

**Министерство здравоохранения
Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

На правах рукописи

**КРАЕВАЯ
Елизавета Евгеньевна**

**ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ВЕДЕНИЮ ПАЦИЕНТОК С
ТРОМБОФИЛИЕЙ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

14.01.01- акушерство и гинекология

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Долгушина Н.В.

доктор биологических наук

Силачев Д.Н.

Москва 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 10 |
| 1.1. Причины неудач имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий..... | 10 |
| 1.2. Влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на исходы программ ВРТ | 12 |
| 1.3. Методы исследования гемостаза в программах ВРТ | 21 |
| 1.4. Применение низкомолекулярных гепаринов в программах ВРТ | 23 |
| 1.5. Внеклеточные везикулы и их роль в нарушении системы гемостаза | 26 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 35 |
| 2.1. Группы пациенток..... | 36 |
| 2.2. Конечные точки..... | 37 |
| 2.3. Критерии включения в исследование | 38 |
| 2.4. Объем выборки..... | 39 |
| 2.5. Методы исследования | 40 |
| 2.5.1 Общеклинические методы обследования | 42 |
| 2.5.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза..... | 43 |
| 2.5.3. Гормональное исследование..... | 43 |
| 2.5.4. Исследование эякулята | 44 |
| 2.5.5. Исследование системы гемостаза..... | 45 |
| 2.5.6. Исследование наследственных тромбофилий | 47 |
| 2.5.7. Исследование антифосфолипидных антител..... | 48 |
| 2.5.8. Исследование уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови | 50 |
| 2.5.9. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов..... | 50 |
| 2.5.10. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение | 51 |
| 2.5.11 Морфологическая оценка эмбрионов | 52 |
| 2.5.12. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода | 53 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Статистическая обработка полученных данных | 53 |
| Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ | 55 |
| 3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток | 55 |
| 3.2. Особенности овариальной стимуляции в программах ВРТ | 60 |
| 3.3. Характеристика гаметогенеза и раннего эмбриогенеза в программах ВРТ | 61 |
| 3.4. Оценка наличия наследственной и приобретенной тромбофилии | 62 |
| 3.5. Исследование системы гемостаза | 65 |
| 3.6. Оценка уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови и связь с параметрами гемостаза | 69 |
| 3.7. Назначение низкомолекулярных гепаринов пациенткам в программах ВРТ . | 73 |
| 3.8. Исходы программ ВРТ | 74 |
| Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ | 76 |
| ВЫВОДЫ | 85 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 87 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 89 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 92 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Показатели эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) за последние годы достигли своего плато и сохраняются на стабильном уровне, составляя 30-35% [1]. Для достижения беременности необходимо сочетание двух факторов: наличия эуплоидного эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия, готового к имплантации эмбриона [2]. Но даже при проведении преимплантационного генетического тестирования (ПГТ), которое позволяет производить перенос эуплоидных эмбрионов, не удастся добиться более высокого показателя частоты наступления беременности (ЧНБ), что может свидетельствовать о нарушении процесса имплантации [3], [4].

Наследственная и приобретенная тромбофилия могут быть причиной привычного выкидыша и других осложнений беременности, таких как преэклампсия, задержка роста плода (ЗРП) и мертворождение [5], [6], однако этот вопрос до сих пор является дискуссионным [7]. Возможным механизмом развития осложнений беременности при наличии тромбофилии является тромбоз сосудов плаценты, эндотелиопатия и воспаление, которые могут вызвать нарушение кровоснабжения и функции плаценты [8]. По аналогичному пути может нарушаться ранняя имплантация эмбриона и плацентация в программах ВРТ. Ряд исследований подтверждает влияние тромбофилии на исход программ ВРТ [9], [10], [11], тогда как в других исследованиях данная взаимосвязь не была доказана [12]. Дебаты по поводу роли тромбофилии в эффективности программ ВРТ усиливаются благодаря появляющимся данным о влиянии тромбопрофилактики на повышение числа наступивших беременностей у пациенток с повторными неудачами программ ВРТ в анамнезе [13], [14].

Цель исследования

Разработать алгоритм обследования и лечения бесплодия у пациенток с тромбофилией в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования

1. Сравнить клинико-лабораторные данные, параметры гаметогенеза, раннего эмбриогенеза и особенности овариальной стимуляции у пациенток, включенных в исследование, в зависимости от факта наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

2. Проанализировать частоту выявления наследственной (генетической) и приобретенной тромбофилии (персистенция антифосфолипидных антител) у пациенток, включенных в исследование, и оценить влияние различных видов тромбофилии на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

3. Изучить особенности системы гемостаза у пациенток в зависимости от наличия тромбофилии и наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

4. Исследовать уровень тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови пациенток в зависимости от наличия тромбофилии, параметров системы гемостаза и наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

5. Оценить эффективность низкомолекулярных гепаринов в качестве адьювантной терапии, направленной на повышение частоты наступления беременности, в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Научная новизна

Выявлены виды персистирующих антифосфолипидных антител (приобретенная тромбофилия), влияющие на частоту наступления беременности в программах ВРТ.

С помощью комплексного исследования системы гемостаза - теста тромбодинамики - выявлены и научно обоснованы изменения, характерные для тромбофилического состояния у пациенток программ ВРТ.

Впервые оценена роль тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови пациенток с бесплодием и тромбофилией в программах ВРТ.

Оценена эффективность антикоагулянтной терапии в качестве адъювантной терапии, направленной на повышение частоты наступления беременности в программах ВРТ.

Практическая значимость

Выявлен и предложен в качестве рутинного исследования спектр антифосфолипидных антител, влияющих на частоту наступления беременности в программах ВРТ.

Предложен метод тромбодинамики для комплексного исследования системы гемостаза у пациенток с тромбофилией в программах ВРТ.

Даны рекомендации по особенностям овариальной стимуляции у пациенток с тромбофилией в программах ВРТ.

Предложено назначение низкомолекулярных гепаринов в качестве адъювантной терапии для повышения частоты наступления беременности у пациенток программ ВРТ.

Положения, выносимые на защиту

1. Персистенция повышенного уровня антифосфолипидных антител, представленных в основном так называемыми некритериальными антителами (к фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину и аннексину V), связана с более низкими шансами наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ОШ=4,34; 95% ДИ=1,04; 20,22).

2. Персистенция повышенного уровня антифосфолипидных антител ассоциирована с изменением системы гемостаза в виде развития гиперкоагуляционного, а затем относительного гипокоагуляционного состояния, что связано с введением экзогенных гонадотропинов, и определяет необходимость их назначения в минимально возможных дозах для овариальной стимуляции у пациенток с тромбофилией.

3. Персистенция повышенного уровня антифосфолипидных антител коррелирует с повышенной продукцией тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами в плазме крови, что может быть причиной развития гиперкоагуляционного состояния системы гемостаза.

4. Назначение низкомолекулярных гепаринов у пациенток с тромбофилией не только снижает риск тромбозмболических осложнений, но в качестве адьювантной терапии позволяет увеличить частоту наступления беременности и живорождения в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ОШ=2,87; 95% ДИ=1,18; 6,97).

Личный вклад автора

Автор принимал участие в выборе темы научной работы, формулировании цели и задач исследования, в проведении и интерпретации результатов лабораторных обследований, в том числе исследования системы гемостаза, включая метод тромбодинамики, исследования антифосфолипидных антител, в систематизации и статистическом анализе полученных данных. Автором лично

осуществлялось обследование и ведение пар на всех этапах лечения бесплодия методами ВРТ: экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и переноса эмбриона (ПЭ) в полость матки.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация результатов

Основные положения работы были представлены на межклинической апробации диссертационной работы 16.01.2020 г., апробации диссертационной работы на апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ 27.01.2020 г., XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине 21.01.2020 г.

Практическое применение полученных результатов

Результаты проведенного исследования нашли применение в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории клинической иммунологии (заведующий д.м.н. Кречетова Л.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.). Полученные в результате проведенного исследования материалы включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты исследования изложены в 5 печатных работах, из которых 4 напечатаны в рецензируемых научных журналах,

рекомендуемых ВАК: журналах “Акушерство и гинекология”, «Проблемы репродукции», “Cells”.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена в традиционной форме. Включает оглавление, список принятых сокращений, введение, обзор литературы, главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа изложена на 102 страницах машинописного текста, сопровождается 13 рисунками, 16 таблицами. В библиографическом указателе 20 работ на русском языке и 96 работ на английском языке.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Причины неудач имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Первая успешная программа ВРТ была проведена в 1977 г, и в 1978 г родился первый ребенок, зачатый *in vitro*. Прошло более 40 лет, методы вспомогательной репродукции получили широкое распространение и стали достаточно доступными и позволили получать потомство у пар, которые ранее считались абсолютно бесплодными. Темпы внедрения высокотехнологической помощи в репродуктивной медицине неуклонно растут, в том числе проводится финансирование данных программ за счет государства. В России такие программы внедрены с 2006 г. В 2017 г. проведено 129 746 циклов ВРТ, что составляет 883 цикла на 1 млн населения [15].

За эти годы появились новые методы обследования и подготовки к программам ВРТ, постоянно разрабатываются препараты для стимуляции функции яичников, совершенствуются протоколы программ ВРТ, эмбриологические среды и методики, конечной целью является получить возможно большее количество качественных эмбрионов от бесплодной пары и добиться рождения живого ребенка. Но, несмотря на всю проделанную и проводимую работу, эффективность программ ВРТ за последнее десятилетие существенно не улучшилась [16].

В России в 2017 году в программе ЭКО частота наступления беременности (ЧНБ) составила в расчете на цикл 33,9%, на перенос эмбрионов - 38,4%, в программе инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ) эти показатели составили 31,2%, и 35,7% соответственно, в программе переноса размороженных эмбрионов - 39,6% и 41,0% соответственно, что сопоставимо с показателями Европейских стран [15].

Среди причин неудач программ ВРТ существует немало устранимых факторов: неадекватная овариальная стимуляция или реакция на нее, погрешности на эмбриологическом этапе и, как следствие, неудовлетворительное качество

полученных эмбрионов, погрешности в технике переноса эмбрионов в полость матки [17]. Несмотря на возможность ликвидации этих факторов в дальнейших программах ВРТ, приблизительно у 30% супружеских пар повторное проведение программ ВРТ оказывается безрезультатным [18]. При исключении всех очевидных причин, препятствующих наступлению беременности, и условия переноса в полость матки эмбрионов отличного или хорошего качества по классификации Gardner [19], предполагают, что ненаступление беременности в данном цикле ВРТ связано с нарушениями на этапе имплантации эмбриона, и классифицируют как имплантационную потерю. По аналогии с термином «привычный выкидыш» введен термин «привычные имплантационные потери», который подразумевает отсутствие клинической беременности после переноса минимум 4-х эмбрионов хорошего качества в 3-х циклах ВРТ женщине до 40 лет [20].

Причины имплантационных потерь можно разделить на две большие группы: первая - аномалии эмбриона, не диагностируемые при стандартных морфологических методиках оценки качества (речь прежде всего идет о нарушениях кариотипа), вторая - различная патология эндометрия и, как следствие, неадекватное взаимодействие эндометрия с эмбрионом.

Морфологическими критериями пригодности эмбриона к переносу в полость матки, согласно официально утвержденной классификации Gardner, являются количество бластомеров и степень фрагментации цитоплазмы в определенные временные промежутки [19]. Морфологические критерии оценки качества эмбриона не коррелируют с его хромосомным набором, и при качестве эмбрионов классов AA и AB вероятность анеуплоидии не исключена [21]. По данным литературы частота анеуплоидии эмбрионов, полученных в результате проведения программ ВРТ, выше, чем в естественных циклах, что объясняют проведением овариальной стимуляции, в результате которой удается получить большое количество ооцитов, которые в естественном цикле подверглись бы атрезии [22], [23]. Также это обусловлено тем, что зачастую ВРТ проводится пациентам старшей возрастной группы, у которых вероятность получения анеуплоидного эмбриона

выше, чем в популяции.

Другая группа имплантационных потерь включает в себя различные состояния, сопровождающиеся патологией эндометрия. К этой группе относится органическая внутриматочная патология: воспалительные заболевания матки, аденомиоз, миома матки, гиперпластические процессы эндометрия.

Наследственная и приобретенная тромбофилия могут быть причиной привычного выкидыша и других осложнений беременности, таких как преэклампсия, ЗРП и мертворождение [5], [6], однако этот вопрос до сих пор является дискуссионным [7]. Возможным механизмом развития осложнений беременности при наличии тромбофилии является тромбоз сосудов плаценты, эндотелиопатия и воспаление, которые могут вызвать нарушение кровоснабжения и функции плаценты [8]. По аналогичному пути может нарушаться ранняя имплантация эмбриона и плацентация в программах ВРТ. Ряд исследований подтверждает влияние тромбофилии на исход программ ВРТ [9], [10], [11], тогда как в других исследованиях данная взаимосвязь не была доказана [12]. Дебаты по поводу роли тромбофилии в эффективности программ ВРТ усиливаются благодаря появляющимся данным о влиянии тромбопрофилактики на повышение числа наступивших беременностей у пациенток с повторными неудачами программ ВРТ в анамнезе [13], [14].

1.2. Влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на исходы программ ВРТ

Тромбофилия определяется как патологическое состояние, характеризующееся нарушением системы свёртывания крови, при которой увеличивается риск развития тромбоза. Тромбофилия классифицируется на наследственную и приобретенную, в том числе ятрогенную, а также на тромбофилию высокого и умеренного/низкого риска развития ТЭО.

К наследственной тромбофилии высокого риска ТЭО относят мутацию гена протромбина (FII) *G20210A*, мутацию гена фактора V (FV) *G1691A* (мутация

Лейдена), дефицит антитромбина-III (АТ-III), протеина С и протеина S [24]. Так, гетерозиготные мутации FV и FII при наличии отягощенного личного или семейного тромботического анамнеза повышают риск тромбоза на 17% и 10% соответственно, сочетание мутаций FV и FII - более чем на 20%, дефицит АТ-III - на 40%, дефицит протеина С - на 4-17% [25]. К приобретенной тромбофилии высокого риска тромбоэмболических осложнений (ТЭО) относят антифосфолипидный синдром (АФС).

