исследования СП. Понимание механизмов иммуномодулирующего действия СП позволит разработать принципиально новые персонализированные подходы к коррекции репродуктивной функции женщин.

Цель исследования

Изучение клинико-прогностической значимости иммуномодулирующего потенциала семенной плазмы партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, для предикции эффективности программы вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования

1. Провести анализ данных анамнеза, параметров клинического и гормонального статуса, особенностей фолликуло-, оо- и раннего эмбриогенеза у супружеских пар с трубно-перитонеальным фактором бесплодия в программе ВРТ.
2. Оценить уровни маркеров, определяющих иммуномодулирующий потенциал семенной плазмы полового партнера, при проведении программы ВРТ: содержание интерлейкинов (IL) -1β , -6 , -8 , -10 , $-12p70$, $-17A$, -18 , -23 , -33 , интерферона (IFN) $\alpha 2$ и γ , фактора некроза опухоли (TNF- α), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), уровень трансформирующего фактора роста (TGF β 1) и простагландина E₂ (PGE₂).
3. Провести анализ влияния половых контактов в программе ВРТ на частоту наступления беременности у пациенток в зависимости от содержания

провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и простагландина E_2 в семенной плазме партнера.

4. Выявить прогностическую значимость определения содержания цитокинов и PGE_2 в семенной плазме для оценки эффективности программы ВРТ с рекомендованными половыми контактами и без них.

5. Изучить влияние половых контактов на состояние клеточного звена иммунитета женщин с помощью анализа взаимосвязи между цитокиновым профилем семенной плазмы и уровнем регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток при проведении программы ВРТ.

6. На основании комплексной оценки иммуномодулирующих свойств семенной плазмы разработать алгоритм персонифицированной подготовки и проведения программы ВРТ, предусматривающий включение или отмену половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

Научная новизна

Впервые обнаружена зависимость эффективности программы ВРТ от цитокинового профиля семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала лечения, на фоне отмены половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

С помощью мультиплексного анализа определены уровни цитокинов ($IFN\alpha$, IL-12p, IL-10, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8, TGF, MCP1) и PGE_2 в СП партнера при проведении программы ВРТ.

Впервые установлено влияние цитокинов семенной плазмы полового партнера, поступающей в женский репродуктивный тракт при естественных половых контактах в период проведения программы ВРТ, на реализацию репродуктивной функции у пациенток.

Выявлены механизмы реализации иммуномодулирующего потенциала семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки при половых контактах, связанные с влиянием цитокинового состава СП на состояние Т-клеточного звена иммунной системы пациенток в программе ВРТ.

Практическая значимость

Обоснована целесообразность персонифицированного подхода к назначению режима половых контактов при проведении программы ВРТ.

Установлены параметры цитокинового статуса семенной плазмы, определяющие оптимальный режим половых контактов при проведении программы ВРТ и являющиеся значимым фактором повышения эффективности лечения бесплодия.

Определен пороговый уровень содержания регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток для прогноза успешности имплантации в программе ВРТ.

Разработан алгоритм персонифицированной подготовки и проведения программы ВРТ у супружеских пар с учетом цитокинового профиля семенной плазмы партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациентки и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции.

Методы исследования

Проведено проспективное и ретроспективное обследование супружеских пар, проходящих лечение бесплодия методом ВРТ. Пациенты были подготовлены в соответствии с приказом министерства здравоохранения РФ №107н от 30.08.2012 г.

В работе использовались клинические, лабораторные, инструментальные методы, а также статистический анализ данных. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток и цитокинового профиля СП проводили с использованием проточной цитофлуориметрии. Содержание PG E₂ в СП осуществляли с помощью иммуноферментного анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Во время лечения бесплодия методами ВРТ половые контакты могут оказывать как благоприятное, так и негативное влияние на процессы имплантации эмбриона. Частота наступления клинической беременности при наличии или отсутствии половых контактов связана с содержанием и соотношением провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IFN α , IL12p, IL-18, IL-10) в семенной плазме полового партнера, что свидетельствует о влиянии семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала и во время овариальной стимуляции, на эффективность программы ВРТ.

2. Содержание цитокинов (IL-10, TNF α) в семенной плазме полового партнера, поступающей в репродуктивный тракт пациентки до начала овариальной стимуляции, является одним из факторов, определяющих состояние клеточного звена иммунитета пациентки и эффективность имплантации эмбриона. Повышение содержания регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток (>6,6%) в день трансвагинальной пункции является благоприятным прогностическим фактором имплантации в группе пациентов без половых контактов во время программы ВРТ.

3. Взаимосвязь между режимом половых контактов, иммуномодулирующими свойствами семенной плазмы партнера и частотой наступления беременности является основанием для персонификации протокола

ВРТ. Наиболее значимым показателем, определяющим эффективность рекомендации или ограничения половых контактов в цикле овариальной стимуляции, является содержание противовоспалительного цитокина IL-10 в семенной плазме.

Личный вклад автора

Автор лично принимала участие в выборе темы диссертационной работы, разработке цели и задач, анализе, научном обобщении и статистической обработке полученных результатов. Автор непосредственно принимала участие в сборе биологического материала, ведении пациенток на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ и переносе эмбрионов, анализировала и научно интерпретировала полученные результаты настоящего исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация материалов диссертации

Работа рассмотрена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени Б.В. Леонова (21.06.2019) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (24.06.2019).

Внедрение результатов настоящего исследования в практическую работу

Результаты исследования внедрены и используются в клинической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени Б.В.Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, 4 статьи входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, 1 в зарубежном журнале.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 157 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственные результаты и обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и литературы. В работе представлены 21 таблица и 22 рисунка. Библиографический указатель состоит из 212 литературных источников, из которых 9 русскоязычных и 203 иностранных.

Глава 1. ВЛИЯНИЕ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ ЖЕНЩИН (обзор литературы)

1.1. Введение

В естественных условиях оплодотворению у человека предшествует половой акт, завершающийся эякуляцией, в результате чего в половые женские пути поступает полный объем эякулята мужчины, содержащий как сперматозоиды и иные клеточные компоненты, так и бесклеточную фракцию – семенную плазму (СП). Известно, что богатая протеинами СП содержит компоненты, способствующие поддержанию жизнеспособности сперматозоидов [116; 91].

Долгое время СП рассматривалась как транспортная среда, обеспечивающая возможность прохождения сперматозоидов через слизистый барьер цервикального канала и их выживания во «враждебной» среде женских половых путей [56; 32]. Многочисленные исследования влияния СП на различные аспекты репродукции человека и животных, проведенные в последние три десятилетия, показали, что СП взаимодействует с эндометрием, участвуя в формировании оптимального иммунного ответа материнского организма, необходимого для обеспечения локальной иммунорегуляции и иммунной толерантности, что способствует успеху имплантации [12; 193; 161; 42; 159].

При контакте со слизистыми оболочками репродуктивных органов женщины СП активирует биологические процессы, способствующие зачатию и дальнейшему развитию беременности. СП содержит ряд сигнальных факторов, включая гормоны и цитокины [18; 95; 115; 144; 155], при этом в исследованиях на животных моделях было показано, что нарушения их функции оказывают отрицательное влияние на раннее эмбриональное развитие и в перспективе на здоровье потомства [145; 32]. Следует отметить, что сохранение данной сигнальной роли СП у животных при всем

различии участвующих в молекулярных процессах белков указывает на существенное биологическое значение СП в репродуктивной сфере [124].

В силу определенных трудностей изучения влияния семенной жидкости на репродуктивный тракт женщин, молекулярные и клеточные механизмы действия требуют дальнейшего изучения с установлением точной роли сигнальных молекул на клеточном уровне. В данной работе проведен обзор результатов публикаций, касающихся изучения роли семенной жидкости на репродуктивный тракт женщин, рассматриваются сигнальные молекулы в свете последних данных и механизмы их действий, а также обсуждаются недостатки знаний и пути их решения в будущем.

1.2. Влияние семенной плазмы на репродуктивную систему женщины

При контакте семенной плазмы с эпителием женщины имеет место масштабная активация многочисленных путей экспрессии генов, способная привести к выработке антиспермальных антител и провоспалительных цитокинов [102]. Большинство из свыше 700 генов, экспрессия которых в ткани эктоцервикса изменяется после полового контакта, участвует в процессах презентации провоспалительных антигенов, а также экспрессии цитокинов и хемокинов, участвующих в рекрутировании и активации таких клеток иммунной системы, как Т-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [180; 183].

Первичной тканью, контактирующей с СП у женщин, является эктоцервикс матки. Шейка матки играет ключевую роль в защите от инфекций, и может иметь решающее значение для инициации и поддержания иммунной толерантности к сперматозоидам и другому антигенному материалу, присутствующему в эякуляте. Самые ранние доказательства, демонстрирующие реакцию женщин на семенную

плазму в периовуляторный период, были получены во время инсеминации спермой доноров с последующим изучением мазков из шейки матки [142].

В 2012 году стало известно, что осеменение при вагинальном коитусе вызывает воспалительный ответ в эктоцервиксе, отражающийся в изменениях лейкоцитов и экспрессии генов в многослойном эпителии и более глубоких стромальных тканях [183]. В ходе исследования производился забор материала из шейки с интервалом 48 часов. За 12 часов до второго исследования, у женщин был незащищенный половой акт, половой акт с использованием презерватива или отсутствие полового акта. Рекрутирование лейкоцитов не происходило без полового акта или с использованием презерватива [183]. Микроматричный анализ глобальной экспрессии генов показал, что семенная плазма индуцирует генные пути, связанные с передачей сигналов цитокинов, воспалением, презентацией антигенов, миграцией лейкоцитов и клеточным иммунным ответом, что было подтверждено количественной полимеразной цепной реакцией, демонстрирующей повышение CSF2 (гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор [GM-CSF]), экспрессия мРНК IL6, IL8 и IL1A [183]. СП оказывает иммунорегуляторный эффект не только на поверхности, но и в более глубоких стромальных тканях шейки матки у женщин, сравнимый с реакцией у мышей [162], и, таким образом, потенциально влияет на репродукцию на фундаментальном уровне.

Степень влияния СП, поступающей искусственно или при половом акте, на эндометрий женщин неизвестна. В отличие от мышей, у которых семенная плазма легко достигает верхних отделов тракта, у женщин семенная плазма после полового контакта в основном сохраняется в шейке матки. Возможно, что компоненты семенной плазмы из влагалища, получают доступ к матке через местный противоточный перенос из влагалищной венозной крови и афферентных лимфатических узлов в артериальную кровь. «Эффект первого прохождения», при котором прогестерон, вводимый вагинально, преимущественно поглощается тканью

матки, как было показано, включает прямой транспорт из влагалищных вен в маточную артерию. В дополнение к стероидным гормонам простагландины и пептидные гормоны (которые являются ключевыми медиаторами воздействия на семенную плазму) легко транспортируются с помощью противоточных механизмов в репродуктивных тканях [40].

Эпителиальные клетки эндометрия и стромальные фибробласты, безусловно, способны реагировать на семенную плазму, если достаточно материала достигает поверхности эндометрия. Эксперименты *in vitro* ясно демонстрируют, что семенная плазма вызывает дозозависимые изменения в экспрессии генов, кодирующих IL-1 β , IL-6, LIF и TGF β , в первичных эпителиальных клетках эндометрия, причем клетки, восстановленные в течение средней секреторной фазы, являются наиболее чувствительными [74; 136]. Фрагменты эндометриальной ткани реагируют сходным образом как эпителиальные клетки шейки матки, при этом 10% семенной плазмы индуцирует синтез воспалительного белка макрофагов 1B (MIP-1B), GM-CSF, IL-1 β , IL-10 [125].

Индукцируемые семенной плазмой изменения экспрессии генов и наблюдаемый ответ на клеточном уровне известны как лейкоцитарная реакция [142; 195; 161].

Отсутствие экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов на поверхности сперматозоидов человека позволяет избежать активации специфических адаптивных реакций гистосовместимости [82]. Тем не менее, активация неспецифических медиаторов системы врожденного иммунитета ведет к тому, что микросреда репродуктивной системы женщины на момент имплантации в целом может рассматриваться как потенциально враждебная и характеризующаяся увеличением содержания провоспалительных цитокинов в эндометрии.

Носящая воспалительный характер лейкоцитарная реакция в ответ на попадание сперматозоидов в половые пути женщины представляется неожиданной и подлежит строгой регуляции. Тем не менее многочисленные исследования у

животных и человека продемонстрировали, что контакт половой системы женщины со спермой ведет к улучшению выживаемости сперматозоидов, повышению частоты оплодотворения, а также улучшению параметров имплантации и раннего эмбрионального развития [173].

Лейкоцитарная реакция участвует в процессах «тихого» апоптоза и фагоцитоза некомпетентных и старых сперматозоидов, не способных обеспечить оплодотворение. Данные процессы происходят в отсутствие массивного высвобождения активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, характерного для апоптоза и фагоцитоза соматических клеток. Напротив, при наличии инфекционного агента СП защищает компетентные сперматозоиды от высвобожденных активных форм кислорода [11].

Хотя сперматозоиды и не экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости, контакт иммунных клеток женских половых органов со спермой подразумевает взаимодействие с мужскими антигенами, присутствующими на содержащихся в сперме иммунных клетках, клетках эпителия и клеточном «мусоре». Растворимые иммунные компоненты СП должны модулировать ответ материнского организма на мужские антигены таким образом, что беременность впоследствии будет способна развиваться при экспрессии эмбрионом тех же самых антигенов [160]. Несомненно, что у подавляющего большинства фертильных женщин не наблюдается активный иммунный ответ на сперму с выработкой высоких титров антиспермальных антител, хотя препятствующие этому механизмы остаются предметом изучения [44]. Таким образом, подробное изучение иммуномодулирующих факторов СП является насущной задачей медицинской науки.

1.3. Иммунорегуляторные молекулы семенной плазмы

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) является одним из ключевых компонентов СП, участвующих в регуляции иммунной толерантности матери [158; 55]. TGF- β представляет собой широко распространенный в организме плеiotропный иммуномодулирующий фактор, который изменяет фенотип антигенпрезентирующих клеток и лимфоцитов, тем самым влияя на индукцию и разрешение воспалительных процессов. TGF- β вызывает стимулирующие или ингибирующие эффекты в Т-лимфоцитах в зависимости от степени дифференцировки последних, а также от условий стимуляции [71; 137].

СП является наиболее богатой TGF- β биологической жидкостью человеческого организма [155-157; 165]. Она содержит в основном типы TGF- $\beta 1$ и TGF- $\beta 3$, при этом содержание типа TGF- $\beta 2$ относительно более низкое [162]. Средние концентрации различных типов составляют 219,5 и 172,0 нг/мл для TGF- $\beta 1$ и - $\beta 3$ соответственно [179]. Синтез TGF- β регулируется уровнем тестостерона в семенных пузырьках. Корреляции между уровнем TGF- β и фертильностью не отмечено [113], но исследования СП фертильных мужчин продемонстрировали наличие заметных различий между индивидами в отношении уровней TGF- β [179], при этом колебания уровней различных типов TGF- β наблюдались с течением времени и у отдельных индивидов [181].

В отличие от TGF- β сыворотки крови, присутствующего только в латентной форме, около 25% TGF- β СП представлено активной формой фактора [156]. Исследование TGF- β в полости матки мышей после инсеминации показало, что около 70% молекул фактора представлены в активной форме, что позволяет предположить наличие выраженной активации TGF- β семенных пузырьков при эякуляции или после его попадания в половые пути самки [198]. Кислая среда женского влагалища (рН около 5,0), возможно способна индуцировать частичную

активацию TGF- β наряду с такими ферментами СП, как плазмин, субтилизин-подобные эндопротеазы, а также тканевой и урокиназный активаторы плазминогена; активаторы, такие, как плазмин, тромбоспондин-1 или интегрин $\alpha\beta 6$, могут присутствовать и в женских репродуктивных органах [39; 156; 162].

TGF- β , видимо, является основным стимулятором посткоитального воспалительного ответа, инициирует процесс иммунной толерантности к спермальным антигенам, играет важную роль в подготовке иммунной системы женщины к имплантации, поскольку ряд антигенов, как было указано выше, экспрессируются и в сперме, и у эмбриона. Эксперименты на грызунах позволяют предположить, что СП оказывает существенное влияние на имплантацию через влияние на эпителиальные клетки эндометрия. Индуцированная TGF- β экспрессия провоспалительных цитокинов и хемокинов эпителиальными клетками репродуктивной системы способна поддерживать обеспечивающие успех имплантации процессы клеточного роста и ангиогенеза. В сочетании с CXCL8 (интерлейкин-8, IL-8) TGF- β стимулирует высвобождение провоспалительных цитокинов, включая гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IL-1 β , IL-6 и лейкемия-ингибирующий фактор (LIF) [198; 74; 179; 32].

Иным возможным путем индукции иммунной толерантности в материнском организме является активность TGF- β как индуктора дифференцировки регуляторных Т-клеток (Трег) [156], что может ограничить способность женского организма к аллогенному иммунному ответу, способствуя развитию толерантности к отцовским антигенам и предотвращая отторжение имплантирующегося эмбриона [13].

Еще одним важным иммуномодулирующим фактором СП является простагландин E (PGE), влияющий на многочисленные аспекты функции иммунной системы [149]. Содержание PGE в СП на несколько порядков превосходит таковое в плазме крови, хотя различия уровня PGE в СП характеризуются выраженными

различиями между индивидами. PGE подавляет активность макрофагов и нейтрофилов, а также цитотоксическую активность Т-лимфоцитов и NK-лимфоцитов [67; 187; 155; 156; 131; 51]. PGE повышает экспрессию медиатора воспаления COX 2, фактора роста фибробластов-2 и сосудисто-эндотелиального фактора роста, простагландиновых рецепторов серии E 2 и 4, рецептора эпидермального фактора роста, а также активность сигнальных путей ERK1/2 [23; 130]. Воздействие PGE ведет к повышению выработки IL-10 и снижению продукции IL-12, что рассматривается как элемент сдвига ответа Т-лимфоцитов от парадигмы Th1 с доминированием клеточного иммунитета к парадигме Th2 с доминированием гуморального иммунитета [94]. Стимуляция эксплантов шейки матки PGE выявила индукцию экспрессии CXCL8 и подавление экспрессии обладающего противовоспалительными свойствами фермента антилейкопротеиназы [50].

Как и TGF- β , PGE индуцирует регуляторный фенотип в наивных CD4⁺ CD25⁻ Т-лимфоцитах, способствует ингибирующей функции Treg *in vitro* и индуцирует экспрессию Foxp3 [21].

СП в большом количестве содержит многочисленные провоспалительные цитокины и хемокины, которые способны оказывать влияние на фертильность женщины через рекрутирование и активацию иммунных клеток в тканях репродуктивных органов, а также стимуляцию процессов клеточного роста и ангиогенеза [144]. В частности, СП содержит высокие уровни IL-7, гематопоетического фактора роста, способствующего пролиферации лимфоидных предшественников, созреванию В-лимфоцитов, а также поддержанию функционирования Т- и NK-лимфоцитов [65], а также хемокинов SDF-1, MCP-1 и CXCL8, участвующих в рекрутировании лейкоцитов в область инсеминации.

Присутствующий в СП провоспалительный цитокин IL-15, медиатор клеточной активации, пролиферации и дифференцировки, активируется интерфероном- γ и способствует пролиферации NK-лимфоцитов и активации

сигналов Т-лимфоцитов, поддерживающих антигенспецифическую память Т-лимфоцитов в отсутствие антигена [200; 120]. В сочетании с TGF- β IL-15 участвует в сдвиге иммунного ответа от Th1 к Th2, индуцируя дифференцировку Трег [154; 155].

Недавнее исследование эндометрия самок мышей после инсеминации выявило наличие миграции нейтрофилов в эндометрий, сопровождающейся повышением экспрессии интерлейкина IL-17A. Было показано, что важным источником IL-17A являются $\gamma\delta$ Т-лимфоциты и что СП способна индуцировать секрецию IL-17A последними. Блокировка IL-17A снижает уровень инфильтрации матки нейтрофилами и предотвращает миграцию нейтрофилов в эпителий матки через посредство снижения экспрессии хемокинов CXCL1, CXCL2 и CXCL5. Сигнальный путь $\gamma\delta$ T/IL-17 может явиться еще одним механизмом, с помощью которого СП оказывает влияние на воспалительные процессы в матке, регулируя экспрессию различных хемокинов и цитокинов [189].

При всей популярности мышей как модели в репродуктивной иммунологии следует отметить, что межвидовые различия в отношении молекулярных факторов СП, способствующих имплантации и прогрессированию ранней беременности, представляются весьма вероятными [41]. Различия профиля СП между индивидуумами, а также во времени у одного индивидуума, могут также приводить к разнообразным влияниям на репродуктивную систему женщины и различным результатам в отношении репродуктивного успеха.

1.4. Семенная плазма и регуляторные Т-клетки

Одним из важных индуцируемых СП сигнальных путей является активация и экспансия регуляторных Т-лимфоцитов CD4+CD25+FoxP3+CD127^{low}, которые относятся к небольшой субпопуляции CD4+ Т-клеток, являющихся супрессорами

пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и выработки последними цитокинов. Трег также угнетают выработку антител В-лимфоцитами, цитотоксическую активность NK-лимфоцитов и процессы созревания дендритных клеток [14; 167; 7]. Трег принадлежит критическая роль в поддержании аутоотолерантности и иммунного гомеостаза [164; 3; 153]. Периовуляторное повышение уровня эстрадиола в организме женщины ассоциируется с ростом количества Трег в циркулирующей крови; СП осуществляет прайминговую реакцию в отношении Трег перед контактом последних с эмбриональными антигенами, тем самым полностью реализуя супрессивную функцию Трег [158].

В эксперименте на мышах было показано, что в ответ на воздействие СП при коитусе через несколько дней наблюдается накопление Трег в обеспечивающих лимфоотток из матки парааортальных лимфоузлах, что повышает количество доступных для рекрутирования в матку Трег; подобной реакции при спаривании с самцами, у которых ранее были удалены семенные пузырьки, отмечено не было [72]. Более того, СП участвует в регуляции маточной популяции Трег: индуцированное СП повышение экспрессии хемокина Трег CCL19 в железистых клетках эндометрия способствует миграции Трег из циркулирующей крови в эндометрий [154; 184; 72].

1.5. Потенциальные неблагоприятные эффекты семенной плазмы

Согласно принятой в настоящее время гипотезе в норме содержащиеся в СП иммуномодулирующие и провоспалительные факторы, а также факторы роста оказывают положительное влияние на репродуктивную систему женщины, индуцируя иммунную толерантность организма и способствуя успешному развитию ранней беременности. Нельзя исключить, что вышеуказанные иммуномодулирующие и провоспалительные эффекты могут способствовать прогрессированию инфекций

половых путей, способных привести к неудаче имплантации или потере беременности. С другой стороны, изменения в составе СП при наличии определенных патологических состояний со стороны мужчины, включая инфекции половых путей, способны оказать негативное влияние на осуществление репродуктивной функции женщины, поскольку СП не сможет осуществить свои предполагаемые иммуномодулирующие и провоспалительные эффекты в нужном объеме.

В некоторых случаях СП может оказаться лишенной некоторых описанных выше молекул. Организм женщины вследствие генетических аномалий или инфекций половых путей также может не обладать рецепторами или ферментами, участвующими в реализации сигнальных путей вышеупомянутых иммунорегуляторных факторов СП. В отсутствие индукции иммунной толерантности в половых путях женщины может иметь место синтез антиспермальных или антифосфолипидных антител, а также реализация Т-клеточного иммунного ответа в отношении эмбриона, приводящая к потере беременности [99; 151].

TGF- β и PGE способны индуцировать толерантность или иммуносупрессию со стороны CD8⁺ Т-лимфоцитов, обеспечивающих антигенспецифическую иммунную защиту половых путей женщины от инфекций [146], а также мононуклеарных клеток периферической крови и макрофагов, тем самым нарушая способность иммунной системы противостоять возможной инфекции. Вирусное и бактериальное инфицирование половых путей может ассоциироваться с бесплодием и невынашиванием беременности.

Воспалительные явления половых путей являются фактором риска передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) вследствие рекрутирования в слизистую оболочку половых путей являющихся для ВИЧ мишенями лимфоцитов и активации последних, что делает их более подверженными инфицированию и способствует в

последующем более активной репликации ВИЧ [123]. Как было описано выше, TGF- β и PGE активно участвуют в процессах рекрутирования и регуляции активности лейкоцитов в слизистых оболочках репродуктивных органов женщины. Таким образом, индуцированные СП подавление иммунной активности Т-лимфоцитов и провоспалительный ответ могут способствовать передаче ВИЧ инфекции половым путем [55; 152].

К числу способных оказать негативное влияние на фертильность цитокинов СП также могут принадлежать интерферон- γ и CXCL8 (IL-8), уровни которых повышены в СП мужчин в субфертильных парах и не коррелируют с нарушениями параметров спермограммы [9; 159; 178; 182], что может свидетельствовать о наличии латентных воспалительных процессов в организме мужчин бесплодных супружеских пар. Уровень CXCL8 в семенной плазме может превышать таковой в сыворотке крови в 30 раз [100]. Следует отметить, что CXCL8 семенной плазмы также предлагается в качестве наиболее достоверного прогностического биомаркера простатита [58; 114].

Содержание еще одного провоспалительного цитокина, IL-6, в семенной плазме инфертильных мужчин превышает таковое у фертильных пациентов и характеризуется негативной корреляцией с уровнем малондиальдегида, маркера оксидативного стресса, в сперме, что позволяет предположить наличие у IL-6 роли в запуске процесса перекисного окисления липидов [34]. IL-6 снижает подвижность сперматозоидов *in vitro*, что может быть обусловлено избыточной продукцией оксида азота (II) [105], а также угнетает акросомальную реакцию сперматозоидов [106].

Значимые уровни IL-11, принадлежащего к семейству цитокинов IL-6, были выявлены в СП бесплодных мужчин с инфекциями половых органов [121]. Тем не менее, члены данного семейства, к которому также принадлежит лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), характеризуются наличием многих плейотропных и

дублирующихся функций [79]. Недавнее исследование выявило высокие уровни IL-11 в группе мужчин с хорошим потенциалом к оплодотворению ооцита при ЭКО, что позволяет предположить наличие у IL-11 определенной роли в обеспечении взаимодействия сперматозоида и ооцита [176].

Последний пример подчеркивает возможный двойственный характер функций многих из вышеперечисленных цитокинов в отношении обеспечения процессов репродукции человека и вероятную роль реципрокных взаимодействий иммунных, окислительных и воспалительных медиаторов как определяющих факторов нарушения биологической функции сперматозоидов, приводящих к бесплодию [64].

Можно заключить, что к настоящему времени накоплено достаточно данных, позволяющих поддержать гипотезу о наличии иммунорегуляторных взаимодействий между СП и репродуктивной системой женщины, вследствие чего представляется целесообразным рассмотреть вопрос о возможности использования данных физиологических процессов с целью улучшения параметров имплантации и прогрессирования беременности в циклах ВРТ.

1.6. Семенная плазма и современная клиническая практика

В настоящее время существенно возросла необходимость внедрения новых методов диагностики, мониторинга, лечения и прогноза исходов процедуры ВРТ с целью улучшения результативности лечения бесплодия и дальнейшего совершенствования методов. Применявшиеся многочисленные терапевтические подходы, включая системное применение ацетилсалициловой кислоты, низкомолекулярных гепаринов или препаратов иммуноглобулина, к настоящему времени не позволили повысить частоту наступления беременности в программах ВРТ в целом, что может быть обусловлено отсутствием четких патофизиологических

концепций их применения и не исключает возможной целесообразности применения данных методов при наличии установленных показаний в более узких группах пациенток. Повышение результативности ВРТ невозможно без глубокого изучения физиологических механизмов регуляции имплантации [63]. Исследование физиологических процессов имплантации не может ограничиваться эндометрием, ставшим объектом пристального исследования ученых в отношении прецизионной молекулярной диагностики рецептивности эндометрия [185; 126], но также должно осветить роль СП в имплантации человека [2].

Учитывая представленные в настоящем обзоре данные, позволяющие предположить наличие важной роли элементов СП в индукции способствующих оплодотворению и последующей имплантации иммунных процессов материнского организма, достигнутые успехи в применении ВРТ представляются труднообъяснимыми, поскольку как при ЭКО, так и при искусственной инсеминации клеточная фракция спермы, последующим применением, освобождается от СП. Очевидно, что присутствие СП не является необходимым условием последующего успешного оплодотворения и имплантации эмбриона, хотя отсутствие и может ассоциироваться с повышением частоты неудач имплантации и снижением качества эмбрионов [173].

Тем не менее, наличие или отсутствие контакта СП с половыми путями женщины, вероятно, влияет на дальнейшее течение беременности и последующее здоровье плода. Ряд исследований позволил предположить, что применение ВРТ может привести к рождению детей с повышенным риском развития церебрального паралича [104], повышению риска преждевременных родов [143; 203], рождению детей с низкой и очень низкой массой тела [172], повышению частоты осложнений в родах [136] и пороков развития плода [77]. Данный вопрос остается противоречивым, поскольку дальнейшие исследования не позволили выявить

ассоциации между применением ВРТ и негативными последствиями для здоровья детей [117; 26].

Возможным механизмом развития нарушений после применения ВРТ являются эпигенетические изменения в системе «плацента–плод», развивающиеся вследствие вмешательства в условия зачатия [194]. Влияние предполагаемых нарушений может не ограничиваться периодом ранней беременности, но также привести к воздействию на дальнейшее развитие плода и здоровье ребенка. Известно, что внутриутробная среда является важным фактором программирования реагирования взрослых индивидуумов на стрессовые воздействия и трудности, равно как и на риск заболеваемости в дальнейшем [70]. Период зачатия все чаще рассматривается как наиболее важный в отношении импринтинга более поздних явлений, при этом факторы здоровья и образа жизни матери и отца, существовавшие даже до периода зачатия, могут оказывать влияние через посредство гамет [107]. Ряд исследований позволяет предположить, что изменение условий зачатия способно индуцировать адаптационные процессы, защищающие эмбрион от прямых негативных воздействий, но влекущие за собой риск развития последующих метаболических нарушений [68]. При исследовании состояния здоровья отцов такие факторы, как курение, возраст, воздействие неблагоприятных факторов внешней среды и ожирение, ассоциировались с последующей повышенной заболеваемостью среди потомства, при этом наряду с эпигенетическими механизмами передачи предрасположенности к заболеваниям, включающими некодирующую РНК [190; 57], в качестве возможного фактора, влияющего в период оплодотворения на среду зачатия эмбриона и впоследствии на развитие плода и состояние здоровья потомства, рассматривается семенная плазма [107].

К настоящему времени воздействие СП ассоциируется со снижением частоты развития ряда патологических состояний у беременных и улучшением параметров роста и развития плода [161; 159]. Если описанные на мышинной модели прайминг

иммунной системы и стимуляция роста и развития плаценты в присутствии СП характерны и для человека, то отсутствие контакта с СП способно привести к задержке внутриутробного развития плода, преэклампсии и преждевременным родам, наблюдаемым после ВРТ [30; 47]. Снижение уровня и/или нарушение функции Трег-клеток описано у пациенток с преэклампсией, невынашиванием и первичным бесплодием неясного генеза [171; 16; 73; 84; 150]. Метаболические и сердечно-сосудистые нарушения, приводящие к ожирению и артериальной гипертензии среди детей, рожденных после ВРТ [30; 78; 177], возможно, программируются в период зачатия и имплантации в неестественных для матки условиях, при этом эксперименты на мышах позволяют предположить возможность коррекции с помощью аппликации СП [32].

Любопытно, что длительный контакт организма женщин с СП партнера ассоциируется со снижением риска развития преэклампсии [22; 97]; у родившихся от отцов с нарушениями параметров СП мальчиков наблюдается повышение частоты ожирения и метаболического синдрома [32].

Вышеперечисленные исследования фиксируют наличие важной роли СП в подготовке репродуктивной системы женщины к беременности, в особенности через средство регулирования иммунного ответа матери в отношении толерантности к отцовским антигенам. Изучение с фундаментальной точки зрения роли СП в зачатии, в возникновении осложнений беременности и перинатальной заболеваемости должно стать предметом дальнейших исследований с акцентом на исход беременности и здоровье потомства. К настоящему времени показано, что СП является не только транспортной средой для сперматозоидов, но также выступает в роли важного фактора, регулирующего микросреду репродуктивной системы женщины, предоставляя определенную поддержку имплантирующемуся эмбриону и способствуя дальнейшему нормальному развитию потомства [31].

Оценка контакта женских половых путей с СП как возможного основополагающего фактора успеха ВРТ привела к неоднократным попыткам зарубежных специалистов использовать введение СП в половые пути пациенток с целью повышения эффективности лечения бесплодия. Еще в 1986 г. было установлено, что показатели перинатальной смертности после ЭКО или переноса гамет в маточную трубу снижаются при условии контакта матки с СП в период трансфера эмбрионов или гамет [25]. Впоследствии было отмечено, что перинатальная смертность после ВРТ снижается, если супружеская пара не воздерживается от половых контактов до или сразу после процедуры переноса эмбрионов [199]. Тем не менее, полученные к настоящему моменту данные о влиянии аппликации СП в день трансвагинальной пункции яичников на результативность программы ВРТ носят противоречивый характер. Можно привести примеры работ, выявивших как положительный эффект аппликации СП [25; 45; 37], так и отсутствие статистически значимого эффекта введения СП на частоту наступления беременности [62; 201; 203].

В мета-анализе, обобщившем результаты семи рандомизированных контролируемых исследований [46], была проведена оценка влияния контактов с СП на результаты лечения бесплодия путем ВРТ. Мета-анализ выявил статистически значимое повышение частоты наступления клинической беременности на 24% (относительный риск 1,24; 95% доверительный интервал, 1,07–1,43; $P=0,003$, при расчете на протокол) среди пациенток, подвергшихся воздействию СП в день трансвагинальной пункции или переноса эмбриона, по сравнению с пациентками без данной манипуляции. Несмотря на всеяющий оптимизм результат в отношении частоты наступления клинической беременности, частота прогрессирующей беременности и рождения живых детей достоверно не различались между вышеуказанными группами.

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что применение СП в программе ВРТ способствует улучшению имплантационных свойств эндометрия и повышению частоты наступления беременности. В связи с недостаточным количеством исследований и применением различных методик использования СП авторы обзора указывают на необходимость продолжения проведения РКИ по дополнительному введению СП при лечении бесплодия.

Опубликованный в 2019 году мета-анализ результатов взаимодействия с СП в период времени около ТВП или переноса эмбрионов [166] включил восемь РКИ (2128 пациенток). У рандомизированных в группу контактов с СП пациенток частота наступления клинической беременности была значимо выше по сравнению с контрольной группой (30,0% по сравнению с 25,1%; относительный риск 1,20; 95% доверительный интервал, 1,04–1,39). Значимых различий в отношении частот живорождения, потерь беременности, многоплодия и массы тела при рождении выявлено не было. При анализе подгруппы пациенток с использованием введения СП немедленно после трансвагинальной пункции (четыре РКИ, 780 пациенток), были получены сходные результаты в отношении частоты наступления клинической беременности (46,3% по сравнению с 37,2%; относительный риск 1,23; 95% доверительный интервал, 1,05–1,45).