Наследственные тромбофилии и исходы программ ВРТ. В большинстве обзорных публикаций, посвященных патогенетическим аспектам имплантации и плацентации при беременности вне зависимости от пути ее достижения, наличие наследственной тромбофилии предполагает нарушение этих процессов вследствие чрезмерной активации внешнего и внутреннего путей свертывания крови, ингибирования фибринолиза в месте имплантации, что может нарушать инвазию материнских сосудов в синцитиотрофобласт и приводить к имплантационным потерям, отслойке хориона при наступлении беременности и плацентарным нарушениям на более поздних сроках гестации [26].

Интерес с точки зрения влияния на ЧНБ в программах ВРТ вызывают вышеуказанные наследственные тромбофилии высокого риска ТЭО.

Мутация фактора V (FV) G1691A (мутация Лейдена) является достаточно распространенным видом наследственной тромбофилии. В европейской популяции частота гетерозиготной FV составляет 3-7%, в российской популяции среди лиц без отягощенного тромботического анамнеза - 2,6% [27]. В результате данной мутации при экспрессии гена в белке происходит замена аминокислоты глутамина на аргинин и не происходит его расщепление антикоагулянтом протеином С. Такое состояние называется резистентностью к APC. В результате этой резистентности в крови повышается концентрация FV, что приводит к повышенному риску ТЭО. Роль мутации Лейдена в генезе имплантационных потерь в программах ВРТ остается спорной. Исследование Goppel et al. продемонстрировало противоположный эффект: у носительниц Лейденской мутации частота наступления беременности при проведении ВРТ была вдвое выше [28]. Авторы

исследования связывают этот факт с парадоксальным протективным эффектом данного вида тромбофилии, который обусловлен тромбированием сосудов децидуального слоя на самых ранних сроках беременности при взаимодействии эмбриона с эндометрием. Это приводит к гипоксии, что, в свою очередь, благоприятно для эмбрионального развития, так как избыточное поступление кислорода может оказывать повреждающее воздействие.

Мутация фактора II (FII) G20210A (протромбина) также является достаточно распространенным видом наследственной тромбофилии. Распространенность гетерозиготного носительства мутации FII в европейской популяции составляет 2-6%, среди жителей России - 1,74% [27]. Изменения отмечаются в регуляторном участке гена, поэтому нарушается синтез белка при неизменной его структуре. У носителей аллеля А в крови выявляется повышенный уровень протромбина.

Также активно изучается **мутация гена ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1 675 5G/4G)**, особенно гомозиготная форма носительства. Распространенность гетерозиготного варианта мутации составляет до 50%, гомозиготной формы - 26% [29]. Предполагают, что данная мутация оказывает негативное воздействие на имплантацию эмбриона не путем изменения реологических свойств крови, а за счет усиления выработки в эндометрии белка PAI-1 (SERPINE 1), который препятствует формированию адекватного взаимодействия эмбриона с эндометрием [30]. PAI-1 - белок, синтезирующийся и секретирующийся в кровь эндотелиоцитами, а также гепатоцитами, моноцитами, фибробластами, гладкомышечными клетками. Увеличение концентрации PAI-1 в плазме крови является наиболее частой причиной снижения фибринолитической активности крови. Повышенное в результате полиморфизма гена содержание белка PAI-1 в эндометрии ассоциируют со снижением глубины инвазии трофобласта и неполноценностью имплантации [30].

Антитромбин-III- плазменный гликопротеин, синтезируется в печени. АТ-III связывается преимущественно с фактором II (тромбин), фактором IXa и фактором Xa, что ингибирует процесс свертывания крови [31]. Предполагается, что частота

распространения наследственного дефицита АТ-III составляет 1 случай на 2000-5000 человек [32], а у пациентов с тромбозом в анамнезе - 1 случай на 20-200 человек. При дефиците АТ-III отмечается наивысший риск тромбообразования среди всех наследственных тромбофилий [33]. Наследственный дефицит представлен двумя типами: при I типе наблюдается дефицит белка АТ-III: при гомозиготной мутации - полный дефицит белка АТ-III, при гетерозиготной - потеря до 50% белка; при II типе нарушается функция АТ-III вследствие изменения структуры белка [31].

Протеин С - сериновая протеаза плазмы, взаимодействует с тромбомодулином, превращаясь в активированный белок С (APC), который является сильным антикоагулянтом: инактивирует факторы свертывания крови V и VIII, а также обладает противовоспалительным и цитопротекторным свойствами [33]. Дефицит протеина С - редкое состояние, встречается приблизительно 1 случай на 200-500 человек, клинически проявляется у 1 из 20 000 человек; может быть приобретенным и врожденным - вызванным мутациями в гене *PROC*. Описано более 160 мутаций в гене *PROC*, которые наследуются по аутосомно-доминантному типу и приводят либо к снижению количества APC (I тип), либо к снижению активности APC (II тип). У гетерозигот наблюдается умеренный, а у гомозигот - выраженный дефицит APC, что встречается крайне редко - у 1 из 4 млн. человек [34].

Протеин S - сериновая протеаза плазмы, которая играет важную роль в коагуляции, воспалении и апоптозе. Дефицит протеина S - редкое состояние, встречается приблизительно 1 случай на 500 человек; может быть приобретенным и врожденным - вызванным мутациями в гене *PROS* [35]. Описано более 200 мутаций *PROS*, которые проявляются в трех формах дефицита протеина S: как тип I (пониженный уровень белка S), тип II (низкая активность белка S) и тип III (низкий уровень свободного белка S вследствие повышенного связывания с C4 компонентом комплемента). Мутации наследуются по аутосомно-доминантному типу, при гетерозиготной форме наблюдается умеренный дефицит, при гомозиготной - тяжелый дефицит протеина S. Умеренный проявляется

рецидивирующими тромбозами, тяжелый встречается редко и исследован недостаточно, прогноз для жизни неблагоприятный [35].

Прочие мутации не несут столь значимого риска тромбофилии, и их вклад в дефекты имплантации в программах ВРТ, по мнению большинства исследователей, несущественен [36].

В программах ВРТ проведение овариальной стимуляции сопровождается значительным и нефизиологичным повышением концентрации половых гормонов в крови, что приводит к состоянию гиперкоагуляции [37]. Выявлено, что уровень эстрадиола имеет прямую корреляционную связь с концентрацией фибриногена, D-димера, факторов свертывания крови (FV, FII, фактора Виллебранда), резистентностью к APC; и обратную корреляционную связь с активностью важнейших антикоагулянтов (AT-III и протеина S) [38].

Хорионический гонадотропин, используемый в качестве триггера овуляции, в большей степени, чем эстрадиол, активирует коагуляционный каскад и впоследствии фибринолиз, о чём свидетельствуют увеличение концентрации плазминогена, снижение уровня ингибитора активатора плазминогена (РАI) и увеличение концентрации продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ). Такой отложенный во времени фибринолитический процесс свидетельствует о развитии так называемого репаративного фибринолиза в рамках компенсированного ДВС-синдрома [38].

Все это создает риск нарушения имплантации и плацентации в программах ВРТ. У пациенток с дополнительными факторами риска ТЭО, такими как отягощенный семейный тромботический анамнез, поздний репродуктивный возраст, ожирение, курение, соматические заболевания, и др., гемостазиологические изменения на фоне овариальной стимуляции при проведении ВРТ являются более выраженными [38], [24].

Тем не менее, несмотря на, казалось бы, однозначную связь наследственной тромбофилии и вероятности наступления беременности, к настоящему времени нет доказательных данных о влиянии наследственной тромбофилии на исходы программ ВРТ.

Так, в ретроспективном исследовании Steinvil et al. (2012) была проанализирована распространенность наследственной и приобретенной тромбофилии у пациенток с идиопатическим бесплодием в программах ВРТ. Были получены данные о том, что у пациенток с неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе доля наследственной и приобретенной тромбофилии была не выше, чем у фертильных женщин, и не ассоциировалась с имплантационными неудачами. Напротив, у пациенток с резистентностью к АРС, мутацией гена FV, и/или наличием волчаночного антикоагулянта (ВА) отмечалась более высокая частота живорождения [39]. Tan X. et al. провели мета-анализ (2016), в котором проанализировали результаты 7 когортных исследований за период с 2007 по 2015 г. Было выявлено, что мутации генов системы гемостаза не влияют на успех имплантации вне зависимости от возраста, причины бесплодия и количества попыток программ ВРТ в анамнезе [40].

Наоборот, в работе Qublan et al. (2006) у 68,9% женщин с множественными неэффективными программами ВРТ был выявлен по меньшей мере один из наследственных или приобретенных критериев тромбофилии по сравнению с 25% в группе женщин с наступившей в результате ВРТ беременностью [10]. В исследовании Grandone et al. Лейденовская мутация встречалась чаще (14,4%) у женщин с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе по сравнению с забеременевшими в результате ВРТ пациентками (1%) [11]. В 2004 г. Azem et al. продемонстрировали более частую встречаемость полиморфизма генов тромбофилии у женщин с 4 и более неудачами программ ВРТ по сравнению с группой фертильных женщин или пациенток, забеременевших в первом цикле ЭКО и ПЭ [9]. А мета-анализ, проведенный Di Nisio et al. (2011), в который были включены 8 исследований случай-контроль, показал, что наличие мутации гена FV в 3 раза увеличивало риск неудач имплантации (ОШ=3,08; 95% ДИ=1,77-5,36). При этом наличие гомозиготной мутации увеличивало риск неудач имплантации в 8,4 раза (ОШ=8,43; 95% ДИ=0,96;73,8), а гетерозиготной мутации – в 2,7 раз (ОШ=2,74; 95% ДИ=1,43-5,25). Остальные наследственные тромбофилии не

оказывали влияние на результаты программ ВРТ, по данным проведенного исследования [41].

Таким образом, данные литературы о влиянии наследственной тромбофилии на результаты программ ВРТ являются противоречивыми, что объясняется небольшим числом и обсервационным дизайном проведенных исследований, и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса. Ввиду отсутствия доказательных данных, в настоящее время рутинное обследование на наследственные тромбофилии, согласно клиническим рекомендациям, не рекомендовано перед лечением бесплодия методами ВРТ [42]. При этом пациенткам группы риска ТЭО, с потерей плода после 10 недель гестации, тяжелой степенью ЗРП, тяжелой преэклампсией в анамнезе, обследование на наличие наследственной тромбофилии перед планированием беременности, включая проведение программ ВРТ, может быть целесообразным [43], [44].

Антифосфолипидный синдром и исходы программ ВРТ. АФС - это системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся тромбозами и/или осложнениями беременности на фоне повышенного титра антифосфолипидных антител (АФА) [45].

Диагноз АФС ставится при сочетании клинических проявлений и лабораторных критериев. Клинические проявления АФС включают сосудистые тромбозы и осложнения беременности (привычный выкидыш, потеря хотя бы одной беременности после 10 недель гестации, тяжелая преэклампсия и плацентарные нарушения в анамнезе). К лабораторным критериям относятся повышение титра ВА, и/или антител класса М и/или G к кардиолипину (АКЛ), и/или антител класса М и/или G к β 2-гликопротеину-1 (анти- β 2-ГП1), диагностированные дважды с интервалом в 12 недель [46]. АФС - единственная форма тромбофилии, влияние которой на течение беременности однозначно доказано. У 8-42% женщин с привычными потерями беременности определяются АФА в повышенном титре [47].

При наличии клинических проявлений АФС и отсутствии лабораторных критериев выделяют так называемую серонегативную форму АФС. В таких

ситуациях рекомендуется проводить обследование на антитела класса А к КЛ, β 2-ГП1, а также антитела класса М и G к другим фосфолипидам: фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилхолину (ФХ), фосфатидилинозитолу (ФИ), фосфатидилэтаноламину (ФЭ) и др. [48], [47].

В основе патогенеза бесплодия и осложнений беременности при АФС лежит воздействие АФА на эндотелиальные клетки с развитием эндотелиальной дисфункции и повышенным риском тромбообразования, и на клетки трофобласта с развитием провоспалительной реакции, нейтрофильной инфильтрации, выработкой провоспалительных цитокинов и активацией системы комплемента, что приводит к торможению роста трофобласта [49].

Был проведен ряд исследований, посвященных изучению взаимосвязи АФС, изолированного носительства АФА и исходами программ ВРТ. Если роль АФС и АФА в невынашивании беременности является очевидной и доказанной, то их роль в развитии бесплодия и неудач программ ВРТ остается дискуссионной.

Так, в обзоре Chighizola et al. (2014) было проанализировано 29 исследований, в которых изучалась взаимосвязь между носительством АФА и исходами программ ВРТ. В 44,8% исследований была выявлена зависимость исходов ВРТ от повышенных титров АФА, но авторы обзора отмечают крайне высокую гетерогенность групп пациенток, различные диагностические критерии для оценки титра АФА, исследование различных типов и классов АФА. В результате был сделан вывод о том, что достоверная связь между повышенными титрами АФА и бесплодием, а также исходами ВРТ, в настоящее время не является доказанной [45].

Противоположные выводы были сделаны в исследовании Di Rosa et al. (2019), в котором было проведено обследование 520 пациенток в программах ВРТ на наличие антинуклеарных антител, АКЛ и анти- β 2-ГП1 классов М и G, ВА и других аутоантител [50]. У 19% пациенток был выявлен стойкий повышенный титр аутоантител. Чаще всего определялись повышенные титры ВА (53,49%), АКЛ (44,19%) и анти- β 2-ГП1 (25,58%). 6,73% пациенток имели диагноз системного аутоиммунного заболевания, 3,27% - АФС. Авторы отмечают, что у части пациенток (4,6%) с повышенным титром АФА отсутствовали классические

клинические проявления АФС, тем не менее в анамнезе чаще встречались указания на неблагоприятные исходы беременности, в том числе неудачи имплантации в программах ВРТ. В результате было сделано предположение, что спектр клинических проявлений при наличии лабораторных критериев АФС может быть шире, чем утвержденные классические клинические критерии АФС. Авторы исследования рекомендуют проводить обследование на наличие АФА всем пациенткам программ ВРТ с целью максимально ранней коррекции возможных нарушений имплантации и течения беременности [50].

Интересные данные были получены в систематическом обзоре Di Nisio et al. (2011) [41]. В ходе проведения мета-анализа, включающего 29 когортных исследований и исследований случай-контроль (5270 пациенток), было выявлено, что в целом наличие АФА увеличивало риск неудач программ ВРТ в 3,3 раза (ОШ=3,33; 95% ДИ=1,77-6,26). При этом АФА, играющими роль в имплантационных неудачах, были не АКЛ и анти-β2-ГП1, а ВА, антитела к фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидной кислоте и фосфатидилглицеролу.

По данным отечественных исследований (Khizroeva et al, 2018) частота носительства АФА у пациенток с неудачными исходами программ ВРТ выше по сравнению с пациентками с состоявшейся беременностью: у 42,9% в группе пациенток с отсутствием беременности после ВРТ и у 19,1% забеременевших после ВРТ [51]. При этом чаще выявлялись анти-β2-ГП1 (31,4%), антитела к аннексину V (24,7%) и АКЛ (8,9%). Авторы предлагают рассматривать повышенный титр АФА как временное противопоказание к проведению программ ВРТ.

Таким образом, данные литературы о влиянии АФС на результаты программ ВРТ являются противоречивыми, что объясняется наблюдательным дизайном проведенных исследований, и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса. Ввиду отсутствия доказательных данных в настоящее время рутинное обследование на АФА, согласно клиническим рекомендациям, не рекомендовано перед лечением бесплодия методами ВРТ [42]. При этом обследование на наличие АФА должно быть рекомендовано перед планированием

беременности, включая проведение программ ВРТ, пациенткам группы риска ТЭО, с привычным выкидышем, потерей плода после 10 недель гестации, тяжелой степенью ЗРП, тяжелой преэклампсией в анамнезе [46], [44], [52].

1.3. Методы исследования гемостаза в программах ВРТ

Согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. №107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" все пациентки, вступающие в программы ВРТ, проходят обследование системы гемостаза методом коагулограммы. К базовым показателям коагулограммы относятся фибриноген, протромбиновый индекс (ПТИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), и число тромбоцитов.

Часто пациенткам группы риска ТЭО (старшей возрастной группы, с ожирением, с отягощенным тромботическим анамнезом, и др.) дополнительно назначается развернутое исследование системы гемостаза, включающее дополнительно определение агрегации тромбоцитов, концентрации Д-димера, тромбоэластографию (ТЭГ).

Д-димер – продукт, образующийся в результате деградации поперечно-сшитого фибрина под действием плазмина [53]. Д-димер является маркером активации системы гемостаза, отражает активность фибринолиза и степень коагуляционного потенциала крови. Определение концентрации Д-димера является чувствительным, но неспецифичным тестом для прогноза и диагностики ТЭО, так как ряд состояний и заболеваний, не сопровождающихся тромбозами, ассоциирован с повышенным уровнем Д- димера, например, хирургические вмешательства, кровотечения и травмы, онкологические, воспалительные, инфекционные заболевания и сепсис, также повышенный уровень Д-димера выявляется у лиц старше 80 лет и беременных. На концентрацию Д-димера оказывают влияние величина тромба и время от начала клинических событий до проведения диагностики.

Тромбоэластометрия (ТЭМ) - глобальный метод оценки системы гемостаза. ТЭМ, в отличие от классических клотинговых исследований, отображает кинетику всех стадий формирования тромба с учетом вклада как плазменных, так и клеточных (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов) участников гемостатических реакций, а также фибринолиз. С помощью ТЭМ можно диагностировать активацию системы гемостаза и гипокоагуляцию на ранних этапах, выявить нарушения агрегации тромбоцитов, активацию фибринолиза, оценить эффективность проводимой антикоагулянтной и антиагрегантной терапии [54].

Преимуществами ТЭМ также являются скорость получения результатов (20 минут от начала проведения исследования), простота (исследуется цельная кровь, что близко к ситуации *in vivo*), возможность измерять реальную прочность сгустка, возможность контролировать антикоагулянтную и антитромботическую терапию, возможность использовать в экстренных ситуациях, а также плановых для углубленного изучения сложных коагулопатий [54].

Тромбодинамика (ТД) - новый перспективный метод обследования нарушений свертывания крови [55]. В отличие от существующих тестов, тромбодинамика учитывает физиологические особенности гемостатического процесса: *in vitro* имитирует нарушение целостности стенки сосуда и отображает процесс локализованного формирования фибринового сгустка в режиме реального времени в небольшом объеме образца плазмы крови пациента. В основе метода лежит принцип локальной активации коагуляции на плоской поверхности с нанесенным на неё тромбопластином - тканевым активатором свертывания. С помощью теста тромбодинамики возможно получить информацию о системе гемостаза, принципиально недоступную существующим стандартным методам исследования свертывающей системы крови, а также количественно оценить все этапы формирования фибринового сгустка. Проведенные исследования показали высокую чувствительность метода тромбодинамики к нарушениям плазменного звена гемостаза и эффектам антикоагулянтной терапии при широком спектре заболеваний, в том числе при бесплодии.

1.4. Применение низкомолекулярных гепаринов в программах ВРТ

Утвержденными показаниями для назначения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) в программах ВРТ являются: профилактика ТЭО у пациенток групп риска ТЭО (ТЭО в анамнезе, тромбофилии высокого риска, наличие 3-х и более других факторов риска ТЭО), у пациенток с АФС, и при развитии синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) средней и тяжелой степени [24], [43], [46], [52], [44], [56].

Положительное действие НМГ на процессы имплантации и плацентации опосредуются многими факторами. Помимо непосредственного антикоагулянтного и антитромботического действия, НМГ оказывают влияние на молекулярно-клеточные механизмы, вовлеченные в имплантацию эмбриона. Антикоагулянтное и противотромботическое действие НМГ зависит от молекулярного веса фракций, входящих в их состав. Эти эффекты обусловлены в основном анти-Ха активностью и в меньшей степени анти-IIa активностью. Также НМГ активируют ингибитор превращения тканевого фактора (TFPI), фибринолиз путем прямого высвобождения активаторов плазминогена из эндотелиоцитов [27], [57]. Противовоспалительное действие НМГ осуществляется за счет ингибирования TNF- α , продуцируемого макрофагами, иммуномодулирующее действие - через систему E-кадгерина и инсулиноподобный фактор роста, антиапоптотическое действие – через влияние на клетки трофобласта через эпителиальный фактор роста (EGF), взаимодействие с матриксными металлопротеиназами и усиление инвазивных свойств бластоцисты [49], [58].

Исследование Di Simone N. продемонстрировало, что добавление НМГ в культуру клеток трофобласта увеличивает инвазивную активность и дифференцировку трофобласта [59]. Продемонстрировано стимулирующее влияние НМГ на выработку и активность инсулиноподобного фактора роста IGF-I, принимающего участие в инвазии трофобласта [60], экспрессию IL-1 и IL-6 [61], [62].

С точки зрения этих свойств, неудачи имплантации в программах ВРТ в анамнезе могли бы быть дополнительным показанием к назначению НМГ, однако их рутинное назначение не рекомендовано в программах ВРТ. Тем не менее, вопрос о повышении частоты наступления беременности в программах ВРТ с помощью терапии НМГ остается дискуссионным.

Так, мета-анализ Seshadri et al. (2012), включивший 10 крупных исследований за период с 1994 г. по 2011 г., не выявил эффективности рутинного применения НМГ в программах ВРТ [63]. Авторы мета-анализа пришли к выводу, что затруднительно сделать вывод о целесообразности назначения НМГ в силу того, что в исследованиях были слишком гетерогенные группы пациенток, различались время начала и продолжительность терапии НМГ.

В 2018 г. в ретроспективном когортном исследовании Siristatidis et al., в котором анализировалась целесообразность назначения НМГ пациенткам с имплантационными потерями в анамнезе в программах ВРТ, было показано отсутствие различия в исходах программ ВРТ в группах, получавших и не получавших терапию НМГ [64].

Рандомизированное исследование Lodigiani et al. (2017), в котором НМГ назначался в режиме ежедневных инъекций на протяжении всего протокола овариальной стимуляции, также было продемонстрировано отсутствие увеличения ЧНБ и живорождения [65]. В данном исследовании имплантационные потери в анамнезе не являлись обязательным фактором для включения в основную группу, также обе группы - основная и контрольная - были обследованы на наличие тромбофилии, и наличие тромбофилии высокого риска ТЭО являлось критерием исключения.

В Кохрановский обзор Akhtar et al. (2015) вошли 3 крупных исследования, включающие 386 пациенток программ ВРТ. В 1-е исследование были включены пациентки с одной попыткой программы ВРТ без осложненного тромботического анамнеза. Во 2-е исследование были включены пациентки с как минимум с одним тромботическим эпизодом в анамнезе. В 3-е исследование были включены пациентки с как минимум 2-мя неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе.

Во всех 3-х исследованиях назначались профилактические дозы НМГ со дня трансвагинальной пункции (ТВП) фолликулов или ПЭ в полость матки по сравнению с отсутствием терапии или плацебо. Были получены разные результаты в зависимости от статистической обработки данных. Так, анализ фиксированного эффекта показал увеличение живорождения (ОШ=1,77; 95% ДИ = 1,07-2,90) и наступления беременности (ОШ=1,61; 95% ДИ = 1,03-2,53), тогда как анализ случайных эффектов показал отсутствие позитивного влияния НМГ на живорождение (ОШ=1,85; 95% ДИ = 0,80-4,24) и наступление беременности (ОШ=1,66; 95% ДИ = 0,94-2,90) [66].

В рандомизированном клиническом испытании, проведенным Urman et al. (2009), была изучена эффективность эмпирического назначения НМГ пациенткам с идиопатическими неудачами программ ВРТ. Была выявлена большая доля живорождения в группе НМГ (34,7% vs 26,7%) [14].

Неоднозначные данные были получены и в других исследованиях, в которых изучалось назначение НМГ в программах ВРТ [67].

Что касается применения антиагрегантов, то единственный систематический Кокрановский обзор, сделанный Siristatidis et al. (2016), не выявил положительного влияния назначения низких доз аспирина для повышения эффективности программ ВРТ. В результате были сделаны выводы об отсутствии значимого статистического различия в частоте живорождения, наступления клинической беременности, эктопической беременности, многоплодной беременности и невынашивания беременности между группами пациенток. Таким образом, рутинное назначение аспирина с целью повышения частоты беременности у пациенток в программах ВРТ не является целесообразным [68].

Стандартизированных протоколов терапии НМГ в рамках ВРТ не разработано. Схемы назначения различаются; в исследованиях, посвященных применению НМГ в рамках ВРТ, профилактические дозы препарата назначались либо со дня, следующего за ТВП, либо за 1 цикл до проведения протокола ВРТ и отменялись за сутки до ТВП яичников. Длительность терапии варьировалась в зависимости от состояния системы гемостаза по данным клинико-лабораторного обследования.

Лабораторный контроль не осуществлялся, так как во всех исследованиях назначались профилактические дозы НМГ [14], [65], [64].

Таким образом, применение НМГ в протоколах ВРТ с целью повышения ЧНБ является спорным и дискуссионным вопросом. Результат исследования в значительной степени зависит от дизайна исследования, критериев включения и исключения.

1.5. Внеклеточные везикулы и их роль в нарушении системы гемостаза

Внеклеточные везикулы

Интерес к внеклеточным везикулам (ВВ) растёт экспоненциально, начиная с момента их открытия более 30 лет назад [69]. ВВ – внеклеточные “пузырьки”, окруженные двуслойной липидной мембраной, формируемые различными типами клеток и обнаруженные во всех биологических жидкостях организма, включая кровь, мочу, слюну, пот, грудное молоко, интерстициальную жидкость, семенную жидкость, фолликулярную жидкость и т.д. ВВ участвуют в межклеточной коммуникации, транспорте сигнальных/регуляторных молекул, таких как нуклеиновые кислоты (например, микроРНК) и белки [70].

Внеклеточные везикулы подразделяются на 3 основных класса: экзосомы, эктосомы/микровезикулы и апоптотические тельца. Апоптотические тельца образуются в процессе апоптотической гибели клетки, в то время как экзосомы и микровезикулы формируются живыми клетками (Рисунок 1) [71]–[73].

Микровезикулы/эктосомы представляют собой “пузырьки” размером от 100 до 1000 нм в диаметре [71]. Они образуются путём выпячивания плазматической мембраны из клетки наружу с последующим отделением образовавшегося пузырька от мембраны клетки (Рисунок 1) [73], [74].

Экзосомы - это мембранные везикулы размером от 40 до 100 нм в диаметре, образующиеся из эндосомальных мультивезикулярных телец (МВТ) в результате их слияния с поверхностной мембраной клетки (Рисунок 1) [73], [75].

Апоптотические тельца высвобождаются из фрагментированных в результате апоптоза клеток. Они имеют размер порядка 50-2000 нм в диаметре и представляют собой фрагменты умирающих клеток (Рисунок 1) [73].