Введение неразведённой СП или ее компонентов может рассматриваться в качестве простого неинвазивного подхода к повышению частоты имплантации [132]. Тем не менее, дискуссии в отношении возможной роли СП в программах ВРТ продолжаются [20]. Известно, что не имевшие половых контактов самки многих видов животных являются вполне состоятельными реципиентами после переноса эмбрионов. Многие программы ВРТ у человека позволяют достичь высоких показателей оплодотворения, частоты наступления клинической беременности и рождения живых детей без использования какой-либо прайминговой схемы с использованием СП. Bedford [24] заключает, что при вероятном наличии

воздействия СП на фертильность и результаты лечения бесплодия у человека многие экспериментальные и клинические данные показывают, что наличие СП не является необходимым условием как для успешной транспортировки и выживаемости сперматозоидов в половых путях женщины, так и для оплодотворения, имплантации и дальнейшего эмбрионального развития.

Кокрейновский обзор 2018 года, включивший 11 рандомизированных контролируемых исследований (3215 пациенток), отметил низкое качество научных данных и указал, что в настоящее время нельзя выявить различий между циклами с введением СП и стандартным ЭКО в отношении частот живорождения и невынашивания, хотя применение СП может быть ассоциировано с повышением частоты наступления клинической беременности. Авторы отметили целесообразность дальнейших исследований [17].

Общим недостатком вышеперечисленных работ, посвященных исследованию влияния половых контактов и аппликации СП на результативность программы ВРТ, вероятно, являлось отсутствие исследований, в которых были бы представлены данные о цитокиновом профиле СП полового партнера. Важным шагом в изучении влияния отдельных цитокинов СП на успех программы ВРТ стала выполненная в НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова работа [135], основное внимание в которой было уделено возможной роли провоспалительного цитокина IL-18 [122; 148], члена семейства цитокинов IL-1 и известного антагониста функции TGF- β 1, в неудачах имплантации у человека.

Известно, что IL-18 играет важную роль в выработке IFN- γ Т-лимфоцитами и естественными киллерами [53]. Он присутствует в эндометрии человека [208], а также в зоне контакта матери и плода у человека и мышей [197; 35; 139]. Считается, что тщательное регулирование эндометриальной экспрессии IL-18 является важным моментом в обеспечении нормальной имплантации и децидуализации на этапе ранней беременности [108]. Новейшие научные данные указывают на его роль в

ангиогенезе [98]. Избыток IL-18 в полости матки в день ТВП ассоциируется со снижением частоты имплантации [109]. Любопытно, что при исследовании тканей яичка экспрессия мРНК IL-18 была значимо ниже в тканях с нарушением сперматогенеза по сравнению с нормальными тканями, что позволяет предположить наличие определенной роли IL-18 в регулировании процессов сперматогенеза и стероидогенеза [110].

При оценке исходов 71 пары пациентов программы ЭКО было установлено, что применение интравагинальной аппликации СП может оказывать как благоприятное, так и негативное влияние на частоту наступления беременности, что определяется такими параметрами цитокинового статуса СП, как концентрация IL-18, содержание IL-18 и TGF- β 1 во всем объеме СП, полученном при эякуляции, отношением концентраций TGF- β 1 к IL-18 [135].

Частота наступления беременности у женщин, эякулят полового партнера которых содержал относительно низкое количество IL-18 ($\leq 1432,4$ пг), была в 6,7 раз выше по сравнению с группой пациенток, у полового партнера которых отмечалось относительно высокое содержание IL-18 ($> 1432,4$ пг) в семенной плазме, и составила 61,2% и 9,1%, соответственно. Таким образом, целесообразность использования СП с оптимальным профилем цитокинов позволяет персонализировано подходить к назначению аппликации СП партнера в программах ВРТ [135].

В 2018 году той же группой исследователей был изучен эффект сочетания воздействия СП при половом контакте накануне ТВП и интравагинального введения СП сразу после ТВП у 29 пациенток программы ЭКО. Пропорция Трег, рассматривавшаяся в качестве прогностического фактора наступления беременности, характеризовалась положительной корреляцией с концентрацией IL-18 и присутствием этого цитокина в эякуляте ($P < 0,001$ и $< 0,004$, соответственно) и отрицательной корреляцией с соотношением TGF- β 1 и IL-18 ($P < 0,014$). Эти результаты указывают, что неблагоприятный эффект избытка IL-18 в отношении

имплантации может быть обусловлен предотвращением посткоитальной миграции Трег, ассоциированной с TGF- β 1 [134].

Четкой ассоциации между изменением сигнальной активности СП и состоянием здоровья потомства в отдаленной перспективе у человека к настоящему времени не установлено, хотя описанные выше клинические исследования позволяют предположить ее наличие. Можно предположить, что изменения состава СП могут проявляться не только нарушениями фертильности в паре, но и повлиять на внутриутробное развитие плода и дальнейшее состояние здоровья потомства. Поиск возможных ассоциаций требует разработки длительных исследований с высококачественным дизайном и включением больших выборок пациентов, поскольку возможные отдаленные эффекты на состояние здоровья потомства могут оказаться трудно выявляемыми. Необходимо также принимать во внимание предполагаемые нарушения процессов оплодотворения сперматозоидами при ВРТ, в том числе эпигенетические механизмы [19; 87], и отделить их возможные эффекты от влияния факторов СП. Исследования протеомики спермы привели к разработке пригодных к клиническому применению анализов на содержание таких факторов, как TEX101, ESM1 и ACRV1, при этом ведется активная разработка диагностических панелей ДНК, РНК, белков и метаболитов, которые могут позволить улучшить понимание патофизиологических процессов при мужском бесплодии [27; 86].

1.7. Приоритетные направления будущих исследований семенной плазмы

Очевидно, что в отличие от экспериментальных животных, состав СП у человека может варьировать под действием различных эндогенных и экзогенных факторов. Патологические изменения СП могут быть обусловлены заболеваниями

урогенитального тракта, вредными воздействиями окружающей среды, несбалансированным питанием, курением, алкоголем. Наличие уникальной системы быстрого транспорта компонентов СП, путем их облегченной диффузии из лимфатических и венозных сосудов в артериальную систему матки, может приводить к существенным изменениям иммунорегуляторных сигналов, нарушающих взаимодействие эмбриона и эндометрия.

В настоящее время вся полнота влияния СП на фертильность человека остается до конца неизвестной, но данные в пользу влияния СП на иммунные клетки нижних отделов репродуктивной системы женщин представляются весьма достоверными [169]. Можно предположить, что если СП и не является абсолютно необходимой для индукции иммунной толерантности и обеспечения имплантации эмбриона при оптимальном состоянии репродуктивной системы женщин, в случае нарушения иммунорегуляции иммунной толерантности и процессов инвазии трофобласта роль СП в обеспечении рецептивности матки может оказаться критически важной. При этом дисбаланс цитокинового профиля СП могут привести как к нарушению имплантации [134; 135], так и развитию патологических процессов после наступления беременности [133].

В связи с вышеизложенным представляется своевременным и перспективным оценить влияние состава СП на репродуктивный успех и провести исследование эффективности программы ВРТ с учетом особенностей цитокинового профиля СП. Дальнейшего конкретного рассмотрения в ближайшей перспективе потребуют такие вопросы, как: является ли половой контакт более предпочтительным способом доставки СП, чем искусственная аппликация; важен ли источник происхождения СП (партнер или донор) при проведении ВРТ, и если да, то как влияют методы отбора и хранения СП на исход процедуры и беременности в целом; насколько роль СП значима при использовании криоконсервированных эмбрионов по сравнению с переносом эмбрионов в «свежих» циклах. Другой важной областью исследований

должно стать изучение роли семенной плазмы в предотвращении незначительных, но идентифицируемых побочных реакций во время беременности, а также поиска подходов, снижающих процент перинатальной заболеваемости детей, рожденных после ВРТ.

В исследованиях *in vitro* было показано, что компоненты СП обладают иммуносупрессивными свойствами и индуцируют дифференцировку Трег клеток, которые, в свою очередь, обеспечивают толерантность половых путей женщины к отцовским антигенам сперматозоидов и клеток трофобласта. Изучение иммуномодулирующего потенциала СП партнера в сочетании с оценкой состояния Т-регуляторного клеточного звена иммунной системы женщины может позволить прогнозировать эффективность применения программы ВРТ у супружеских пар.

Вышеописанный механизм индукции толерантности должен контролироваться иммунной системой женщины, не допуская ни ослабления локальной иммунной защиты в отношении передающихся половых путем патогенов, ни развития клеточного и гуморального иммунного ответа в отношении антигенов сперматозоидов и трофобласта, ведущего к ненаступлению или прерыванию беременности.

Эффекты СП в отношении процессов зачатия, раннего эмбрионального развития, имплантации и внутриутробного развития плода, влияющие на фертильность в паре и в конечном итоге на состояние здоровья потомства, должны стать предметом активного изучения со стороны исследователей. Можно не сомневаться, что наряду с уже известными сигнальными факторами СП в будущем могут быть идентифицированы иные факторы, также оказывающие значимое воздействие на сигнальные процессы в репродуктивной системе женщины.

Невзирая на достигнутые к настоящему времени успехи медицинской науки в оценке вклада СП в репродуктивный успех, количество «белых пятен» остается неисчислимым. Наряду с необходимостью оценки отдаленных последствий наличия

или отсутствия СП при оплодотворении и роли состава таковой необходимо принимать во внимание существенные различия профилей СП как между индивидуумами, так и у одного индивидуума с течением времени, значимость и роль которых до настоящего времени остаются неизученными, а также возможные эффекты воспалительных заболеваний мужских половых путей. Можно лишь предполагать, являются ли вышеуказанные изменения значимыми факторами в отношении потенциала СП к индукции благоприятных иммунных реакций материнского организма, а также влияют ли они на фертильность мужчин, течение беременности и параметры здоровья потомства в дальнейшем.

Представляется, что исследование сигнальных процессов СП способно в итоге привести к повышению частоты наступления беременности и частоты рождения живых детей после программы ВРТ, а также способствовать разработке новых подходов к преодолению бесплодия и терапии патологических состояний при беременности.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Отбор пациентов для данного исследования проводился в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» (руководитель отделения д.м.н., профессор Калинина Е.А.) среди супружеских пар, обратившихся по поводу лечения бесплодия с использованием методов ВРТ. Анализ и оценка показателей крови пациенток и семенной плазмы партнеров осуществлялись в лаборатории клинической иммунологии (руководитель лаборатории к.м.н. Кречетова Л.В.).

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». Все пациенты подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

В соответствии с поставленными задачами в исследование были включены 60 супружеских пар (рисунок 1).

В **первую группу** (33 супружеские пары) вошли пациенты с регулярными половыми контактами без контрацепции во время лечения вплоть до периода за 3-5 дней до трансвагинальной пункции фолликулов:

подгруппа А: беременность не наступила (n=25);

подгруппа Б: беременность наступила (n=8).

Вторую группу (27 супружеских пар) составили пациенты без регулярных половых контактов с момента начала цикла овариальной стимуляции:

подгруппа А: беременность не наступила (n=18);

подгруппа Б: беременность наступила (n=9).

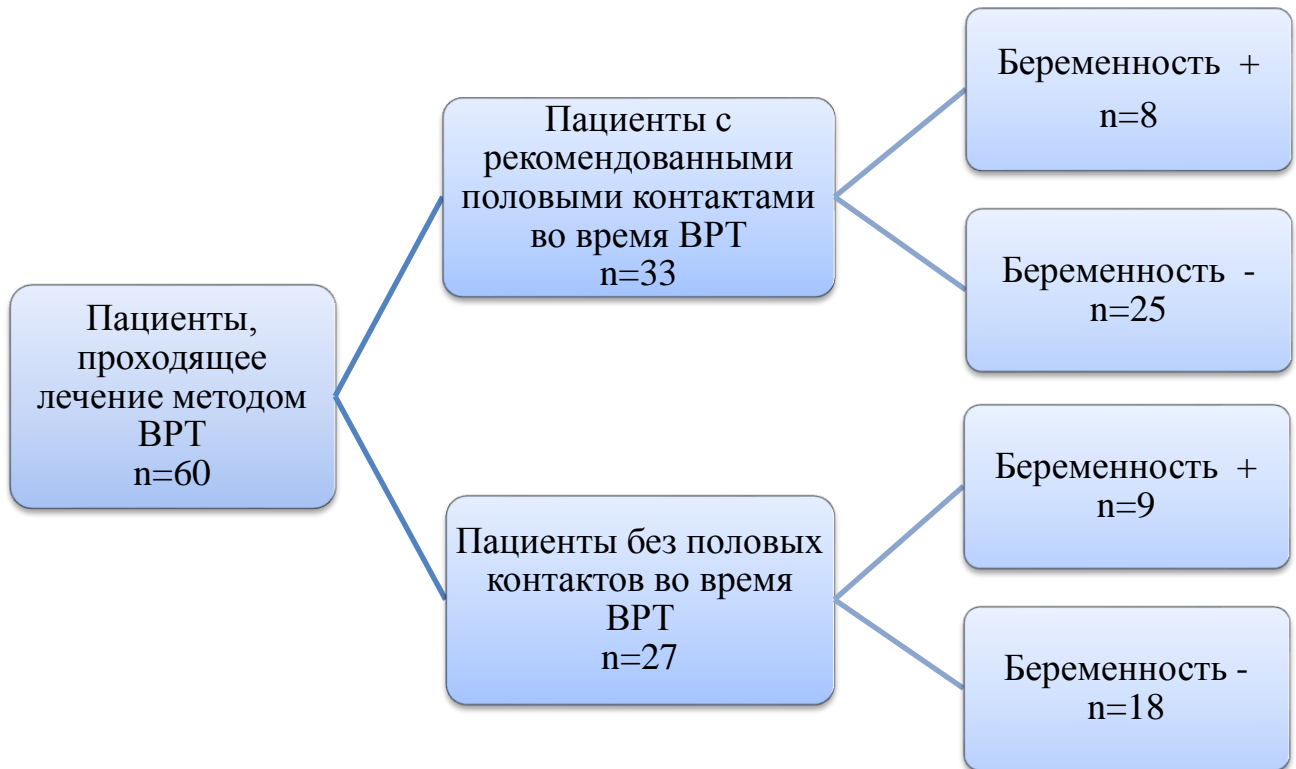


Рисунок 1. Дизайн исследования

Группы наблюдения составили пациенты, обратившиеся для проведения программы ВРТ, прошедшие обследование и соответствующие критериям включения/исключения.

Критерии включения:

- Возраст пациенток 20-38 лет, возраст супруга 20-50 лет;
- Трубно-перитонеальный фактор бесплодия;
- Регулярный менструальный цикл;
- Сохраненный овариальный резерв;
- Регулярная половая жизнь без контрацепции;
- Не более двух неудачных попыток ВРТ;
- Селективный перенос 1 эмбриона;
- Нормальное анатомическое строение матки;
- Нормальный кариотип;

- Отсутствие выраженной патозооспермии;
- Отсутствие урогенитальных инфекций и хронических воспалительных заболеваний органов малого таза;
- Отсутствие антиспермальных антител (MAR-тест < 10%);
- Отсутствие выраженной экстрагенитальной патологии;
- Отсутствие приема лекарственных средств со спермотоксичным действием;
- Наличие подписанного информированного согласия супругов на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- Пациенты с противопоказаниями для проведения ВРТ, в том числе с экстрагенитальной патологией, онкологическими заболеваниями;
- Эндокринное, иммунологическое, маточное бесплодие;
- Наличие подтвержденного хронического эндометрита по данным морфологического исследования;
- Наличие генитального эндометриоза 3-4 степени; миомы матки больших размеров или деформирующей полость матки; опухолевых и опухолевидных образований яичников, СПКЯ;
- Пороки развития половых органов;
- Выраженная патозооспермия: олигозооспермия ($< 5 \times 10^6$ млн/мл), тератозооспермия ($< 1\%$ морфологически нормальных сперматозоидов), некрозооспермия, PESA для получения сперматозоидов, использование донорской спермы необходимость выполнения TESA, MESA.

Критерии исключения:

- Осложнения, вызванные лечением: воспалительные явления, синдром гиперстимуляции яичников, внутрибрюшное кровотечение;

- Использование донорской яйцеклетки или применение суррогатного материнства.

2.2. Методы исследования

Все пациенты на этапе подготовки к программе ВРТ прошли стандартные методы обследования в соответствии с приказом МЗ РФ №107н от 30.08.2012 «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»:

- 1.1 Рентгеновские снимки матки и труб (по показаниям);
- 1.2 Гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ТТГ, Т4св, АТ-ТПО, ДГА-С, пролактин, СТГ, кортизол, тестостерон, АМГ;
- 1.3 Исследование на инфекции методом ПЦР: хламидии, микопlasма, уреаплазма;
- 1.4 Анализ крови на ВПГ, ЦМВ, токсоплазмоз, краснуху;
- 1.5 Мазок на микрофлору;
- 1.6 Бакпосев на флору из влагалища и шейки матки;
- 1.7 Кольпоскопия, мазок на онкоцитологию;
- 1.8 УЗИ органов малого таза на 5-8 день цикла;
- 1.9 УЗИ щитовидной железы;
- 1.10 Маммография или УЗИ молочных желез;
- 1.11 Анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, anti-HCV, реакция Вассермана (оба супруга);
- 1.12 Группа и резус-фактор крови;
- 1.13 Клинический анализ крови;
- 1.14 Биохимический анализ крови;
- 1.15 Гемостазиограмма;

- 1.16 Общий анализ мочи;
- 1.17 ЭКГ;
- 1.18 Флюорография;
- 1.19 Консультация врача-терапевта;
- 1.20 Консультация генетика (по показаниям);
- 1.21 Консультация андролога, спермограмма мужа.

2.2.1. Общеклинические методы обследования

Сбор анамнеза проводился с учетом паспортных данных, профессиональных и бытовых вредностей, вредных привычек, особенностей питания и физической активности, семейного и соматического анамнеза, перенесенных заболеваний.

Тщательному анализу были подвергнуты характер становления менструальной функции (возраст менархе, регулярность и продолжительность менструального цикла, длительность и характер менструального кровотечения, нарушения цикла), половая функция (начало половой жизни, количество половых партнеров, длительность половых отношений с настоящим партнером, регулярность половых контактов, использование методов контрацепции в анамнезе), репродуктивная функция (количество беременностей, их исходы и осложнения). Уточнялся гинекологический анамнез (наличие гинекологических заболеваний, локализация процесса, методы лечения, в том числе хирургические вмешательства и их объем), наличие или отсутствие в анамнезе венерических заболеваний.

Особое внимание заслуживали данные о продолжительности и причинах бесплодия, методах лечения, ранее проводившихся программах ВРТ.

Вычисляли индекс массы тела пациенток, путем уточнения данных о росте и весе ($\text{ИМТ} = \text{масса тела} / \text{рост}^2$ (кг/м²)).

Гинекологическое исследование включало осмотр наружных половых органов, обследование влагалища и шейки матки с помощью зеркал, влагалищно-абдоминального и ректо-абдоминального исследований, в ходе которых оценивали размер, положение, подвижность, болезненность тела матки, состояние придатков и характер выделений из половых путей.

В индивидуальную карту пациентки заносились все полученные данные.

2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

На этапе предварительного обследования на 5-8 день менструального цикла всем женщинам было проведено ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза для оценки размеров тела матки и структуры миометрия, толщины и структуры эндометрия, размеров и объема яичников, состояния фолликулярного аппарата, наличия или отсутствия объемной патологии в малом тазу. На старте цикла овариальной стимуляции на 2-3 день менструального цикла всем пациенткам проводилось УЗИ органов малого таза с целью определения возможного наличия противопоказаний к проведению программы ВРТ. Далее УЗИ выполнялось по мере необходимости для контроля фолликулогенеза и состояния эндометрия, коррекции доз гонадотропинов и определения времени назначения ТВП. Исследование проводилось на ультразвуковом аппарате компании «ВК Medical» (Дания) 54 трансвагинальным датчиком с частотой 3,5-7,5 МГц.

2.2.3. Гормональное обследование

Перед началом программы ВРТ оценивался гормональный профиль женщин в период ранней фолликулиновой фазы (2-3 день менструального цикла).

Нормативные показатели содержания гормонов в сыворотке крови по фазам менструального цикла представлены в таблице 1.

Таблица 1

Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин фертильного возраста

Показатели	Референсные значения
ФСГ, МЕ/л	2,0 - 10,0
ЛГ, МЕ/л	2,3 – 15,0
АМГ, нг/мл	1,0 -10,6
Эстрадиол, пмоль/л	150,0 – 450,0
Прогестерон, нмоль/л (лютеиновая фаза цикла)	16,0 – 95,0
Пролактин, мМЕ/л	120,0 – 500,0
Кортизол, нмоль/л	200,0 - 550,0
Тестостерон, нмоль/л	0,5 - 2,5
ТТГ, мМЕ/л	0,4 - 3,5
Т4, пмоль/л	10,0 – 25,0
ДГЭА-С, мкмоль/сут	0,9 – 11,7
17-ОП, нмоль/л	0,3 – 3,0

2.2.4. Обследование партнера

В ходе сбора информации о половом партнере уточняли паспортные данные, бытовые и профессиональные вредности, вредные привычки, особенности питания и физической активности, соматического здоровья, перенесенных заболеваний.

Ряд вопросов были адресованы половой функции (старт половой жизни, количество половых партнеров, длительность сексуальных отношений с текущим партнером, регулярность половых актов, использование контрацепции в анамнезе) и репродуктивной функции (наличие детей).

Росто-весовые параметры способствовали вычислению индекса массы тела (ИМТ = масса тела/рост² (кг/м²)).

Параметры спермограммы оценивались в ходе исследования в рамках подготовки к программе ВРТ. Перед проведением исследования пациентам были даны необходимые рекомендации. В результате мастурбации материал собирался в стерильный контейнер.

Эталоном принимали параметры спермограммы ВОЗ 2010 года (табл.2).

Таблица 2

Нормативы параметров спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
РН	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	≥ 15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	≥ 39 млн
Время разжижения	10-60 минут
Подвижность сперматозоидов Общая подвижность сперматозоидов (А+В)	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением (А)	$\geq 32\%$
Морфология	$\geq 4\%$ нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	$\geq 58\%$ живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	< 1 млн/мл
Агглютинация	Отсутствует
Эритроциты	Отсутствуют
MAR-тест IgG	0-50 %

В день ТВП повторно выполнялся анализ образца спермы, которую использовали для оплодотворения и последующего определения цитокинового состава СП. Эякулят супруга оценивался эмбриологами для решения вопроса о методе оплодотворения (стандартное ЭКО или ИКСИ), далее отбирали необходимое для оплодотворения количество спермы, оставшийся материал с целью выделения СП подвергали центрифугированию, полученный супернатант замораживали для дальнейшего исследования.

2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и трансвагинальная пункция фолликулов

Старт овариальной стимуляции приходился на 2-3 день менструации согласно протоколу с использованием препаратов антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) или комбинированного препарата с лютеинизирующим гормоном (ЛГ). Начальная доза рассчитывалась по индивидуальным параметрам овариального резерва. Далее осуществлялся мониторинг фолликулогенеза и коррекция дозы препаратов.

Все супружеские пары, проходящие лечение, были разделены на две группы. Первой группе рекомендовали половые контакты вплоть до 3-5 дня до ТВП, второй группе наоборот половое воздержание на все время лечения (рис. 2).

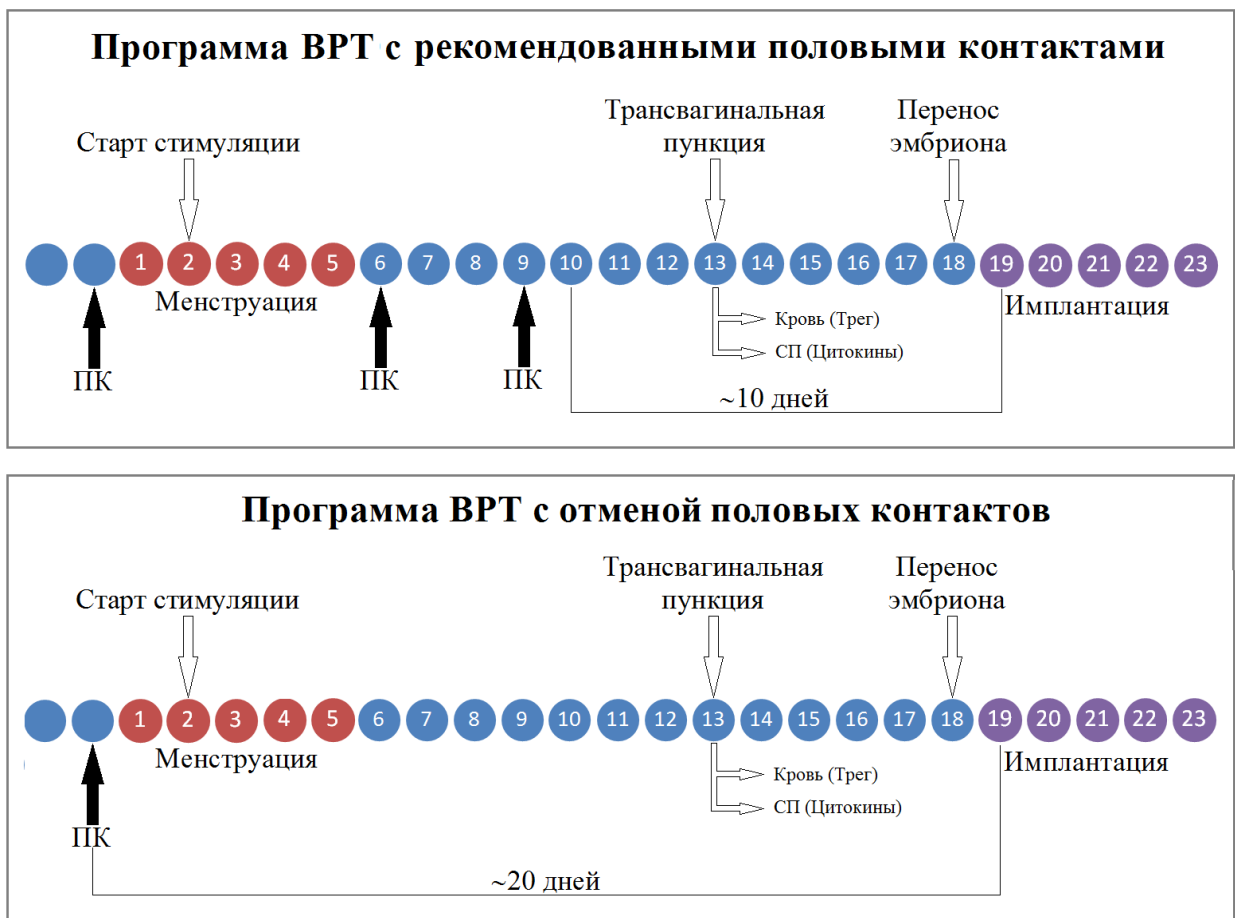


Рисунок 2. Схематическое изображение программы ВРТ в двух группах сравнения

Условные обозначения: ПК – половой контакт; СП – семенная плазма; Трег – регуляторные Т клетки. Цифрами обозначены дни менструального цикла

С целью предотвращения преждевременного пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) по достижении диаметра фолликулов 14 мм назначался препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сутки подкожно. Для финального созревания ооцитов по достижении диаметра фолликулов ≥ 17 мм использовался триггер овуляции. Триггером овуляции выступал препарат человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) в дозе 8000-10000 МЕ или агонист гонадотропина релизинг гормона (а-ГнРГ) в дозе 0,2 мг при риске развития синдрома гиперстимуляции яичников.

В условиях операционной под внутривенной анестезией и ультразвуковым контролем через 35 часов после введения триггера овуляции осуществлялась трансвагинальная пункция фолликулов с последующей оценкой качества ооцитов и оплодотворением спермой партнера.

Выбор метода оплодотворения ЭКО или интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит (ИКСИ) производился исходя из эякулята, полученного в день трансвагинальной пункции, на усмотрение эмбриолога. ИКСИ применяли при наличии у супруга субфертильной спермы, малом числе полученных ооцитов (< 4) и отсутствии или низком проценте оплодотворения (менее 20%) в предыдущих программах ВРТ.

На следующие сутки после ТПВ оценивали оплодотворение, состоявшимся считали наличие в цитоплазме двух пронуклеусов.

На пятые сутки культивирования проводили морфологическую оценку эмбрионов с использованием классификации Gardner.

Степень зрелости бластоцисты классифицировали по следующим критериям [66]:

1. полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона, что соответствует ранней бластоцисте;
2. полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;
3. полная бластоциста - полость бластоцисты занимает объем эмбриона;
4. расширенная бластоциста - полость становится больше и начинает истончаться блестящая оболочка (ZP);
5. проникновение трофэктодермы сквозь zona pellucida;
6. вылупившаяся бластоциста, покидающая zona pellucida.

Внутриклеточную массу классифицировали следующим образом:

- A. плотно упакованная с большим количеством клеток;
- B. более свободная группировка среднего количества клеток;
- C. незначительное количество клеток.

Трофэктодермальный слой:

- A. много клеток, формирующих трофэктодерму;
- B. немного клеток;
- C. незначительное количество больших клеток.

К эмбрионам «отличного» качества относили бластоцисты 4-5 класса с внутриклеточной массой и трофэктодермальным слоем класса А.

2.2.6. Перенос эмбрионов и ведение посттрансферного периода

Имел место селективный перенос 1 эмбриона «отличного» качества в полость матки мягким катетером Wallace (Германия) или СооК (Австралия) на 5-е сутки после ТПВ под ультразвуковым контролем. Оставшиеся эмбрионы должного качества витрифицировали.

Поддержка лютеиновой фазы цикла осуществлялась препаратами прогестерона (микронизированный прогестерон 300 мг/сутки интравагинально или дидрогестерон 30 мг/сутки per os), начиная со дня пункции фолликулов и последующим повышением дозы после переноса эмбриона (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки интравагинально или дидрогестерон 60 мг/сутки per os).

Для диагностики беременности пациентки сдавали кровь на содержание бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) на 14 день после переноса эмбриона в полость матки. Уровень β -ХГЧ более 20 МЕ/л свидетельствовал о положительном результате. На 21 день после переноса эмбриона выполнялось УЗИ для подтверждения клинической маточной беременности, путем визуализации плодного яйца в полости матки.

2.3. Специальные методы исследования

2.3.1. Оценка иммунного статуса

В день проведения ТВП производили забор крови у пациентки с целью определения субпопуляционного состава лимфоцитов (Т-лимфоцитов), пробирку с кровью передавали в лабораторию клинической иммунологии (заведующий лабораторией - к.м.н. Л.В. Кречетова).

Забор крови осуществляли натошак из локтевой вены в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл.

Для выявления регуляторных Т-клеток использовали моноклональные антитела к поверхностным лимфоцитарным антигенам CD4, меченные перидин-хлорофилл протеином (Per-CP), CD25, меченные флуоресцеин-изотиоцианатом, и CD127,

меченные фикоэритрином (Beckton Dickinson, США). Моноклональные антитела добавляли к цельной крови согласно требованиям производителя, вортексировали, инкубировали 20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Затем лизировали эритроциты раствором FACS Lysing Solution (Beckton Dickinson, США) в течение 12 минут, пробы пипетировали, центрифугировали в течение 5 min при оборотах 500g, после чего супернатант удаляли и к осадку добавляли 150 мкл фиксирующего раствора BD CellFIX (Beckton Dickinson, США). Анализ клеток проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Beckton Dickinson, США). Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявляли с помощью моноклональных антител к CD45, меченных аллофикоцианином (APC) (Beckton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали по 5 тысяч лимфоцитов.

2.3.2. Оценка цитокинового профиля семенной плазмы

Содержание TGF- β 1 и цитокинов (IFN γ , IL-33, IL-6, IL-8, IL-23, IL-10, TNF α , IL-18, IL-17A, IFN α , IL-12p, MCP1) оценивали в образцах СП, полученных в день ТВП, с помощью специальных наборов для определения концентрации цитокинов – LegendPlex Multi-Analyte Flow Assay Kits [Human Free Active/Total TGF- β 1 Assay и Human Inflammation Panel (13-plex)] в соответствии с инструкциями изготовителя (BioLegend, США).

Образцы СП сначала размораживали, далее при тестировании TGF- β 1 проводили кислотную активацию образцов в соответствии с инструкцией производителя. Для анализа содержания TGF- β 1 и всех остальных цитокинов проводили разведение СП в 1:300 и 1:4, соответственно. Количественные измерения

концентраций цитокинов проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) с использованием программы CellQuest.

Калибровочные кривые для данных цитокинов были получены с использованием стандартных образцов, представленных в наборах. Концентрации цитокинов в каждом образце были вычислены путем обработки данных, полученных с проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Beckton Dickinson, США), с помощью специального программного обеспечения LegendPlex v.8.0., предоставленного фирмой производителем вместе с наборами (BioLegend, США).

2.3.3. Оценка содержания простагландина E₂ в семенной плазме

Содержание простагландина E₂ (PG E₂) оценивали в образцах СП, полученных в день ТВП, при помощи специальных наборов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с инструкцией изготовителя (R&D Systems, Inc., США). Для анализа содержания PGE₂ СП разводили в 40 тыс раз. Количественные измерения концентрации PGE₂ проводили с помощью ИФА ридера модели Infinite F50 производства фирмы TECAN (США) с использованием с помощью специального программного обеспечения Magellan.

2.4. Статистический анализ полученных данных

Для статистической обработки полученных данных использовали пакет прикладных программ MSEXcel и MedCalc и методов непараметрического анализа. Для количественных параметров при нормальном распределении результаты представлялись как среднее \pm стандартное отклонение. Для сравнения параметрических данных использовали t-критерий Стьюдента для 2-х независимых

выборок. С целью оценки межгрупповых различий для качественных данных был использован метод χ^2 . Для оценки достоверности различий в двух выборках между непрерывными (непараметрическими) показателями применяли U-критерий Манна-Уитни.

Для оценки диагностической эффективности определения уровня цитокинов в СП, влияющих на исходы программы ВРТ с рекомендованными половыми контактами, проведен ROC-анализ. Использовались ROC-кривые для определения пороговых значений лабораторных показателей для выявления предикторов. Устанавливалась информативность диагностических критериев - чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической значимости.

Путем корреляционного анализа с использованием параметрического критерия Пирсона и непараметрического критерия Спирмена оценивалась связь между изучаемыми количественными показателями.

С целью построения модели прогнозирования исходов лечения методом ВРТ использовали CART (Classification and Regression Tree) - алгоритм. Построение деревьев классификации является прогнозирование наиболее вероятных значений зависимой переменной (исход лечения) при соответствующих значениях одного или нескольких независимых переменных-предикторов (уровень цитокинов в СП).

Различия между величинами считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клиническая характеристика супружеских пар, включенных в исследование

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования были отобраны 60 супружеских пар, находившихся в отделении вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия для проведения программы ВРТ, в связи с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, и соответствовавших критериям включения/исключения.

Рандомизация осуществлялась с использованием таблицы случайных чисел на две группы: первая - с рекомендованными половыми контактами во время программы ВРТ (n=33) и вторая - с их отсутствием (n=27).

Возраст пациенток достоверно не отличался и находился в пределах 22-38 лет, в первой группе составил в среднем $31,3 \pm 4,1$ лет, во второй группе $32,2 \pm 3,1$ лет ($p=0,323$). При распределении больных по возрастным группам максимальное число пациенток было в возрасте от 30 до 34 лет (табл.3).

Таблица 3

Распределение больных по возрастным группам

Группа исследования	Возраст, лет			Средний возраст, лет (M±m)
	22-29	30-34	35-38	
Первая группа, % (n) n=33	27 (9)	55 (18)	18 (6)	$31,3 \pm 4,1^*$
Вторая группа, % (n) n=27	26 (7)	52 (14)	22 (6)	$32,2 \pm 3,1^*$

Данные приведены как % и абсолютные величины; $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

*Данные представлены как средние \pm стандартное отклонение, $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Средний возраст партнеров пациенток достоверно не различался между группами и составил $32,8 \pm 3,8$ лет для первой группы, $37,2 \pm 7,6$ лет для второй ($p > 0,05$).

Женский тип телосложения с правильным развитием вторичных половых признаков отмечали у всех участвующих в исследовании женщин. Среднее значение индекса массы тела (ИМТ) пациенток составило $23,0 \pm 3,4$ кг/м² для первой группы, $22,8 \pm 3,4$ кг/м² для второй ($p = 0,44$), что является нормальным значением ИМТ.

Средние значения ИМТ партнеров для первой и второй групп составили $26,2 \pm 4,0$ и $27,9 \pm 4,3$ кг/м², соответственно ($p = 0,09$). В первой группе выявлено 19 мужчин (57,6%) с избыточной массой тела, во второй группе – 18 (66,7%).

Согласно анализу семейного положения, условий жизни, уровня образования, трудовой занятости женщины исследуемых групп статистически не различались. Пациенты разных групп были идентичны по структуре наследственных заболеваний (онкопатология, сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет второго типа).

По частоте встречаемости курения среди женщин ($p = 0,67$) и мужчин ($p = 0,95$) группы сравнения между собой статистически не различались.

Сопутствующие экстрагенитальные заболевания пациенток исследуемых групп распределились следующим образом: детские инфекции (ветряная оспа, корь, краснуха) у 20 (61%) пациенток первой группы и у 17 (63%) второй; заболевания эндокринной системы (скорректированные до начала лечения) у 9 (27,3%) I группы и 7 (25,9%) у II группы. Статистически значимых различий между представленными показателями в группах пациенток выявлено не было (χ^2 -тест, $p > 0,05$).

Сравнительный анализ показателей менструальной функции пациенток продемонстрирован в таблице 4.

У всех пациенток менструальный цикл установился сразу, регулярного характера, с умеренной интенсивностью выделений. Альгодисменореей страдали

15% (5) и 18% (5) женщин первой и второй групп, соответственно. Достоверных различий между группами выявлено не было ($p>0,05$).

Таблица 4

Характеристика менструальной функции включенных в исследование пациенток

Показатель	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Возраст менархе, лет	13,4±1,2	13,3±1,7	0,19
Продолжительность менструального цикла, дни	28,4±2,0	28,4±1,4	0,29
Длительность менструального цикла, дни	4,8±0,9	4,8±0,8	0,46

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, $p>0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Средний возраст начала половой жизни среди женщин I первой группы составил 17,3 лет и 18,1 лет II группы ($p=0,15$). Количество половых партнеров у женщин I первой группы составило 3,6±2,7 и 3,3±2,5 II группы ($p=0,26$). Длительность половых отношений с настоящим партнером среди женщин I первой группы составляла 7,9±3,8 лет и 6,8±4,5 II группы ($p=0,08$), регулярность половых отношений с настоящим партнером 2,3±1,0 и 2,6±1,0 раз в неделю, соответственно ($p=0,11$) (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика половой функции включенных в исследование пациенток

Показатель	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Возраст начала половой жизни, лет	17,3±1,8	18,1 ±3,4	0,15
Количество половых партнеров, n	3,6±2,7	3,3±2,5	0,26

Длительность половых отношений с настоящим партнером, лет	7,9±3,8	6,8±4,5	0,08
Регулярность половых отношений с настоящим партнером, раз в неделю	2,3±1,0	2,6±1,0	0,11

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Данные о частоте и структуре ранее перенесенных гинекологических заболеваний у обследованных пациенток отражены в таблице 6.

Таблица 6

Структура перенесенных гинекологических заболеваний в исследованных группах

Гинекологические заболевания	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Инфекции, передаваемые половым путем, % (n)	27,3 (9)	25,9 (7)	0,18
Доброкачественные заболевания шейки матки, % (n)	18,2 (6)	7,4 (2)	0,68
Наружный генитальный эндометриоз I – II ст., % (n)	3,0 (1)	7,4 (2)	0,90
Миома матки малых размеров, % (n)	3,0 (1)	11,1 (3)	0,67
Патология эндометрия, % (n)	12,1 (4)	11,1 (3)	0,99

Данные приведены как % и абсолютные величины; $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Согласно представленным данным ведущее место занимали инфекции, передающиеся половым путем, 27,3 % (9) в первой группе и 25,9 % (7) во второй ($p=0,18$). Доброкачественные заболевания шейки матки обнаруживались у 6 (18,2%) первой группы и у 2 (7,2%) второй группы женщин, наружный генитальный эндометриоз у 3,0% (1) пациенток первой группы и у 7,4% (2) женщин второй группы. Миома матки с интерстициальным расположением узлов диаметром до 3 см

была у 1 женщины первой и у 3 пациенток второй группы ($p=0,67$). Патология эндометрия (полип эндометрия, гиперплазия) ранее выявляли у 4 (12,1%) женщин первой группы и у 3 (11,1%) второй группы. Значимых различий в частоте перенесенных гинекологических заболеваний в группах обследованных пациенток не было ($p>0,05$).

Оперативные вмешательства на органах малого таза в анамнезе имели место у большинства женщин. Наиболее часто проводилась диагностическая лапароскопия, тубэктомия (по поводу внематочной беременности или воспалительных заболеваний маточных труб). Причиной проведения гистероскопии и отдельного диагностического выскабливания являлась патология эндометрия. Более подробные данные представлены в таблице 7. Статистически значимых различий между группами не выявлено ($p>0,05$).

Таблица 7

Оперативные вмешательства на органах малого таза у обследованных пациенток

Оперативные вмешательства	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Диагностическая лапароскопия, % (n)	51,5 (17,0)	51,9 (14,0)	0,99
Тубэктомия, % (n)	60,6 (20,0)	48,2 (13,0)	0,82
Коагуляция очагов эндометриоза, % (n)	3,0 (1,0)	7,4 (2,0)	0,90
Гистероскопия, отдельное диагностическое выскабливание, % (n)	51,5 (17,0)	55,6 (15,0)	0,99
Манипуляции на шейке матки, % (n)	18,2 (6,0)	7,4 (2,0)	0,68

Данные приведены как % и абсолютные величины; $p>0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Исследование репродуктивной функции пациенток показало, что у 18,2 % (6) женщин первой группы были своевременные роды в анамнезе, во второй группе у 22,2 % (6). Внематочная беременность в анамнезе у 45,5 % (15) женщин первой

группы и у 44,4 % (12) второй. Замершая беременность встречалась соответственно 12,1 % (4) и 22,2 % (6). Частота медицинских абортс составила 15,2 % (5) и 22,2 % (6) в первой и второй группах соответственно (табл. 8).

Таблица 8

Исходы предыдущих беременностей у обследованных пациенток

Исход беременности	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Своевременные роды, % (n)	18,2 (6,0)	22,2 (6,0)	0,99
Внематочная беременность, % (n)	45,5 (15,0)	44,4 (12,0)	0,99
Самопроизвольный выкидыш до 12 недель, % (n)	3,0 (1,0)	7,4 (2,0)	0,90
Замершая беременность, % (n)	12,1 (4,0)	22,2 (6,0)	0,78
Медицинский аборт, % (n)	15,2 (5,0)	22,2 (6,0)	0,92

Данные приведены как % и абсолютные величины; $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

При изучении типа бесплодия у женщин исследуемых групп не выявили статистически значимых различий в распределении случаев первичного и вторичного бесплодия ($p > 0,05$). Согласно данным анамнеза средняя продолжительность бесплодия составила $4,8 \pm 2,8$ лет и $4,4 \pm 2,9$ лет в первой и второй группах соответственно. Пациенток с первым циклом ВРТ в первой группе было 24 (72,7%), с повторным - 9 (27,3%). Во второй же группе первый цикл был у 19 (70,4%) женщин, повторный у 8 (29,6 %). Среднее число программ ВРТ в анамнезе составило $0,5 \pm 0,8$ для первой группы и $0,4 \pm 0,7$ для второй, что обусловлено критериями включения в исследование (не более двух программ в анамнезе). В структуре этиологии трубно-перитонеальное бесплодие было у всех женщин, что являлось одним из критериев включения. На долю сочетанного фактора (трубно-

перитонельный и мужской) пришлось 78,8 % (26) и 92,6 % (25) первой и второй групп соответственно (табл. 9).

Таблица 9

Анамнез бесплодия у пациенток в исследуемых группах

Показатель	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Продолжительность бесплодия, лет*	4,8±2,8	4,4±2,9	0,09
Первый цикл ВРТ, % (n)	72,7% (24)	70,4% (19)	0,99
Повторный цикл ВРТ, % (n)	27,3% (9)	29,6 % (8)	0,99
Среднее число циклов ВРТ*	0,5±0,8	0,4±0,7	0,48
Сочетанный фактор бесплодия, % (n)	78,8 % (26)	92,6 % (25)	0,53

Данные приведены как абсолютные значения и %; χ^2 -тест

*Данные приведены как среднее значение ± стандартное отклонение; t-тест

Параметры гормонального статуса, полученные в результате предварительного обследования пациенток на 2-3 день и на 21-22 день не стимулированного менструального цикла, представлены в таблице 10.

Таблица 10

Результаты гормонального скрининга в раннюю фолликулиновую фазу не стимулированного менструального цикла пациенток, включенных в исследование

Показатель	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
ФСГ, МЕ/л	7,5±2,0	7,0±2,0	0,16
ЛГ, МЕ/л	5,9±2,7	5,4±2,8	0,23
АМГ, нг/мл	3,8±2,9	3,4±2,7	0,29
Эстрадиол, пмоль/л	146,6±85,0	247,4±75,0	0,09
Прогестерон, нмоль/л	31,9±17,4	30,5±24,4	0,34
Пролактин, мМЕ/л	331,8±151,9	340±158,6	0,44
Кортизол, нмоль/л	384,5±152,4	390,4±137,1	0,43
Тестостерон, нмоль/л	1,4±0,9	1,5±0,8	0,14
ТТГ, мМЕ/л	1,7±0,8	1,9±1,0	0,30

T ₄ , пмоль/л	13,7±2,0	13,6±1,9	0,37
ДГЭА-С, мкмоль/сут	5,5±2,1	4,6±3,4	0,08
17-ОП, нмоль/л	3,0±1,8	3,1±1,6	0,26

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Представленные данные демонстрируют отсутствие статистически значимых различий по уровню гормонов в плазме крови пациенток в исследуемых группах ($p > 0,05$).

Таким образом, изучение особенностей соматического и гинекологического анамнеза, а также функционального состояния репродуктивной системы у исследуемых групп пациенток выявило отсутствие статистически значимых межгрупповых различий по анализируемым параметрам, а значит исследуемые группы можно назвать однородными и сопоставимыми.

3.2. Характеристика показателей спермограммы партнера пациенток, включенных в исследование

Исследование эякулята было проведено у всех мужчин, проходящих лечение. Пациентам был рекомендован соответствующий половой режим. Число мужчин с нормальными показателями спермограммы в первой группе равнялось 8 (25,0%), во второй – 2 (7,4%). Среди мужчин встречались различные формы патозооспермии, которые выражались в снижении количества, подвижности и повышенном числе морфологически патологических форм сперматозоидов (табл. 11).

При оценке показателей спермограммы полового партнера пациенток обеих подгрупп не было выявлено статистически значимых различий в концентрации, подвижности и числе морфологически патологических форм сперматозоидов.

Характеристика спермограммы мужчин, включенных в исследование

Показатель, единицы измерения	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
Объем эякулята, мл	3,5 (1,4-9,0)	3,7 (1,5-8,0)	0,34
Половое воздержание, дни	2,9 (2,0-4,0)	3,0 (2,0-3,0)	0,43
Общее количество сперматозоидов, млн	243,0 (27,5-704,0)	335,0 (27,7-1365,0)	0,14
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	75,0 (11,0-176,0)	104,0 (6,0-455,0)	0,23
Общая подвижность сперматозоидов, %	61,9 (32,0-83,0)	55,7 (34,0-72,0)	0,10
Сперматозоиды с прогрессивным движением категория А+В, %	54,7 (19,0-79,0)	47,5 (24,0-64,0)	0,09
Морфология: нормальных форм, %	2,8 (1,0-6,0)	2,5 (1,0-6,0)	0,17
Концентрация незрелых клеток, млн/мл	7,2 (1,1-19,3)	10,8 (1,3-52,2)	0,22
Концентрация лейкоцитов, млн/мл	0,45 (0,03-0,96)	0,42 (0,12-0,96)	0,40

Данные приведены как медианы с интерквартильным размахом; тест Манна-Уитни

3.3. Характеристика программы ВРТ

3.3.1. Характеристика протокола овариальной стимуляции в исследуемых группах женщин

Всем пациентам, включенным в исследование, проводили овариальную стимуляцию с использованием протокола с рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном (рФСГ) и антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ). Данные показателей овариальной стимуляции представлены в таблице 12, из чего следует, что дозы вводимых гормонов и длительность стимуляции достоверно не различались ($p > 0,05$).

Данные показателей овариальной стимуляции

Показатель, единицы измерения	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - p
День начала стимуляции ГТ	3,0±0,9	3,2±0,9	0,15
Начальная доза рФСГ, МЕ/сут	214,4±99,4	238,9±107,7	0,17
Курсовая доза рФСГ, МЕ/сут	1674,8±898,6	1816,3±1070,1	0,50
Длительность стимуляции, дни	8,9±1,3	8,7±1,3	0,50

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, p>0,05 по U – критерию Манна-Уитни.

3.3.2. Характеристика процессов фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза

Основные параметры фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза обследованных пациенток представлены в таблице 13.

Таблица 13

Характеристика фолликуло-, оо- и эмбриогенеза у пациенток исследуемых групп

Показатель, единицы измерения	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимост и различий - p
Среднее количество фолликулов диаметром ≥ 18 мм в день введения ХГЧ, n **	11 (2-20)	8 (3-20)	0,15
Среднее количество полученных ооцитов при ТВП, n **	9 (2-15)	7 (1-16)	0,31
Среднее количество зрелых ооцитов МП, n **	6 (2-14)	5 (1-14)	0,31
ЭКО, % (n) *	24 (8)	18 (5)	0,96
ИКСИ, % (n) *	76 (25)	82 (22)	0,96
Среднее количество эмбрионов на стадии 2-х пронуклеусов, n **	6 (1-12)	4 (1-13)	0,31
Криоконсервация эмбрионов, % (n)*	64 (21)	63 (17)	0,99

* Данные приведены как абсолютные значения и %; χ^2 -тест

**Данные приведены как медианы с интерквартильным размахом; тест Манна-Уитни

Данные демонстрируют адекватный ответ яичников на стимуляцию, что подтверждается достаточным количеством фолликулов в день введения триггера финального созревания ооцитов. Среднее количество полученных при проведении ТВП ооцитов составило $8,7 \pm 3,8$ в первой группе и $8,1 \pm 4,6$ в группе сравнения и достоверно не различалось между собой ($p=0,31$).

Для оплодотворения полученных ооцитов были использованы два метода – ЭКО и ИКСИ. Учитывая отклонения в показателях спермограммы в день проведения ТВП, потребовалось применение метода ИКСИ: 76 % в первой группе и 82 % во второй, различий между группами не выявлено ($p=0,96$).

Всем пациенткам осуществлялся селективный перенос одного эмбриона «отличного» качества на 5 сутки развития. Криоконсервация эмбрионов «отличного» качества была произведена у 64 % (21) пациенток первой группы и у 63 % (17) женщин второй группы ($p=0,99$).

Таким образом статистически значимых различий в отношении показателей фолликуло-, оо- и эмбриогенеза между исследуемыми группами выявлено не было, что свидетельствует о сопоставимости групп по данным критериям.

3.4. Сравнительный анализ исходов программы ВРТ

Анализ частоты имплантации и наступления беременности проводился из расчета на перенос эмбрионов, частоты репродуктивных потерь. Также оценивалась конечная цель лечения бесплодия – частота родов. Исходы программы ВРТ у женщин обследуемых групп представлены в таблице 14.

Частота имплантации в первой группе составила 25,0 % (8), во второй 44,4 % (12), статистических различий не выявлено ($p=0,48$).

Показатели эффективности программы ВРТ и исходы беременности у пациенток исследуемых групп

Показатель, единицы измерения	Первая группа (n=33)	Вторая группа (n=27)	Уровень значимости различий - р
Частота имплантации, % (n)	25,0 (8)	44,4 (12)	0,48
Частота наступления клинической беременности, % (n)	25,0 (8)	33,3 (9)	0,92
Частота прерывания беременности до 12 нед, % (n)	25,0 (2)	11,1 (1)	0,41
Частота прерывания беременности после 12 нед, % (n)	25,0 (2)	0	0,11
Частота эктопической беременности, % (n)	12,5 (1)	0	0,16
Частота родов, % (n)	37,5 (3)	88,9 (8)	0,12

Данные приведены как % и абсолютные величины; $p > 0,05$ по U – критерию Манна-Уитни

Частоту наступления клинической беременности рассчитывали как отношение количества визуализируемых беременностей при ультразвуковой диагностике на 21 день после переноса эмбрионов к общему числу перенесенных эмбрионов и выражали в процентах. В первой группе частота составила 25,0%, в второй группе – 33,3%. Представленные данные демонстрируют отсутствие статистически значимых различий в отношении частоты наступления клинической беременности в исследуемых группах ($p=0,92$). Не было выявлено отличий и при оценке других показателей: частоты прерывания беременности до и после 12 недель, частоты рождения живого ребенка, частоты внематочной беременности (табл. 14).

Ранее было показано, что эффективность программы ВРТ, в которой поступление СП осуществлялось не только при половых контактах, но и было дополнено интравагинальным введением СП в день ТВП, определяется содержанием ИЛ-18. Было установлено, что аппликация СП с относительно высоким уровнем ИЛ-18

резко снижала частоту наступления беременности до 9%, в то же время у пациентов с низким содержанием IL-18, этот показатель достигал 61% [134; 135; 1].

Однако оставался невыясненным вопрос, является ли определяющим фактором наступления беременности аппликация СП в день ТВП или же влияние оказывают цитокины СП, попадающие в репродуктивный тракт женщины при половых контактах в цикле овариальной стимуляции.

В связи с этим представлялось своевременным и перспективным провести исследование оценки эффективности программы ВРТ с учетом особенностей содержания цитокинов в СП, поступающей в репродуктивные пути женщин при половых контактах.

Кроме того, СП содержит большое количество простагландина E₂ (PG). Исследования, посвященные роли PG E₂, выявили как его провоспалительную, так и иммуносупрессивную функции [43]. Поэтому представлялось актуальным определение зависимости наступления беременности от содержания этой биологически активной молекулы в СП.

3.5. Характеристика содержания цитокинов и простагландина E₂ в семенной плазме партнера

Определение уровня цитокинов (MCP1, TGF, IFN α , IL-12p, IL-10, TNF α , IFN γ , IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8) в образцах СП было проведено с помощью мультиплексного анализа с использованием проточной цитофлуориметрии у половых партнеров пациенток, включенных в исследование (рис. 3). Этот подход позволяет одновременно выявить весь спектр указанных цитокинов в одном образце СП, и тем самым, дать комплексную оценку цитокинового состава СП.

Результаты оценки содержания цитокинов свидетельствуют о значительном варьировании концентрации цитокинов в СП, различающейся более чем на 6

порядков. Так выявлены минимальные концентрации цитокинов IFN α и IL-12p, медианные значения которых составили 3,9 пг/мл и 4,2 пг/мл, соответственно (рис.3). Концентрация каждого из маркеров в семенной плазме не зависела от возраста, индекса массы тела, курения и основных параметров спермограммы пациентов (данные не приводятся).

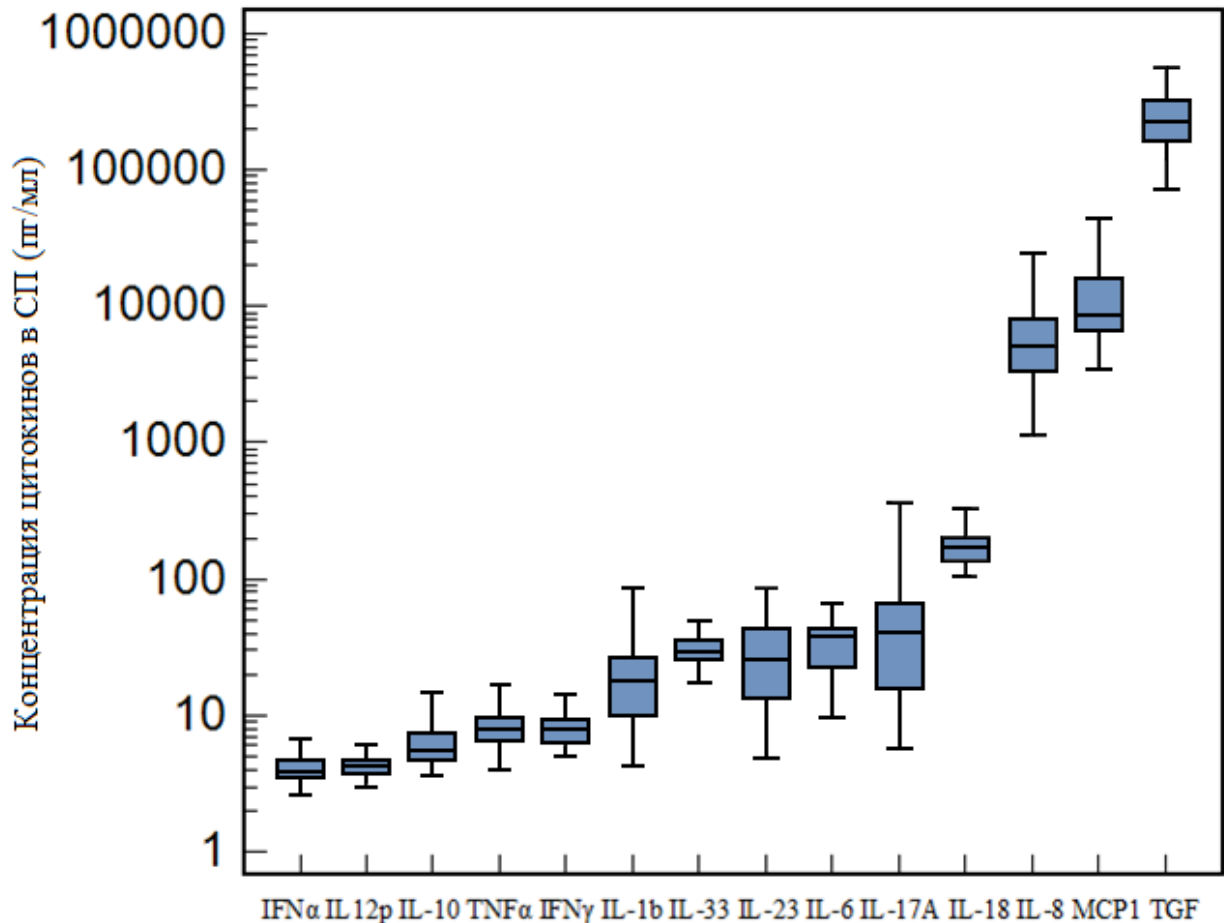


Рисунок 3. Цитокиновый профиль СП партнеров пациенток, включенных в исследование

Максимальная концентрация, составившая 223,6 нг/мл, выявлена для TGF- β 1, что согласуется с результатами многочисленных исследований и подтверждает, что СП является наиболее богатой TGF- β биологической жидкостью человеческого организма. TGF- β , является основным стимулятором посткоитального воспалительного ответа и инициатором процесса иммунной толерантности к

спермальным антигенам, играя важную роль в подготовке иммунной системы женщины к имплантации [179].

Помимо цитокинов также оценивался уровень простагландина E_2 . Медианное значение содержания простагландина E_2 в СП составило 70,95 мкг/мл. По данным литературы, воздействие PGE_2 ведет к повышению выработки IL-10 и снижению продукции IL-12, что рассматривается как элемент сдвига Th1-направленности иммунного ответа с доминированием клеточного иммунитета к Th2-противовоспалительной направленности с доминированием гуморального иммунитета [94].

3.6. Зависимость исходов ВРТ от концентрации цитокинов в семенной плазме партнера в группе с половыми контактами во время лечения

Определение уровня цитокинов $IFN\alpha$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-12p, IL-10, IL-1b, IL-33, IL-23, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-8, MCP1, TGF- β в образцах СП партнера, поступающей при половых контактах, было проведено у 33 пар (первая группа). В зависимости от результата лечения были сформированы две подгруппы: 1А подгруппа (n=25) – отсутствие беременности, 1Б подгруппа (n=8) – наступление беременности. Не было выявлено статистически значимой разницы между группами по клинико-anamнестическим и параметрам фолликулогенеза (табл. 15).

При оценке основных показателей спермограммы полового партнера пациенток исследуемых подгрупп не было выявлено статистически значимых различий в концентрации, подвижности и числе морфологически патологических форм сперматозоидов. Концентрация лейкоцитов в эякуляте в подгруппе А составила 0,43 (0,1-0,96) млн/мл, в подгруппе Б - 0,45 (0,03-0,9) млн/мл ($p=0,36$). Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни. Различия между группами статистически недостоверны ($p>0,05$).

Клинико-anamнестическая характеристика пациенток в группе с половыми контактами во время ВРТ с ненаступившей (подгруппа А) и наступившей беременностью (подгруппа Б)

Параметры	Небеременные (подгруппа А)	Беременные (подгруппа Б)	Уровень значимости различий - p
Возраст, лет	30,7±3,2	33,3±2,5	0,09
Возраст мужа, лет	32,6±3,4	33,5±4,5	0,63
Индекс массы тела, кг/м ²	22,8±3,4	23,5±3,3	0,66
Продолжительность бесплодия, лет	5,1±2,8	3,9±2,2	0,26
Регулярность половой жизни, количество раз в неделю	2,4±1,1	2,5±0,5	0,84
ФСГ, МЕ/л	7,3±2,2	7,9±1,0	0,32
ЛГ, МЕ/л	6,3±2,6	4,8±2,1	0,16
АМГ, нг/мл	3,3±2,3	5,2±3,6	0,22
Суммарная доза препарата, МЕ	1601,7±773,8	1856,3±1107,2	0,58
Длительность стимуляции, дни	8,6±0,9	9,5±1,9	0,29
Число полученных ооцитов*	8,0 (2,0-15,0)	11,5 (5,0-14,0)	0,24

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, U-тест.

*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни.

У пациенток с наступившей беременностью выявлено увеличение содержания ПЛ-18 по сравнению с женщинами, у которых беременность не наступила, (p=0,017) – медиана составила 225,7 (138,3-330,6) пг/мл и 158,0 (72,9-248,0) пг/мл, соответственно. У беременных пациенток выявлено уменьшение содержания ПЛ-10 по сравнению с небеременными женщинами (p=0,010) – медиана составила 5,0 (4,4-5,7) пг/мл и 6,6 (4,1-23,7) пг/мл, соответственно (рис. 4).

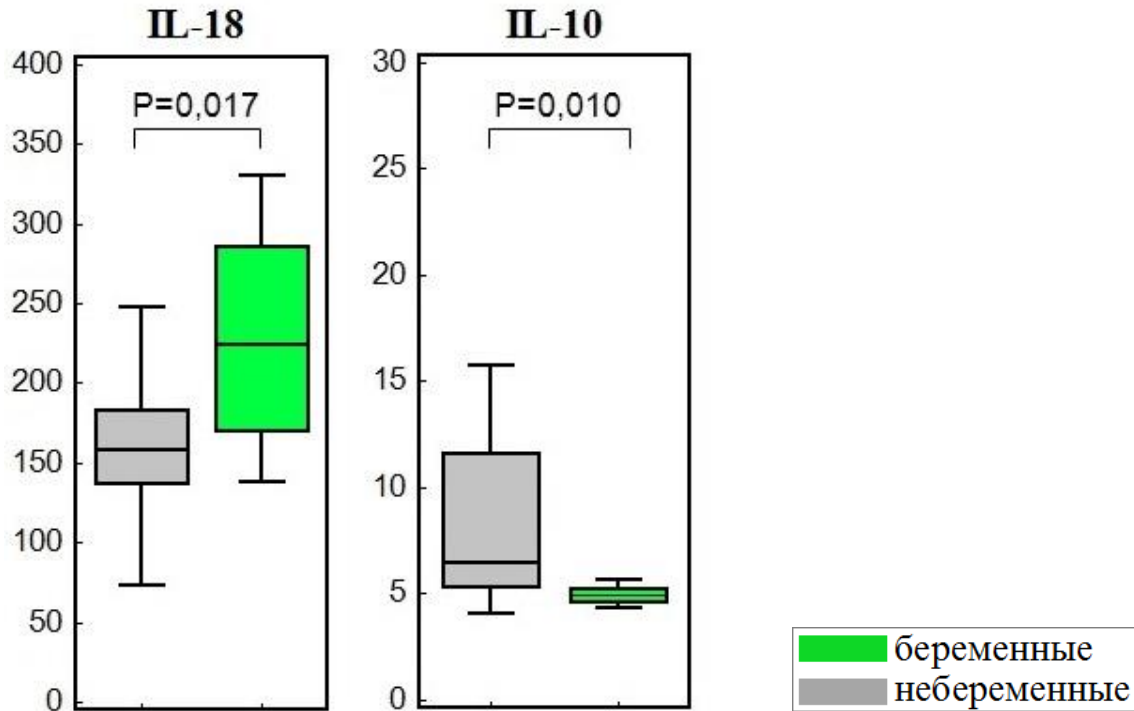


Рисунок 4. Содержание IL-18 и IL-10 (пг/мл) в СП партнера беременных и небеременных пациенток в группе с половыми контактами во время ВРТ

Основным параметром клеточного иммунитета, определяющим направленность иммунных реакций, является функциональное состояние Т-хелперов (Th). Т-хелперы первого типа (Th1), продуцирующие цитокины $IFN\alpha$, IL-12p, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1b, -6, -17A, -18, -8 стимулируют воспалительные реакции. Т-хелперы второго типа (Th2) продуцируют IL-10, IL-4, IL-5 и препятствуют воспалению. Показано, что физиологическая беременность протекает на фоне противовоспалительных реакций [94]. Однако в последнее время появляется все больше данных о том, что ранние этапы беременности – имплантация и плацентация – развиваются на фоне провоспалительных Th1-реакций [63; 173]. Нельзя исключить, что формирование противовоспалительных реакций в микроокружении эмбриона при участии СП может быть неблагоприятным фактором для наступления беременности. Поэтому особую актуальность приобретает оценка зависимости вероятности наступления беременности от особенностей Th1/Th2 баланса цитокинов СП. Данные о соотношении уровней цитокинов в СП представлены на рисунке 5.

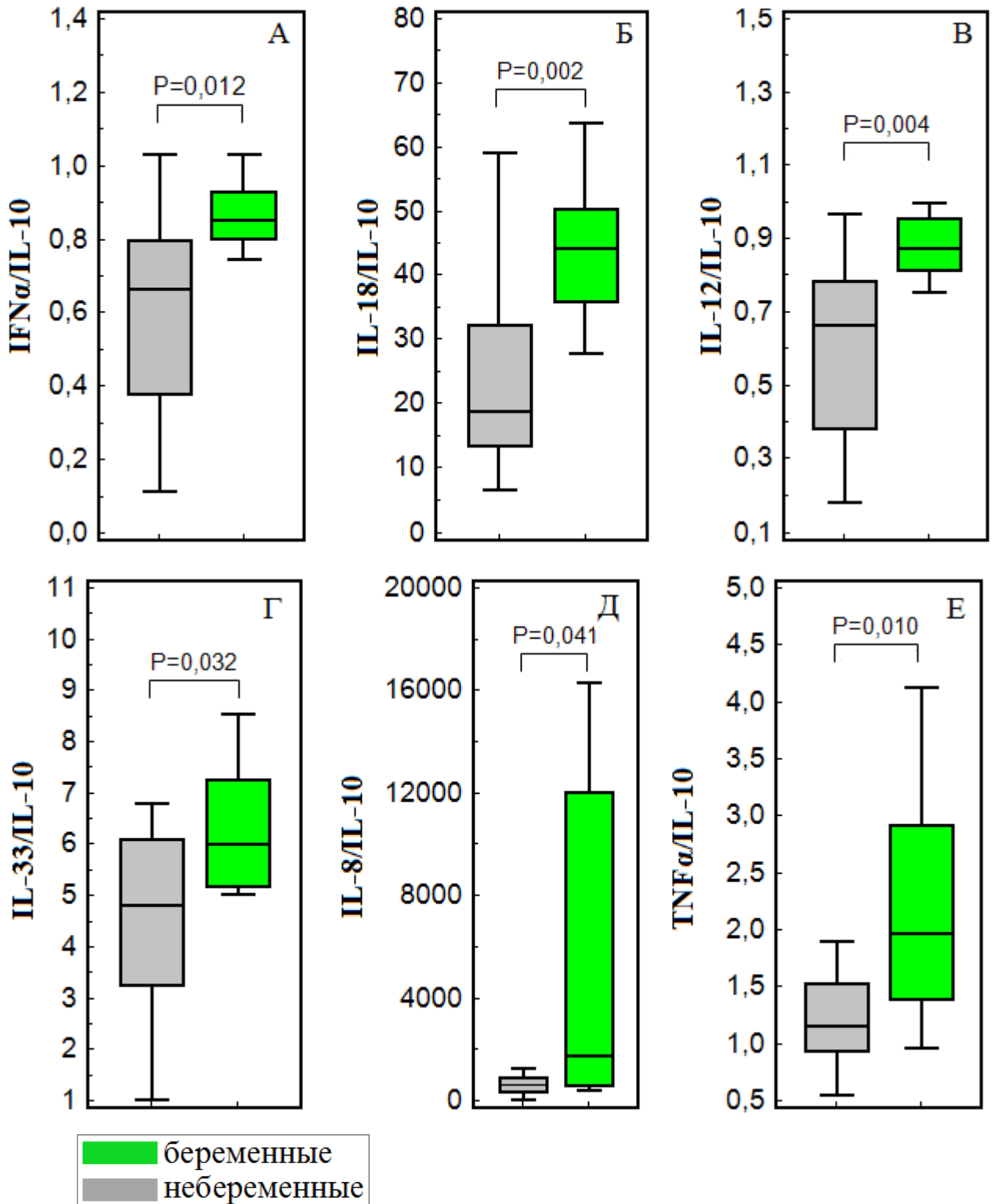


Рисунок 5. Соотношение цитокинов в СП партнера беременных и небеременных пациенток группы с половыми контактами в цикле ВРТ. Обозначения: А - соотношение IFN α /IL-10; Б - соотношение IL-18/IL-10; В - соотношение IL-12/IL-10; Г - соотношение IL-33/IL-10; Д - соотношение IL-8/IL-10; Е - соотношение TNF α /IL-10

Отношение уровня провоспалительных цитокинов $IFN\alpha$, $IL-18$, $IL-12$, $IL-33$, $IL-8$, $TNF\alpha$ к противовоспалительному цитокину $IL-10$ в подгруппе с наступившей беременностью было статистически значимо выше по сравнению с аналогичными показателями в подгруппе женщин с отрицательным результатом лечения. Таким образом было установлено, что Th1/Th2 баланс цитокинов в СП был существенно выше в группе с наступившей беременностью: соотношения $IFN\alpha/IL-10$, $IL-18/IL-10$, $IL-12/IL-10$, $IL-33/IL-10$, $IL-8/IL-10$, $TNF\alpha/IL-10$ были в 1,3; 2,4; 1,3; 1,2; 2,9; 1,7 раз выше, чем в группе с отсутствием беременности (рис. 5).