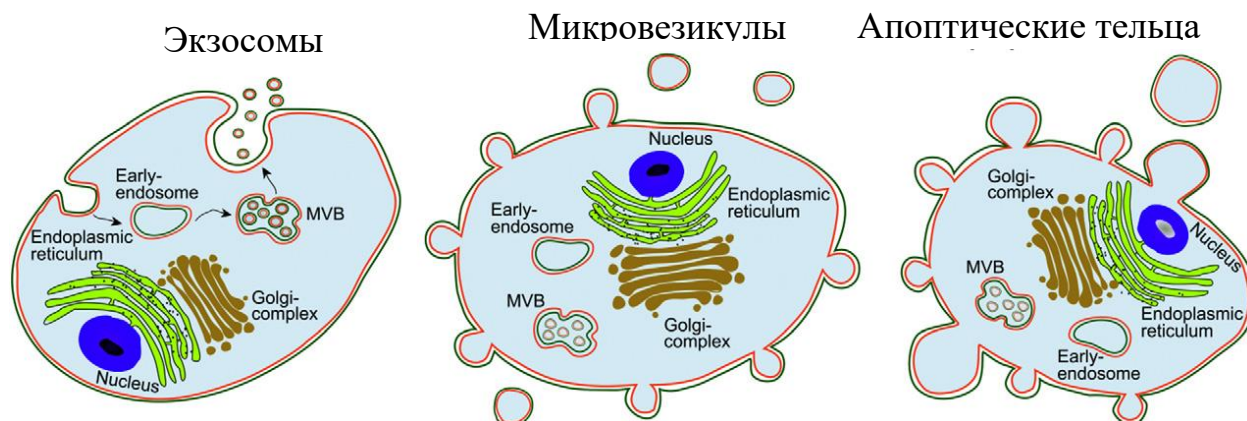


Рисунок 1. Внеклеточные везикулы: экзосомы, микровезикулы/ эктосомы, апоптотические тельца. Схематически изображен биогенез трёх типов ВВ [76].

На сегодняшний день общепризнано, что ВВ являются ключевыми медиаторами межклеточной коммуникации (как между соседними клетками, так и клетками, находящимися далеко друг от друга). ВВ способны переносить различные молекулы, включая ДНК, белки и РНК к клеткам-реципиентам. Все известные типы РНК были обнаружены внутри ВВ и, по крайней мере, часть РНК сохраняют свою функциональную активность при попадании внутрь клеток-реципиентов, влияя на биологические процессы внутри таких клеток. ВВ выполняют множество функций в организме в норме: от роли при пигментации кожи, регуляции иммунной системы до антибактериальной активности. Было показано, что при различных заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, онкологические заболевания, могут происходить изменения в размере, количестве, а также содержимом ВВ. Учитывая свойства и функции ВВ, они могут быть использованы в качестве переносчиков терапевтических молекул к клеткам-мишеням, в качестве биомаркеров при диагностике различных заболеваний, а также в качестве альтернативы клеточной терапии [69], [77].

Эктосомы и экзосомы

Ранее экзосомами называли везикулы, формирующиеся из плазматической мембраны ретикулоцитов в процессе их созревания, а также многокомпонентные частицы, участвующие в процессинге РНК [77]–[79]. Что касается эктосом, которые в большей степени варьируют по своему размеру, в научной литературе часто встречаются и другие термины, относящиеся к эктосомам: микровезикулы, микрочастицы и почкующиеся везикулы (shedding vesicles) [74], [77], [79]. Когда эктосомы и экзосомы были впервые идентифицированы, было показано, что они формируются из мембран в различных компартментах клетки (Рисунок 1) [77], [80].

Предшественники экзосом, “интралюминальные везикулы” (intraluminal vesicles, ILVs) (ИЛВ) формируются из мембраны эндоцитозных вакуолей в результате впячивания участков мембраны вакуолей внутрь. При накоплении ИЛВ внутри вакуолей, эти вакуоли превращаются мультивезикулярные тельца (multivesicular bodies, MVBs) (МВТ) (Рисунок 1). Продолжительность пребывания МВТ в цитоплазме варьирует; некоторые МВТ сливаются с плазматической мембраной клетки (происходит экзоцитоз), и ИЛВ (которые на сегодняшний день называют экзосомами) попадают во внеклеточное пространство [77].

Эктосомы же формируются достаточно быстро из плазматической мембраны клеток: содержимое эктосом изначально “группируется” в цитозоле у поверхности мембраны, которая “выпячивается” наружу, затем мембрана смыкается, и эктосома высвобождается в межклеточное пространство (Рисунок 1) [77].

Различные компартменты и механизмы формирования указывают на то, что эктосомы и экзосомы отличаются друг от друга. Для выяснения свойств и отличительных особенностей эктосом и экзосом были предприняты попытки их выделения и получения чистых фракций этих двух типов ВВ. На протяжении многих лет, тем не менее, процедуры выделения были основаны на дифференциальном центрифугировании, что приводило к получению смешанной фракции, содержащей различные типы ВВ. Недавно дифференциальное центрифугирование начали совмещать с другими методами, такими как ультрафильтрация и афинное (иммунное) выделение [77], [81]–[83]. Более того,

появились новые методики, такие как масс-спектрометрия и анализ траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis), которые достаточно успешно применяются для разделения ВВ [77], [84]. Таким образом, в последние годы появились более надежные и убедительные данные об отличительных особенностях различных типов ВВ, чем за весь предыдущий период их исследований. Были созданы базы данных протеомных исследований ВВ: EVpedia (www.evpedia.info), ExoCarta (www.exocarta.org), Vesiclepedia (www.microvesicles.org) (однако при работе с этими данными нужно помнить, что методики разделения подтипов ВВ всё еще не идеальны, а сами популяции экзосом и эктосом достаточно гетерогенны; гетерогенность связана с происхождением от различного типа клеток, а также с функциональным состоянием каждого типа клеток в момент формирования ВВ) [77].

Помимо различных молекул, полученных внеклеточными везикулами в процессе формирования из МВТ и плазматических мембран, в ВВ попадают и накапливаются молекулы, редко встречающиеся или вообще отсутствующие в клетке. В связи с особенностями состава и механизмами формирования, каждый тип ВВ играет свою существенную роль в физиологии и функционировании клеток (как родительских клеток, из которых формируются ВВ, так и целевых клеток, с которыми сливаются ВВ) [77].

Компонентный состав экзосом и эктосом имеет ряд сходных и отличительных особенностей [77].

Липидные мембраны экзосом отличаются высоким содержанием холестерина, сфингомиелина, церамида. Кроме этого, в составе мембран экзосом обнаружена лизобисфосфатидная кислота, нестандартный фосфолипид, отсутствующий в других клеточных мембранах и играющий роль в аккумуляции холестерина. Что касается мембранных белков экзосом, кластеры тетраспанинов совместно с другими трансмембранными белками формируют функционально активные мембранные структуры, получившие название “динамические платформы”. Тетраспанины взаимодействуют с цитоплазматическими белками и, вероятно, участвуют в процессе “загрузки” везикул различными молекулами, в том

числе сигнальными белками, такими как E-кадгерин, бета-катенин и Wnt. Кроме тетраспанинов мембраны экзосом включают: флотиллин (flotillin), PGRL и стоматин (stomatin), которые взаимодействуют с липидами; белки адгезии L1CAM и LAMP2; интегрины; фермент аланиламинопептидаза N; нерастворимый фибронектин, поверхностный гликопротеин. Внутри экзосом можно обнаружить те же белки, что и в цитозоле клетки: белки цитоскелета и белки, связанные с ним (актин, виментин, талин и аннексин); некоторые шапероны (Hsp70 и Hsc70); ряд ферментов, таких как PGK1 и GAPDH; и другие. Наличие (аккумуляция) ряда белков отличает экзосомы от других ВВ: синтенин-1 (syntenin-1), EHD4, ADAM10, TSG101 и аннексин XI (annexin XI) [77], [85]. В состав экзосом в процессе их формирования могут быть включены молекулы РНК (например, микроРНК) и связанные с РНК белки, которые регулируют функции РНК (Argonaute 2 и Y-box binding protein 1), а также некодирующие молекулы ДНК. В процессе формирования экзосом принимают участие различные ГТФазы, такие как Arf6 [77].

Мембраны экзосом (аналогично мембранам экзосом) содержат высокие уровни холестерина, сфингомиелина и церамида. Активность Ca^{2+} -зависимых ферментов может приводить к реорганизации фосфолипидной бислоевой мембраны, сопровождающейся транслокацией фосфатидилсерина (ФС) из внутреннего слоя в наружный слой мембраны и функциональными изменениями в мембране и цитозоле. Изменения в фосфолипидной мембране сопровождаются изменениями в составе и организации мембранных белков. Помимо небольшого количества (в низкой плотности) интегринов, тетраспанинов и некоторых рецепторов, в мембране экзосом также присутствуют другие белки: матричная металлопротеиназа MT1-MMP, гликопротеиновые рецепторы (GP1b и GPIIb/GPIIa), белок адгезии P-селектин (P-selectin), интегрин Mac-1. В связи с гетерогенностью ВВ, как уже отмечалось выше, некоторые из этих белков могут присутствовать не во всех экзосомах, а только в субпопуляции экзосом. Отчасти, содержимое экзосом сходно с составом цитозоля клетки (аналогично экзосомам). Однако может происходить аккумуляция определенных белков внутри экзосом; так, для экзосом характерны актинин-4, митофилин и другие митохондриальные

белки, которые отсутствуют в ВВ меньшего размера [77], [85]. В формировании эктосом принимают участие Rho и Ras ГТФазы. Также внутри эктосом можно обнаружить РНК – преимущественно, микроРНК, но также мРНК и некодирующие РНК [77].

Учитывая особенности биогенеза, строения и состава, эктосомы и экзосомы отличаются друг от друга и по роли в физиологических и патологических процессах [77].

Роль ВВ в процессах свертывания крови в норме и при патологических состояниях

Наличие фосфатидилсерина на поверхности эктосом, а также ассоциация тканевого фактора с мембраной эктосом, указывает на их роль в процессах коагуляции (Рисунок 2) [74], [86]–[90]. В отличие от экзосом, эктосомы хорошо связываются с аннексином V и могут взаимодействовать с протромбином и фактором свертывания крови X с образованием протромбиназного комплекса (Рисунок 2) [91].

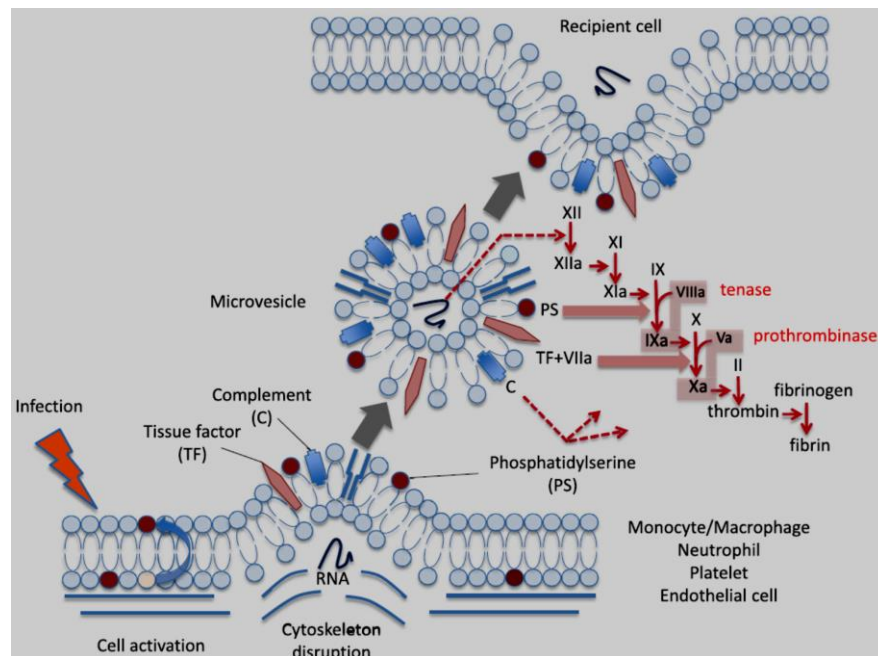


Рисунок 2. Прокоагулянтные свойства эктосом/микровезикул [86]

Как показали Verckmans с коллегами [92], в плазме крови здоровых людей присутствует достаточно много ВВ. При использовании современных методов и оборудования, они определили общее содержание ВВ в плазме крови – $138,3 \cdot 10^8$

ВВ/л; источником 52% внеклеточных везикул являются тромбоциты, 29% - эритроциты, 20% - лейкоциты; источником небольшого числа ВВ, обнаруженных в плазме, являются (активированные) клетки эндотелия (стенки сосудов являются источником ВВ). Кроме этого, они показали, что ВВ из плазмы крови здоровых добровольцев не обладают коагуляционной активностью (добавление таких ВВ к плазме крови, лишенной тромбоцитов, не приводит к формированию тромбина и фибрина). Напротив, такие “здоровые” ВВ способствуют фибринолизу [92].

Однако при развитии широкого спектра заболеваний (особенно, связанных с нарушением системы гемостаза, нарушением целостности сосудов, а также связанных с ростом риска тромбообразования) показано увеличение количества “прокоагулянтных” ВВ в плазме крови пациентов [85], [86], [93], [94].

Тканевой фактор (ТФ) – трансмембранный рецептор для факторов VII/VIIa, которые играют основную роль в активации внешнего пути свертывания крови. ТФ конститутивно (постоянно) экспрессируется клетками вне сосудов; однако его экспрессия в клетках крови в норме (в физиологических условиях) отсутствует и активируется при патологиях (например, сепсисе). Несмотря на то, что ТФ, ассоциированный с ВВ (ВВ-ТФ), составляет лишь небольшую фракцию от общего уровня ТФ в крови, присутствие ВВ-ТФ связано с развитием генерализованного тромбогеморрагического синдрома (ДВС-синдрома) [86].

Тем не менее, однозначную связь между ВВ и процессами коагуляции установить сложно, поскольку при патологиях, наряду с “прокоагулянтными” ВВ (ВВ-ТФ), растёт и уровень “антикоагулянтных” ВВ (например, ВВ, с которыми ассоциирован рецептор эндотелиального протеина С; ВВ, с которыми ассоциирован тромбомодулин) [86], [93], [95]–[98].