Выявленное нами увеличенное содержание противовоспалительного цитокина $IL-10$ и сниженный уровень Th1/Th2 баланса цитокинов в группе с неудачной попыткой ВРТ свидетельствуют о том, что формирование воспалительных реакций в микроокружении эмбриона при участии СП выступает благоприятным фактором для имплантации, в то время как вклад СП в усиление противовоспалительной направленности иммунных реакций способен препятствовать наступлению беременности.

3.7. ROC – анализ значимости определения уровня цитокинов в семенной плазме партнера в группе с регулярными половыми контактами в программе ВРТ для прогноза наступления беременности

С позиции оценки клинической значимости определения уровня исследованных цитокинов в СП полового партнера для прогнозирования исходов программы ВРТ нами был проведен ROC-анализ (Receiver Operating Characteristics) полученных результатов. ROC-анализ продемонстрирован характеристическими кривыми, отражающие взаимосвязь между чувствительностью и специфичностью метода. График кривых отражает: по оси ординат долю истинно положительных

результатов (чувствительность), по оси абсцисс – долю ложноположительных результатов (специфичность) (рис. 6).

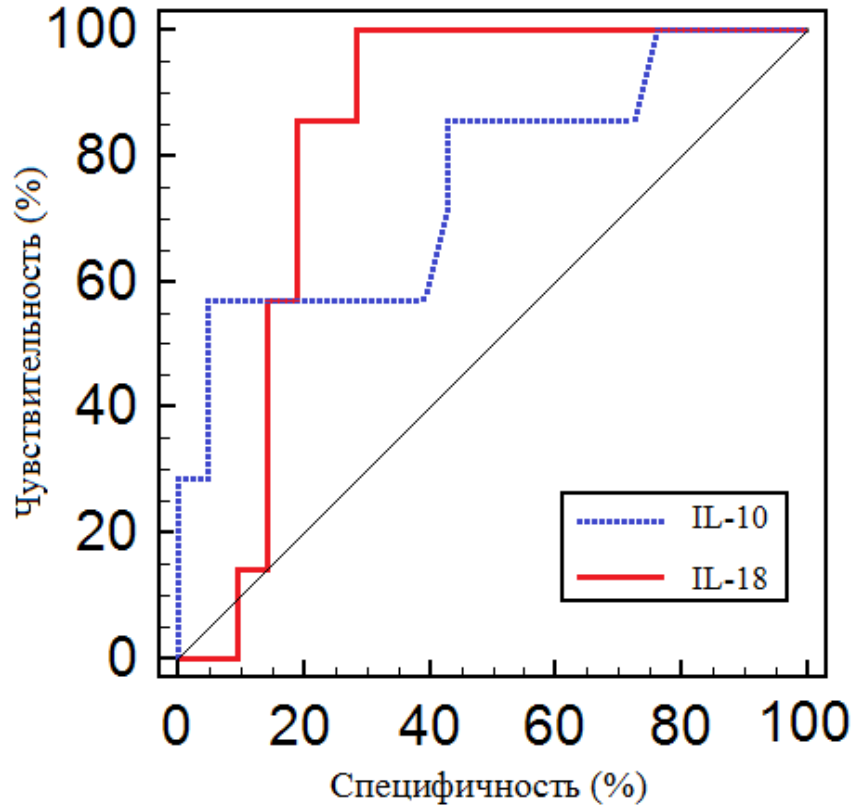


Рисунок 6. ROC-кривые содержания IL-18 и IL-10 (пг/мл) в СП для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ в группе с половыми контактами

Определение оптимального порогового значения каждого показателя, при котором диагностическая значимость теста максимальна, важный аспект данной работы. Этот параметр именуют точкой отсечения (cut-off value). Площадь под характеристической кривой (Area Under Curve, AUC) отражает качество диагностического теста. Чем выше значение AUC, тем большей прогностической ценностью обладает конкретный показатель. Далее определялась чувствительность и специфичность каждого показателя, полученного при определении цитокинового профиля СП.

Прогностическая значимость показателя IL-10 была достаточно высокой: площадь под кривой составила $0,75 \pm 0,11$, чувствительность теста - 87,5 %, специфичность - 71,4 % при значении показателей $\leq 5,7$ пг/мл; положительная и отрицательная прогностическая значимость 53,8 % и 93,8 % ($p=0,024$). Прогностическая значимость показателя IL-18 также была достаточно высока: площадь под кривой составила $0,79 \pm 0,11$, чувствительность теста - 62,5 %, специфичность - 95,2 % при значении показателей $>210,4$ пг/мл; положительная и отрицательная прогностическая значимость 83,3 % и 87,0 % ($p=0,006$).

Следовательно, частота наступления беременности при повышенной концентрации IL-18 (параметра, обладающего наибольшей диагностической значимостью) составила 83,3%, в то время как при пониженной концентрации IL-18 наступление беременности наблюдалось лишь у 13,0 % женщин.

Следующим этапом мы провели ROC – анализ с целью уточнения прогностической значимости определения соотношения уровня цитокинов в семенной плазме для исходов программы ВРТ в группе с рекомендованными половыми контактами (табл. 16).

Таблица 16

Клинико-прогностическая значимость определения соотношения уровня цитокинов в семенной плазме для исходов программы ВРТ в группе с половыми контактами

Параметр	AUC	95% ДИ	Точка отсечки	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Значение P
IL-18/IL-10	0,899	0,729-0,979	$>33,21$	87,5	85,7	70,0	94,7	$<0,0001$
IL-12/IL-10	0,887	0,714-0,974	$>0,81$	87,5	81,0	63,6	94,4	$<0,0001$
IFN α /IL-10	0,839	0,656-0,948	$>0,72$	100,0	66,7	53,3	100,0	$<0,0001$

TNF α /IL-10	0,803	0,605- 0,930	>1,90	62,5	100,0	100,0	86,4	0,0055
IL-33/IL-10	0,798	0,608- 0,923	>4,97	100,0	57,1	47,1	100,0	0,0008
IL-8/IL-10	0,769	0,572- 0,906	>798,70	75,0	75,0	54,5	88,2	0,0164

AUC – площадь под характеристической кривой

ДИ – доверительный интервал

+ ПЦ – положительная прогностическая ценность

- ПЦ – отрицательная прогностическая ценность

Достигнута статистическая достоверность ($p < 0,05$)

Установлено, что соотношение IL-18/IL-10 и IL-12/IL-10 в СП является наилучшим предиктором для прогнозирования исходов ВРТ (рис. 7).

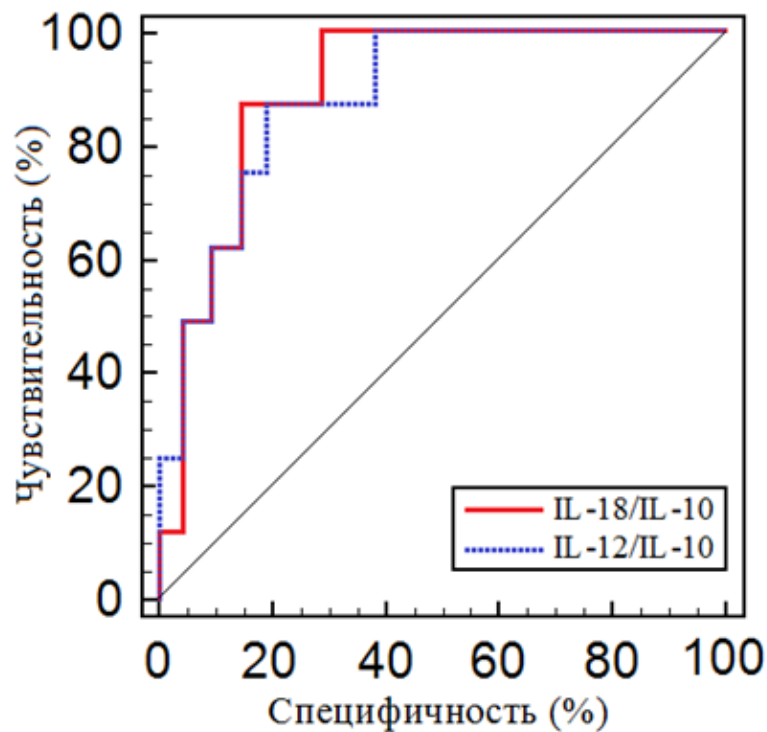


Рисунок 7. ROC - кривая содержания соотношения IL-18/IL-10 и IL-12/IL-10 в СП для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ в группе с половыми контактами

Прогностическая значимость соотношения IL-18/IL-10 оказалась достаточно высокой: площадь под кривой составила $0,899 \pm 0,058$, чувствительность 87,5 %, специфичность 85,7 % при значении показателей $>33,21$; положительная и отрицательная прогностическая значимость 70,0 % и 94,7 % ($p < 0,0001$). Прогностическая значимость соотношения IL-12/IL-10 достаточно значима: площадь под кривой составила $0,887 \pm 0,063$, чувствительность 87,5 %, специфичность 81,0 % при значении показателей $>0,81$; положительная и отрицательная прогностическая значимость 63,6 % и 94,4 % ($p < 0,0001$).

Частота наступления беременности при повышенном соотношении IL-18/IL-10 ($>33,21$) составляет 70 %, в то время как при пониженном соотношении IL-18/IL-10 ($< 33,21$) наступление беременности наблюдается лишь у 5,3 % женщин.

Итого, нами установлено, что поступление цитокинов семенной плазмы в репродуктивный тракт женщины при половых контактах программирует исходы ВРТ. Повышенное содержание в СП противовоспалительного цитокина IL-10, а также пониженный уровень Th1/Th2 баланса приводят к резкому снижению частоты наступления беременности. В то же время преобладание провоспалительных цитокинов в СП и повышенный уровень Th1/Th2 баланса являются факторами, благоприятными для наступления беременности.

3.8. CART-анализ группы с рекомендованными половыми контактами во время программы ВРТ

Для построения модели прогнозирования исходов лечения методом ВРТ с рекомендованными половыми контактами во время лечения, мы применили алгоритм CART (Classification and Regression Tree), предназначенный для построения бинарного дерева решений. Цель построения деревьев классификации – прогнозирование наиболее вероятных значений зависимой переменной при

соответствующих значениях одного или нескольких независимых переменных-предикторов. Для построения дерева решений предикторами выступали данные, полученные при анализе цитокинового профиля СП, а зависимой переменной – исход лечения.

На рисунке 8 представлена модель прогнозирования исходов лечения методом ВРТ с помощью алгоритма CART.

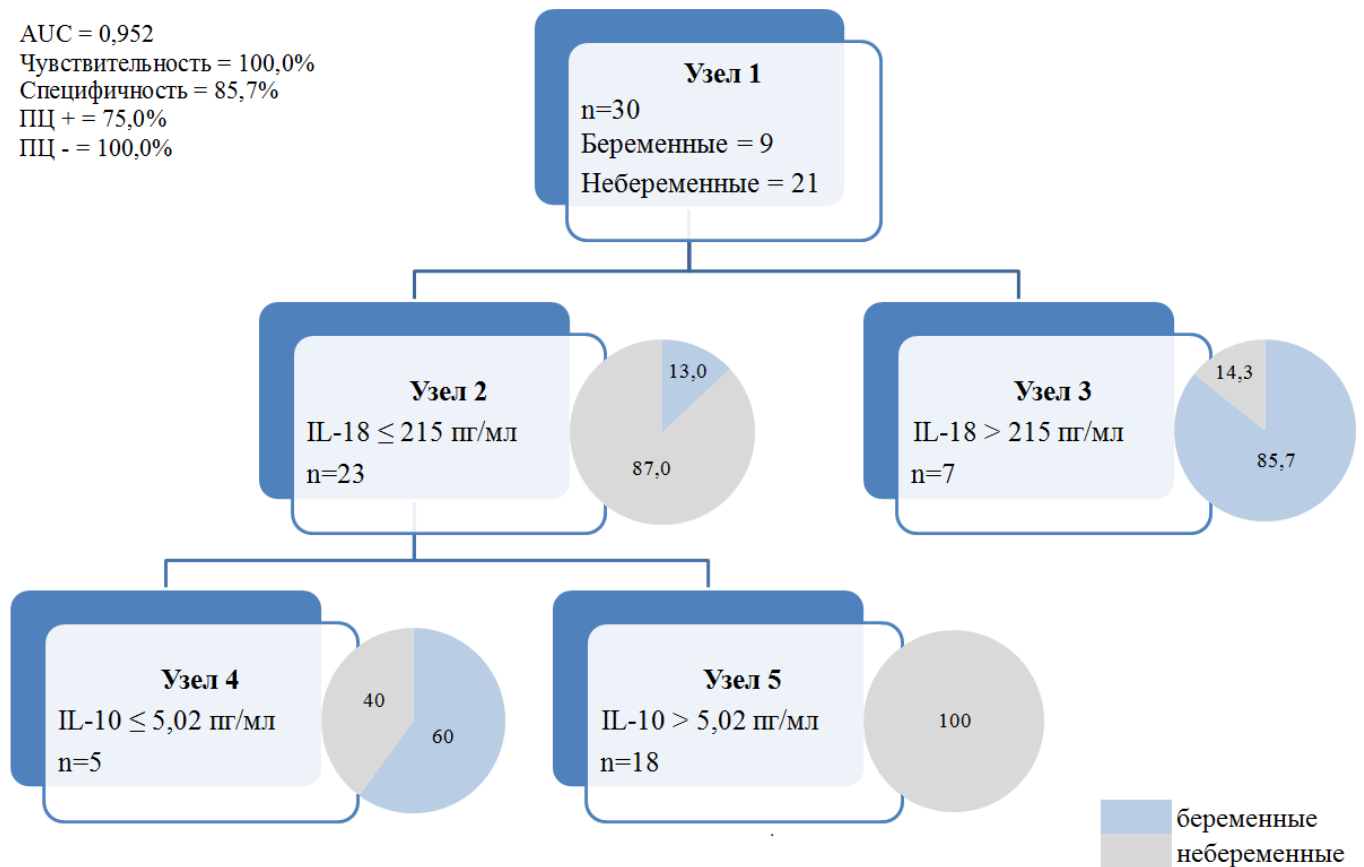


Рисунок 8. CART-алгоритм прогнозирования исходов лечения методом ВРТ в группе с половыми контактами

Информацию о соответствующем параметре цитокинового профиля СП, оптимальной точке отсечения и общем количестве пациентов содержит каждый узел алгоритма. Круговая диаграмма в каждом узле отражает результаты лечения в ходе

программы ВРТ (голубым цветом представлен процент пациентов с наступившей беременностью, серым – процент неудачных исходов).

Первый уровень CART-алгоритма представлен концентрацией IL-18 в СП. У пациенток, СП партнера которых содержала IL-18 $\leq 214,5$ пг/мл (узел 2) беременность наступала лишь в 13,0 % случаев. Если содержание IL-18 $> 214,5$ пг/мл (узел 3), исход лечения был положительным в 85,7% случаев.

Второй уровень алгоритма представлен концентрацией IL-10. Если концентрация IL-10 $\leq 5,02$ пг/мл (узел 4), то беременность наступала в 60,0 % случаев, в то время как при концентрации IL-10 $> 5,02$ пг/мл (узел 5) исход лечения был заведомо отрицательным.

Из вышесказанного следует, что алгоритм оценки успешности лечения бесплодия с рекомендованными половыми контактами можно представить следующим образом: при содержании IL-18 в СП $> 214,5$ пг/мл (узел 3) отмечалась высокая частота наступления беременности 85,7%. Если же IL-18 $\leq 214,5$ пг/мл (узел 2), а концентрация IL-10 $\leq 5,02$ пг/мл (узел 4), то беременность наступала в 60,0 % случаев, в то время как при концентрации IL-10 $> 5,02$ пг/мл (узел 5), исход лечения был заведомо отрицательным.

Таким образом, согласно данным CART-анализа было выявлено, что содержание IL-18 и IL-10 в СП могут быть предикторами прогнозирования исхода лечения методом ВРТ в группе с рекомендованными половыми контактами.

3.9. Зависимость исходов программы ВРТ от концентрации цитокинов в семенной плазме партнера в группе без половых контактов во время лечения

Нами было установлено, что противовоспалительный цитокиновый профиль СП, обусловленный преобладанием цитокина IL-10, определяет низкую частоту

наступления беременности в протоколе ВРТ с рекомендованными половыми контактами. Мы предположили, что более эффективным способом лечения бесплодия в этом случае может стать ограничение поступления патологически измененной СП в репродуктивный тракт женщины в цикле овариальной стимуляции. Это предположение подтвердилось при ретроспективной оценке состава цитокинов СП половых партнеров в группе без половых контактов во время лечения. Воздержание от половых контактов во время программы ВРТ было рекомендовано 27 супружеским парам. В зависимости от результатов лечения были сформированы две подгруппы: подгруппа 2А (n=18) - с отрицательным и подгруппа 2Б (n=9) - с положительным результатом лечения.

По клинико-anamнестическим данным (возраст, ИМТ, уровень гормонов, продолжительность бесплодия, схемы и дозы стимуляции, параметры сперматогенеза) и по параметрам оогенеза не было выявлено статистически значимой разницы между группами (табл. 17).

Таблица 17

Клинико-anamнестическая характеристика пациенток подгруппы А (с отсутствием) и подгруппы Б (с наступлением беременности) группы без половых контактов

Параметры	Небеременные (подгруппа 2А)	Беременные (подгруппа 2Б)	Уровень значимости различий - p
Возраст, лет	31,8±3,3	32,8±2,5	0,19
Возраст мужа, лет	38,1±8,7	35,3±4,8	0,18
Индекс массы тела, кг/м ²	23,2±3,5	21,9±3,2	0,16
Продолжительность бесплодия, лет	4,2±2,7	4,7±3,5	0,43
ФСГ, МЕ/л	6,9±2,1	7,4±2,0	0,37
ЛГ, МЕ/л	4,9±2,2	6,2±3,7	0,14
АМГ, нг/мл	3,3±2,9	3,6±2,6	0,25

Регулярность половой жизни, количество раз в неделю	2,7±1,1	2,4±0,7	0,39
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	2089,7±201,5	1300,0±481,7	0,10
Длительность стимуляции, дни	9,0 ±1,4	8,1±1,1	0,10
Число полученных ооцитов *	7,0(1,0-14,0)	6,0(3,0-16,0)	0,46
Объем, мл *	3,3 (1,5-8,0)	3,0 (1,5-8,0)	0,38
Концентрация, млн/мл *	65,5 (6,0-455,0)	107,5 (26,0-178,0)	0,35
Прогрессивно-подвижные, % *	48,0 (24,0-64,0)	50,0 (38,0-64,0)	0,31
Морфологически нормальные, % *	2,5 (1,0-6,0)	2,0 (2,0-3,0)	0,25
Концентрация лейкоцитов, млн/мл *	0,4 (0,1-1,0)	0,4 (0,1-0,8)	0,42

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, U-тест.

*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни.

Различия между группами статистически недостоверны ($p>0,05$).

При оценке основных показателей спермограммы партнера пациенток исследуемых подгрупп не было выявлено статистически значимых различий в концентрации, подвижности и числе морфологически патологических форм сперматозоидов. Концентрация лейкоцитов в эякуляте составила в подгруппе А 0,44 (0,12-0,96) млн/мл ($p=0,42$), в подгруппе Б - 0,37 (0,14-0,79) млн/мл (табл. 17).

Был проведен ретроспективный анализ цитокинового профиля СП в подгруппах пациентов с отсутствием и наступлением беременности. При анализе концентрации цитокинов в СП было установлено статистически значимое повышение уровня цитокинов IFN α , IL-12p, IL-10, IL-33, IL-23, IL-17A в подгруппе с наступившей беременностью (подгруппа Б), и отсутствие различий в содержании цитокинов TNF α , IFN γ , IL-1b, IL-6, IL-8, MCP1, TGF, IL-18 (рис. 9, табл. 18).

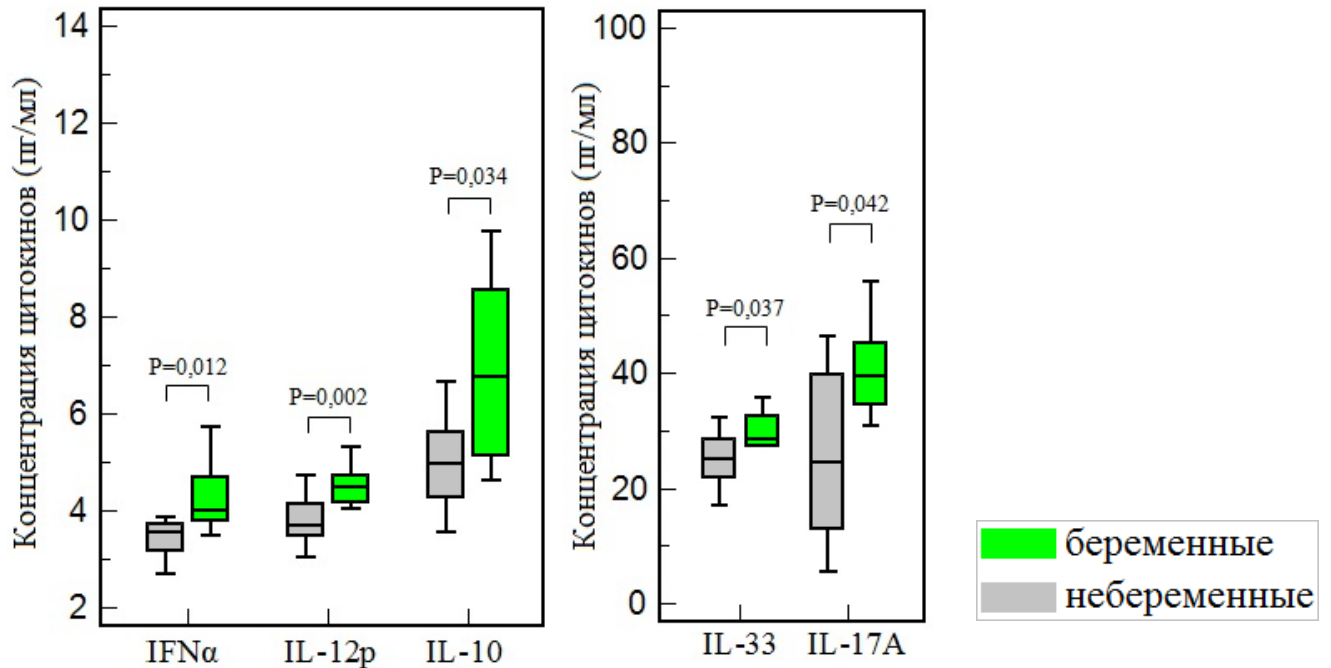


Рисунок 9. Концентрация цитокинов (пг/мл) IFN α , IL12p, IL-10, IL-33, IL-17A в семенной плазме партнера пациенток с рекомендованным воздержанием во время программы ВРТ подгрупп с отсутствием и наступлением беременности

Таблица 18

Концентрация цитокинов в СП партнера пациенток подгруппы А (с отсутствием) и подгруппы Б (с наступлением беременности) группы без половых контактов во время ВРТ

Цитокин	Подгруппа А (Б-) пг/мл	Подгруппа Б (Б+) пг/мл	Уровень значимости различий - p
IFNα	3,58 (2,72-4,83)	3,99 (3,51-5,73)	0,012
IL-12p	3,69 (3,08-4,72)	4,5 (4,07-5,3)	0,002
IL-10	4,99 (3,58-6,66)	6,75 (4,66-9,77)	0,034
IL-33	25,2 (17,26-39,16)	28,58 (27,69-35,63)	0,037
IL-23	16,37 (1,11-88,09)	29,45 (13,31-55,04)	0,101
IL-17A	24,61 (5,7-46,35)	39,4 (31,0-55,96)	0,042
TNF α	6,72 (3,94-10,3)	7,89 (7,09-8,78)	0,116
IFN γ	7,02 (5,05-9,12)	7,1 (6,06-9,12)	0,332
IL-1b	14,44 (5,22-25,54)	16,16 (7,81-70,29)	0,785
IL-6	20,87 (5,99-91,14)	19,53 (12,47-83,3)	0,602

IL-8	4271,6 (1138,4-24136,4)	4392,5 (2337,0-17703,3)	0,772
MCP1	7056,6 (1083,3-25271,6)	12345,1 (4230,4-118606,5)	0,123
TGF	219397,5 (87801,2-576189,4)	282369 (114846,4-385947,8)	0,776
IL-18	155,5 (67,8-210,4)	170,1 (122,2-216,5)	0,585

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни.

Таким образом в подгруппе с наступившей беременностью в СП выявляется существенно большая концентрация провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-17A и противовоспалительного цитокина IL-10. При этом Th1/Th2 баланс (соотношения IL-12p/IL-10 и TNF α /IL-10) был существенно ниже в группе с наступившей беременностью. Медиана TNF α /IL-10 для группы с наступившей беременностью составила 0,92 (0,455-1,424), что ниже по сравнению с медианой при отсутствии беременности 1,196 (0,914-1,833) ($p=0,02$). Медиана IL-12p/IL-10 для группы с наступившей беременностью составила 0,584 (0,123-0,873), что ниже по сравнению с медианой при отсутствии беременности 0,789 (0,618-0,919) ($p=0,044$) (рис. 10).

Необходимо отметить, что в протоколе с воздержанием во время лечения последний контакт с СП состоялся до начала менструации, до начала стимуляции, то есть примерно за 20 дней до предполагаемой имплантации, в отличие от протокола с рекомендованной половой жизнью во время лечения, где период отсутствия воздействия СП составляет около 10 дней от последнего полового акта до имплантации эмбриона (рисунок 2 в разделе методы). Таким образом, положительный эффект цитокинов СП на имплантацию в программе ВРТ с рекомендованным воздержанием, по-видимому, реализуется за счет отмены негативного действия противовоспалительной направленности иммунных реакций,

формирующихся при поступлении цитокинов семенной плазмы в репродуктивные пути женщины перед началом цикла овариальной стимуляции. В то же время отмена половых контактов в группе с повышенным уровнем Th1/Th2 баланса в СП приводила к негативным результатам ВРТ.

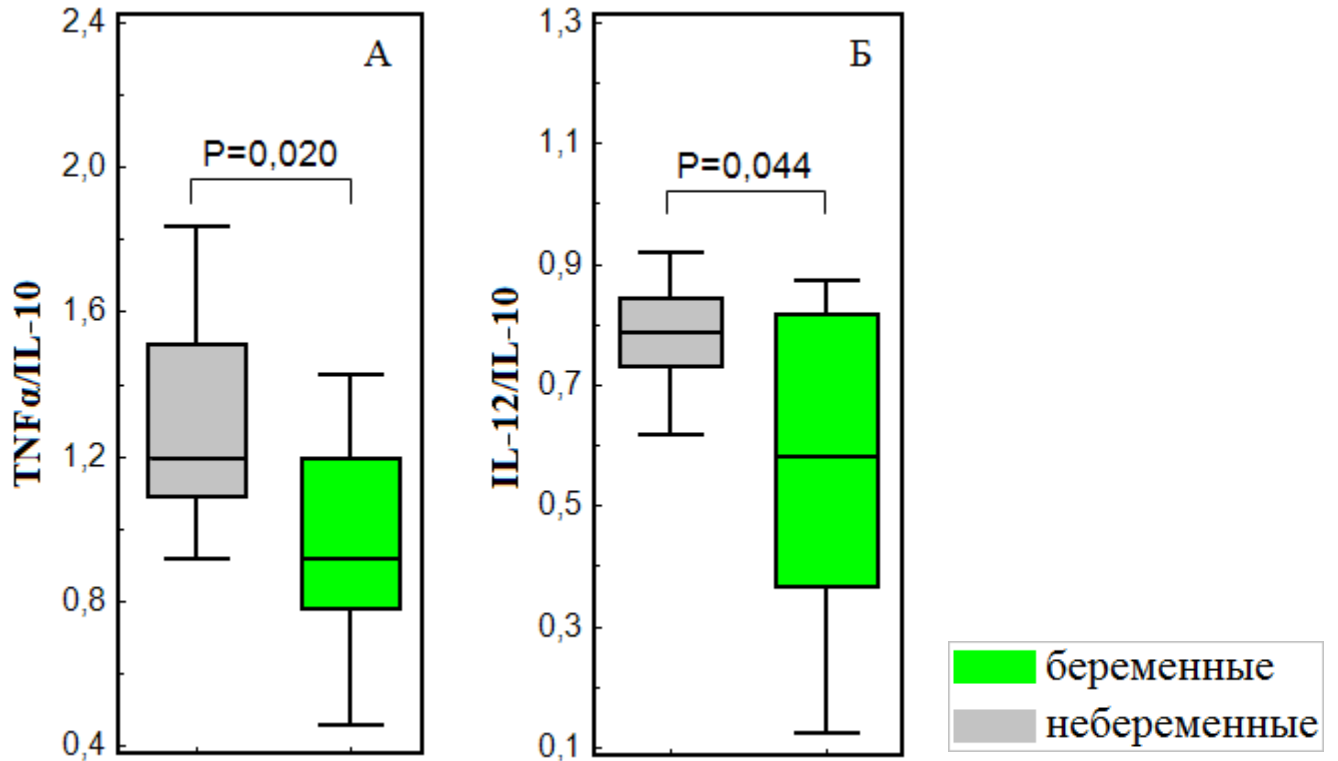


Рисунок 10. Соотношения цитокинов TNF α /IL-10 и IL-12/IL-10 в семенной плазме партнера с рекомендованным воздержанием во время программы ВРТ подгрупп с отсутствием и наступлением беременности.

3.10. ROC – анализ значимости определения уровня цитокинов в семенной плазме в группе без половых контактов в программе ВРТ для прогноза наступления беременности

Аналогично группе с рекомендованными половыми контактами нами был проведен ROC-анализ для группы с воздержанием во время лечения. Были получены следующие данные, приведенные в таблице 19.

Клинико-прогностическая значимость определения уровня цитокинов в семенной плазме для исходов программы ВРТ в группе без половых контактов

Параметр	AUC	95% ДИ	Порог отсечки, пг/мл	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Уровень значимости различий - p
IL-12p	0,889	0,688-0,981	>4,0	100,0	71,4	69,2	100,0	<0,0001
IFN α	0,817	0,602-0,946	>3,8	77,8	85,7	77,8	85,7	0,0006
IL-10	0,796	0,584-0,931	>6,6	66,7	93,3	85,7	82,4	0,0030
IL-33	0,762	0,54-0,913	>25,2	100,0	57,1	60,0	100,0	0,0096
IL-17A	0,762	0,541-0,913	>26,6	100,0	60,0	57,1	100,0	0,0091

AUC – площадь под характеристической кривой

ДИ – доверительный интервал

+ ПЦ – положительная прогностическая ценность

- ПЦ – отрицательная прогностическая ценность

Достигнута статистическая достоверность ($p < 0,05$)

Прогностическая значимость показателя IL-12p была достаточно высокой: площадь под кривой составила $0,889 \pm 0,069$, чувствительность теста – 100,0 %, специфичность - 71,4 % при значении показателей $>4,0$ пг/мл; положительная и отрицательная прогностическая значимость составила 69,2 % и 100,0 % ($p < 0,0001$). Частота наступления беременности при повышенной концентрации IL-12p составляет 69,2%, в то время как снижение уровня IL-12p несет заведомо отрицательный результат наступления беременности. Прогностическая значимость показателя IFN α также была достаточно высокой: площадь под кривой составила $0,817 \pm 0,093$, чувствительность теста - 77,8 %, специфичность - 85,7 % при значении

показателей $>3,8$ пг/мл; положительная и отрицательная прогностическая значимость 77,8 % и 85,7 % ($p=0,0006$).

Установлено, что содержание IL-12p в эякуляте является наилучшим предиктором для прогнозирования исходов ВРТ (рис. 11).

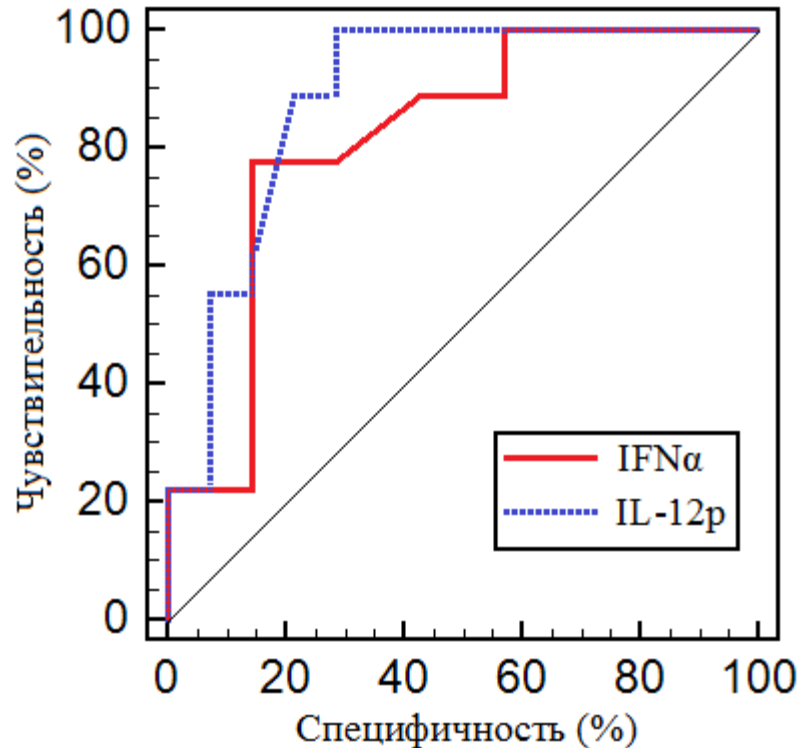


Рисунок 11. ROC-кривые содержания IFN α и IL-12p (пг/мл) в СП в группе без половых контактов для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ.

Прогностическая значимость показателя TNF α /IL-10 составила $0,800 \pm 0,113$, чувствительность теста - 75,0 %, специфичность - 86,7 % при значении показателей $\leq 0,983$; положительная и отрицательная прогностическая значимость 75,0 % и 86,7 % ($p=0,0078$) (табл. 20).

Клинико-прогностическая значимость определения соотношений цитокинов в семенной плазме для исходов программы ВРТ в группе без половых контактов

Параметр	AUC	95% ДИ	Порог отсечки	Чувствительность, %	Специфичность, %	+ ПЦ	- ПЦ	Уровень значимости различий - p
TNF α /IL-10	0,800	0,582-0,936	$\leq 0,983$	75,0	86,7	75,0	86,7	0,0078
IL-12/IL-10	0,754	0,532-0,907	$\leq 0,584$	55,6	100,0	100,0	77,8	0,0371

AUC – площадь под характеристической кривой

ДИ – доверительный интервал

+ ПЦ – положительная прогностическая ценность

- ПЦ – отрицательная прогностическая ценность

Достигнута статистическая достоверность ($p < 0,05$)

Прогностическая значимость показателя IL-12p/IL-10 была достаточно высокой: площадь под кривой составила $0,754 \pm 0,122$, чувствительность теста - 55,6 %, специфичность – 100,0 % при значении показателей $\leq 0,584$; положительная и отрицательная прогностическая значимость составили 100,0 % и 77,8 % ($p=0,0371$) (рис. 12).