Кроме ТФ, важную роль в ВВ-опосредованной коагуляции при различных патологиях играет ФС, способствующий формированию теназного (Фактор VIIIa/Фактор IXa) и протромбиназного (Фактор Va/Фактор Xa) комплексов, а также формированию тромбина в результате активации системы комплемента [86], [87], [99]. При ряде патологий растёт уровень ФС на поверхности мембран клеток и формируемых ими ВВ [86].

“Прокоагулянтные” ВВ, кроме прочего, играют роль в развитии ряда осложнений беременности и заболеваний, затрагивающих репродуктивную систему (например, при преэклампсии, преждевременных родах) [100]–[104]. Например, при эмболии околоплодными водами происходит попадание амниотической жидкости в кровоток матери, что приводит к развитию ДВС-синдрома; в этом процессе ключевую роль, как считают исследователи, могут играть обнаруженные в амниотической жидкости “прокоагулянтные” ВВ, ассоциированные с ТФ и ФС [103].

В целом, роль ВВ в функционировании репродуктивной системы как мужчин, так и женщин (как в норме, так и при развитии патологий), очень велика: от участия в процессах созревания половых клеток и оплодотворения до имплантации, развития эмбриона и родов [70], [100], [105], [106]. Интересно, что ВВ, ассоциированные с ТФ и ФС, были обнаружены в семенной жидкости здоровых мужчин [106]. В тестах на формирование фибрина такие ВВ семенной жидкости показали положительную коагуляционную активность. Авторы отмечают, что роль таких “прокоагулянтных” ВВ семенной жидкости в норме может заключаться в регуляции процессов оплодотворения и трансплантации эмбриона. Кроме этого, авторы указывают на то, что “прокоагулянтные” ВВ, обнаруженные в жидкостях организма (например, слюне, семенной жидкости), не контактирующих с кровью, в норме не активируют процессов формирования тромбина и фибрина, но при попадании в кровь (в случае развития патологий, нарушения целостности сосудов) такие ВВ могут “запускать” процесс свертывания [106]. Аналогично семенной жидкости, в фолликулярной жидкости также обнаружены ВВ, играющие важную роль в процессе созревания ооцита, оплодотворении и имплантации [100], однако их ассоциация с ТФ и ФС, а также роль в процессах коагуляции не установлена.

В процессе имплантации эмбриона участвуют ВВ различного происхождения: ВВ семенной жидкости, ВВ фолликулярной жидкости, а также ВВ эндометрия/плаценты, “материнские” ВВ. ВВ играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, в формировании взаимодействия между эмбрионом

и организмом матери, формировании толерантности иммунных систем матери и плода [107]. Изменение уровня и компонентного состава ВВ в кровотоке и/или в жидкостях организма при развитии различных патологий, в том числе, затрагивающих процессы созревания половых клеток, оплодотворения, имплантации и развития эмбриона, может служить маркером данных патологий (при их диагностике, а также, например, при оценке риска отторжения плода при ВРТ); ВВ могут быть мишенью либо вектором для терапевтических вмешательств (в том числе при применении ВРТ) [70], [108].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий - д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии (заведующий - д.м.н. Л.В. Кречетова), лаборатории молекулярно-генетических методов исследования (заведующий – к.м.н. А.Е. Донников) и лаборатории клеточных технологий (заведующий - д.б.н. Д.Н. Силачев).

В исследование были включены 97 пар, планирующих лечение бесплодия методами ВРТ. Супружеским парам было проведено обследование согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

На 1-м этапе были изучены клиничко-лабораторные и эмбриологические характеристики, потенциально оказывающие влияние на эффективность программ ВРТ, в группах пациенток в зависимости от факта наступления беременности.

На 2-м этапе было проанализировано влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на ЧНБ с учетом клиничко-лабораторных и эмбриологических показателей.

На 3-м этапе были изучены особенности системы гемостаза, включая метод тромбодинамики, в группах пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии.

На 4-м этапе был исследован уровень тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в крови пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии, параметров системы гемостаза и наступления беременности.

На 5-м этапе было проанализировано влияние НМГ, назначенного в качестве антикоагулянтной или адьювантной терапии, на ЧНБ и частоту живорождения в программах ВРТ.

2.1. Группы пациенток

Для решения поставленных задач было проведено ретроспективное и проспективное исследование случай-контроль (Рисунок 3).

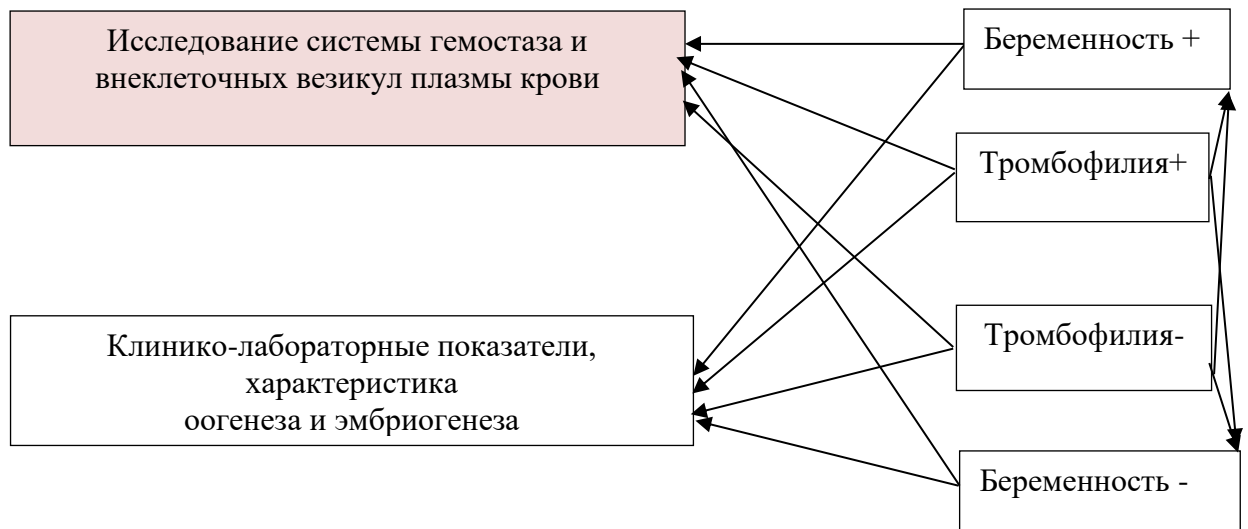


Рисунок 3. Дизайн исследования.

Группы пациенток:

- группа 1 – пациентки с наступившей беременностью;
- группа 2 – пациентки с ненаступившей беременностью.

Критерии тромбофилии:

- Наследственная тромбофилия - наличие хотя бы одной из перечисленных мутаций генов системы гемостаза: гомозиготная или гетерозиготная мутация гена протромбина (FII) *G20210A*, гомозиготная или гетерозиготная мутация гена фактора V (FV) *G1691A* (мутация Лейдена), дефицит антитромбина-III <60%, протеина C <50% и протеина S <55% [24].

- Приобретенная тромбофилия – двукратное с интервалом 12 недель повышение выше референсных значений уровня критериальных АФА: ВА, и/или антител класса IgM/IgG к КЛ, и/или антител класса IgM/IgG к β 2-ГП1, [46], или некритериальных АФА: антител класса IgM/IgG к аннексину V и/или ФС и/или ФЭ.

2.2. Конечные точки

Первичная конечная точка:

- ОШ_{кор} ЧНБ и живорождения в зависимости от наличия персистенции различных видов АФА и других клинико-лабораторных факторов.
Оценивались следующие клинико-лабораторные факторы, влияющие на ЧНБ:
- возраст;
- индекс массы тела (ИМТ);
- гравидарность;
- паритет;
- продолжительность бесплодия;
- количество программ ВРТ в анамнезе;
- гинекологические заболевания;
- соматические заболевания;
- овариальный резерв (количество антральных фолликулов - КАФ, уровень антимюллера гормона - АМГ, ФСГ);
- протокол овариальной стимуляции;
- показатели спермограммы;
- число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), зигот, бластоцист и бластоцист отличного качества по Гарднеру.

Анализируемые исходы программ ВРТ:

- ЧНБ (на основании повышения уровня β -субъединицы хорионического гонадотропина (β -ХГ) более 20 МЕ/л и визуализации плодного яйца при

ультразвуковом исследовании (УЗИ) органов малого таза через 21 день после ПЭ);

- частота выкидыша до 12 недель беременности;
- частота рождения живого ребенка.

2.3. Критерии включения в исследование

Критериями включения в исследование были:

1. отсутствие патологических изменений в кариотипе супругов;
2. возраст пациентки от 18 до 40 лет;
3. ИМТ пациентки 18-29,9 кг/м²;
4. овариальная стимуляция с использованием ант-ГнРГ;
5. селективный перенос одной нативной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после ТВП;
6. стандартный протокол поддержки посттрансферного периода (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки *per vaginam*);
7. информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критериями не включения в исследование были:

1. противопоказания к проведению лечения методами ВРТ, в том числе генитальный эндометриоз III-IV степени, миома матки крупных размеров, опухоли и опухолевидные образования яичников, тяжелая экстрагенитальная патология, онкологические заболевания;
2. аномалии строения матки;
3. выраженная патоспермия у партнера;
4. снижение овариального резерва ($AMГ \leq 1,1$ нг/мл, $КАФ \leq 5$).

Критериями исключения из исследования были:

1. проведение ПГТ в исследуемом цикле;
2. ВРТ с донорскими ооцитами или программа суррогатного материнства;
3. «бедный» ответ яичников в данном протоколе овариальной стимуляции;

4. отсутствие бластоцист для переноса в данном протоколе овариальной стимуляции;
5. осложнения при проведении ВРТ (развитие СГЯ средней или тяжелой степени, внутрибрюшное кровотечение, гнойно-воспалительные осложнения в исследуемом цикле ВРТ);
6. отказ пациентки от участия в исследовании.

2.4. Объем выборки

Расчет объема выборки производился с помощью пакета программ STATISTICA 10 (США).

Расчет объема выборки основывался на данных литературы о влиянии тромбофилии на вероятность наступления беременности [41]. Для получения валидных данных был принят уровень альфа = 0,05 и мощность исследования = 90%. Вероятность наследственной тромбофилии в виде гомозиготной или гетерозиготной мутации гена фактора V (FV) *G1691A* (мутации Лейдена) у пациенток с неудачами попыток программ ВРТ составляет 8%, у пациенток с наступившей беременностью – 2,4% (в 3,3 раза ниже) [41]. Учитывая, что ЧНБ в программах ВРТ в общей когорте пациенток с бесплодием по данным РАРЧ составляет примерно 35% [1], допустим, что у пациенток с наследственной тромбофилией данный показатель будет в 3,3 раза ниже, т.е. 10,6%. На основании этих данных необходимо включить в исследование минимум 60 пациенток в группу - всего 120 пациенток. Аналогично: вероятность приобретенной тромбофилии в виде персистенции АФА у пациенток с неудачами попыток программ ВРТ составляет 21,7%, у пациенток с наступившей беременностью – 5,5% (в 3,9 раз ниже) [41]. Учитывая, что ЧНБ в программах ВРТ в общей когорте пациенток с бесплодием по данным РАРЧ составляет примерно 35% [1], допустим, что у пациенток с приобретенной тромбофилией данный показатель будет в 3,9 раз ниже, т.е. 8,8%. На основании этих данных необходимо включить в исследование минимум 50 пациенток в группу - всего 100 пациенток.

Также расчет объема выборки основывался на количестве исследуемых факторов риска (предполагается анализ 10 предикторов). Учитывая, что максимальное количество предикторов, включенных в модель, не должно превышать количество исходов, деленное на значение от 5 (Wasson et al., 1985) до 20 (Harrel et al., 1984, 1985), для анализа 15 факторов риска достаточно включения минимум 50 человек в каждую группу (суммарно 100 человек).

2.5. Методы исследования

Все пациентки были обследованы перед программами ВРТ. Все обследования, за исключением УЗИ органов малого таза и исследования гемостазиограммы, проводились однократно (Таблица 1).

Исследования, проведенные обоим партнерам:

- определение в крови иммуноглобулинов М/Г к *Treponema pallidum*, к вирусу иммунодефицита человека 1/2 (ВИЧ 1/2), к вирусам гепатита В и С;
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов (из шейки матки и влагалища у женщин, из уретры – у мужчин);
- молекулярно-биологическое исследование соскоба из цервикального канала на *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*;
- цитогенетическое исследование хромосомного набора супругов.

Стандартные исследования, проведенные пациенткам:

- клинический анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- определение группы крови и резус-фактора;
- общий анализ мочи;
- определение в крови иммуноглобулинов М/Г к *Rubella*;
- цитологическое исследование соскоба эндоцервикса и экзоцервикса;
- УЗИ органов малого таза на 5-8-й день менструального цикла;

- флюорография;
- электрокардиография;
- заключение терапевта о наличии или отсутствии противопоказаний для проведения программ ВРТ;
- УЗИ молочных желез (всем пациенткам) и маммография (после 35 лет);
- Гормональное обследование (гормоны в крови на 2-3-й день менструального цикла): лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), эстрадиол (Е2), тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т₄_{св}), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС), пролактин, общий тестостерон (Т), АМГ.

Стандартным исследованием для партнеров была спермограмма.

Дополнительные исследования, проведенные при наличии показаний:

- исследование полости матки, проходимости маточных труб (гистеросальпингография, гистероскопия, лапароскопия);
- консультации смежных специалистов (эндокринолога, уролога).

Специальные методы обследования, проведенные пациенткам:

- гемостазиограмма с проведением теста тромбодинамики и определение ВА;
- обследование на наследственные тромбофилии;
- определение антител класса М/Г к ФЛ;
- определение уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови.