Таким образом ограничение половых контактов в цикле ВРТ для пациентов с повышенным уровнем цитокинов IFN α , IL-12p, IL-10, IL-33, IL-17A и сниженным уровнем IL-12p/IL-10 и TNF α /IL-10 в СП приводит к существенному увеличению частоты наступления беременности. В то же время попадание СП с высокой концентрацией IL-10 ($>5,7$ пг/мл) при рекомендованных половых контактах в цикле овариальной стимуляции, оказывало негативный эффект на наступление беременности (частота наступления беременности составляла 6,2%). Отмена половых контактов в программе ВРТ, и соответственно, отмена воздействий высоких концентраций этого цитокина, превышающих в данном протоколе 6,6 пг/мл,

приводило к наступлению беременности в 85,7% случаев. Такая высокая эффективность ВРТ обусловлена пилотным характером исследования на небольшой выборке пациентов. Очевидно, что необходимо проведение более масштабных проспективных исследований для подтверждения возможности персонализированного назначения режима половой жизни, определяемого содержанием цитокинов в СП.

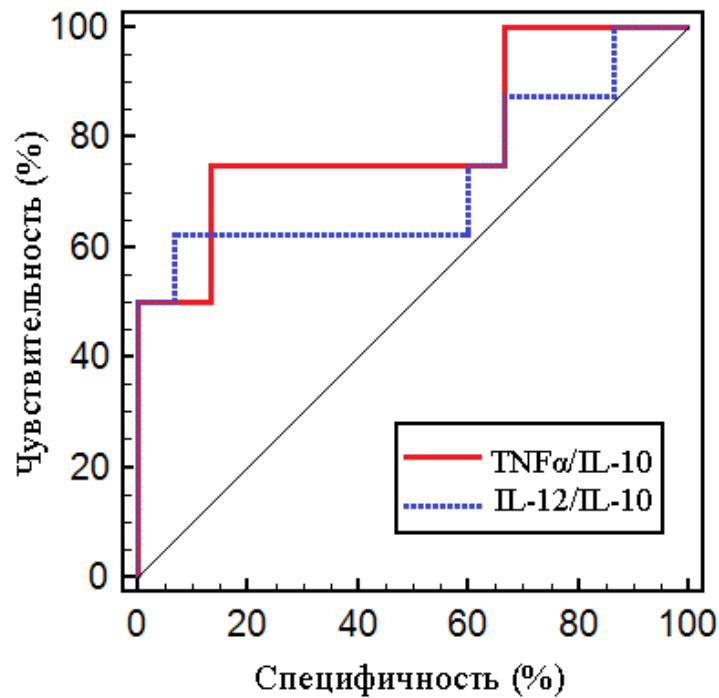


Рисунок 12. ROC-кривые соотношения TNFα/IL-10 и IL-12p/IL-10 в СП в группе без половых контактов для прогнозирования успеха лечения методом ВРТ

3.11. CART анализ группы без половых контактов во время ВРТ

Для построения модели прогнозирования исходов лечения методом ВРТ с рекомендованным воздержанием во время лечения, мы применили алгоритм CART, предназначенный для построения бинарного дерева решений. На рисунке 13

представлена модель прогнозирования исходов лечения методом ВРТ с помощью алгоритма CART.

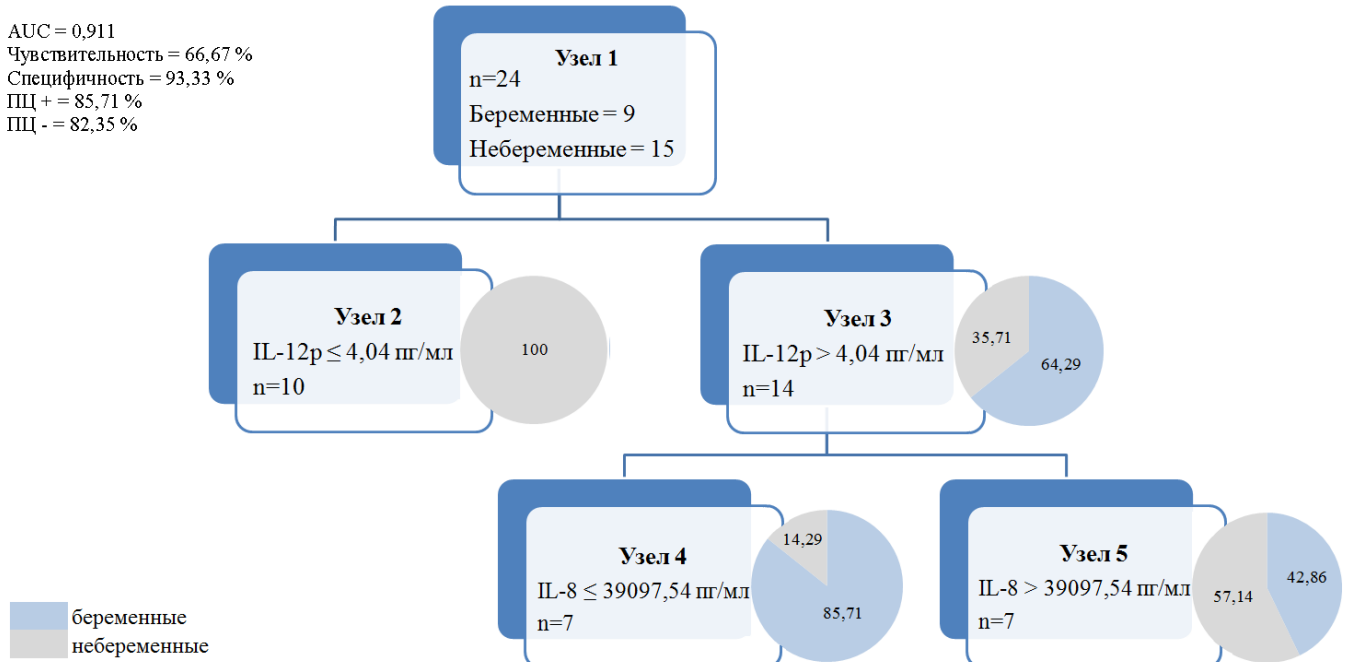


Рисунок 13. CART-алгоритм прогнозирования исходов лечения бесплодия в группе с рекомендованным воздержанием в программе ВРТ

Каждый узел содержит информацию о соответствующем параметре цитокинового профиля СП, оптимальной точке отсечения и общем количестве пациентов в данном узле. Круговая диаграмма в каждом узле отражает результаты лечения бесплодия (голубым цветом представлен процент пациенток с наступившей беременностью, серым – процент неудачных исходов).

Первый уровень CART-алгоритма представлен концентрацией IL-12p в СП. У пациенток, СП партнеров которых содержала IL-12p ≤ 4,04 пг/мл (узел 2), исход лечения был заведомо отрицательным. Если содержание IL-12p > 4,04 пг/мл (узел 3), исход лечения был положительным в 64,29 % случаев.

Второй уровень алгоритма представлен концентрацией IL-8. Если концентрация IL-8 $\leq 39097,54$ пг/мл (узел 4), то беременность наступала в 85,71 % случаев, в то время как при концентрации IL-8 $> 39097,54$ пг/мл (узел 5), беременность наступала в 42,86 % случаев.

Из вышесказанного следует, что алгоритм оценки успешности лечения бесплодия с рекомендованным воздержанием можно представить следующим образом: при содержании IL-12p в СП $> 4,04$ пг/мл (узел 3) отмечалась высокая частота наступления беременности 64,29 %, если же при этом концентрация IL-8 $\leq 39097,54$ пг/мл (узел 4), то беременность наступала в 85,71 % случаев, а если концентрация IL-8 $> 39097,54$ пг/мл (узел 5), беременность наступала в 42,86 % случаев. При концентрации IL-12p $\leq 4,04$ пг/мл (узел 2), исход лечения был заведомо отрицательным.

Согласно данным CART-анализа было выявлено, что содержание IL-12p и IL-8 в СП могут быть предикторами прогнозирования исхода программы ВРТ в группе с рекомендованным воздержанием во время лечения.

3.12. Оценка вариабельности уровня цитокинов в семенной плазме

В представленной работе проводился анализ семенной плазмы, полученный в день трансвагинальной пункции фолликулов. Очевидно, что для персонифицированного назначения режима половой жизни в программе ВРТ информация о цитокиновом составе СП должна быть получена перед началом цикла овариальной стимуляции, то есть в 1-3 день менструации женщины. Так как нельзя исключить, что показатели цитокинового статуса СП, полученной с интервалом в 2 недели, могут существенно отличаться, была проведена оценка вариабельности уровня цитокинов СП, полученной в двух временных точках: в начале менструального цикла пациентки и в день ТВП.

Как известно, ключевым фактором, влияющим на уровень цитокинов в СП, является длительность воздержания [181]. Поэтому мы стандартизировали этот показатель и использовали СП после 3-4 дней воздержания. Для каждого цитокина оценивали относительное изменение его содержания - отношение разницы концентрации цитокина в СП, полученной в день ТВП и в день начала протокола, к уровню данного цитокина в день ТВП. Очевидно, что при увеличении концентрации цитокина относительное изменение представляло собой положительную величину, а при снижении содержания цитокина в СП ко дню ТВП, получали отрицательные значения.

На рисунке 14 и в таблице 21 представлены данные об уровне варьирования цитокинов в СП. Степень варьирования цитокинов существенно различается. Цитокины были распределены нами на 3 условные группы с низкой, умеренной и высокой степенью варьирования их концентраций (табл. 21, рис. 14).

Таблица 21

Уровни варьирования цитокинов в СП

	Min %	Max %	Степень варьирования
IFNα	-6,1	8,7	Низкая
IL-10	-8,8	9,6	
IFN γ	-16,6	34,4	Умеренная
IL-12	-26,9	26,0	
IL-33	-11,9	44,0	
IL-17	-53,7	7,9	
MCP	-9,4	56,1	
IL-6	-51,9	71,4	Сильная
IL-23	-99,6	37,7	
IL-8	-52,2	98,5	
IL-18	-95,6	175,0	
TNF α	-57,3	161,2	
IL-1b	-174,7	324,4	

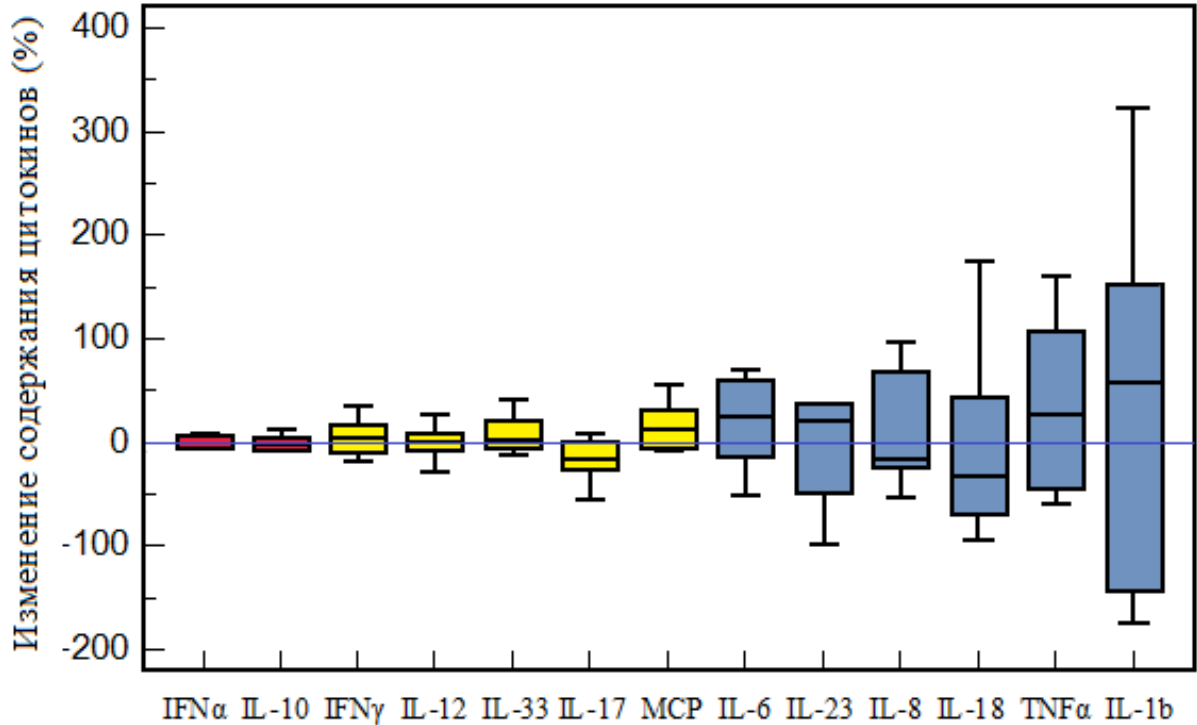


Рисунок 14. Вариабельность цитокинового состава семенной плазмы, полученной в течение одного менструального цикла пациентки

Низкая вариабельность отмечалась у IFN α и IL-10, в отличие от цитокинов с умеренной (IFN γ , IL-12, IL-33, IL-17, MCP) и сильной вариабельностью (IL-6, IL-23, IL-8, IL-18, TNF α , IL-1b). А значит, оценка содержания цитокинов с низкой степенью варьирования IL-10 перед началом протокола ВРТ является наиболее перспективным подходом для рекомендации режима половой активности в лечебном цикле, так как уровень именно этого цитокина определял эффективность наступления беременности в обоих использованных нами протоколах стимуляции с рекомендованными или нет половыми контактами. При высоком содержании IL-10 наибольшая частота наступления беременности наблюдалась в группе с воздержанием, при низком содержании данного цитокина к эффективной имплантации приводят половые контакты в цикле ВРТ.

3.13. Персонализированный подход к рекомендациям по половой жизни во время ВРТ

Нами была подтверждена низкая вариабельность концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 в СП, который, согласно полученным данным, играет одну из ключевых ролей и имеет прогностическое значение в двух вариациях использованных протоколов овариальной стимуляции. Установлено, что повышение содержания IL-10 в СП является значимым фактором, негативно влияющим на наступление беременности при половых контактах в цикле ВРТ, отмена их в лечебном цикле у пациентов с преобладанием IL-10 в СП приводит к резкому повышению эффективности ВРТ.

Сравнение частоты наступления беременности проводилось с использованием единой точки отсечки для уровня IL-10, равной 6,6 пг/мл, определенного ранее для программы ВРТ без половых контактов. Очевидно, что при содержании IL-10 $\leq 6,6$ пг/мл целесообразным является рекомендация половых контактов в цикле ВРТ, при этом ожидаемая частота наступления беременности составит 42,1%. При относительно высоком содержании IL-10 $> 6,6$ пг/мл эффективной является отмена половой жизни, что приводит к наступлению беременности у 85,7 % супружеских пар. На основании сравнения эффективности двух протоколов для пациентов с низким и высоким содержанием IL-10 (рис. 15) мы можем оптимизировать программу ВРТ с помощью персонализации режима половой жизни во время лечения бесплодия.

Содержание IL-10 в эякуляте

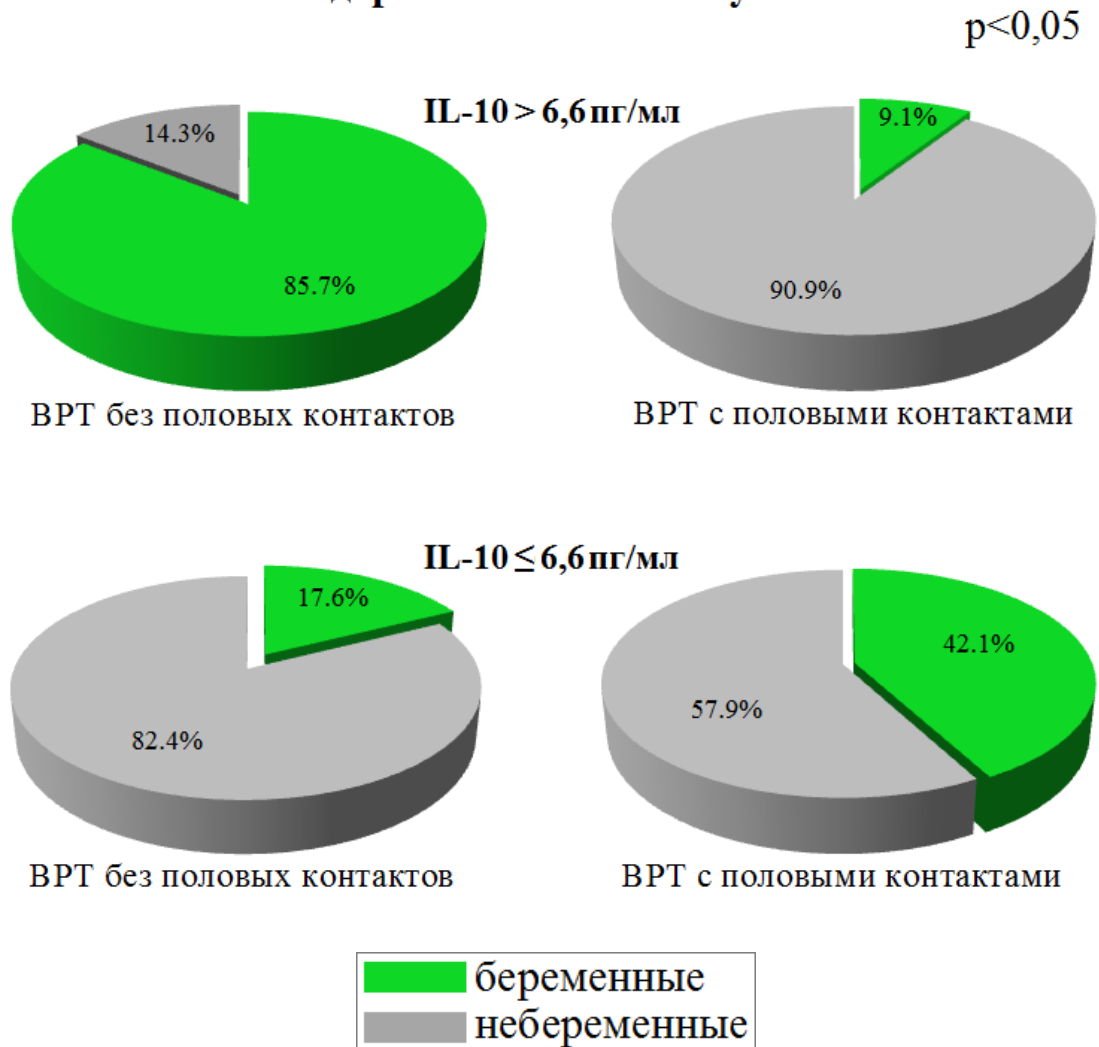


Рисунок 15. Частота наступления беременности при разных уровнях IL-10 в СП в группах: с половыми контактами; без половых контактов во время программы ВРТ

3.14. Зависимость исхода программы ВРТ от концентрации простагландина E₂ в семенной плазме партнера во время лечения

Следующим этапом нашей работы явилась оценка влияния содержания простагландина E₂ (PG E₂) в семенной плазме на наступление беременности в группах с половыми контактами и без. В группе с рекомендованными половыми

контактами во время лечения медианное значение PG E₂ составило 72,7 (37,7-100,0) мкг/мл при отрицательном результате и 72,7 (42,8-100,0) мкг/мл - при наступлении беременности. Представленные данные демонстрируют отсутствие статистически значимых различий в отношении частоты наступления клинической беременности и уровня PG E₂ (p=0,77) (рис. 16).

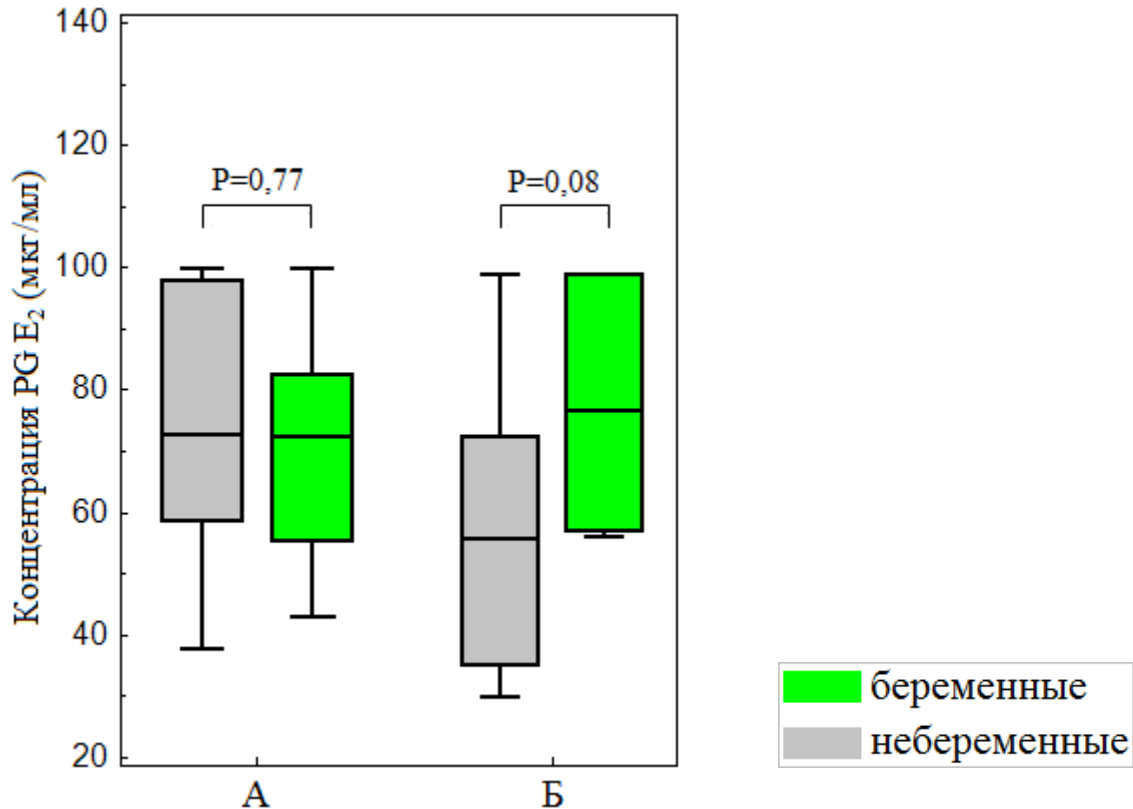


Рисунок 16. Концентрация простагландина E₂ (PG E₂) (мкг/мл) в семенной плазме партнера пациенток групп с половыми контактами (А) и без (Б) в подгруппах с отсутствием и наступлением беременности

В группе с рекомендованным воздержанием во время лечения медианное значение PG E₂ составило 56,3 (29,8-100,0) мкг/мл при отрицательном результате беременности, 77,3 (56,6-100,0) мкг/мл в группе с наступлением беременности, отмечена тенденция к повышению содержания PG E₂, но уровень достоверности различий не был достигнут (p=0,08) (рис. 16).

Было проведено сравнение содержания простагландина E_2 в семенной плазме партнеров пациенток с наступившей беременностью между группами с половыми контактами и без во время лечения бесплодия, статически достоверных отличий выявлено не было ($p=0,45$).

Далее проанализировали содержание простагландина E_2 в СП партнера пациенток с отрицательным результатом лечения между группами с половыми контактами и без, что также не дало статически достоверных различий ($p=0,05$), но отмечалась тенденция к повышению уровня PG E_2 в СП партнера пациенток, с отсутствием беременности при рекомендованных половых контактах во время протокола ВРТ.

Таким образом, не было выявлено зависимости исходов лечения бесплодия от содержания простагландина E_2 в семенной плазме.

3.15. Зависимость состояния клеточного звена иммунитета пациенток и исходов программы ВРТ

Следующим этапом исследования стало решение вопроса о механизмах влияния СП на имплантацию эмбриона. В последнее время получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что для успешной имплантации необходима аккумуляция циркулирующих тимических регуляторных Т клеток (Трег) в матке и дренирующих матку лимфоузлах [134]. Ранее нами было показано, что цитокины СП при половых контактах в программе ВРТ могут влиять на локальную аккумуляцию циркулирующих Трег, что в свою очередь отражается на содержании Трег в периферической крови [134]. Поэтому была проведена оценка уровня Трег в периферической крови с позиции прогнозирования наступления беременности, а также выявление зависимости между содержанием Трег в периферической крови и уровнем цитокинов в СП в группе с рекомендованными половыми контактами во

время лечения и в группе без них. Оценивалось содержание Трег (Treg) с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$ лимфоцитов периферической крови в день трансвагинальной пункции фолликулов.

На рисунке 17 представлены данные об уровне Трег в подгруппах с наступившей беременностью и ее отсутствием в группе с половыми контактами во время лечения.

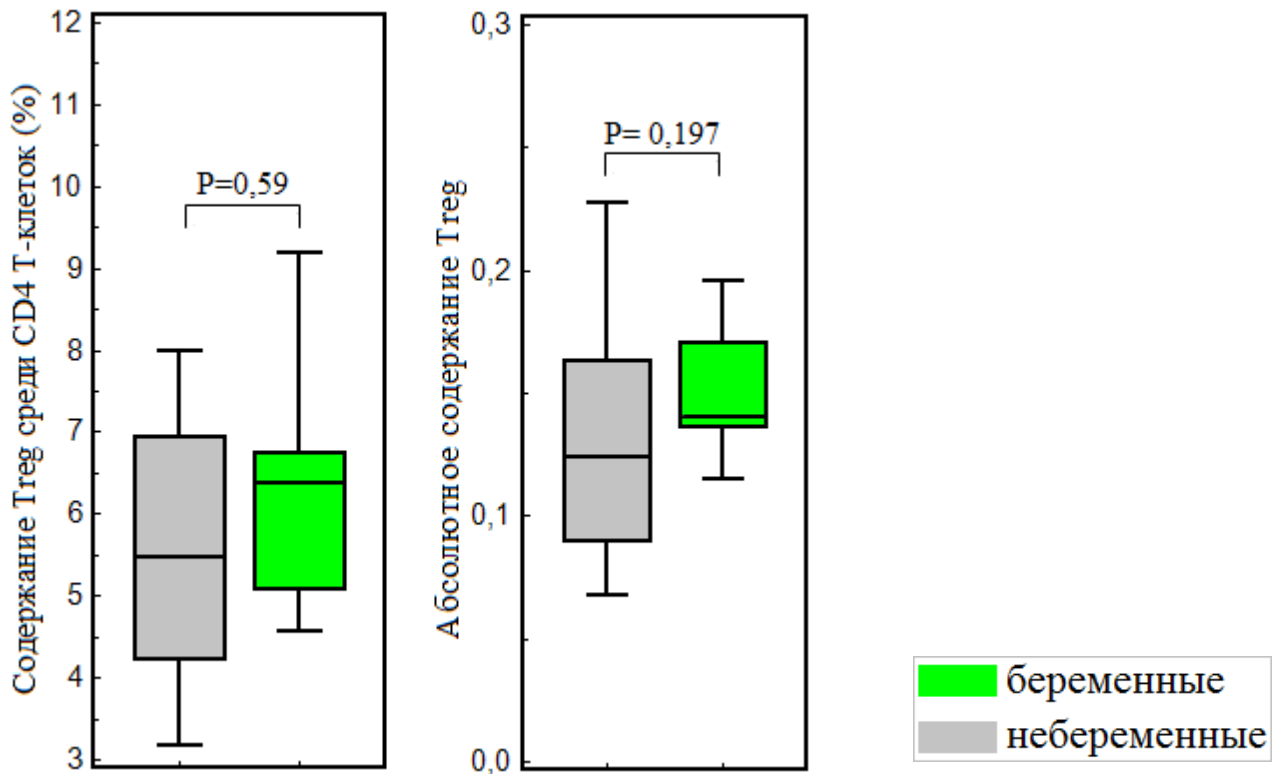


Рисунок 17. Процентное и абсолютное содержание регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток в группе с половыми контактами при отсутствии и наступлении беременности

Медианное значение процентного содержания Трег составило 5,47 (3,17-7,98) % в подгруппе с отсутствием беременности и 6,40 (4,56-9,18) % в подгруппе с наступившей беременностью ($p=0,59$). Что касается абсолютного содержания Трег в периферической крови медианное значение оказалось равным 0,12 (0,07-0,23) $\times 10^6/\text{мл}$ и 0,14 (0,11-0,20) $\times 10^6/\text{мл}$ для групп с отрицательным и положительным результатом лечения соответственно ($p=0,197$) (рис. 17).

А значит, зависимости наступления беременности от уровня Трег в периферической крови в группе с половыми контактами во время программы ВРТ выявлено не было.

Далее анализировали данные группы с рекомендованным воздержанием во время лечения бесплодия (рис. 18).

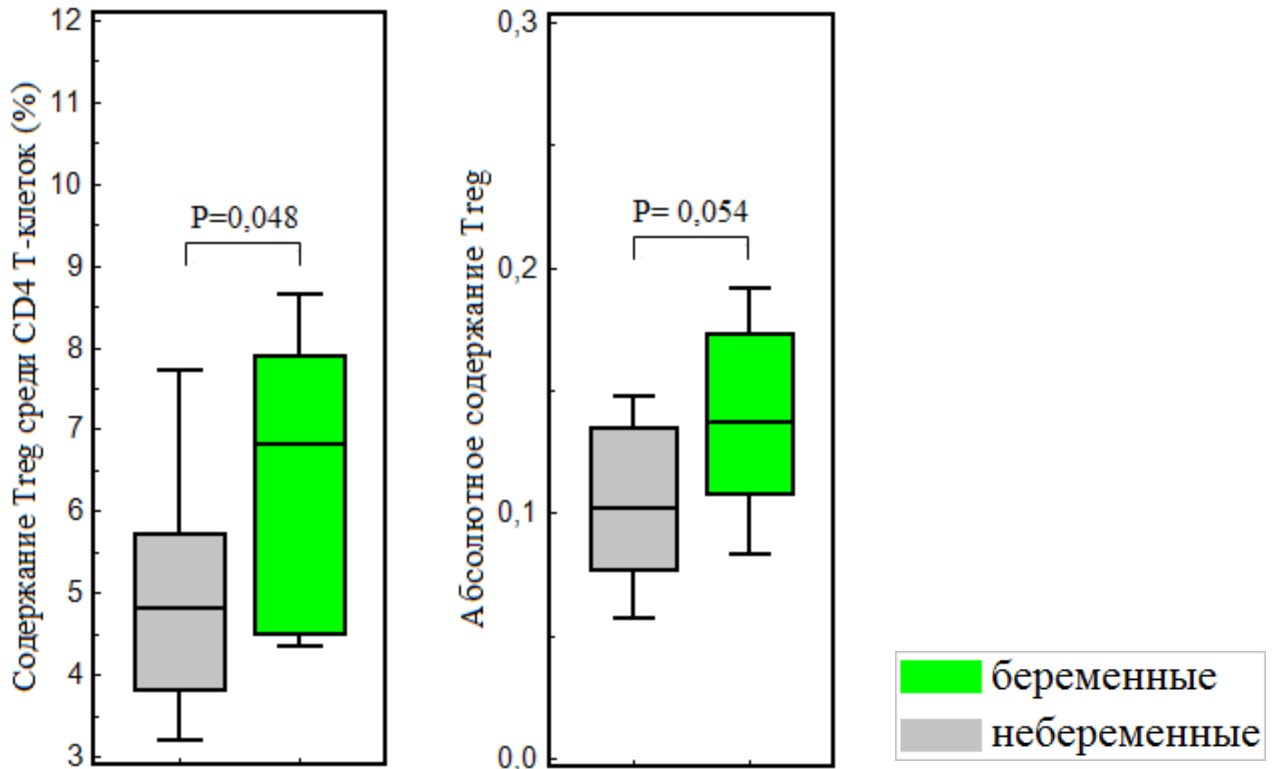


Рисунок 18. Процентное и абсолютное содержание регуляторных Т клеток в периферической крови пациенток в группе без половых контактов при отсутствии и наступлении беременности

У пациенток подгруппы с успешным исходом лечения в день ТВП было выявлено повышение содержания Трег клеток по сравнению с аналогичным показателем у женщин, у которых беременность не наступила, - медиана составила 6,85 (4,34-8,64)% и 4,85 (3,2-7,73)%, соответственно ($p=0,048$). При оценке содержания абсолютного числа Трег в периферической крови группы с воздержанием также были выявлены близкие к достоверным различия ($p=0,054$).

Медианное значение для подгруппы с положительным исходом лечения было выше по сравнению с группой с отсутствием беременности и равнялось 0,14 (0,08-0,19) $\times 10^6$ /мл и 0,1 (0,06-0,15) $\times 10^6$ /мл, соответственно (рис. 18).

Полученные результаты демонстрируют зависимость наступления беременности от состояния клеточного звена иммунитета пациенток в группе без половых контактов во время лечения бесплодия. Выявлено статически значимое повышение уровня Трег клеток (%) с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$ лимфоцитов периферической крови в день ТВП у женщин с наступившей беременностью и рекомендованным воздержанием во время программы ВРТ.

Нами был проведен ROC – анализ прогностической значимости определения процентного содержания Трег клеток с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$ лимфоцитов периферической крови в день ТВП для наступления беременности у пар с воздержанием во время программы ВРТ. Установлено, что процентное содержание Трег клеток является одним из предикторов успеха программы ВРТ. Площадь под ROC - кривой составила $0,724 \pm 0,131$ (95% ДИ 0,494-0,890), порог отсечки $> 6,6$ %, чувствительность 57,1 %, специфичность 93,3 %, положительная прогностическая ценность 80,0 %, отрицательная 82,4 %.

Таким образом, повышение содержания Трег клеток с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$ лимфоцитов периферической крови в день ТВП более 6,6 % является позитивным прогностическим фактором успешной имплантации у супружеских пар с воздержанием во время программы ВРТ.

3.16. Зависимость состояния клеточного звена иммунитета пациенток в день трансвагинальной пункции от цитокинового профиля семенной плазмы

Следующим этапом работы стал поиск корреляционной зависимости содержания Трег клеток с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$

лимфоцитов периферической крови в день ТВП от цитокинового профиля СП для группы без половых контактов во время лечения бесплодия. Обнаружена прямая корреляционная связь между содержанием Treg клеток (%) и концентрацией IL-10 (пг/мл) в СП ($r=0,429$; $p=0,067$), а также концентрацией TNF α (пг/мл) в СП ($r=0,543$; $p=0,016$) (рис. 19). А значит, что с увеличением содержания IL-10 и TNF α в СП партнера связан высокий уровень Treg клеток (%) в крови женщин, и как следствие является положительным прогностическим признаком исходов программы ВРТ. В ходе корреляционного анализа между уровнем Treg и PG E₂ не было выявлено статически значимых различий ($p>0,05$).