Таблица 1

Схема обследования пациенток при проведении исследования

| | Перед программой ВРТ | ТВП | 4-5-е сутки после ТВП/ перед ПЭ | 2 недели после ПЭ | 3 недели после ПЭ |
|-------------------------------------|----------------------|-----|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| Обследование согласно приказу №107н | X | | | | |
| Исследование системы гемостаза | X | X | X | | X |
| Наследственные тромбофилии и АФА | X | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Морфологическая оценка эмбрионов | | | X | | |
| Определение экзосом в фолликулярной жидкости и в плазме крови | X | X | | | |
| β -ХГ | | | | X | |
| УЗИ органов малого таза | X | | X | | X |

2.5.1 Общеклинические методы обследования

При первом обращении осуществлялся сбор анамнестических данных, который включал возраст, образование, наличие вредных привычек и профессиональных вредностей, семейное положение. При первичном осмотре были получены данные о росте, массе тела, особенностях телосложения, вычислялся ИМТ, измерялись артериальное давление и пульс, проводился осмотр и пальпация молочных желез. Был собран акушерско-гинекологический анамнез: менструальная функция, паритет, наличие самопроизвольных и искусственных прерываний беременности в анамнезе, осложнения во время предшествующих беременностей и родов. Была получена информация о наличии гинекологических заболеваний, оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе, перенесенных инфекционных и соматических заболеваний, оперативных вмешательств. Уточнялись данные о продолжительности бесплодия, а также о проведенных ранее диагностических и лечебных мероприятиях, в том числе наличие программ ВРТ в анамнезе, а также их характеристики (протокол овариальной стимуляции, количество и качество полученных ооцитов и эмбрионов, исход программы ВРТ).

При гинекологическом исследовании осматривались наружные половые органы, влагалище и шейка матки в зеркалах. При бимануальном исследовании органов малого таза оценивались размеры, форма и консистенция тела матки,

подвижность и наличие болезненности при пальпации, наличие или отсутствие объемных образований в области придатков матки, а также признаки спаечного процесса в малом тазу.

2.5.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

УЗИ органов малого таза проводилось в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - профессор А.И. Гус). УЗИ проводилось несколько раз: в цикле перед ВРТ в первую фазу менструального цикла (на 5-8-й день). Оценивались размер и структура тела матки, толщина и структура эндометрия, размеры и структура яичников, КАФ, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза. Далее УЗ-мониторинг выполнялся на 2-3 день менструального цикла- в день начала овариальной стимуляции, на 6-й день овариальной стимуляции, и далее ежедневно до назначения триггера овуляции с целью оценки динамики фолликулогенеза и ответа эндометрия на овариальную стимуляцию, для своевременной возможности коррекции дозы вводимых экзогенно гонадотропинов (ГТ), а также определения начала введения ант-ГнРГ и назначения триггера овуляции, и дня ТВП.

При наличии положительного результата β -ХГ УЗИ органов малого таза выполнялось на 21-й день после ПЭ с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Через 5-6 недель после ПЭ в полость матки УЗИ проводилось повторно с целью определения сердцебиения эмбриона.

2.5.3. Гормональное исследование

Исследование гормонов в крови осуществлялось в научно-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - д.м.н. Т.Ю. Иванец) радиоиммунологическим методом (тест-

системы «Hoffmann La Roche, Ltd.» Швейцария): ЛГ, ФСГ, АМГ, Е2, ТТГ, Т4_{св}, ДГЭАС, пролактин, Т общий.

Забор крови для исследования производился в раннюю фолликулярную фазу (на 2-3 день) предшествующего циклу ВРТ менструального цикла.

2.5.4. Исследование эякулята

Всем пациентам перед вступлением в программу ВРТ проводился анализ эякулята. Исследовались следующие показатели: концентрация сперматозоидов, их подвижность, процент морфологически измененных сперматозоидов, количество лейкоцитов, а также количество и типы незрелых клеток сперматогенеза. Оценивался объем образца спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, рН (Таблица 2).

Критерии, использованные для оценки патологии эякулята:

- олигозооспермия - снижение концентрации сперматозоидов ниже <15 млн/мл;
- астенозооспермия - снижение подвижности сперматозоидов (общая подвижность <40%, сперматозоиды с прогрессивным движением <32%);
- тератозооспермия - повышение количества сперматозоидов с нарушениями морфологии (>96%).

Таблица 2

Нормативные показатели спермограммы (ВОЗ, 2010)

| Показатель | Норматив, единицы измерения |
|---|-----------------------------|
| Общий объем эякулята | ≥ 1,5 мл |
| рН | ≥ 7,2 |
| Концентрация сперматозоидов | ≥ 15 млн/мл |
| Общее количество сперматозоидов | ≥ 39 млн |
| Время разжижения | < 60 минут |
| Подвижность сперматозоидов | ≥ 40% |
| Сперматозоиды с прогрессивным движением | ≥ 32% |

| | |
|---------------------------------|---|
| Морфология | ≥ 4 % нормальных форм |
| Жизнеспособность сперматозоидов | ≥ 58% живых сперматозоидов |
| Концентрация лейкоцитов | < 1 млн/мл |
| Антиспермальные антитела (АСАТ) | <50% сперматозоидов, ассоциированных с АСАТ |

2.5.5. Исследование системы гемостаза

Исследование гемостаза проводилось 3 раза: до овариальной стимуляции, в день ТВП и в день ПЭ в лаборатории клинической иммунологии (зав. - д.м.н. Л.В. Кречетова).

Забор кровь осуществлялся в 5 мл вакуумную пробирку Monovette (Sarstedt, Germany) с 106 мМ (3,2%) цитрата натрия в соотношении кровь: цитрат 9:1. Кровь доставляли в лабораторию клинической иммунологии (зав. - д.м.н. Л.В. Кречетова) в течение 30 минут от момента взятия.

Оценивались параметры плазменного звена гемостаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), концентрация фибриногена/протромбин по Квику (%)/международное нормализованное отношение (МНО), уровень D-димера, - с использованием реагентов Pathromtin®SL, Thromborel®S и INNOVANCE®D-Dimer соответственно (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия). Исследования проводили на автоматическом коагулометре SYSMEX CA-1500 (Япония).

Тромбоэластометрию (ТЭМ) проводили в цельной крови на приборе ROTEM®delta (Tem Innovations. GmbH, Германия) без активатора (тест – NATEM) с добавлением 0,2 М хлорида кальция для нейтрализации антикоагулянта (цитрата натрия). При проведении анализа исследуемый образец крови помещался в подогреваемую до 37°C кювету, в которую затем погружали стержень, совершающий вращательно-колебательные движения на несколько градусов. Процесс образования сгустка начинался после добавления в образец активатора свертывания крови. По мере полимеризации фибрина и увеличения вязкости

образца колебания передавались с одного элемента системы на другой и регистрировались. Формирующаяся кривая зависимости амплитуды колебаний от времени характеризовала процесс коагуляции, а позже фибринолиза. Оценивались следующие параметры: время коагуляции (СТ), время формирования сгустка (CFT), максимальная амплитуда (MCF), угол α ($^{\circ}$) [109] (Рисунок 4).

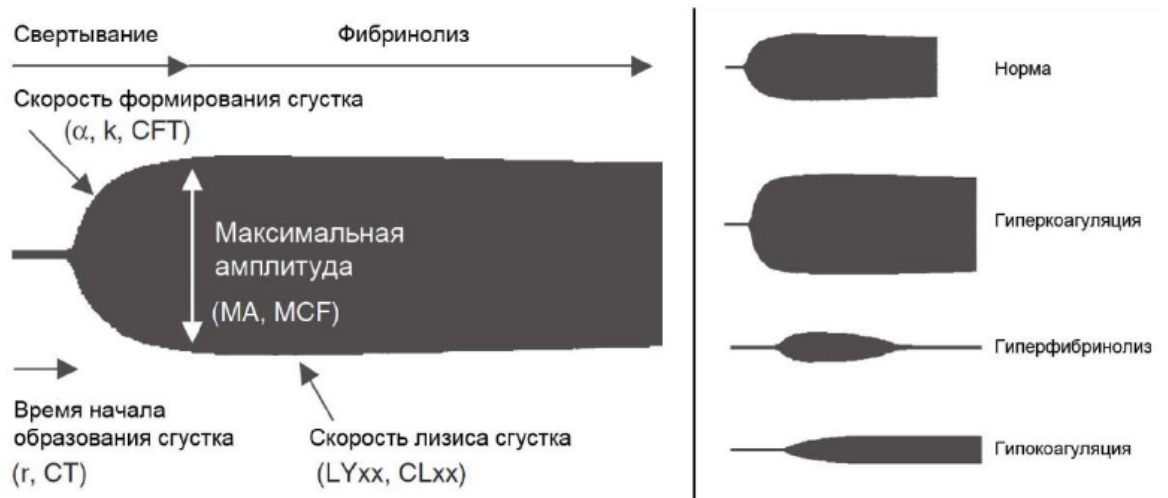


Рисунок 4. Основные численные параметры ТЭМ (слева) и примеры ее внешнего вида в случае различных отклонений в системе гемостаза (справа).

Тест тромбодинамики проводили с помощью диагностической лабораторной системы «Регистратор Тромбодинамики Т-2» (ООО Гемакор, Россия) с применением определенных реагентов и расходных материалов. Подготовленные образцы плазмы крови пациенток помещались в каналы специальной измерительной кюветы. Затем в кювету вводилась вставка-активатор с торцами, покрытие которых содержит липиды и тканевый фактор. Это имитировало повреждение стенки кровеносного сосуда. Контакт плазмы крови с тканевым фактором инициировал коагуляцию, и от торца вставки-активатора начинал формироваться фибриновый сгусток. Процесс возникновения и роста фибринового сгустка от торца вставки-активатора в канале кюветы регистрировался прибором в режиме последовательной фотосъемки цифровой фотокамерой при помощи метода темного поля в течение 30 минут. На основе полученных изображений программное обеспечение прибора строило зависимость размера сгустка от времени и рассчитывало численные параметры пространственной динамики роста

фибринового сгустка и спонтанного тромбообразования. Оценивались основные параметры тромбодинамики: начальная скорость образования сгустка (V_i , мкм/мин), скорость роста сгустка (V , мкм/мин), размер фибринового сгустка через 30 минут (C_s , мкм), формирование спонтанного сгустка в объеме плазмы крови, не контактирующем с активирующей поверхностью вставки (Т) (Рисунок 5) [109].

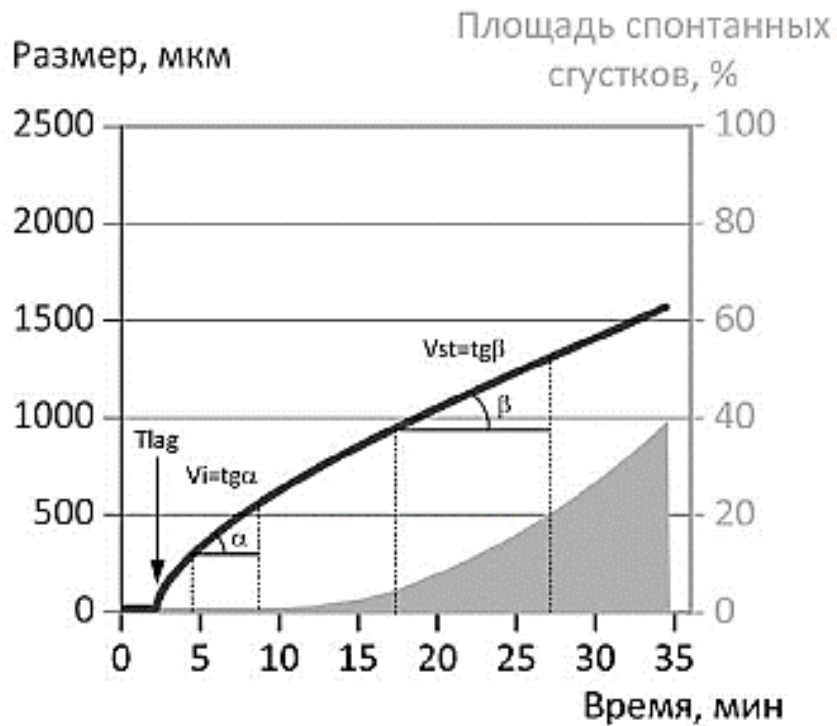


Рисунок 5. Зависимость размера фибринового сгустка и площади спонтанных сгустков от времени.

2.5.6. Исследование наследственных тромбофилий

Носительство гомозиготной или гетерозиготной мутации гена протромбина (FII) *G20210A*, гомозиготной или гетерозиготной мутации гена фактора V (FV) *G1691A* (мутация Лейдена), гомозиготной или гетерозиготной мутации гена PAI-1 *675 4G/5G* определялось с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в лаборатории молекулярно-генетических методов института репродуктивной генетики (зав. - к.м.н. А.Е. Донников).

Оценка антикоагулянтного звена (активности антитромбина-III (норма $\geq 60\%$), протеина С (норма $\geq 50\%$) и протеина S (норма $\geq 55\%$)) проводилась с

использованием реагентов HemosIL Liquid Antithrombin, HemosIL Protein C, HemosIL Free Protein S на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (IL Werfen, США) в лаборатории клинической иммунологии (зав. - д.м.н. Л.В. Кречетова).

2.5.7. Исследование антифосфолипидных антител

Антитела определялись дважды: до овариальной стимуляции и через 12 недель на фоне наступившей беременности или отсутствии ее в лаборатории клинической иммунологии (зав. - д.м.н. Л.В. Кречетова).

Антитела в плазме крови классов M (норма - 0-7 Ед/мл) и G (норма - 0-10 Ед/мл) к кардиолипину (КЛ), β 2-гликопротеину-I (β 2-ГП-1) (норма - 0-8 Ед/мл), аннексину V (норма - 0-8 Ед/мл), фосфатидилсерину (ФС) (норма - 0-10 Ед/мл) и фосфатидилэтаноламину (ФЭ) (норма - 0-16 Ед/мл) определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов фирм «ORGENTEC Diagnostika GmbH» и «IBL International GmbH» (Германия).