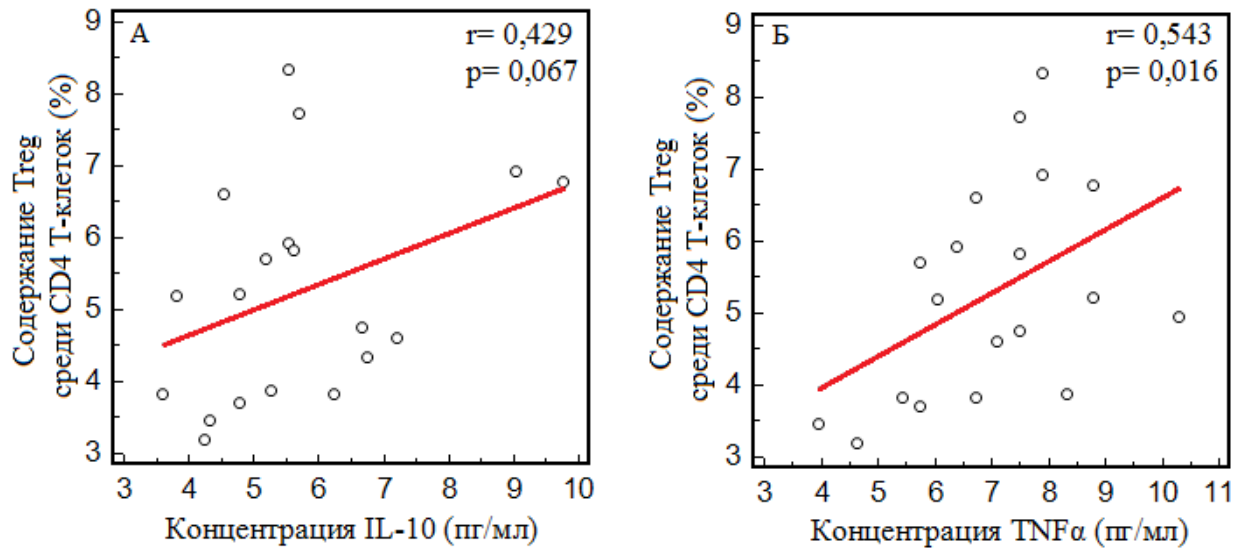


Рисунок 19. Корреляционная зависимость процентного содержания регуляторных T клеток в периферической крови женщин от концентрации IL-10 и TNF α (пг/мл) в семенной плазме полового партнера в группе без половых контактов во время лечения бесплодия

Полученные данные позволяют нам сделать вывод, что цитокины СП, поступающие во время половых контактов до начала цикла овариальной стимуляции, влияют на клеточное звено иммунитета пациенток, изменяя уровень Treg в периферической крови в день ТВП, что, по-видимому, отражает состояние локального иммунитета репродуктивного тракта женщины и определяет исходы программы ВРТ.

На основании проведенного исследования предложен алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ у супружеских пар с учетом цитокинового профиля СП партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациенток и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции (рис. 20).

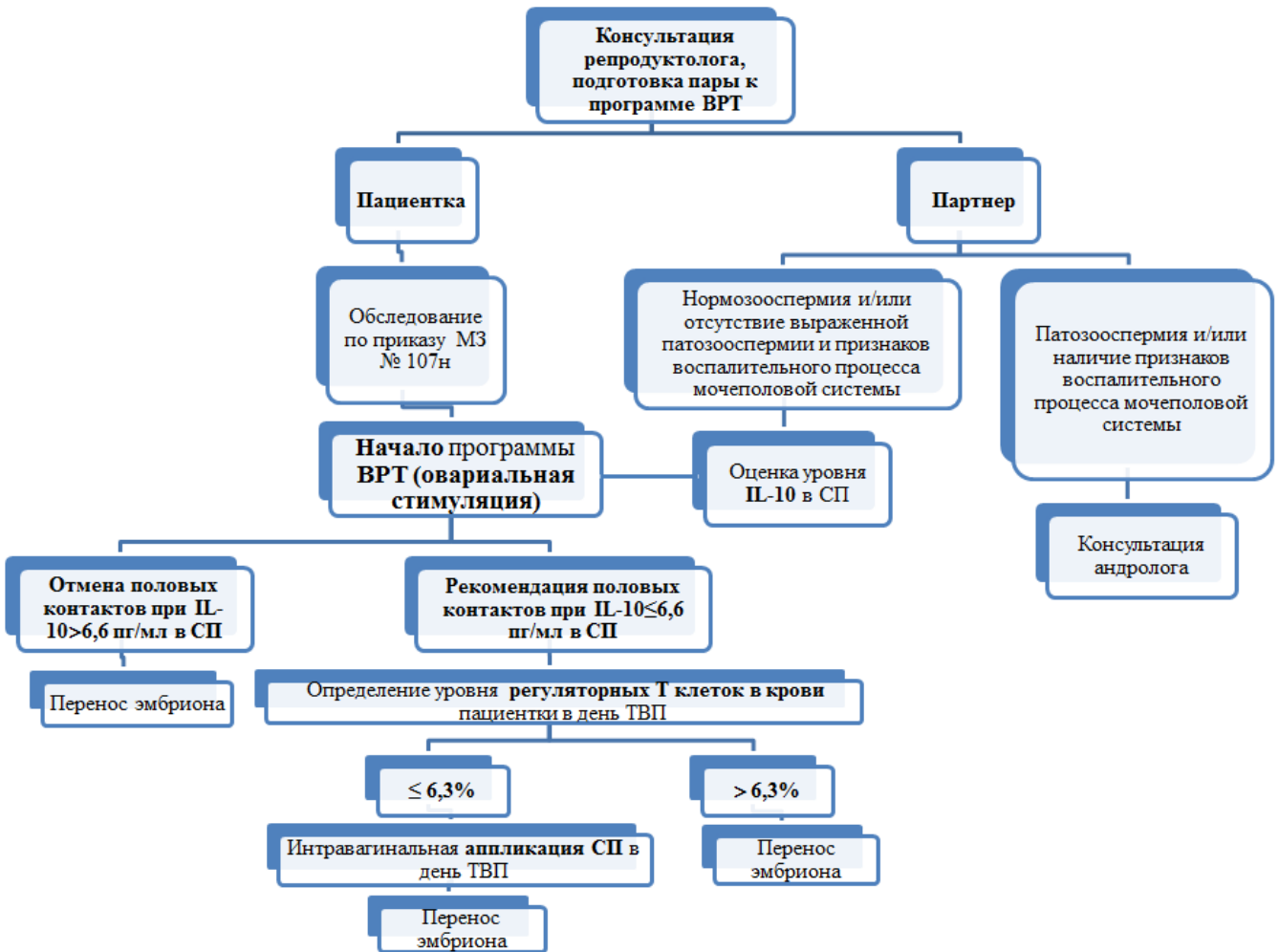


Рисунок 20. Алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ с учетом цитокинового профиля СП партнера, уровня регуляторных Т клеток в крови пациенток и режима половых контактов в цикле овариальной стимуляции

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Семенная плазма часто рассматривается в качестве транспортной среды для сперматозоидов в женских половых путях, однако в последнее время накоплено множество данных, подтверждающих важную роль СП в регуляции репродуктивного здоровья женщины. Интерес представляет тот факт, что СП содержит ряд сигнальных молекул, которые взаимодействуют с клетками женских репродуктивных тканей, готовя матку к оплодотворению и имплантации. Следует отметить, что СП индуцирует привлечение лейкоцитов и пролиферацию регуляторных Т клеток, которые обладают иммуносупрессорными свойствами, способствуя имплантации, активации васкуляризации матки и выработке иммунологической толерантности по отношению к плоду. Всё больше появляется сравнительных данных, свидетельствующих о запуске адаптивного иммунного ответа в тканях цервикального канала после полового акта, в ходе которого сперматозоиды, достигая верхних отделов матки, непосредственно воздействуют на эндометрий. Изучение данных реакций организма женщины может иметь практическое значение, в отношении повышения вероятности зачатия при переносе эмбриона при ВРТ [159].

Отсутствие контакта с СП в день ТВП является особенностью программы ВРТ в отличие от естественного цикла зачатия, поэтому неоднократно проводились эксперименты использовать введение СП в женские половые пути при проведении программы ВРТ с целью повышения эффективности лечения. Однако на сегодняшний день убедительных данных о благоприятном влиянии аппликации СП в день ТВП на результативность программы ВРТ получено не было [46].

Очевидно, что клинические эффекты применения СП могут определяться содержанием различных иммуномодулирующих факторов - гормонов, цитокинов и других биологически активных молекул, в избытке присутствующих в СП. Наиболее

значимой иммунорегуляторной молекулой СП является TGF- β 1. Указанный цитокин считается базовым в развитии толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. TGF- β отвечает за развитие посткоитального воспаления, индуцирует супрессорную активность Трег. Введение рекомбинантного TGF- β предотвращало спонтанные аборт у мышей. Установлено, что концентрация TGF- β 1 в СП в пять раз превышает уровень этого цитокина в сыворотке крови, поэтому предполагалось, что содержание TGF- β 1 в СП может определять эффективность наступления беременности в программе ВРТ [156].

Однако в исследовании, проведенном в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова [135], не было выявлено зависимости наступления беременности от содержания TGF- β 1 в СП в протоколе ВРТ, включающем интравагинальное введение СП в день ТВП, в то же время было впервые установлено, что высокая концентрация IL-18 приводит к резкому снижению вероятности наступления беременности [135; 1]. При введении СП с низким содержанием IL-18 наступление беременности наблюдалось в 61,2% случаев, а при высоком содержании - в 9,1 % [135]. Дискутабельным оставалась связь положительного/отрицательного эффектов с аппликацией СП в день ТВП, и выявленная зависимость наступления беременности от уровня цитокинов в СП сохранится и при поступлении СП при обычных половых контактах в цикле овариальной стимуляции. Указанная работа была ограничена исследованием лишь двух цитокинов СП.

Поэтому наше исследование было направлено на выяснение взаимосвязи эффективности лечения бесплодия методом ВРТ от комплекса иммунных факторов семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт женщин при половых контактах. Для этого было сформировано две группы. Первую составили пациенты с рекомендованными половыми контактами во время программы ВРТ, второй группе назначено воздержание в период проведения овариальной стимуляции. Каждая группа распалась на две подгруппы в зависимости от наступления или отсутствия

клинически подтвержденной беременности. При анализе клинико-анамнестических данных пациенток исследуемых групп и внутри подгрупп статистически значимых различий не выявлено, что говорит об однородности и сопоставимости анализируемых параметров. Все пациенты отвечали критериям включения и исключения. При анализе основных показателей спермограммы половых партнеров не было отмечено статистически значимых меж- и внутригрупповых различий в концентрации, подвижности, числе морфологически патологических форм сперматозоидов и лейкоцитов.

Частота наступления клинической беременности в первой группе составила 25,0%, во второй – 33,3%. Полученные результаты демонстрируют отсутствие статистически значимых различий в отношении частоты наступления клинической беременности в исследуемых группах ($p=0,92$), а значит не выявлено зависимости наступления беременности от наличия или отсутствия половых контактов в цикле лечения бесплодия.

Ранее было показано, что половая жизнь в перитрансферный период при проведении программы ЭКО благоприятно влияет на результаты лечения [199]. В то же время в исследовании А. Aflatoonian и соавторов были показаны обратные результаты. Полученные авторами данные продемонстрировали отсутствие статистически значимой разницы в частоте наступления беременности у пациенток, ведущих активную половую жизнь за 12 часов до переноса эмбриона, и женщин, которым рекомендовалось воздержание [10].

Вероятно, как наши собственные данные, в которых не учитывался состав СП, так и данные предыдущих исследований, не смогли подтвердить зависимость эффективности программы ВРТ от контакта с СП [62; 199].

Очевидно, что успешность влияния СП на репродуктивный тракт женщины может определяться содержанием иммунорегуляторных молекул - цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, простагландинов. При контакте семенной плазмы с

эпителием женщины имеет место масштабная активация множественных путей экспрессии генов, приводящая к выработке антиспермальных антител и цитокинов провоспалительного ряда [102]. Экспрессия более 700 генов, которые в ткани эктоцервикса изменяются после коитуса и задействованы в процессах презентации провоспалительных антигенов, а также экспрессии цитокинов и хемокинов, участвующих в рекрутировании и активации таких клеток иммунной системы, как Т-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [180; 183]. Индуцируемые семенной жидкостью изменения экспрессии генов и наблюдаемый ответ на клеточном уровне известны как лейкоцитарная реакция [142; 195; 161].

В многочисленных работах показано, что имплантация и самые ранние стадии первого триместра физиологической беременности протекают на фоне воспаления [167; 48], а избыточные противовоспалительные реакции могут препятствовать наступлению беременности.

Таким образом, СП - стимулятор каскада событий, результатом которых является усиление эндогенной экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, способствующих созданию благоприятного иммунологического фона для имплантации эмбриона, децидуализации эндометрия и формирования плаценты. Развитие воспалительных реакций является также важнейшим условием индукции толерантности материнской иммунной системы к антигенам плода, которая обеспечивает защиту полуаллогенного плода, несущего чужеродные антигены отца, от отторжения [8].

Основным параметром клеточного иммунитета, определяющим провоспалительную или противовоспалительную направленность иммунных реакций, является функциональное состояние Т-хелперов (Th). Т-хелперы первого типа (Th1), продуцирующие цитокины $IFN\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-2, IL-12p, IL-1b, TNF- β , IL-18, IL-17A стимулируют воспалительные реакции. Т-хелперы второго типа (Th2) продуцируют IL-10, IL-4 и IL-5, препятствуют воспалению.

Поэтому следующим этапом исследования явилась оценка зависимости наступления беременности от уровня содержания цитокинов ($IFN\alpha$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL-12p$, $IL-10$, $IL-1b$, $IL-33$, $IL-23$, $IL-6$, $IL-17A$, $IL-18$, $IL-8$, $MCP1$, $TGF-\beta1$) в СП партнера в группе с половыми контактами в программе ВРТ.

Определение уровня цитокинов в образцах СП было проведено с помощью мультиплексного анализа с использованием проточной цитофлуориметрии у полового партнера пациенток, включенных в исследование. Этот уникальный подход позволил одновременно выявить весь спектр указанных цитокинов, концентрации которых в одном образце СП различаются почти на 6 порядков, и тем самым, дать комплексную оценку цитокинового состава СП.

Было установлено, что в группе с рекомендованными половыми контактами во время лечения выявлено повышение содержания $IL-18$ ($p=0,017$) и снижение содержания $IL-10$ ($p=0,01$) в СП. Наши данные подтверждают, что воздействие СП на исходы программы ВРТ может реализовываться не только при применении аппликации СП в день ТВП, но и при поступлении СП в репродуктивный тракт женщины при предшествующих сексуальных отношениях с биологическим отцом. Полученные ранее данные [135], а также результаты, представленные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что влияние СП на эффективность программы ВРТ определяется как режимом контактов с СП, так и уровнем цитокинов $IL-10$ и $IL-18$ в СП.

Как упоминалось выше, если в день ТВП интравагинально вводилась СП с высокой концентрацией $IL-18$, вероятность наступления беременности резко снижалась, составляя 9,1 % [134]. Мы предполагали, что отмена интравагинального введения СП с высоким уровнем $IL-18$ может нейтрализовать негативный эффект воздействия этого цитокина на имплантацию. То есть ожидаемый эффект должен реализоваться в протоколе овариальной стимуляции с рекомендованными половыми контактами, при котором введение СП в день ТВП не использовалось.

Действительно, в этой группе пациентов при повышенном содержании IL-18 в СП наблюдалось существенное увеличение частоты наступления беременности, составившей 83,3%, что превышает средние значения частоты наступления беременности при использовании методов ВРТ.

В то же время при относительно низком содержании IL-18 наблюдалось резкое снижение частоты наступления беременности до 13% в группе пациентов с половыми контактами во время лечения. При этом ранее было показано, что при половых контактах в программе ВРТ, дополненных аппликацией СП в день ТВП, у пациентов в группе с низким содержанием цитокина IL-18 в СП беременность наступала в 61,2%.

В литературе упоминают наличие IL-18 в эндометрии человека и фетоплацентарном пространстве при беременности у человека и мышей. Вероятно, тонкая регуляция экспрессии IL-18 крайне важна для нормальной имплантации и ремоделирования децидуальной ткани на ранних сроках беременности. Однако избыточное содержание IL-18 в полости матки в день забора яйцеклеток связано с низким уровнем имплантации [110].

Полученные данные позволяют предположить, что постепенное уменьшение концентрации IL-18, поступившего при сексуальном контакте за 3-4 дня до ТВП, может обеспечивать оптимальную рецептивность эндометрия. Последующая же аппликация СП с повышенным содержанием IL-18 в день ТВП может приводить к избыточной концентрации IL-18 в полости матки в день переноса эмбриона и препятствовать имплантации.

Следовательно, использование персонифицированного режима контакта с СП в программе ВРТ, выбор которого зависит от цитокинового профиля, может существенно повысить эффективность лечения.

Важным атрибутом цитокинового звена иммунитета является взаимозависимость цитокинов и их функций. Они не действуют изолированно, а

взаимодействуют внутри цитокиновой сети, усиливая или противодействия друг другу. То есть изменение одного конкретного цитокина может сопровождаться повышенной или пониженной экспрессией других. Для характеристики особенностей цитокинового профиля, предопределяющего исходы ВРТ, нами была использована одна из моделей множественной линейной регрессии - алгоритм CART.

Согласно данным CART-анализа всего множества предикторов, включая соотношения цитокинов, отражающих состояние Th1/Th2 баланса, содержание IL-18 и IL-10 в эякуляте являются главными предикторами прогнозирования исхода лечения методом ВРТ с рекомендованными половыми контактами. Нами установлено, что частота наступления беременности при относительно высоком уровне Th1/Th2 баланса цитокинов в СП была существенно выше по сравнению с группой пациенток, у полового партнера которых отмечался относительно низкий уровень этого показателя.

В многочисленных работах показано, что имплантация и самые ранние стадии первого триместра физиологической беременности протекают на фоне воспалительных реакций [167; 48], а избыточные противовоспалительные реакции могут препятствовать наступлению беременности.

Полученные нами данные согласуются с представлениями о том, что цитокины в СП могут вносить существенный вклад в формирование микроокружения, обеспечивающего имплантацию эмбриона, что обеспечивается уникальной системой быстрого транспорта компонентов СП путем их облегченной диффузии из лимфатических и венозных сосудов в артериальную систему матки [40]. Контакт пациенток с СП с высоким уровнем IL-10 и низким уровнем Th1/Th2 баланса может снижать вероятность наступления беременности, в то же время в группе пациентов со сбалансированным содержанием цитокинов в СП

частота наступления беременности может существенно превышать усредненный показатель для программы ВРТ, составляющий 30-40%.

Особый интерес представляют вопросы о причинах формирования дисбаланса СП и о механизмах действия компонентов СП, снижающих вероятность наступления беременности.

Причины повышения концентраций IL-18 и IL-10 в СП остаются неизученными. По данным литературы концентрация IL-18 может быть увеличена в СП при урогенитальных инфекциях [122; 148]. Однако воспалительные заболевания репродуктивного тракта как у мужчин, так и у женщин являлись критериями исключения в нашей работе. Не было выявлено различий в содержании лейкоцитов в СП в группах пациентов. Хотелось бы отметить, что для оценки содержания лейкоцитов в нашей работе использовался объективный метод проточной цитофлуориметрии, позволяющий с высокой точностью оценивать содержание лейкоцитов и клеток сперматогенеза в образцах спермы [75]. Полученные данные могут свидетельствовать, что возможной причиной дисбаланса цитокинов в СП может быть психоэмоциональный стресс, вызванный бесплодием и усиливающийся на фоне самого лечения [76].

Цитокин IL-18 является одним из ключевых иммунных маркеров стресса, уровень которого резко повышается при стимуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы [191]. Установлено, что адренкортикотропный гормон (АКТГ) стимулирует продукцию неактивного предшественника про-IL-18, который, в свою очередь, превращается в активную форму с помощью IL-1 β -конвертирующего фермента (каспазы-1), активность которого десятикратно возрастает при психоэмоциональном стрессе [175].

Считается, что IL-10 также является стресс зависимым цитокином, повышение уровня которого отмечают и при отсутствии урогенитальных инфекций. Исследование, опубликованное в журнале *Brain, Behavior, and Immunity*, указывает,

что путь IL-10 / STAT3 может играть ключевую роль в иммуносупрессии, вызванной хроническим стрессом. Медиаторы стресса, в частности катехоламины, являются мощными индукторами IL-10 [59; 205].

Поэтому мы считаем обоснованным предположение, что накопление в СП ключевых гормональных и иммунных факторов, участвующих в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях, индуцируемых стрессорными реакциями [191], могут блокировать физиологические реакции женского репродуктивного тракта на введение СП, снижая тем самым вероятность наступления беременности. Негативные эффекты стресса, опосредованные усилением синтеза кортизола при активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, на сперматогенез и функции сперматозоидов являются предметом многочисленных исследований [89]. Эффекты стресса на уровень цитокинов в семенной плазме, а также зависимость репродуктивной функции женщины от обусловленных стрессом иммуно-эндокринных изменений у полового партнера, не изучались ни в нашей стране, ни за рубежом.

Известно, что характер иммунных реакций может отличаться при остром и хроническом стрессе. При остром психологическом стрессе наблюдается преобладание воспалительных реакций, которые сопровождаются увеличением содержания Th1 провоспалительных цитокинов как в различных структурах гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, так и в сыворотке крови. Исследования эффектов хронического стресса выявили сдвиг Th1/Th2 баланса в сторону Th2, то есть обнаружили усиление противовоспалительных реакций [76].

Ранее было показано, что при введении СП в день ТВП негативное влияние на эффективность ВРТ оказывал повышенный уровень IL-18 – маркера острого стресса [1;135]. Возможно, совокупный эффект введения в репродуктивный тракт женщины в день ТВП повышенных количеств стресс-зависимых компонентов СП (как провоспалительных цитокинов, так и гормонов - кортизола, тестостерона,

дегидроэпиандростерона) оказывает негативное влияние как на состояние локального иммунитета, так и на рецептивность эндометрия.

Было установлено, что повышение концентрации IL-18 в СП нарушает миграцию Трег в предимплантационный период, снижая при этом вероятность наступления беременности в программе ВРТ [134]. Также было обнаружено, что IL-1 β ингибирует экспрессию генов HOXA10 децидуальными клетками, препятствуя имплантации эмбриона [170]. Экспериментальные данные подтвердили негативный эффект повышенной концентрации тестостерона на имплантацию [52].

Ранее была выявлена высокая частота острого стресса у пациентов при сдаче спермы путем мастурбации в условиях клиники [60], при этом отмечалось резкое снижение показателей спермограммы по сравнению с группой пациентов, сдававших сперму в домашних условиях. Поэтому вероятность стресс-зависимого изменения состава СП при этой ситуации также достаточно высока. Полученные данные позволяют предположить, что введение в день ТВП семенной плазмы, полученной от партнеров в состоянии острого психологического стресса, является неблагоприятным фактором для наступления беременности.

Результаты, полученные в группе с рекомендованными половыми контактами в цикле овариальной стимуляции, свидетельствуют о том, что негативное влияние СП на наступление беременности может быть обусловлено состоянием хронического стресса, маркером которого является повышенный уровень IL-10 и сниженный уровень Th1/Th2 баланса. Было установлено, что соотношения IFN α /IL-10, IL-18/IL-10, IL-12/IL-10, IL-33/IL-10, IL-8/IL-10, TNF α /IL-10 в группе с половыми контактами были существенно ниже при отсутствии беременности, чем при наступлении (рис. 5). При этом низкий уровень соотношений IL-18/IL-10 в СП являлся достоверным предиктором отрицательных результатов ВРТ.

Состояние острого стресса при половых контактах в этой группе пациентов маловероятно, и, по-видимому, определяющим фактором, негативно влияющим на

наступление беременности в этой группе пациентов, являются изменения СП, обусловленные состоянием хронического стресса и, соответственно, избытком IL-10.

IL-10 является цитокином с плеiotропным действием на многие иммунные клетки. Например, IL-10 модулирует функцию антигенпрезентирующих клеток путем ингибирования фагоцитоза, подавления экспрессии главного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул и уменьшения продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов [140]. Кроме того, IL-10 напрямую ингибирует дифференцировку Th-клеток и поддерживает подавляющую активность Treg-клеток. Предполагается, что секреция IL-10 трофобластом может влиять на экспрессию молекул I класса HLA в зоне плодово-материнского взаимодействия, что снижает уровень иммунного ответа и таким образом защищает плод от отторжения [128].

Повышение концентрации IL-10, обладающего мощным противовоспалительным эффектом, может блокировать посткоитальную реакцию, нарушая тем самым иммунорегуляцию процесса имплантации.

Более того, кроме простого ингибирования синтеза провоспалительных цитокинов, IL-10 может действовать как фактор, препятствующий имплантации с помощью ряда различных механизмов. Во-первых, IL-10 угнетает секрецию хемотаксических белков эпителиальными клетками и макрофагами [138], что может препятствовать развитию посткоитальной воспалительной реакции, необходимой для адаптации к беременности [183]. Во-вторых, IL-10 может негативно влиять на начальную стадию имплантации, ингибируя прикрепление бластоцисты к эндометрию через подавление адгезии межклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM-1) [189].

Кроме того, антиимплантационный эффект IL-10 может быть реализован посредством блокирования выработки литических ферментов, продуцируемых

моноцитами, таких, как матрикс-металлопротеиназы [103], которые могут играть ключевую роль во взаимоотношениях эмбриона и эндометрия.

В случае существования стресс зависимых изменений цитокинового спектра СП эффективным терапевтическим подходом может оказаться использование психологической помощи. Ранее было показано, что проведение психотерапии пациентам перед вступлением в программу ВРТ существенно уменьшает уровень стресса и, соответственно, увеличивает вероятность наступления беременности [4; 5; 163].

Однако, с нашей точки зрения, наиболее эффективным подходом может явиться ограничение половых контактов с партнером, у которого выявлен дисбаланс цитокинов, препятствующий наступлению беременности. Анализ влияния цитокинового состава СП на женщин, у которых половые контакты прекращались перед менструацией накануне цикла овариальной стимуляции, подтвердил это предположение. Была выявлена взаимосвязь между содержанием цитокинов и наступлением беременности в группе, где половые контакты прекращались перед началом менструации у пациенток, вступающих в программу ВРТ. Было установлено, что концентрация $IFN\alpha$, $IL-12p$ и $IL-10$ в СП, являются наилучшими предикторами прогнозирования исходов ВРТ в данной группе. Отмена половых контактов в группе пациентов с высоким содержанием $IFN\alpha$, $IL-12p$ и $IL-10$ и низким уровнем соотношений $IL12/IL10$ и $TNF\alpha/IL10$ – иммунологических показателей, отражающих состояние $Th1/Th2$ баланса при хроническом стрессе, приводила к существенному повышению частоты наступления беременности.

Таким образом, в группе с повышенным содержанием цитокина $IL-10$ рекомендованное воздержание во время лечения в 9 раз повышало вероятность наступления беременности по сравнению с группой с половыми контактами (рис. 15).

Полученные нами данные однозначно свидетельствуют о существенном влиянии СП на эффективность ВРТ. В зависимости от содержания целого ряда цитокинов СП, а также от режима половой жизни в цикле овариальной стимуляции, может наблюдаться как положительное влияние СП на имплантацию эмбриона, так и резкое снижение частоты наступления беременности. В совокупности анализ индивидуального статуса цитокинов СП представляет собой многообещающий персонализированный подход к повышению эффективности лечения бесплодия с помощью выбора режима половой отношений в программе ВРТ. Однако необходимо отметить, что в нашем исследовании состав СП анализировался в день ТВП, в то же время для персонализированного назначения режима половой жизни в программе ВРТ информация о цитокиновом составе СП должна быть получена перед началом овариальной стимуляции, то есть в 1-3 день менструального цикла женщины. Поэтому нельзя исключить, что цитокиновый состав СП, полученной за две недели до ТВП, может отличаться.

Действительно, параметры цитокинового статуса СП существенно колеблются в ответ на множество факторов [181]. Анализ спермы показывает внутреннюю изменчивость параметров спермы у отдельных мужчин, а также на уровне популяции [141]. Количество, структура и функция сперматозоидов зависят от возраста [88] и периода воздержания [80], а также от образа жизни, факторов питания, профессии, воздействия окружающей среды и инфекции, а также от генетики [186]. Существенно менее изученной является проблема изменчивости семенной плазмы. Установлено влияние на состав СП курения [129], алкоголя, вредных воздействий окружающей среды [204; 118], несбалансированного питания [61; 147].

Очевидно, что стратегия использования оценки содержания цитокинов для персонализации режима половой жизни в программе ВРТ возможна только в случае низкого уровня вариабельности цитокинов в СП пациента. Поэтому одним из этапов

нашей работы стало выявление изменений цитокинового состава семенной плазмы с течением времени у одного и того же мужчины в ходе программы ВРТ. Была проведена оценка вариабельности уровня цитокинов СП, полученной в двух временных точках: в начале менструального цикла пациентки и в день ТВП. Низкая вариабельность отмечалась у $IFN\alpha$ и $IL-10$, умеренная - $IFN\gamma$, $IL-12$, $IL-33$, $IL-17$, MCP и сильная вариабельность - $IL-6$, $IL-23$, $IL-8$, $IL-18$, $TNF\alpha$, $IL-1b$. Таким образом, на небольшой выборке пациентов нами подтверждена низкая вариабельность $IL-10$, который, согласно полученным данным, является ключевым цитокином, имеющим прогностическое значение в двух использованных нами вариациях программы ВРТ.

Таким образом, выявленные взаимосвязи между иммуномодулирующими свойствами СП полового партнера пациенток и частотой наступления беременности позволяют оптимизировать программу ВРТ с помощью выбора режима половой жизни в период лечения.

Нами установлено, что противовоспалительный цитокин $IL-10$ является ключевым фактором СП, препятствующим наступлению беременности в программе ВРТ с рекомендованными половыми контактами, а их отмена в цикле овариальной стимуляции у пациентов с преобладанием $IL-10$ в СП приводит к резкому повышению эффективности лечения.

Оптимальным показателем, позволяющим персонифицировать режим половой жизни в цикле ВРТ, является содержание противовоспалительного цитокина $IL-10$ в СП. В ходе ретроспективного анализа данных определено, что при содержании $IL-10 \leq 6,6$ пг/мл в СП частота наступления беременности 42,1%, следовательно, целесообразным является рекомендация половых контактов в цикле стимуляции. При относительно высоком содержании $IL-10 > 6,6$ пг/мл и отмене половых контактов частота наступления беременности достигла 85,7 %

Однако с учетом высоких рисков варьирования параметров спермы требуется проведение дополнительного исследования, подтверждающего стабильность определенного нами прогностического показателя.

На следующем этапе нашей работы мы сравнили содержание простагландина E_2 в СП между и внутри групп. Статистически достоверных различий выявлено не было. Однако в группе с рекомендованным воздержанием при успешном результате лечения отмечена тенденция к повышению содержания PG E_2 в СП ($p=0,08$).

Имплантация эмбриона начинается с контакта бластоцисты и эндометрия с последующим ее прикреплением к поверхности эндометрия [48]. Этот процесс имеет сходство с «открытой раной», требующей сильного воспалительного ответа [127]. Значительное количество провоспалительных T1-клеток и цитокинов, включая IL-8 и IL-6, характеризуют раннюю имплантацию [83; 207]. Кроме того, повышенные уровни PG E_2 обнаруживаются в зонах избыточной проницаемости сосудов эндометрия, связанных с началом имплантации, что позволяет предположить, что PG E_2 играет важную роль во время имплантации [96].

Среди простагландинов PG E_2 считается особенно важным для имплантации и децидуализации [111]. PG E_2 глубоко вовлечен в иммунную систему и играет существенную роль в дифференцировке T-клеток, Chizzolini и Brembilla [38] дают краткий обзор роли PG E_2 в дифференцировке T-клеток. При захвате патогенов дендритные клетки высвобождают воспалительные цитокины, но PG E_2 оказывает ингибирующее действие на высвобождение последних [85].

Одним из механизмов влияния цитокинов СП на репродуктивную функцию женщины может быть их влияние на характеристики локального иммунитета, определяющего эффективность процесса имплантации эмбриона. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся животных моделей, указывают на роль Трег во время имплантации, которая может быть гораздо более весомой, чем на более поздних стадиях беременности [92; 184; 210; 174]. Полагают, что миграционная

способность Трег имеет решающее значение для их регуляторной функции во время периода имплантации [209; 134].

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что введение СП в репродуктивный тракт женщины вызывает активный воспалительный ответ, который является необходимым для наступления беременности у некоторых видов животных [28] и человека [183]. СП вызывает локальную посткоитальную экспансию регуляторных Т клеток в женском репродуктивном тракте и дренирующих лимфоузлах экспериментальных животных. Регуляторные Т клетки представляют собой субпопуляцию CD4⁺ Т клеток, которые экспрессируют специфический фактор транскрипции, Foxp3 [168; 81], и играют ключевую роль в супрессии чрезмерного воспалительного ответа, а также в формировании иммунологической толерантности [168]. Более того, эксперименты, проведенные на мышах [14; 209; 92; 184] и с участием человека [171; 188; 196], продемонстрировали, что регуляторные Т клетки важны для коррекции необходимого для успешной беременности иммунного ответа на отцовские антигены и антигены плода.

Транскриптомный анализ показал, что СП содержит биоактивные факторы, способные вызывать хемотактические реакции в матке, приводящие к привлечению лейкоцитов в ткань эндометрия [36]. Некоторые исследования определяют трансформирующий фактор роста TGF- β 1 в качестве ключевого игрока в индукции, развитии и контроле за локальным воспалительным процессом, индуцированным семенной плазмой. TGF- β вызывает выброс гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF, активируя тем самым GM-CSF-зависимую миграцию миелоидных клеток [198; 183], которые в свою очередь могут участвовать в привлечении CD4⁺CD25⁺ Т клеток благодаря продукции хемокинов [33]. Установлено, что Трег экспрессируют хемокиновый рецептор CCR7 [206], обеспечивающий миграцию клеток в матку [192] и их взаимодействие с соответствующим лигандом CCL19, локализованном на поверхности железистого и

покровного эпителия матки [72]. При отсутствии экспрессии CCR7 регуляторными клетками наблюдается нарушение имплантации [192].

Ранее показано, что в программе ВРТ, включающей половые контакты вплоть до 3-5 дня до ТВП вместе с интравагинальной аппликацией СП в день ТВП, влияние СП, благоприятной по составу цитокинов на наступление беременности, может привести к своевременным иммуно-эндокринным взаимодействиям, предназначенным для контроля воспалительного статуса эндометрия на стадии имплантации. Этот контроль над воспалением опосредуется через перераспределение Трег, проявляющиеся снижением их частоты циркуляции [134].

Поэтому на основании данных литературы и поставленных задач, нами был проведен анализ клеточного звена иммунитета пациенток. Выявлено, что повышение содержания Трег клеток с фенотипом ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$) среди $CD4^+$ лимфоцитов периферической крови в день ТВП более 6,6 % является позитивным прогностическим фактором успешной имплантации у супружеских пар с воздержанием во время программы ВРТ.

Для группы без половых контактов во время лечения бесплодия обнаружена прямая корреляционная связь между содержанием Трег клеток (%) и концентрацией IL-10 (пг/мл) в СП, а также концентрацией TNF α (пг/мл) в СП. А значит, с увеличением содержания IL-10 и TNF-альфа в СП партнера связан высокий уровень Трег клеток (%) в крови женщин и улучшение исходов программы ВРТ.

Установлено, что отмена половых контактов или использование средств барьерной контрацепции в цикле овариальной стимуляции для пациентов с повышенным уровнем как провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-17A, так и цитокина IL-10, приводит к повышению содержания циркулирующих Трег в периферической крови в день ТВП и является предиктором наступления беременности. При содержании IL-12p > 4,0 пг/мл; IFN α > 3,8 пг/мл; IL-10 > 6,6 пг/мл;

IL-33>25,2 пг/мл; IL-17A>26,6 пг/мл частота наступления беременности выше. В то же время при отмене половых контактов у пациентов со сбалансированным содержанием цитокинов в СП низкое содержание Трег в периферической крови сопровождается снижением частоты наступления беременности. Низкий уровень циркулирующих Трег не обеспечивает накопления достаточного количества Трег в эндометрии.

Наши результаты согласуются с данными Zhou et al., в которых авторы утверждают, что существует связь между высоким уровнем периферических Трег в день ТВП с успехом ЭКО / ИКСИ [211].

Таким образом, полученные в нашей работе данные однозначно свидетельствуют о том, что ключевой мишенью воздействия СП на иммунную систему женщины являются регуляторные Т клетки.