Количественное определение антител проводили в соответствии с инструкцией по применению фирмы-производителя, прилагаемой к набору. В лунки микропланшета, покрытые иммобилизованным фосфолипидом или фосфолипид-связывающим протеином, вносили 6 калибраторов, отрицательный и положительный контроли и образцы сыворотки крови, разведенные 1:100 в буфере для разведения. Присутствующие в образцах антитела связывались с иммобилизованным антигеном во время инкубации при $20\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. После 3-х-кратного промывания планшета в лунки добавляли конъюгаты антител против IgG или IgM человека с пероксидазой хрена в рабочем разведении и инкубировали при $20\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. После удаления избытка конъюгатов и 3-х-кратного промывания в лунки вносили раствор хромогенного субстрата, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), и проводили инкубацию при $20\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15 минут, при этом цвет раствора изменялся на голубой. Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора, содержащего серную кислоту. Цвет раствора изменялся на желтый.

Оптическую плотность (ОП) измеряли на микропланшетном фотометре MULTISCAN EX (Thermo Electron (Shanghai) Instrument Co., Китай) при длине волны 450 нм. Концентрацию антител в исследуемом образце определяли по 4-параметрической калибровочной кривой зависимости ОП от концентрации антител, построенной в линейно-логарифмических координатах.

По рекомендации ISTH определение волчаночного антикоагулянта (ВА) в плазме крови проводили двумя независимыми тестами, включающими скрининговые и подтверждающие пробы. Исследования проводили на автоматическом коагулометре SYSMEX CA-1500 (Япония) с использованием реагентов Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия. В данной работе тест «Время свертывания с ядом гадюки Рассела (dRVVT)» применяли как скрининговый (LA1 Screening Reagent) и подтверждающий (LA2 Confirmation Reagent), а в качестве независимого теста использовали активированное частичное тромбопластиновое время (ACTIN FSL) с низким содержанием фосфолипидов и высокой чувствительностью к ВА. Результаты скрининговых проб представляли в виде отношения (СО) $СО = Тб / Тн$, где Тб - время скрининговой пробы плазмы больного, Тн - время скрининговой пробы донорской плазмы. При удлинении одного или нескольких скрининговых проб более, чем на 20% от нормы, т.е. при $СО > 1,2$ проводили подтверждающие пробы. Результаты подтверждающей пробы представляли в виде отношения (ПО) $ПО = Тб / Тн$, где Тб - время подтверждающей пробы плазмы больного, Тн - время подтверждающей пробы донорской плазмы. При удлинении одного или нескольких подтверждающих проб более, чем на 20% от нормы, т.е. при $ПО > 1,2$, рассчитывали нормализованное отношение (НО) $НО = СО / ПО$. Окончательный вывод о наличии ВА принимали при условии, $НО > 1,2$, т.е. при данном условии тест ВА считали положительным.

2.5.8. Исследование уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови

Прокоагулянтную активность тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными микровезикулами, в размороженных образцах очищенной от тромбоцитов плазмы измеряли с помощью коммерческого набора ZYMUPHEN MP-TF kit (HYPHEN BioMed, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Размороженная плазма в объеме 20 мкл, а также стандарты и контроли вносили в лунки планшета с антителами к тканевому фактору и инкубировали с MP-TF-assay enhancer ночь при комнатной температуре с последующей отмывкой на автоматическом вошере, инкубацией с фактором VIIa и Ха в течение 2 часов при 37°C. После этого в лунки вносили субстрат для фактора X с последующей инкубацией в течение 2 часов при 37°C. Реакцию останавливали добавлением лимонной кислоты. Измерения OD производили на планшетном микроридере Infinite f50 (TECAN, Швейцария) при 405 нм. Значения фона вычитали из всех полученных данных OD. Концентрацию тканевого фактора определяли по построенной калибровочной кривой.

2.5.9. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

Всем пациенткам овариальная стимуляция проводилась по протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ) или комбинированных препаратов ФСГ и ЛГ. Доза препарата подбиралась индивидуально и зависела от возраста пациентки, овариального резерва и особенностей предшествующих овариальных стимуляциях при их наличии. По результатам УЗ- мониторинга дозы препаратов при необходимости корректировались.

Препараты ГТ назначались со 2-3 дня менструального цикла. По мере достижения фолликулами диаметра 14 мм назначался ант-ГнРГ для профилактики

эндогенных преждевременных пиков ЛГ. Препарат ант-ГнРГ назначался ежедневно, включая день назначения триггера овуляции.

Триггер овуляции назначался по мере достижения лидирующими фолликулами диаметра 18 мм. В качестве триггера овуляции использовался ХГ в дозе 8 000 - 10 000 МЕ.

ТВП яичников проводилась в условиях малой операционной с применением кратковременного внутривенного наркоза под ультразвуковым контролем с использованием одноразовых пункционных игл через 36 часов после введения триггера овуляции. Полученная фолликулярная жидкость помещалась в стерильные подогретые пробирки, содержащие 0,5 мл гепарина (2500 ЕД/мл).

2.5.10. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение

В полученной фолликулярной жидкости эмбриологом под микроскопом определялось число полученных ОКК, производилась отмывка ооцитов от фолликулярной жидкости и крови, и помещение их в стерильные планшеты с культуральной средой для периода предварительной инкубации в течение 2-3 часов.

После окончания предварительной инкубации производилось денудирование ооцитов (удаление клеток кумулюса из препарата). После энзимной и механической обработки ооцитов оценивалась степень зрелости клеток:

- ооцит на стадии профазы 1-го мейотического деления (GV), если в цитоплазме клетки визуализируется ядро и отсутствует полярное тельце;
- ооцит на стадии метафазы 1-го мейотического деления (MI), если в цитоплазме клетки отсутствует ядро и полярное тельце;
- ооцит на стадии 2-го мейотического деления (MII), если в цитоплазме клетки визуализируется ядро и полярное тельце.

В то же время производилось центрифугирование, флотирование и обработка спермы партнера. Все зрелые ооциты были оплодотворены методом ЭКО или ИКСИ.

После процедуры оплодотворения ооциты переносились в культуральную среду для дальнейшего культивирования. Нормальное оплодотворение констатировали при наличии 2-х симметричных по размеру пронуклеусов в цитоплазме через 16-18 часов после проведения оплодотворения. При обнаружении одного или трех и более пронуклеусов в цитоплазме оплодотворение расценивалось как аномальное. При отсутствии пронуклеусов в цитоплазме ооцита ооцит считался не оплодотворившимся. Этап культивирования осуществлялся с применением сред культивирования СООК (Австралия).

Показаниями к ИКСИ у наблюдаемых супружеских пар явились:

1. патоспермия у партнера;
2. низкая частота оплодотворения методом ЭКО в предыдущих программах ВРТ.

2.5.11 Морфологическая оценка эмбрионов

Оценку морфологии эмбрионов проводили на 5-е сутки культивирования по классификации Гарднера (учитывались степень зрелости бластоцист, качество внутриклеточной массы (ВКМ) и качество трофэктодермального слоя (ТФЭ) [84],[6],[5]. Степень зрелости бластоцисты оценивалась следующим образом:

1. ранняя бластоциста - полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона;
2. полость бластоцисты более половины объема эмбриона;
3. полная бластоциста - полость занимает весь объем эмбриона;
4. расширенная бластоциста - полость бластоцисты увеличивается, начинается истончение блестящей оболочки;
5. ТФЭ начинает проникать через блестящую оболочку;
6. бластоциста покидает блестящую оболочку.

ВКМ оценивалась следующим образом:

- А. плотная упаковка большого числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- В. свободная упаковка среднего числа клеток легко визуализируемой ВКМ;

С. незначительное число клеток ВКМ.

ТФЭ оценивалась следующим образом:

А. большое число клеток формируют единый эпителиальный слой;

В. небольшое число клеток формируют неплотный эпителиальный слой;

С. незначительное число клеток ТФЭ.

К эмбрионам отличного качества относились бластоцисты 4-5 класса с ВКМ категории А и качеством ТФЭ категории А.

2.5.12. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода

В полость матки переносили 1 эмбрион лучшего качества на 5-е сутки после ТВП в нативном цикле с помощью «мягкого» катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). В посттрансферном периоде всем пациенткам назначался вагинального микронизированный прогестерон в вагинальной форме в дозе 600 мг в день согласно принятым в клинической практике протоколам.

Исследование концентрации β -ХГ в сыворотке крови пациентки проводилось через 14 дней после ПЭ в полость матки. Тест на беременность считался положительным при уровне β -ХГ более 20 МЕ/л. Пациенткам с положительным тестом на беременность через 21 день после ПЭ в полость матки проводилось УЗИ ОМТ для визуализации плодного яйца в полости матки и установления факта клинической беременности.

2.6. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистической программы «Statistica V10» (США).

Для оценки качественных данных вычислялись риски (%). Для сравнения категориальных данных в двух и более группах, а также для оценки значимых различий между ними использовался тест χ^2 . Для сопоставления бинарных данных мерой сравнения явилось отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом 95% (95% ДИ). Метод логистической регрессии с расчетом площади под кривой (AUC – от англ. – Area Under the Curve) использовался при расчете ОШ_{кор} для учета множественных конфаундеров.

Для анализа количественных данных в группах сравнения определялся вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова, графический анализ данных). При нормальном распределении данных вычислялись средние значения со стандартным отклонением, для оценки различий в группах применялись методы параметрической статистики (t-тест, ANOVA). При ненормальном распределении данных определялись медианы с интерквартильным размахом, для оценки различий в группах применялись методы непараметрической статистики (тест Манна-Уитни, тест Крускала-Уоллиса).

Зависимые данные оценивались с помощью коэффициента корреляции. Корреляционный анализ проводился с применением непараметрического корреляционного критерия Спирмена.

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

Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток

Для решения задачи №1 в исследование случай-контроль изначально были включены 105 пар, планирующих лечение бесплодия методами ВРТ, которые были разделены на 2 группы в зависимости от факта наступления беременности в данной программе ВРТ. Пары случай-контроль были подобраны на основании уравнивания по 2-м критериям: врачу акушеру-гинекологу и врачу-эмбриологу, проводивших данную программу. Супружеские пары, у которых в процессе лечения были выявлены критерии исключения, а также не предоставившие полной информации о данных лабораторного обследования, выбыли из исследования (Рисунок 6).

В конечном итоге были сформированы 2 группы пациентов:

- группа 1 – пациентки с наступившей беременностью (n=30);
- группа 2 – пациентки с ненаступившей беременностью (n=67).



Рисунок 6. Схема включения пациенток в исследование.

Были изучены клинико-лабораторные показатели пациенток в 2-х группах сравнения. Возраст пациенток и их мужей в группе 2 был значимо выше по сравнению с группой 1. При этом диапазон возраста женщин был в пределах 20-40 лет, а мужчин - 23-47 лет в обеих группах. Пациенток позднего репродуктивного возраста в группе 1 было 5 из 30 (16,7%), в группе 2 - 28 из 67 (41,8%) ($p < 0,0001$), ОШ=3,59 (95% ДИ=1,25; 11,55). Антропометрические данные, уровень образования, распространенность вредных были сопоставимы в обеих группах пациенток (Таблица 3).

Таблица 3

Возраст и антропометрические данные пациентов групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| Возраст женщин, лет* | 32,3±3,2 | 34,0±4,1 | 0,0438 |
| Возраст мужчин, лет* | 33,1±4,1 | 36,5±5,3 | 0,0030 |
| Рост, см* | 165,7±4,3 | 166,9±3,6 | 0,1795 |
| Масса тела, кг* | 62,2±8,2 | 63,3±9,2 | 0,5789 |
| ИМТ, кг/м ² * | 22,6±2,4 | 22,7±2,3 | 0,8408 |

*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

**Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

Менструальная и сексуальная функции не отличались у пациенток 2-х групп (Таблица 4).

Таблица 4

Характеристика менструальной и сексуальной функции у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| Возраст менархе, лет | 13,7±1,3 | 13,3±1,3 | 0,2130 |
| Длительность цикла, дней | 28,3±2,0 | 28,5±3,1 | 0,7746 |
| Длительность менструации, дней | 4,7±1,0 | 4,8±0,9 | 0,8946 |
| Дебют половой жизни, лет | 19,1±2,1 | 19,3±3,0 | 0,7713 |

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

Среди гинекологических заболеваний у пациенток встречались хронический сальпингоофорит с тубэктомией в анамнезе, наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) и аденомиоз 1-2 степени, интрамуральная и субсерозная миома матки и миомэктомия в анамнезе, резекция яичников в анамнезе по поводу

эндометриоидных кист, гиперпластические процессы эндометрия и ИППП (хламидиоз, генитальный герпес) в анамнезе, а также синдром поликистозных яичников (СПКЯ). Несмотря на отсутствие значимых различий в частоте гинекологических заболеваний, в группе незабеременевших пациенток отмечалась более высокая частота НГЭ (в 2,2 раза чаще), резекции яичников по поводу эндометриоидных кист (в 2 раза чаще) и полипов эндометрия в анамнезе (в 1,8 раз чаще). При этом пациентки группы 1 чаще имели СПКЯ (в 2,2 раза чаще) и тубэктомии в анамнезе (в 1,6 раз чаще). 2/3 пациенток страдали вторичным бесплодием. При этом средняя продолжительность бесплодия в обеих группах составила 5,8 лет (Таблица 5).