Многочисленные данные показывают, что в норме попадание СП в репродуктивный тракт женщины приводит к посткоитальной реакции – миграции миелоидных клеток, Т и В лимфоцитов, а также регуляторных Т клеток в матку и последующее накопление циркулирующих Трег в маточных лимфоузлах. Формирование локального «стратегического запаса» Трег в лимфоузлах может происходить при половых контактах до начала программы ВРТ и сопровождаться снижением содержания Трег в циркулирующей крови (рис.21) При физиологическом зачатии попадание СП в репродуктивный тракт женщины в день овуляции является триггером выброса Трег из лимфоузлов и их миграции в эндометрий. При отсутствии половых контактов и, соответственно, отсутствии выброса Трег из лимфоузлов, низкий уровень циркулирующих Трег не обеспечивает достаточного количества Трег в эндометрии, вследствие чего происходит нарушение иммунорегуляции имплантации.

В случае избыточного содержания в СП цитокинов, подавляющих посткоитальную реакцию, происходит блокирование миграции Трег из

периферической крови в лимфоузлы и сохраняется высокая концентрация их в периферической крови. При этом миграция Трег в эндометрий обеспечивается факторами иммунной и эндокринной систем женщины, что подтверждается научными данными об эффективном наступлении беременности в программах ВРТ у женщин, не имевших контакта с семенной плазмой [166]. Ключевым эндогенным фактором, обеспечивающим локальную аккумуляцию Трег в эндометрии, может являться хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Установлено, что ХГЧ привлекает Трег в плодово-материнское пространство на ранних стадиях беременности у человека через активацию рецептора лютеинизирующего гормона / хорионического гонадотропина на поверхности Трег [72]. Таким образом, сигналами, усиливающими миграцию Трег в область имплантации до переноса эмбриона, могут являться как усиление секреции ХГЧ железистым и покровным эпителием эндометрия в секреторную фазу менструального цикла [212], так и секреция хемоаттрактантов маточным эпителием, индуцируемая ХГЧ [29]. Нельзя исключить, что введение пациенткам триггера финального созревания ооцитов препарата ХГЧ, включенное в стандартную программу ВРТ, может также приводить к активации клеток эндометрия и служить дополнительным фактором, усиливающим синтез хемоаттрактантов и миграцию Трег. Необходимо отметить, что продукция ХГЧ является наиболее ранним эмбриональным сигналом, необходимым для эмбрио-эндометриального взаимодействия. Синтез ХГЧ обнаруживается уже на стадии 2-х клеточного эмбриона [90] и существенно увеличивается при последующих делениях, происходящих перед имплантацией [112]. Влияя на продукцию ХГЧ, эмбрион может осуществлять не только тонкую настройку рецептивности эндометрия, но и стимулировать миграцию Трег в зону имплантации.

Таким образом, попадание цитокинов СП в репродуктивные пути женщины при половых контактах до начала цикла овариальной стимуляции может влиять на

характер перераспределения пула Трег в лечебном цикле, что в свою очередь, определяет эффективность последующих этапов иммунорегуляции имплантации.

Попадание «хорошей» СП в репродуктивный тракт женщины начинает подготовку к беременности задолго до имплантации (период от последнего полового контакта до имплантации эмбриона составляет 19-23 дня), однако отсутствие решающего сигнала – контакта с СП в день ТВП, стимулирующего миграцию Трег в эндометрий, нарушает физиологию репродукции и снижает вероятность имплантации эмбриона (рис. 21 Б).

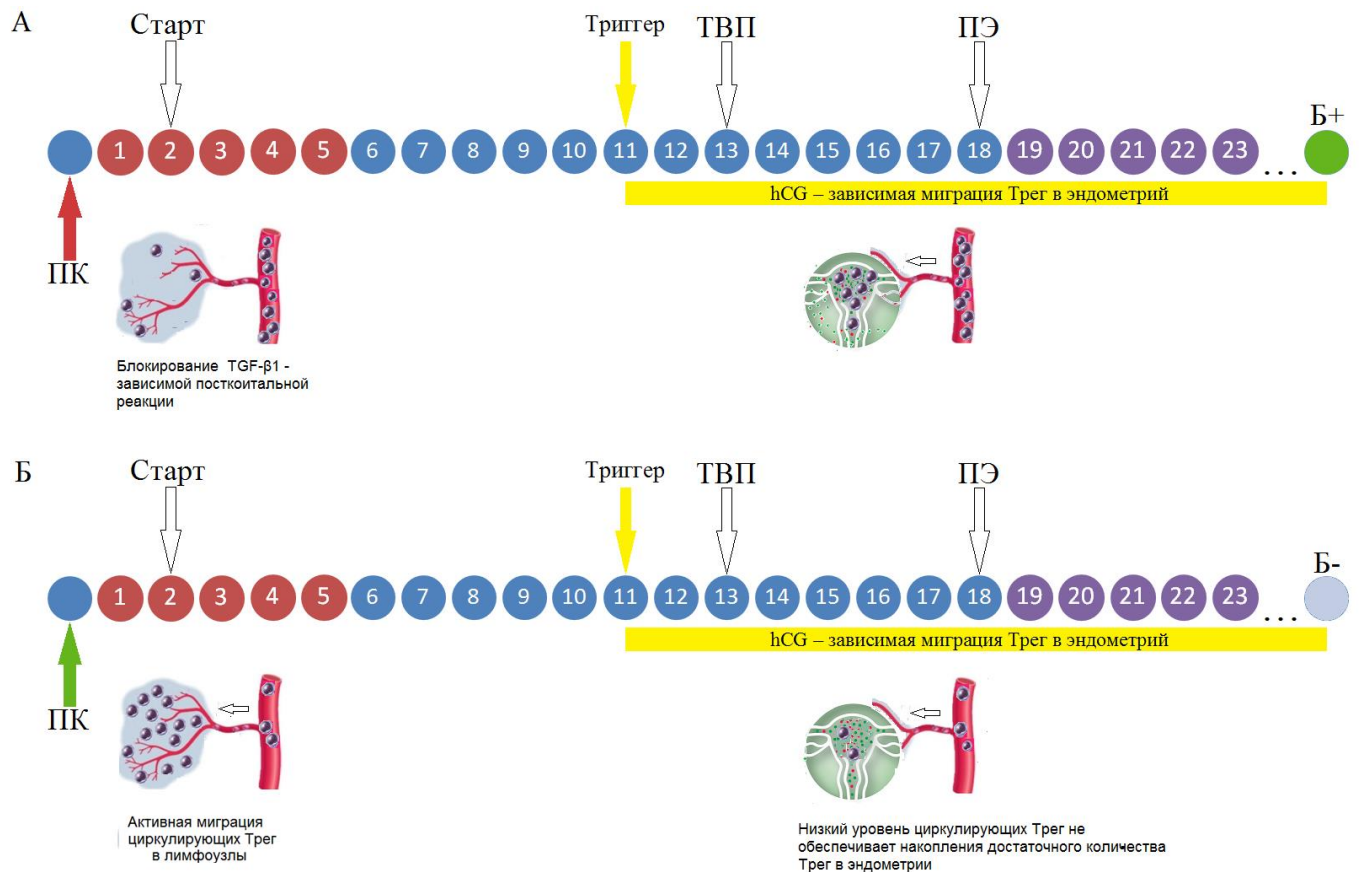


Рисунок 21. Схематичное изображение предполагаемых механизмов влияния цитокинового профиля семенной плазмы полового партнера на состояние клеточного звена иммунитета пациентки при проведении программы ВРТ в группе без половых контактов: А – схема воздействия семенной плазмы с повышенным содержанием противовоспалительного цитокина ИЛ-10; Б – схема воздействия семенной плазмы с пониженным содержанием противовоспалительного цитокина. Обозначения: 1-5 дни менструации; 19-23 дни предполагаемой имплантации; ТВП – трансвагинальная пункция фолликулов; ПЭ – перенос эмбриона; Старт – начало протокола ЭКО; Б+ наступление беременности; Б- отсутствие беременности

В то же время попадание «плохой» СП, с высоким содержанием противовоспалительного цитокина IL-10, в репродуктивный тракт тормозит локальную воспалительную реакцию, и таким образом, остается «незамеченным» иммунной системой женщины (рис. 21 А). В этом случае реализуется сценарий формирования оптимального микроокружения эмбриона с помощью эндогенных иммуно-эндокринных биорегуляторов.

Негативное влияние IL-10 на имплантацию в программе ВРТ, включающей половые контакты, также может быть обусловлено блокированием посткоитальной реакции и нарушением формирования пула иммунорегуляторных клеток в эндометрии за счет ингибирования секреции хемотаксических белков эпителиальными клетками и макрофагами [138]. В отличие от программы ВРТ без половых контактов, при котором ингибирующее влияние IL-10 на эндометрий отменяется перед началом цикла и наблюдается полноценная децидуализация эндометрия, половые контакты с «плохой» СП в цикле овариальной стимуляции блокируют формирование эндометрия, снижая его хемотаксический потенциал. Таким образом, при достаточно высоком уровне Трег в периферической крови, функциональная несостоятельность эндометрия не позволяет сформировать адекватный локальный пул Трег и обеспечить достаточный уровень противовоспалительных реакций.

Предполагаемые закономерности подтверждаются зависимостью эффективности трех вариантов протоколов ВРТ от содержания Трег в периферической крови пациенток в день ТВП (рис. 22). Данные, полученные при проведении программы ВРТ, включающей половые контакты в цикле стимуляции, дополненной интравагинальной аппликацией СП, были получены ранее в рамках исследований, проводимых в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, с использованием стандартного протокола определения Трег [1; 134]. Это позволило оценить эффективность всех трех протоколов при низком и высоком содержании Трег в

периферической крови. В качестве точки отсечки для всех трех протоколов использовалось значение содержания Трег, равное 6,3%, определенное ранее [6]. Максимальная эффективность ВРТ наблюдалась при содержании Трег $> 6,3\%$ в протоколе без половых контактов и при содержании Трег $\leq 6,3\%$ в протоколе с половыми контактами, дополненных аппликацией СП, (85,7% и 71,4%, соответственно, рис. 22). При отсутствии аппликации СП в группе с половыми контактами частота наступления беременности значительно снижалась и составляла 18,8%.

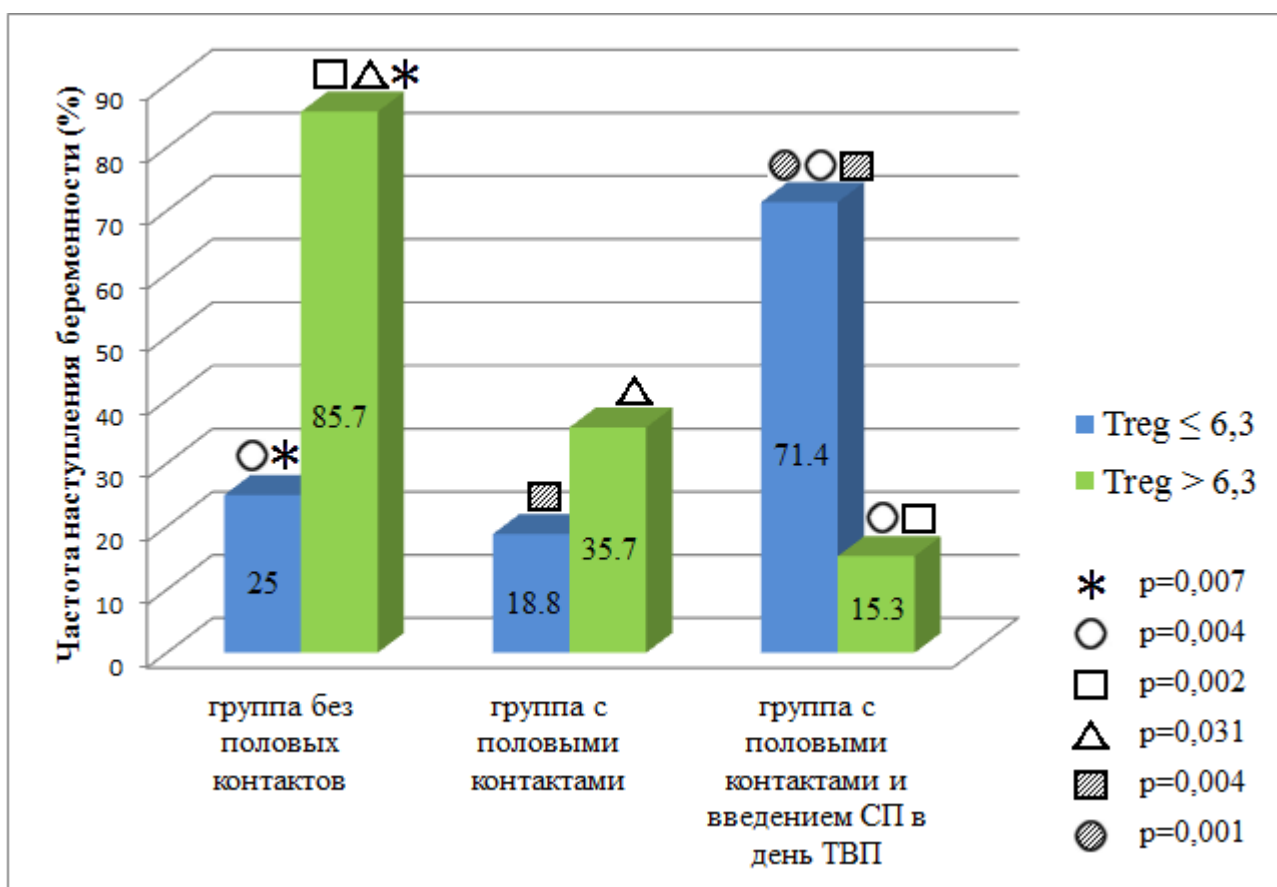


Рисунок 22. Зависимость частоты наступления беременности от уровня Трег и половых отношений в программе ВРТ в группах без половых контактов, – с половыми контактами и – с половыми контактами и введением СП в день ТВП

Таким образом, эти данные свидетельствуют о необходимости аппликации СП в день ТВП пациенткам с относительно низким содержанием Трег.

Перспективным подходом к повышению эффективности программы ВРТ, исключающей половые контакты, может явиться введение СП в день ТВП при относительно низком уровне Трег.

Проанализированные данные позволяют сделать вывод, что СП, поступающая во время половых контактов в репродуктивный тракт женщины, влияет на клеточный иммунитет пациенток, изменяя уровень Т-регуляторных клеток в периферической крови в день ТВП, тем самым влияет на исходы программы ВРТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работы последних лет определили формирование нового направления в исследованиях молекулярных основ фертильности - изучение влияния семенной плазмы на репродуктивную функцию женщины. На смену классическим представлениям о СП как транспортной среде сперматозоидов приходит все большее понимание значимости биологического вклада СП в процесс имплантации, течение беременности и обеспечение здоровья потомства.

Согласно данным нашей работы поступление цитокинов семенной плазмы в репродуктивный тракт женщины при половых контактах программирует исходы ВРТ. Цитокины СП, поступающие во время половых контактов до начала цикла овариальной стимуляции, также влияют на клеточное звено иммунитета пациенток, изменяя уровень Трег в периферической крови в день ТВП, что отражает состояние локального иммунитета репродуктивного тракта женщины и определяет исходы программы ВРТ.

Очевидно, что требуется проведение дальнейшей клинической апробации полученных результатов с помощью использования полученных нами прогностических параметров СП при проведении проспективных исследований зависимости эффективности программы ВРТ от цитокинового профиля СП.

Ключевыми направлениями дальнейших исследований могут являться: 1) изучение влияния семенной плазмы, поступающей в репродуктивный тракт женщины при половом акте, на профили экспрессии основных молекул, определяющих рецептивность эндометрия; 2) идентификация биоактивных молекул, определяющих влияние СП на функциональное состояние клеток эндометрия; 3) изучение механизмов праймирования половых путей женщины семенной плазмой и его влияния на имплантацию эмбриона, течение беременности и исход родов.

Глубокое понимание молекулярных и клеточных основ влияния СП на формирование оптимального иммунного ответа материнского организма, необходимого для успешной реализации репродуктивной функции, позволит разработать новые персонифицированные подходы к лечению бесплодия и нарушений гестации, планированию семьи, а также поможет повысить эффективность вспомогательных репродуктивных технологий.

ВЫВОДЫ

1. Для исследуемых пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, характерен молодой репродуктивный возраст ($31,7 \pm 3,6$), нормальные показатели индекса массы тела ($24,9 \pm 4,1$) и овариального резерва, не более двух программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в анамнезе. Частота наступления беременности при проведении программы ВРТ не зависела от клинико-анамнестических данных, параметров оо- и раннего эмбриогенеза, основных показателей спермограммы партнера и не отличалась в группах пациентов с половыми контактами и без них.

2. Иммуномодулирующий потенциал СП полового партнера пациенток в программе ВРТ определяется широким спектром маркеров. Интерлейкины (IL) -1 β , -6, -8, -10, -12p70, -17A, -18, -23, -33, интерферон (IFN) α и γ , фактор некроза опухоли (TNF- α), моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1), трансформирующий фактор роста (TGF β_1) и простагландин E₂ (PGE₂) обладают высоким уровнем межиндивидуальной вариабельности. Концентрация каждого из маркеров в семенной плазме не зависит от возраста, индекса массы тела, курения и основных параметров спермограммы пациентов.

3. Выявлена зависимость частоты наступления беременности в цикле ВРТ с половыми контактами от содержания цитокинов в СП партнера. В группе пациенток с наступившей беременностью уровень IL-18 был в 1,4 раза выше, а уровень IL-10 в 1,3 раза ниже по сравнению с группой пациенток с отсутствием беременности. В группе пациенток с наступившей беременностью определено смещение баланса цитокинов в сторону провоспалительного профиля и увеличения соотношений IFN α /IL-10, IL-18/IL-10, IL-12/IL-10, IL-33/IL-10, IL-8/IL-10, TNF α /IL-10.

4. Наступление беременности при отмене половых контактов в цикле ВРТ связано с содержанием в СП провоспалительных цитокинов IFN α , IL-12p, IL-33, IL-

17A и противовоспалительного цитокина IL-10, концентрация которых была значимо выше в группе пациенток с наступившей беременностью. Для группы пациенток с наступившей беременностью было характерно смещение баланса цитокинов в сторону противовоспалительного профиля: отношения $TNF\alpha/IL-10$ и $IL-12/IL-10$ были в 1,3 и 1,4 раза ниже по сравнению с группой пациенток с не наступившей беременностью.

5. Одним из наиболее значимых предикторов наступления беременности у пациенток группы с половыми контактами в программе ВРТ является соотношение $IL-18/IL-10$ в СП. При смещении баланса цитокинов в сторону провоспалительного профиля ($IL-18/IL-10 > 33,2$) частота наступления беременности была выше в 2,4 раза по сравнению с группой пациенток с менее выраженной провоспалительной направленностью баланса цитокинов ($\leq 33,2$) и составляла 70,0% и 5,3%, соответственно. Наиболее значимым фактором, связанным с вероятностью наступления беременности при отмене половых контактов, является концентрация IL-12p в семенной плазме партнера. При уровне IL-12p, превышающем найденное пороговое значение (4,01 пг/мл), частота наступления беременности составляла 69,2%, при уровне IL-12p ниже порогового наступления беременности не наблюдалось.

6. Половые контакты до начала цикла ВРТ влияют на состояние клеточного звена иммунитета пациенток в день трансвагинальной пункции фолликулов. Выявлена прямая корреляционная связь между содержанием цитокинов IL-10 и $TNF\alpha$ в семенной плазме и содержанием Трег клеток в периферической крови пациенток, прекративших половые контакты до начала лечения. Содержание Трег клеток в периферической крови в день ТВП является значимым прогностическим фактором успешности имплантации у пациенток группы без половых контактов во время программы ВРТ. Частота наступления беременности составляла 85,7% при

относительно высоком содержании Трег клеток ($>6,6\%$) и $13,3\%$ при относительно низком ($\leq 6,6\%$).

7. Противовоспалительный цитокин IL-10 является ключевым фактором СП, уровень которого ассоциирован с разнонаправленным действием на наступление беременности при наличии и отсутствии половых контактов в программах ВРТ. Половые контакты в цикле овариальной стимуляции при содержании IL-10 $\leq 6,6$ пг/мл в СП, ведут к наступлению беременности в 2,4 раза чаще, чем при их отмене ($42,1\%$ и $17,6\%$, соответственно). Отмена половых контактов в программе ВРТ при содержании IL-10 $>6,6$ пг/мл в СП ведет к увеличению частоты наступления беременности в 9,4 раза по сравнению с группой пациентов с половыми контактами ($85,7\%$ и $9,1\%$, соответственно).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Супружеским парам в программе вспомогательных репродуктивных технологий целесообразна оценка уровня IL-10 цитокинового профиля семенной плазмы партнера.

2. Супружеским парам следует соблюдать персональный режим половых контактов (каждые два дня в период с 5 по 10 день менструального цикла до трансвагинальной пункции) или их отмену в цикле вспомогательных репродуктивных технологий на основании данных о содержании IL-10 в семенной плазме партнера.

3. Половые контакты в цикле овариальной стимуляции рекомендуются при относительно низком содержании IL-10 в семенной плазме, не превышающем 6,6 пг/мл. При относительно высоком содержании IL-10 > 6,6 пг/мл рекомендуется отмена половых контактов на время программы вспомогательных репродуктивных технологий.

4. При проведении программы вспомогательных репродуктивных технологий в группе пациентов с половыми контактами (IL-10 ≤ 6,6 пг/мл в семенной плазме) и относительно низким содержанием регуляторных T клеток ≤ 6,3 % в периферической крови пациентки с целью повышения эффективности имплантации целесообразна аппликация семенной плазмы в день трансвагинальной пункции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а-ГнРГ	- агонисты гонадотропин – рилизинг гормона
АМГ	- антимюллеров гормон
АТ-ТПО	- антитела к тиреопероксидазе
ант-ГнРГ	- антагонисты гонадотропин – рилизинг гормона
ВОЗ	- всемирная организация здравоохранения
ВРТ	- вспомогательные репродуктивные технологии
ВПГ	- вирус простого герпеса
ВИЧ	- вирус иммунодефицита человека
ГнРГ	- гонадотропин – рилизинг гормон
Гн	- гонадотропины
ДГЭА-С	- дигидроэпиандростерон-сульфат
ДК	- дендритные клетки
ДИ	- доверительный интервал
Е2	- эстрадиол
ИФА	- иммуноферментный анализ
ИКСИ	- интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
ИМТ	- индекс массы тела
ИППП	- инфекции, передающиеся половым путем
К	- кортизол
ЛГ	- лютеинизирующий гормон
НМИЦ АГП	-национальный медицинский исследовательский центр акушерства гинекологии и перинатологии имени В.И.Кулакова
П	- прогестерон
ПРЛ	- пролактин
ПЭ	- перенос эмбрионов
ПЦ	- прогностическая ценность
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
мРНК	- матричная рибонуклеиновая кислота
РКИ	- рандомизированные клинические исследования

рФСГ	- рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
17-ОП	- 17-гидроксипрогестерон
СГЯ	- синдром гиперстимуляции яичников
СП	- семенная плазма
СПКЯ	- синдром поликистозных яичников
СС	- сброс спермы
СТГ	- соматотропный гормон
T4св	- тироксин свободный
Treg, Tрег	- T-регуляторные клетки
ТВП	- трансвагинальная пункция яичников
ТТГ	- тиреотропный гормон
УЗИ	- ультразвуковое исследование
ФСГ	- фолликулостимулирующий гормон
ХГ	- хорионический гонадотропин
ЧМГ	- человеческий менопаузальный гонадотропин
ЧНБ	- частота наступления беременности
ЦМВ	- цитомегаловирус
ЭКО	- экстракорпоральное оплодотворение
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
AUC	- area under curve (площадь под кривой)
CD	- cluster designation
СОХ	- циклооксигеназа
ССL	- хемокины семейства СС
ССР	- рецепторы к хемокинам семейства СС
СХСL	- хемокины семейства СХС
СХСL R	- рецепторы к хемокинам семейства СХС
CART	- Classification and Regression Tree
DAMPs	- молекулярный фрагмент, ассоциированный к повреждениям
ERK	- extracellular signal-regulated kinase
FACS	- fluorescent-activated cell sorter
FGF2	- фактор роста фибробластов 2

Foxp3	-регулятор (транскрипционный фактор) развития и функционирования регуляторных Т клеток.
F- β 1	- трансформирующий фактор роста β 1
G-CSF	- гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GDF	- growth differentiation factor
GM-CSF	- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IFN- γ	- интерферон- γ индуцирующий фактор
IFN α	- интерферон- α индуцирующий фактор
IL	- интерлейкины
LIF	- фактор, ингибирующий лейкемию
MAR	- mixed antiglobulin reaction
MCP-1	- моноцитарный хемотаксический протеин 1
Mip	- макрофагальный белок воспаления
MESA	- microsurgical epididymal sperm aspiration
ME	- международная единица
NK	- натуральные киллеры
PGE ₂	- простагландин E ₂
P	- прогестерон
ROC	- Receiver Operating Characteristics
SDF-1	- Stromal cell-derived factor-1
TESA	- testicular sperm extraction
Th1	- Т-хелперы первого типа
Th2	- Т-хелперы второго типа
TLR4	- Толл-подобный рецептор 4
TNF- α	- фактор некроза опухоли
VEGF	- фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаян А. А. Влияние иммунорегуляторных свойств семенной плазмы на репродуктивную функцию женщин при экстракорпоральном оплодотворении: дис...канд. мед. наук:14.01.01 // Бабаян Алина Анатольевна. - М., 2017. - 133 с.
2. Бабаян А.А., Смольникова В.Ю., Николаева М.А., Степанова Е.О., Калинина Е.А. Влияние иммунорегуляторных свойств семенной плазмы на репродуктивную функцию женщин. // Гинекология. - 2012. - № 4. - С. 80-82.
3. Быковская С.Н. Анализ Т-регуляторных клеток CD4+CD25+FoxP3+ при аутоиммунных заболеваниях // Быковская С.Н., Карасев А.В., Лохонина А.В. и соавт. // Молекулярная медицина. - 2013. - № 3. - С. 20-28.
4. Кулаков В.И., Гарданова Ж.Р., Хритинин Д.Ф., Кулакова Е.В. Тревожно-депрессивные расстройства у женщин в процессе проведения программы экстракорпорального оплодотворения. // Ж. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И.Мечникова. - 2006. - № 3. - С. 29-35.
5. Кулаков В.И., Хритинин Д.Ф., Гарданова Ж.Р., Кулакова Е.В. Психотерапевтическая коррекция аффективных расстройств у женщин, получающих помощь по программе вспомогательных репродуктивных технологий. // Ж. Неврология и психиатрия им. Корсакова. - 2007. - № 1. - С. 21-25.
6. Николаева М.А., Степанова Е.О., Бабаян А.А., Ванько Л.В., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Кречетова Л.В. Содержание Т-регуляторных клеток в периферической крови женщин и эффективность экстракорпорального оплодотворения. // Акушерство и гинекология. - 2014. - №4. - С.32-37.
7. Соколов Д.И., Степанова О.И., Сельков С.А. Роль различных субпопуляций CD4+Т-лимфоцитов при беременности» // Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18, № 6. - С. 521-536.

8. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. «Иммунология беременности». М.: Издательство РАМН, 2003. - 400 с.
9. Тарасова М.Н., Чистякова Г.Н., Газиева И.А., И.И. Ремизова И.И. Роль цитокинов в патогенезе мужского бесплодия. // Уральский медицинский журнал. - 2008. - № 12. - С. 44-49.
10. Aflatoonian A., Ghandi S., Tabibnejad N. The Effect of Intercourse around Embryo Transfer on Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology Cycle. // International Journal of Fertility and Sterility. - Feb.- Mar. - 2009. - Vol. 2, № 4. - P. 169-172.
11. Aitken R.J., Baker M.A. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection.// J. Reprod Immunol. - Nov. - 2013. - Vol. 100, № 1. - P. 11-9.
12. Alexander N.J., Anderson D.J. Immunology of semen. // Fertil Steril. - Feb. - 1987. - Vol. 47, № 2. - P. 192-205.
13. Alijotas-Reig J, Llurba E., Gris J.M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. // Placenta. - Apr. - 2014. - Vol. 35, № 4. - P. 241-248.
14. Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus.// Nat Immunol. - Mar. - 2004. - Vol. 5, № 3. - P. 266-271.
15. Anderson D.J., Politch J.A. Role of seminal plasma in human female reproductive failure: immunomodulation, inflammation, and infections. // Adv. Exp. Med. Biol. - 2015. - Vol. 868. - P. 159–69.
16. 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. - Feb. 15 - 2007. - Vol. 178, № 4. - P. 2572-2578.

17. Ata B., Abou-Setta A.M., Seyhan A., Buckett W. Application of seminal plasma to female genital tract prior to embryo transfer in assisted reproductive technology cycles (IVF, ISCI and frozen embryo transfer). // *Cochrane Database Syst Rev.* - Feb. 28 - 2018. - P. 2.
18. Aumüller G., Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. // *Andrologia.* - Jul.-Aug. - 1992. - Vol. 24, № 4. - P.183-196.
19. Azpiazu R., Amaral A., Castillo J., Estanyol J.M., Guimerà M., Ballescà J.L., Balasch J., Oliva R. High-through out sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. // *Hum Reprod.* - Jun. - 2014. - Vol. 29, № 6. - P. 1225-1237.
20. Barad D.H. Hypothesis: does exposure to sperm lead to pregnancy? // *BJOG.* - Jan. - 2019. - Vol. 126, № 2. - P. 226.
21. Baratelli F., Lin Y., Zhu L., Yang S.C., Heuzé-Vourc'h N., Zeng G., Reckamp K., Dohadwala M., Sharma S., Dubinett S.M. Prostaglandin E₂ induces FOXP₃ gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells. // *J. Immunol.* - Aug. - 2005. - Vol. 175, № 3. - P. 1483-1490.
22. Basso O., Christensen K., Olsen J. Higher risk of pre-eclampsia after change of partner. An effect of longer interpregnancy intervals? // *Epidemiology.* - Nov. - 2001. - Vol. 12, № 6. - P. 624-629.
23. Battersby S., Sales K.J., Williams A.R., Anderson R.A., Gardner S., Jabbour H.N. Seminal plasma and prostaglandin E₂ up-regulate fibroblast growth factor 2 expression in endometrial adenocarcinoma cells via E-series prostanoid-2 receptor-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinase pathway. // *Hum Reprod.* - Jan. - 2007. - Vol. 22, № 1. - P. 36-44.
24. Bedford J.M. The functions-or not-of seminal plasma? // *Biol Reprod.* - Jan. - 2015. - Vol. 92, № 1. - P. 18.

25. Bellinge B.S., Copeland C.M., Thomas T.D., Mazzuccelli R.E., O'Neil G., Cohen M.J. The influence of patient insemination on the implantation rate in an vitro fertilization and embryo transfer program. // *Fertil. Steril.* - 1986. - Vol. 46. - P. 252-256.
26. Berry K.A., Baron I.S., Weiss B.A., Baker R., Ahronovich M.D., Litman F.R. In vitro fertilization and late preterm preschoolers' neuropsychological outcomes: the PETIT study. // *Am J Obstet Gynecol.* - Oct. - 2013. - Vol. 209, № 4. - P. 356. - e1-6.
27. Bieniek J.M., Drabovich A.P., Lo K.C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. // *Asian J. Androl.* - May-Jun. - 2016. - Vol. 18, № 3. - P. 426-433.
28. Bischof R.J., Lee C.S., Brandon M.R., Meeusen E. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. // *J. Reprod Immunol.* - 1994. - Vol. 26, № 2. - P. 131-146.
29. Bourdieu A., Calvo E., Rao C.V., Akoum A. Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation. // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8, № 5. - P. 64829-26.
30. Bower C., Hansen M. Assisted reproductive technologies and birth outcomes: overview of recent systematic reviews. // *Reprod. Fertil.* - Dec. - 2005. - Vol. 17, № 3. - P. 329-333.
31. Bromfield J.J. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. // *J. Assist. Reprod. Genet.* - Jun. - 2014. - Vol. 31, № 6. - P. 627-636.
32. Bromfield J.J., Schjenken J.E., Chin P.Y., Care A.S., Jasper M.J., Robertson S.A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - Feb. - 2014. - Vol. 111, № 6. - P. 2200-5.

33. Bystry R.S., Aluvihare V., Welch K.A., Kallikourdis M., Betz A.G.. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. // *Nat. Immunol.* - 2001. - Vol. 2, № 12. - P. 1126-1132.

34. Camejo M.I., Segnini A., Proverbio F. Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. // *Arch. Androl.* - Apr.-Jun. - 2001. - Vol. 47, № 2. - P. 97-101.

35. Chaouat G., Zourbas S., Ostojic S., Lappree-Delage G., Dubanchet S., Ledee N., Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. // *J. Reprod. Immunol.* - Jan. - 2002. - Vol. 53, № 1-2. - P. 241-256.

36. Chen T., Darrasse-Je`ze G., Bergot A.S., et al. Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. // *J. Immunol.* - 2013. - Vol. 191. - № 5. P. 2273-2281.

37. Chicea R., Ispasoiu F., Focsa M. Seminal plasma insemination during ovum-pickup—a method to increase pregnancy rate in IVF/ICSI procedure. A pilot randomized trial. // *J. Assist. Reprod. Genet.* - Apr. - 2013. - Vol. 30, № 4. - P. 569–574.

38. Chizzolini C., Brembilla N.C. Prostaglandin E₂: igniting the fire. // *Immunol. Cell. Biol.* - 2009. - Vol. 87. - P. 510–511.

39. Chu T.M., Kawinski E. Plasmin, substilisin-like endoproteases, tissue plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator are involved in activation of latent TGF- β in human seminal plasma. // *Biochem Biophys Res Commun.* - Dec. 9. - 1998. - Vol. 253, № 1. - P. 128-134.

40. Cicinelli E.D. de Ziegler Transvaginal progesterone: evidence for a new functional 'portal system' flowing from the vagina to the uterus // *Human Reproduction Update.* - Jul. 1999. - Vol. 5, № 4. - P. 365–372.

41. Clark D.A. Mouse is the new woman? Translational research in reproductive immunology. // *Semin. Immunopathol.* - Nov. - 2016. - Vol. 38, № 6. - P. 651-668.

42. Clark D.A., Fernandes J., Banwatt D. Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF- β and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells. // *Am. J. Reprod. Immunol.* - Jun. 2008. - Vol. 59, № 6. - P. 525-534.
43. Clark G.F., Schust D.J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. // *Front. Immunol.* - 2013. - Vol. 4. - P. 26.
44. Clarke G.N. ASA in the Female. In: *Immune Infertility: Impact of Immune Reactions on Human Fertility*. Eds. Krause WKH, Naz. RK. // Springer International Publishing Switzerland. -2017. - P. 161-171.
45. Coulam C.B., Stern J.J. Effect of seminal plasma on implantation rates. // *Early Pregnancy.* - 1995. - Vol. 1, № 1. - P. 33–66.
46. Crawford G., Ray A., Gudi A., Shah A., Homburg R. The role of seminal Plasma for improved outcomes during in vitro fertilization treatment: review of the literature and meta-analysis. // *Hum. Reprod. Update.* - Mar.-Apr. - 2015. - Vol. 21, № 2. - P. 275-284.
47. Davies M.J., Moore V.M., Willson K.J., Van Essen P., Priest K., Scott H., Haan E.A., Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. // *N. Engl. J. Med.* - May. 10. - 2012. - Vol. 366, № 19. – P.-1803-1813.
48. DeKel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. “Inflammation and implantation” // *American Journal of Reproductive Immunology.* - 2010. - Vol. 63, № 1. - P. 17-21.
49. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Racicot K., Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. // *Am. J. Reprod. Immunol.* - Aug. – 2014. - Vol. 72, № 2. - P.141-147.
50. Denison F.C., Calder A.A., Kelly R.W. The action of prostaglandin E₂ on the human cervix: stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease inhibitor. // *Am. J. Obstet Gynecol.* - Mar. - 1999. - Vol. 180, № 3, Pt. 1. - P. 614-620.

51. Dennis E.A., Norris P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. // *Nat. Rev. Immunol.* - Aug. - 2015. - Vol. 15, № 8. - P. 511-23.
52. Diao H.L., Su R.W., Tan H.N., Li S.J., Lei W, Deng W.B., Yang Z.M. Effects of androgen on embryo implantation in the mouse delayed-implantation model. // *Fertil. Steril.* - Oct. - 2008. - Vol. 90, № 4. - P. 1376-1383.
53. Dinarello C.A., Novick D., Kim S., Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. // *Front Immunol.* - Oct. 8. - 2013. - Vol. 4. - P. 289.
54. Donato R., Cannon B.R., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., Weber D.J., Geczy C.L. Functions of S100 proteins. // *Curr. Mol. Med.* - Jan. - 2013. - Vol. 13, № 1. - P. 24-57.
55. Doncel G.F., Anderson S., Zalenskaya I. Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment-implications for HIV transmission. // *Am. J. Reprod. Immunol.* - Jun. - 2014. - Vol. 71, № 6. - P. 564-574.
56. Drobnis E.Z., Overstreet J.W. Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. // *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* - 1992. - Vol. 14. - P.1-45.
57. Dupont C., Kappeler L., Saget S., Grandjean V., Lévy R. Role of miRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated With Paternal Diet-Induced Obesity. // *Front. Genet.* - Apr.18. - 2019. - Vol. 10. - P. 337.
58. Eggert-Kruse W., Boit R., Rohr G., Aufenanger J., Hund M., Strowitzki T. Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality. // *Hum. Reprod.* - Mar. - 2001. - Vol. 6, № 3. - P. 517-28.
59. Elenkov I.J., Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Chrousos G.P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. // *Proc. Assoc. Am. Physicians.* - Sep. - 1996. - Vol. 108, № 5. - P. 374-381.
60. Elzanaty S. Time-to-ejaculation and the quality of semen produced by masturbation at a clinic. // *Urology.* - May. - 2008. - Vol. 71, № 5. - P. 883-888.

61. Ferigolo P.C., Ribeiro de Andrade M.B., Camargo M., Carvalho V.M., Cardozo K.H.M., Bertolla R.P., Fraietta R. Sperm functional aspects and enriched proteomic pathways of seminal plasma of adult men with obesity. // *Andrology*. - May. - 2019. - Vol. 7, № 3. - P. 341-349.
62. Fishel S., Webster J., Jackson P., Faratian B. Evaluation of high vaginal insemination at oocyte recovery in patients undergoing in vitro fertilization. // *Fertil. Steril.* - 1989. - Vol. 51, № 1. - P. 135–138.
63. Fox C., Morin S., Jeong J.W., Scott R.T. Jr., Lessey B.A. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? // *Fertil. Steril.* - Apr. - 2016. - Vol. 105, № 4. - P. 873-884.
64. Fraczek M., Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. // *J. Reprod. Immunol.* - Apr. - 2015. - Vol. 108. - P. 98-104.
65. Fry T.J., Mackall C.L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. // *J. Immunol.* - Jun. 1. – 2005. - Vol. 174, № 11. - P. 6571-6576.
66. Gardner D.K., Scholcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. // *Cur. Opin. Obstet. Gynec.* - 1999. - Vol. 11, № 3. - P. 307–311.
67. Gerozissis K., Jouannet P., Soufir J.C., Dray F. Origin of prostaglandins in human semen. // *J. Reprod. Fertil.* - Jul. – 1982. - Vol. 65, № 2. - P. 401-404.
68. Gluckman P.D., Hanson M.A. Metabolic disease: evolutionary, developmental and transgenerational influences. // *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* - 2005. - Vol. 55. - P. 17-27.
69. Gnainsky Y., Granot I., Aldo P.B., Barash A., Or Y., Schechtman E., Mor G., Dekel N. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. // *Fertil. Steril.* - Nov. – 2010. - Vol. 94, № 6. - P. 2030-2036.

70. Godfrey K.M., Gluckman P.D., Hanson M.A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. // Trends Endocrinol Metab. - 2010. - Vol. 21, № 4. - P. 199-205.

71. Gorelik L., Flavell R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. // Nat. Rev. Immunol. - Jan. - 2002. - Vol. 2, № 1. - P. 46-53.

72. Guerin L.R., Moldenhauer L.M., Prins J.R., Bromfield J.J., Hayball J.D., Robertson S.A. 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. - Aug. - 2011. - Vol. 85, № 2. - P. 397-408.

73. Guerin L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? // Hum. Reprod. Update. - Sep.-Oct. - 2009. - Vol. 15, № 5. - P. 517-35.

74. Gutsche S., von Wolff M., Strowitzki T., Thaler C.J. Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. // Mol. Hum. Reprod. - Dec. - 2003. - Vol. 9, № 12. - P. 785-91.

75. Hacker-Klom U.B., Göhde W., Nieschlag E., Behre H.M. DNA flow cytometry of human semen. // Hum. Reprod. - 1999. - Vol. 14. - P. 2506-2512.

76. Haimovici F., Janis L. A., Gordon W. B., Catherine R., Elizabeth S.G.D.S., Raina N. Fichorova. Stres, anxiety, and derpesion of both partners in infertile couples are associated with cytokine levels and adverse IVF outcome. // Am.J. Reprod. Immunol. - Apr. - 2018. - Vol.79, № 4. - P. e12832.

77. Hansen M., Kurinczuk J.J., Bower C., Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. // N. Engl. J. Med. - Mar. 7. - 2002. - Vol. 346, № 10. - P. 725-30.

78. Hart R., Norman R.J. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I--General health outcomes. // Hum. Reprod. Update. - May-Jun. - 2013. - Vol. 19, № 3. - P. 232-43.

79. Heinrich P.C., Behrmann I., Müller-Newen G., Schaper F., Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. // *Biochem. J.* - Sep. – 1998. - Vol. 334, Pt. 2. - P. 297-314.

80. Heuchel V., Schwartz D., Price W. Within-subject variability and the importance of abstinence period for sperm count, semen volume and pre-freeze and post-thaw motility. // *Andrologia.* - Sep.-Oct. - 1981. - Vol. 13, № 5. - P. 479-85.

81. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. // *Science.* - 2003. - Vol. 299, № 5609. - P. 1057-1061.

82. Hutter H., Dohr G. HLA expression on immature and mature human germ cells. // *J. Reprod. Immunol.* - Jul. – 1998. - Vol. 38, № 2. - P. 101-22.

83. Jasper M.J., Care A.S., Sullivan B., Ingman W.V., Aplin J.D., Robertson S. A. “Macrophage-derived LIF and IL-1B regulate α (1,2) fucosyltransferase 2 (Fut2) expression in mouse uterine epithelial cells during early pregnancy,” // *Biology of Reproduction.* - 2011. - Vol. 84, № 1. - P. 179–188.

84. Jin L.P., Chen Q.Y., Zhang T., Guo P.F., Li D.J. The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. // *Clin. Immunol.* - Dec. - 2009. - Vol. 133, № 3. - P. 402-410.

85. Jing H., Vassiliou E., Ganea D. Prostaglandin E₂ inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. // *J. Leukoc Biol.* - 2003. - Vol. 74. - P. 868–879.

86. Jodar M. Sperm and seminal plasma RNAs: What roles do they play beyond fertilisation? // *Reproduction.* - May 1. - 2019.

87. Jodar M., Soler-Ventura A., Oliva R. Molecular Biology of Reproduction and Development Research Group. Semen proteomics and male infertility. // *J. Proteomics.* - Jun. 6. - 2017. - Vol. 162. - P. 125-134.

88. Johnson S.L., Dunleavy J., Gemmell N.J., Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. // *Ageing. Res. Rev.* - Jan. - 2015. - Vol. 19. - P. 22-33.
89. Joseph D.N., Whirledge S. Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. // *Int. J. Mol. Sci.* - Oct. 24. - 2017. - Vol. 18, № 10.
90. Jurisicova A., Antenos M., Kapasi K., Meriano J., Casper R.F. Variability in the expression of trophoctodermal markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific β -1 glycoprotein by the human blastocyst. // *Hum. Reprod.* - 1999. - Vol. 14, № 7. - P. 1852-1858.
91. Juyena N.S., Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. // *J. Androl.* - Jul.-Aug. - 2012. - Vol. 33, № 4. - P. 536-51.
92. Kahn D.A., Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigenspecific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2010. - Vol. 107, № 20. - P. 9299-9304.
93. Kałuza A., Ferens-Sieczkowska M.A., Olejnik B., Kołodziejczyk J., Zimmer M., Kratz E.M. The content of immunomodulatory glycoepitopes in seminal plasma glycoproteins of fertile and infertile men. // *Reprod. Fertil Dev.* - Mar. – 2019. - Vol. 31, № 3. - P. 579-589.
94. Kelly R.W. Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. // *J. Reprod. Fertil.* - May. - 1981. - Vol. 62, № 1. - P. 293-304.
95. Kelly R.W., Critchley H.O. Immunomodulation by human seminal plasma: a benefit for spermatozoon and pathogen? // *Hum. Reprod.* - Oct. - 1997. - Vol. 12, № 10. - P. 2200-2207.
96. Kenedy T.G., Gillio-Meina C., Phang S.H., “Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization,” // *Reproduction.* - 2007. - Vol. 134, № 5. - P. 635–643.

97. Kho E.M., McCowan L.M., North R.A., Roberts C.T., Chan E., Black M.A., Taylor R.S., Dekker G.A. SCOPE Consortium. Duration of sexual relationship and its effect on preclampsia and small for gestational age perinatal outcome. // *J. Reprod. Immunol.* – Oct. – 2009. – Vol. 82, № 1. – P. 66-73.
98. Kobori T., Hamasaki S., Kitaura A., Yamazaki Y., Nishinaka T., Niwa A., Nakao S., Wake H., Mori S., Yoshino T., Nishibori M., Takahashi H. Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis. // *Front Immunol.* – Mar. 6. – 2018. – Vol. 9. – P. 334.
99. KoKcu A., Yavuz E., Celik H., Bildircin D. A panoramic view to relationships between reproductive failure and immunological factors. // *Arch. Gynecol. Obstet.* – Nov. – 2012. – Vol. 286, № 5. – P. 1283-1289.
100. Koumantakis E., Matalliotakis I., Kyriakou D., Fragouli Y., Relakis K. Increased levels of interleukin-8 in human seminal plasma. // *Andrologia.* – Nov. – 1998. – Vol. 30, № 6. – P. 339-343.
101. Koyama K., Hasegawa A., Komori S. Functional aspects of CD52 in reproduction. // *J. Reprod. Immunol.* – Dec. – 2009. – Vol. 83, № 1-2. – P. 56-59.
102. Kverka M., Ulcova-Gallova Z., Bartova J., Cibulka J., Bibkova K., Micanova Z., Tlaskalova-Hogenova H. Sperm cells induce distinct cytokine response in peripheral mononuclear cells from infertile women with serum anti-sperm antibodies. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 8. e44172.
103. Lacroix S., Nicod L.P., Chicheportiche R., Welgus H.G., Dayer J.M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP1 production in human mononuclear phagocytes. // *J. Clin. Invest.* – Nov. – 1995. – Vol. 96, № 5. – P. 2304-2310.
104. Lambert R.D. Safety issues in assisted reproductive technology: aetiology of health problems in singleton ART babies. // *Hum. Reprod.* – Oct. – 2003. – Vol. 18, № 10. – P. 1987-1991.

105. Lampiao F., du Plessis S.S. Effects of tumour necrosis factor α and interleukin-6 on progesterone and calcium ionophore-induced acrosome reaction. // *Int. J. Androl.* – Jun. – 2009. – Vol. 32, № 3. – P. 274-277.

106. Lampiao F., du Plessis SS. TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. // *Reprod Biomed Online.* – Nov. – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 628-31.

107. Lane M., Robker R.L., Robertson S.A. Parenting from before conception. // *Science.* – Aug. 15. – 2014. – Vol. 345, № 6198. – P.756-760.

108. Laskarin G., Strbo N., Bogovic Crncic T., Juretic K., Ledee Bataille N., Chaouat G., Rukavina D. Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface. // *Chem. Immunol. Allergy.* – 2005. – Vol. 89. – P.10-25.

109. Ledee-Bataile N., Bonnet-Chea K., Hosny G., Dubanchet S., Frydman R., Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. // *Fertil. Steril.* – Mar. – 2005. – Vol. 83, № 3. – P. 598-605.

110. Lédée-Bataille N., Olivennes F., Kadoch J., Dubanchet S., Frydman N., Chaouat G., Frydman R. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer. // *Hum. Reprod.* – Sep. – 2004. – Vol. 19, № 9. – P. 1968-1973.

111. Lim H., Dey S.K. Prostaglandin E₂ receptor subtype EP2 gene expression in the mouse uterus coincides with differentiation of the luminal epithelium for implantation. // *Endocrinology.* – 1997. – Vol. 138. – P. 4599–4606.

112. Lopata A., Hay D.L. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. // *Hum. Reprod.* – 1989. – Vol. 4, Suppl. 8. – P. 87-94.

113. Loras B., Vételé F., E Malki A., Rollet J., Soufir J.C., Benahmed M. Seminal transforming growth factor- β in normal and infertile men. // *Hum. Reprod.* – Jun. – 1999. – Vol. 14, № 6. – P. 1534-1539.

114. Lotti F., Maggi M. Interleukin 8 and the male genital tract. // *J. Reprod. Immunol.* – Nov. – 2013. – Vol. 100, № 1. – P. 54-65.

115. Maegawa M., Kamada M., Irahara M., Yamamoto S., Yoshikawa S., Kasai Y., Ohmoto Y., Gima H., Thaler C.J., Aono T. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. // *J. Reprod. Immunol.* – Mar. – 2002. – Vol. 54, № 1-2. – P. 33-42.

116. Mann T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* // Methuen, London; Wiley, New York. – 1964.

117. Marchand E., Poncelet C., Carbillon L., Pharisien I., Tigaizin A., Chanelles O. Is there more complications with pregnancies from the assisted reproductive technology than spontaneous pregnancies? A retrospective study over 6 years. Article in French. // *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. Paris.* – Oct. – 2011. – Vol. 40, № 6. – P. 522-528.

118. Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Lakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., Jerzak L., Stuczyński T., Woźniak A., Buciński A. Human Sperm Characteristics with Regard to Cobalt, Chromium, and Lead in Semen and Activity of Catalase in Seminal Plasma. // *Biol. Trace. Elem. Res.* – Apr. – 2019. – Vol. 188, № 2. – P. 251-260.

119. Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. // *PLoS Med.* – Dec. – 2012. – Vol. 9, № 12. – e1001356.

120. Maślińska D. The cytokine network and interleukin-15 (IL-15) in brain development. // *Folia Neuropathol.* – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 43-47.

121. Matalliotakis I., Kyriakou D., Fragouli Y., Loutradis D., Goumenou A., Koumantakis E. Determination of interleukin-11 in seminal plasma and elevated IL-11 in

seminal plasma of infertile patients with urogenital infection. // Arch. Androl. – Nov-Dec. – 1998. – Vol. 41, № 3. – P. 177-183.

122. Matalliotakis I.M., Cakmak H., Fragouli Y., Kourtis A., Arici A., Huszar G. Increased IL-18 levels in seminal plasma of infertile men with genital tract infections. // Am. J. Reprod. Immunol. – Jun. – 2006. – Vol. 55, № 6. – P. 428-433.

123. Mayer K.H., Venkatesh K.K. Interactions of HIV, other sexually transmitted diseases, and genital tract inflammation facilitating local pathogen transmission and acquisition. // Am. J. Reprod. Immunol. – Mar. – 2011. – Vol. 65, № 3. – P. 308-316.

124. McGraw L.A., Suarez S.S., Wolfner M.F. On a matter of seminal importance. // Bioessays. – Feb. – 2015. – Vol. 37, № 2. – P. 142-147.

125. McGuane J.T., Watson K.M., Zhang J., Johan M.Z., Wang Z., Kuo G., et al. Seminal plasma promotes lesion development in a xenograft model of endometriosis. // Am. J. Pathol. – 2015. – Vol. 185. – P. 1409–1422.

126. Miravet-Valenciano J., et al., Balaguer N., Vilella F., Simón C. Molecular diagnosis of endometrial receptivity. In: The Endometrial Factor: A Reproductive Precision Medicine Approach. // CRC Press, Boca Raton, USA. 2017. – 2017. – P. 36-49.

127. Mor G., Cardenas I., Abrahams V., Guller S. “Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site,” // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 1221, № 1. – P. 80–87.

128. Moreau P., Adrian-Cabestre F., Menier C. et al. IL-10 selectively includes HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. // Int. Immunol. – 1999. – Vol. 11, №5. – P. 803-11.

129. Mostafa T, Tawadrous G, Roaia M.M., Amer M.K., Kader R.A., Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. // Andrologia. – Dec. – 2006. Vol. 38, № 6. – P. 221-224.

130. Müller M., Sales K.J., Katz A.A., Jabbour H.N. Seminal plasma promotes the expression of tumorigenic and angiogenic genes in cervical adenocarcinoma cells via the

E-series prostanoid 4 receptor. // *Endocrinology*. – Jul. – 2006. – Vol. 147, № 7. – P. 3356-65.

131. Munoz-Suano A., Hamilton A.B., Betz A.Г. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. // *Immunol Rev.* – May. – 2011. – Vol. 241, № 1. – P. 20-38.

132. Nawroth F., von Wolff M.. Seminal Plasma Activity to Improve Implantation in In Vitro Fertilization-How Can It Be Used in Daily Practice? // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – Apr. – 2018. – Vol. 27, № 9. – P. 208.

133. Nederlof I., Meuleman T., van der Hoorn M.L.P., Claas F.H.J., Eikmans M. The seed to success: The role of seminal plasma in pregnancy. // *J. Reprod. Immunol.* – Sep. – 2017. – Vol. 123. – P. 24-28.

134. NiKolaeva M., Babayan A., Stepanova E., Arefieva A., Dontsova T., Smolnikova V., Kalinina E., Krechetova L., Pavlovich S., Sukhikh G. The Link Between Seminal Cytokine Interleukin 18, Female Circulating Regulatory T Cells, and IVF/ICSI Success. // *Reproductive Sciences*. – 2019. – Vol. 26, № 8. – P. 1034-1044.

135. Nikolaeva M.A., Babayan A.A., Stepanova E.O., Smolnikova V.Y., Kalinina E.A., Fernández N., Krechetova L.V., Vanko L.V., Sukhikh G.T. The relationship of seminal transforming growth factor- β 1 and interleukin-18 with reproductive success in women exposed to seminal plasma during IVF/ICSI treatment. // *J. Reprod. Immunol.* – Sep. – 2016. – Vol. 117. – P. 45-51.

136. Ochsenkühn R., Strowitzki T., Gurtner M., Strauss A., Schulze A., Hepp H., Hillemanns P. Pregnancy complications, obstetric risks, and neonatal outcome in singleton and twin pregnancies after GIFT and IVF. // *Arch. Gynecol. Obstet.* – Oct. – 2003. – Vol. 268, № 4. – P. 256-61.

137. Oh S.A., Li M.O.. TGF- β : guardian of T cell function. // *J. Immunol.* – Oct. 15. – 2013. – Vol. 191, № 8. P.3973-3979.

138. Olszyna D.P., Pajkrt D., Lauw F.N., van Deventer S.J., van Der Poll T. Interleukin 10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia. // *J. Infect. Dis.* –Feb. – 2000. – Vol. 181, № 2. – P. 613-620.

139. Ostojic S., Dubanchet S., Chaouat G., Abdelkarim M., Truyens C., Capron F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – Feb. – 2003. – Vol. 49, № 2. – P. 101-112.

140. Ouyang W., Rutz S., Crellin N.K. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 71-109.

141. Pacey A.A., Merrick H., Arden-Close E., Morris K., Barton L.C., Crook A.J., Tomlinson M.J., Wright E., Rowe R., Eiser C. Monitoring fertility (semen analysis) by cancer survivors who banked sperm prior to cancer treatment. // *Hum. Reprod.* –Nov. – 2012. – Vol. 27, № 11. – P. 3132-3139.

142. Pandya I.J., Cohen J. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. // *Fertil. Steril.* – Mar. 1985. – Vol. 43, № 3. – P. 417-21.

143. Perri T., Chen R., Yoeli R., Merlob P., Orvieto R., Shalev Y., Ben-Rafael Z., Bar-Hava I. Are singleton assisted reproductive technology pregnancies at risk of prematurity? // *J. Assist. Reprod. Genet.* – May. – 2001. – Vol. 18, № 5. – P. 245-249.

144. Politch J.A., Tucker L., Bowman F.P., Anderson D.J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. // *Hum. Reprod.* – Nov. – 2007. Vol. 22, № 11. – P. 2928-2935.

145. Poon H.K., Lee K.H., Wong C.L., O W.S., Chow P.H. Absence of paternal accessory sex gland secretions disturbs epigenetic reprogramming and expression of Igf2 and Dlk1 in golden hamster embryos. // *Theriogenology.* – Jun. – 2009. – Vol. 71, № 9. P. 1367-1380.

146. Pudney J., Quayle A.J., Anderson D.J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. // *Biol. Reprod.* – Dec. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 1253-1263.

147. Qi Y.N., Ma J, Han R.Y., Ma J., Wang S.S. Correlation of seminal plasma zinc α -2 glycoprotein with semen quality in obese males. // *Zhonghua Nan Ke Xue.* –Mar. - 2018. – Vol. 24, № 3. – P. 216-220.

148. Qian L., Zhou Y., Du C., Wen J., Teng S., Teng Z. IL-18 levels in the semen of male infertility: semen analysis. // *Int. J. Biol. Macromol.* – Mar. – 2014. – Vol. 64. –P. 190-192.

149. Quayle A.J., Kelly R.W., Hargreave T.B., James K. Immunosuppression by seminal prostaglandins. // *Clin. Exp. Immunol.* – Mar. – 1989. – Vol. 75, № 3. – P. 387-391.

150. Quinn K.H., Lacoursiere D.Y., Cui L., Bui J., Parast M.M.. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. // *J. Reprod. Immunol.* – Sep. – 2011. – Vol. 91, № 1-2. – P. 76-82.

151. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. // *Immunol. Today.* – Oct. – 1997. –Vol. 18, № 10. – P. 478-482.

152. Rametse C.L., Olivier A.J., Masson L., Barnabas S., McKinnon L.R., Ngcapu S., Liebenberg L.J., Jaumdally S.Z., Gray C.M., Jaspán H.B., Passmore J.A. Role of semen in altering the balance between inflammation and tolerance in the female genital tract: does it contribute to HIV risk? // *Viral. Immunol.* – Jun. – 2014. –Vol. 27, № 5. –P. 200-206.

153. Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L.M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. // *J. Clin. Invest.* – Oct. 1. – 2018. – Vol. 128, № 10. –P. 4224-4235.

154. Robertson S.A., Guerin L.R., Bromfield J.J., Branson K.M., Ahlström A.C., Care A.S. Seminal fluid drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell pool and

induces tolerance to paternal alloantigens in mice. // *Biol. Reprod.* – May. – 2009. – Vol. 80, № 5. –P. 1036-1045.

155. Robertson S.A., Guerin L.R., Moldenhauer L.M., Hayball J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. // *J. Reprod. Immunol.* – Dec. – 2009. – Vol. 83, № 1-2. – P. 109-116.

156. Robertson S.A., Ingman W.V., O'Leary S., Sharkey D.J., Tremellen K.P. Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. // *J. Reprod. Immunol.* – Oct-Nov. – 2002. – Vol. 57, № 1-2. – P. 109-128.

157. Robertson S.A., O'Connell A.C., Hudson S.N., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post-mating inflammatory response in mice. // *J. Reprod. Immunol.* – 2000. – Vol. 46. – P.131–154.

158. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – Apr. – 2013. –Vol. 69, № 4. – P. 315-330.

159. Robertson S.A., Sharkey D.J. Seminal fluid and fertility in woman. // *Fertil. Steril.* – Sep. 1. – 2016. –Vol. 106, № 3. P. 511-519.

160. Robertson S.A., Sharkey D.J. The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. // *Semin. Immunol.* – Aug. – 2001. Vol. 13, № 4. – P. 243-254.

161. Robertson S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. // *J. Anim. Sci.* – Mar. – 2007. – Vol. 85. 13 Suppl. – P. 36-44.

162. Robertson S.A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. // *Cell. Tissue. Res.* – Oct. – 2005. –Vol. 322, № 1. –P. 43-52.

163. Rooney K.L., Domar A.D. The relationship between stress and infertility. // *Dialogues Clin Neurosci.* – Mar. – 2018. – Vol. 20, № 1. –P. 41-47.

164. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. // *Immunol. Rev.* – May. – 2011. – Vol. 241, № 1. – P. 260-268.

165. Sabatté J., Remes Lenicov F., Cabrini M., Rodriguez Rodrigues C., Ostrowski M., Ceballos A., Amigorena S., Geffner J. The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. // *Microbes. Infect.* – Nov. – 2011. – Vol. 13, № 12-13. – P. 977-982.

166. Saccone G., Di Spiezio Sardo A., Ciardulli A., Caissutti C., Spinelli M., Surbek D., von Wolff M. Effectiveness of seminal plasma in in vitro fertilisation treatment: a systematic review and meta-analysis. // *BJOG.* – Jan. – 2019. – Vol. 126, № 2. – P. 220-225.

167. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – Jun. – 2010. – Vol. 63, № 6. – P. 601-610.

168. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various immune diseases. // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155, № 3. – P. 1151-1164

169. Samanta L., Parida R., Dias T.R., Agarwal A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – Apr. 28. – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 41.

170. Sarno J.L., Schatz F., Lockwood C.J., Huang S.T., Taylor H.S. Thrombin and interleukin-1beta regulate HOXA10 expression in human term decidual cells: implications for preterm labor. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – Jun. – 2006. – Vol. 91, № 6. – P. 2366-2372.

171. Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S., Higuma S., Shiozaki A., Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and

spontaneous abortion cases. // *Mol. Hum. Reprod.* – May. – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 347-353.

172. Schieve L.A., Meikle S.F., Ferre C., Peterson H.B., Jeng G., Wilcox L.S. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. // *N. Engl. J. Med.* – Mar. 7. – 2002. – Vol. 346, № 10. – P. 731-737.

173. Schjenken J.E., Robertson S.A. Seminal fluid and immune adaptation for pregnancy-comparative biology in mammalian species. // *Reprod. Domest. Anim.* – Sep. – 2014. – Vol. 49, Suppl 3. – P. 27-36.

174. Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S., et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 9. – P. 5488-5497.

175. Sekiyama A., Ueda H., Kashiwamura S., Nishida K., Kawai K., Teshimakondo S., Rokutan K., Okamura H. IL-18; a cytokine translates a stress into medical science. // *J. Med. Invest.* – Nov. – 2005. – Vol. 52. – P. 236-239.

176. Seshadri S., Bates M., Vince G., Jones D.I. Cytokine expression in the seminal plasma and its effects on fertilisation rates in an IVF cycle. // *Andrologia.* – Dec. – 2011. – Vol. 43, № 6. – P. 378-386.

177. Shankaran S. Outcomes from infancy to adulthood after assisted reproductive technology. // *Fertil. Steril.* – May. – 2014. – Vol. 101, № 5. – P. 1217-1221.

178. Sharkey D.J., Glynn D.J., Schjenken J.E., Tremellen K.P., Robertson S.A. Interferon- γ inhibits seminal plasma induction of colony-stimulating factor 2 in mouse and human reproductive tract epithelial cells. // *Biol. Reprod.* – Sep. 1. – 2018. – Vol. 99, № 3. – P. 514-526.

179. Sharkey D.J., Macpherson A.M., Tremellen K.P., Mottershead D.G., Gilchrist R.B., Robertson S.A. TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. // *J. Immunol.* – Jul. 15. – 2012. – Vol. 189, № 2. – P. 1024-1035.

180. Sharkey D.J., Macpherson A.M., Tremellen K.P., Robertson S.A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. // *Mol. Hum. Reprod.* – Jul. – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 491-501.

181. Sharkey D.J., Tremellen K.P., Briggs N.E., Dekker G.A., Robertson S.A. Seminal plasma transforming growth factor- β , activin A and follistatin fluctuate within men over time. // *Hum. Reprod.* – Oct. – 2016. – Vol. 31, № 10. – P.2183-91.

182. Sharkey D.J., Tremellen K.P., Briggs N.E., Dekker G.A., Robertson S.A. Seminal plasma pro-inflammatory cytokines interferon- γ (IFNG) and C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8) fluctuate over time within men. // *Hum. Reprod.* – Jul.1. – 2017. – Vol. 32, № 7. – P.1373-1381.

183. Sharkey D.J., Tremellen K.P., Jasper M.J., Gemzell-Danielsson K., Robertson S.A. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. // *J. Immunol.* – Mar. 1. – 2012. – Vol.188, № 5. – P. 2445-5.

184. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. // *J. Reprod. Immunol.* – Jun. – 2010. – Vol. 85, № 2. – P. 121-9.

185. Simón C., Giudice L.C., Eds. *The Endometrial Factor: A Reproductive Precision Medicine Approach.* // CRC Press, Boca Raton, USA. - 2017.

186. Skakkebaek N.E., Rajpert-De Meyts E., Buck Louis G.M., Toppari J., Andersson A.M., Eisenberg M.L., Jensen T.K., Jørgensen N., Swan S.H., Sapra K.J., Ziebe S., Priskorn L., Juul A. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. // *Physiol. Rev.* – Jan. – 2016. – Vol. 96, № 1. – P. 55-97.

187. Skibinski G., Kelly R.W., Harrison C.M., McMillan L.A., James K. Relative immunosuppressive activity of human seminal prostaglandins. // *J. Reprod. Immunol.* – Aug. – 1992. – Vol. 22, № 2. – P.185-95.

188. Somerset D.A., Zheng Y., Kilby M.D., Sansom D.M., Drayson M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset. // *Immunology.* – 2004. – Vol. 112, № 1. – P. 38-43.

189. Song Z.H., Li Z.Y., Li D.D., Fang W.N., Liu H.Y., Yang D.D., Meng C.Y., Yang Y., Peng J.P. seminal plasma induces inflammation in the uterus through the $\gamma\delta$ T/IL-17 pathway. // *Sci. Rep.* – Apr. – 2016. – Vol. 25, № 6. – P. 25118.

190. Soubry A. Epigenetics as a Driver of Developmental Origins of Health and Disease: Did We Forget the Fathers? // *Bioessays.* - Jan. – 2018. – Vol. 40, № 1.

191. Sugama S., Conti B. Interleukin-18 and stress. // *Brain Res. Rev.* – Jun. – 2008. – Vol. 58, № 1. – P. 85-95.

192. Teles A., Schumacher A., Kühnle M.C., Linzke N., Thuere C., Reichardt P. et al. Control of uterine microenvironment by foxp3 (+) cells facilitates embryo implantation. // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol.4. – P. 158.

193. Thaler C.J. Immunological role for seminal plasma in insemination and pregnancy. // *Am. J. Reprod. Immunol.* - Nov-Dec. – 1989. – Vol. 21, № 3-4. – P. 147-50.

194. Thompson J.G., Kind K.L., Roberts C.T., Robertson S.A., Robinson J.S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 11. – P. 2783-6.

195. Thompson L.A., Barratt C.L., Bolton A.E., Cooke I.D. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – Sep. – 1992. – Vol. 28, № 2. – P. 85-9.

196. Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J. et al. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 8. – P.5737-5745.

197. Tokmadzić V.S., Tsuji Y., Bogović T., Laskarin G., Cupurdija K., Strbo N., Koyama K., Okamura H., Podack E.R., Rukavina D. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – Oct. - 2002. – Vol. 48, № 4. – P. 191-200.

198. Tremellen K.P., Seamark R.F., Robertson S.A. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. // *Biol. Reprod.* - May. – 1998. – Vol. 58, № 5. – P.1217-25.

199. Tremellen K.P., Valbuena D., Landeras J., Ballesteros A., Martinez J., Mendoza S., Norman R.J., Robertson S.A., Simón C. The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. // *Hum. Reprod.* – Dec. – 2000. – Vol. 15, № 12. – P. 2653-8.

200. Vanpouille C., Introini A., Morris S.R., Margolis L., Daar E.S., Dube M.P., Little S.J., Smith D.M., Lisco A., Gianella S. Distinct cytokine/chemokine network in semen and blood characterize different stages of HIV infection. // *AIDS.* – Jan. – 2016. – Vol. 30, № 2. – P.193-201.

201. von Wolff M., Rösner S., Germeyer A., Jauckus J., Griesinger G., Strowitzki T. Intrauterine instillation of diluted seminal plasma at oocyte pick-up does not increase the IVF pregnancy rate: a double-blind, placebo controlled, randomized study. // *Hum. Reprod.* – Dec. – 2013.-Vol. 28, № 12. – P.3247-52.

202. von Wolff M., Rösner S., Thöne C., Pinheiro R.M., Jauckus J., Bruckner T., Biolchi V., Alia A., Strowitzki T. // Intravaginal and intracervical application of seminal plasma in in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection treatment cycles--a

double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. // *Fertil. Steril.* – Jan. – 2009. – Vol. 91, № 1. – P.167-72.

203. Wang J.X., Norman R.J., Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. // *Hum. Reprod.* – Apr. – 2002. – Vol.17, № 4. – P. 945-9.

204. Wang Y.X., Chen H.G., Li X.D., Chen Y.J., Liu C., Feng W., Zeng Q., Wang P., Pan A., Lu W.Q. Concentrations of vanadium in urine and seminal plasma in relation to semen quality parameters, spermatozoa DNA damage and serum hormone levels. // *Sci. Total. Environ.* – Dec. – 2018. – Vol.15, № 645. – P.441-448.

205. Woiciechowsky C., Asadullah K., Nestler D., Eberhardt B., Platzer C., Schöning B., Glöckner F., Lanksch W.R., Volk H.D., Döcke W.D. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. // *Nat. Med.* – Jul. - 1998. – Vol. 4, № 7. – P. 808-13.

206. Worbs T., Förster R. A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. // *Trends Immunol.* – 2007. – Vol. 28, № 6. – P. 274-80.

207. Yoshinaga K. “Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system.” // *Seminars in Cell and Developmental Biology.* – 2008. - vol. 19, № 2. – P. 161–169.

208. Yoshino O., Osuga Y., Koga K., Tsutsumi O., Yano T., Fujii T., Kugu K., Momoeda M., Fujiwara T., Tomita K., Taketani Y. Evidence for the expression of interleukin (IL)-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 7, № 7. – P. 649-54.

209. Zenclussen A.C., Gerlof K., Zenclussen M.L., et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 166, № 3, - P. 811-822.

210. Zenclussen A.C., Hammerling G.J. Cellular regulation of the uterine microenvironment that enables embryo implantation. // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 321.

211. Zhou J., Wang Z., Zhao X., Wang J., Sun H., Hu Y. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 68, № 2. – P. 100-106.

212. Zimmermann G., Ackermann W., Alexander H. Expression and production of human chorionic gonadotropin (hCG) in the normal secretory endometrium: evidence of CGB7 and/or CGB6 beta hCG subunit gene expression. // *Biol. Reprod.* – 2012. – Vol. 86, № 3. – P. 87.