Таблица 5

Структура гинекологической заболеваемости у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | р-уровень |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| Хронический сальпингоофорит* | 16 (53,3%) | 30 (44,8%) | 0,4353 |
| Наружный генитальный эндометриоз* | 3 (10%) | 15 (22,4%) | 0,1469 |
| Аденомиоз* | 3 (10%) | 8 (11,9%) | 0,7805 |
| Миома матки* | 6 (20%) | 10 (14,9%) | 0,5336 |
| Полипы эндометрия в анамнезе* | 6 (20%) | 24 (35,8%) | 0,1191 |
| Хламидиоз в анамнезе* | 8 (26,7%) | 20 (29,8%) | 0,7490 |
| СПКЯ* | 8 (26,7%) | 8 (11,9%) | 0,0708 |
| Миомэктомия в анамнезе* | 5 (16,7%) | 7 (10,4%) | 0,3898 |
| Тубэктомия в анамнезе* | 10 (33,3%) | 14 (20,9%) | 0,1894 |
| Резекция яичников в анамнезе* | 2 (6,7%) | 9 (13,4%) | 0,3313 |
| Бесплодие вторичное* | 20 (66,7%) | 42 (62,7%) | 0,4343 |
| Длительность бесплодия, лет** | 5,5±3,4 | 6,1±3,5 | 0,4555 |

*Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

**Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, t-тест

Акушерский анамнез (число беременностей, родов, самопроизвольных и искусственных прерываний беременности, внематочных беременностей) был схожим в обеих группах. Отмечались низкая gravidарность и паритет у всех включенных в исследование пациенток. 35 пациенток (36%) имели первичное бесплодие, 34 пациентки (35%) имели только 1 беременность в анамнезе, и лишь у 1/3 пациенток (n=28) отмечалось 2 и более беременности в анамнезе (29%). Роды в

анамнезе отмечались лишь у 17 пациенток (17,5%). Количество попыток программ ВРТ в анамнезе было выше в группе 2, но разница не достигла статистической значимости (Таблица 6).

Таблица 6

Акушерский анамнез у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--|----------------------|----------------------|-----------|
| Количество беременностей | 1 (0-2) | 1 (0-2) | 0,8664 |
| Количество родов | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0,9758 |
| Количество самопроизвольных выкидышей | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0,4698 |
| Количество искусственных абортов | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0,0999 |
| Количество внематочных беременностей | 0 (0-1) | 0 (0-0) | 0,5776 |
| Количество попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе | 0 (0-1) | 1 (0-3) | 0,0661 |
| Количество беременностей в результате ВРТ | 0 (0-0) | 0 (0-1) | 0,2648 |

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

Структура соматических заболеваний не отличалась в обеих группах пациенток и была представлена заболеваниями верхних дыхательных путей в виде хронического тонзиллита и назофарингита, заболеваниями желудочно-кишечного тракта - хроническим гастродуоденитом и язвой желудка в стадии ремиссии, заболеваниями мочевыделительной системы - хроническим циститом и пиелонефритом в стадии ремиссии, аллергическими заболеваниями - атопическим дерматитом и бронхиальной астмой, заболеваниями сердечно-сосудистой системы – пролапсом митрального клапана без выраженной регургитации и пароксизмальной тахикардией. Эндокринные заболевания в виде гипотиреоза в стадии медикаментозной компенсации чаще отмечались в группе 1 (в 1,8 раз чаще), хотя и не статистически значимо. У ¼ всех пациенток отмечалась варикозное расширение вен нижних конечностей. 11,3% пациенток имели тромбоз эмболические осложнения (ТЭО) в личном или семейном анамнезе. 2 пациентки (2%) имели однократный тромбоз поверхностных вен голени (1 пациентка в группе 1 и 1 пациентка в группе 2), 9 пациенток имели отягощенный

семейный тромботический анамнез (тромбоз у родственников 1-й линии) в сочетании с другими факторами риска ТЭО (возраст старше 35 лет, курение, акушерские осложнения в виде преэклампсии, экстренное кесарево сечение в анамнезе) с равным распределением между обеими группами. Ко времени вступления пациенток в протокол ВРТ все соматические заболевания находились в стадии ремиссии (Таблица 7).

Таблица 7

Соматические заболевания у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--|----------------------|----------------------|-----------|
| Аллергические заболевания | 4 (13,3%) | 12 (17,9%) | 0,5745 |
| Пролапс митрального клапана | 1 (3,3%) | 3 (4,5%) | 0,7933 |
| Заболевания верхних дыхательных путей | 3 (6,9%) | 8 (7,2%) | 0,9602 |
| Заболевания желудочно-кишечного тракта | 6 (20%) | 16 (23,9%) | 0,6731 |
| Заболевания мочевыделительной системы | 5 (16,7%) | 13 (19,4%) | 0,7486 |
| Гипотиреоз компенсированный | 4 (13,3%) | 5 (7,5%) | 0,3569 |
| Варикозное расширение вен нижних конечностей | 7 (23,3%) | 16 (23,8%) | 0,9532 |
| ТЭО в личном или семейном анамнезе | 3 (10%) | 8 (11,9%) | 0,7805 |

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

Результаты клинического, биохимического анализа крови, общего анализа мочи, рентгенографии органов грудной клетки, УЗИ молочных желез/маммографии, УЗИ щитовидной железы, ЭКГ, мазка на флору из влагалища и шейки матки, а также цитологического исследования шейки матки у всех исследуемых женщин были в пределах нормы и не отличались в изучаемых группах. В уровне гормонов также не было выявлено значимых отличий между группами (Таблица 8).

Всем пациенткам перенос эмбрионов в полость матки проводился под контролем УЗИ. Размеры и объем матки, яичников и структура эндометрия были сопоставимы в обеих группах пациенток.

Уровень гормонов у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| ФСГ, мЕд/мл | 5,7±1,3 | 6,2±1,8 | 0,1935 |
| ЛГ, мЕд/мл | 7,3±1,3 | 6,9±1,6 | 0,2981 |
| Е2, пмоль/л | 197,7±71,4 | 192,8±52,6 | 0,7082 |
| Пролактин, мЕд/л | 401,5±150,1 | 363,5±129,2 | 0,2062 |
| Т, нмоль/л | 1,4±0,6 | 1,5±0,7 | 0,7650 |
| ДГЭА-С, мкмоль/л | 5,6±2,5 | 5,6±2,2 | 0,9501 |
| АМГ, нг/мл | 3,2±3,0 | 2,6±3,1 | 0,5067 |
| ТТГ, мЕд/л | 2,0±0,7 | 2,1±0,9 | 0,7436 |
| Т ₄ св., пмоль/л | 14,3±2,6 | 13,5±2,5 | 0,1441 |

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

3.2. Особенности овариальной стимуляции в программах ВРТ

Всем пациенткам овариальную стимуляцию проводили по протоколу с антагонистами ГнРГ препаратами рФСГ или комбинированных препаратов ФСГ и ЛГ. У пациенток группы 1 регистрировалось более частое (в 1,6 раз) назначение препаратов рФСГ по сравнению с группой 2, в которой пациентки чаще получали препараты мочевых ГТ. Суммарная доза назначаемых ГТ была сопоставимой в 2-х группах пациенток. Продолжительность овариальной стимуляции также не отличалась в группах сравнения (Таблица 9).

Таблица 9

Характеристики овариальной стимуляции у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| Вид ГТ* | | | |
| • рФСГ | 19 (63,3%) | 26 (38,8%) | 0,0251 |
| • ФСГ/ЛГ | 11 (36,7%) | 41 (61,2%) | |
| Продолжительность стимуляции, дней** | 9,0±1,6 | 8,9±1,7 | 0,7080 |
| Суммарная доза ГТ, МЕ** | 1310,3±403,4 | 1416,0±471,9 | 0,2898 |

*Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

**Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

3.3. Характеристика гаметогенеза и раннего эмбриогенеза в программах ВРТ

При анализе сперматогенеза и оогенеза не было выявлено значимых отличий между 2-мя группами. Параметры эмбриогенеза были также сопоставимы в обеих группах пациенток (Таблица 10).

Таблица 10

Характеристика полученных гамет и эмбрионов у пациентов групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|--|----------------------|----------------------|-----------|
| Патоспермия* | 14 (46,7%) | 41 (61,2%) | 0,1819 |
| Среднее число ОКК на 1 пациентку** | 8 (5-12) | 6 (4-10) | 0,1517 |
| Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку** | 6 (4-8) | 5 (3-7) | 0,2235 |
| ИКСИ* | 25 (83,3%) | 61 (91%) | 0,2682 |
| Среднее число зигот на 1 пациентку** | 5 (3-6) | 4 (3-6) | 0,2582 |
| Средний уровень фертилизации*** | 0,85±0,19 | 0,87±0,19 | 0,5553 |
| Среднее число бластоцист на 1 пациентку** | 3,5 (2-6) | 3 (2-5) | 0,5250 |
| Средний уровень бластуляции*** | 0,86±0,20 | 0,89±0,17 | 0,3837 |
| Среднее число бластоцист отличного качества на 1 пациентку** | 2 (1-2) | 1 (0-2) | 0,2709 |

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

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

***Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, t-тест.

Таким образом, при изучении клинико-лабораторных и эмбриологических показателей пациентов было установлено, что пары, у которых беременность наступила, были младше, и им чаще назначали препараты рФСГ для овариальной стимуляции. Остальные параметры не отличались значимо между группами. Данные факторы были учтены при проведении многофакторного анализа по оценке влияния тромбофилии на эффективность программ ВРТ.

3.4. Оценка наличия наследственной и приобретенной тромбофилии

Всем пациенткам, включенным в исследование, было проведено исследование на выявление полиморфизмов генов системы гемостаза: протромбина (FII) *G20210A*, фактора V (FV) *G1691A* (мутация Лейдена), PAI-1 *675 4G/5G*, а также оценка активности АТ-III, протеина С и протеина S (Таблица 11). Распространенность наследственных тромбофилий высокого риска ТЭО была низкая в обеих группах пациенток: не было выявлено мутации гена FII, распространенность мутации гена FV составила 3% и была представлена только в гетерозиготном варианте. Активность важнейших естественных антикоагулянтов находилась в пределах нормы за исключением 4-х пациенток группы 2, у которых активность протеина S была ниже референтного значения. Средняя активность антикоагулянтов не отличалась между 2-мя группами пациенток. Таким образом, наследственные тромбофилии высокого риска ТЭО была выявлена у 7 пациенток, что составило 7,2%. Распространенность полиморфизма гена PAI-1, напротив, была высокая, составив 28,8% для гомозиготной формы и 43,3% для гетерозиготной формы полиморфизма, но также не отличалась в 2-х группах пациенток (Таблица 11).

Таблица 11

Распространенность наследственных тромбофилий у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| FII <i>G20210A</i> * | AA/GA | 0/0 | 0/0 | |
| FV <i>G1691A</i> * | AA/GA | 0/1 (3,3%) | 0/2 (2,9%) | 0,9192 |
| PAI-1 <i>5G6754G</i> * | <i>4G4G/5G4G</i> | 10 (33,3%)/ 13 (43,3%) | 18 (26,8%)/ 29 (43,3%) | 0,6248 |
| АТ-III** | | 106,6±14,5 | 110,3±10,2 | 0,4009 |
| протеин С** | | 112,0±10,3 | 115,3±12,8 | 0,4858 |
| протеин S** | | 88,2±16,1 | 81,7±17,8 | 0,3318 |
| АТ-III* | <60% | 0 | 0 | - |
| протеин С* | <50% | 0 | 0 | - |
| протеин S* | <55% | 0 | 4 (5,9%) | 0,1693 |

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

**Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, t-тест.

Был исследован уровень антифосфолипидных антител классов IgM и IgG к КЛ, β 2-ГП-1, аннексину V, ФС, ФЭ, и определен ВА. Исследование было проведено дважды с интервалом в 12 недель. Было выявлено, что у пациенток группы 2 отмечалось значимое повышение уровня критериальных (к β 2-ГП-1) и некритериальных антител класса М (к ФС, ФЭ и аннексину V) (Таблица 12, Рисунок 7).

Таблица 12

Уровень антифосфолипидных антител у пациенток групп 1 и 2

| Показатели | Группа 1 (n = 30) | Группа 2 (n = 67) | p-уровень |
|---|----------------------|----------------------|---------------|
| ВА | 1,00±0,04 | 0,99±0,05 | 0,4804 |
| анти-КЛ IgM, Ед/мл | 1,74±0,64 | 2,06±1,29 | 0,2027 |
| анти-КЛ IgG, Ед/мл | 1,83±0,54 | 1,74±0,68 | 0,5379 |
| анти-β2-ГП-1 IgM, Ед/мл | 1,94±0,73 | 2,43±1,04 | 0,0203 |
| анти- β 2-ГП-1 IgG, Ед/мл | 2,33±1,00 | 2,26±1,02 | 0,7693 |
| анти- аннексин V IgM, Ед/мл | 2,23±0,63 | 2,62±0,96 | 0,0457 |
| анти-аннексин V IgG, Ед/мл | 1,77±0,86 | 1,74±0,93 | 0,8992 |
| анти-ФС IgM, Ед/мл | 1,53±0,79 | 2,13±1,46 | 0,0382 |
| анти-ФС IgG, Ед/мл | 3,11±0,89 | 3,14±1,17 | 0,8918 |
| анти-ФЭ IgM, Ед/мл | 4,87±4,19 | 9,26±4,28 | 0,0295 |
| анти-ФЭ IgG, Ед/мл | 2,79±1,39 | 3,29±1,22 | 0,5806 |

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, t-тест

У 28 пациенток уровень различных АФА был выше референсных значений: у 4 пациенток группы 1 (13,3%) и у 24 пациенток группы 2 (35,9%) ($p=0,0238$).

У 18 пациенток (18,5%) уровень АФА выше референсных значений был выявлен дважды с интервалом в 12 недель: у 2 пациенток группы 1 (6,7%) и у 16 пациенток группы 2 (23,9%) ($p=0,0438$). При этом отмечалась персистенция некритериальных антител - к ФС, ФЭ и аннексину V с конверсией IgM на IgG.

При указании на ТЭО или привычный выкидыш в анамнезе у 8 пациенток с персистенцией АФА был диагностирован АФС: у 1 пациентки группы 1 (3,3%) и у 7 пациенток группы 2 (10,4%) ($p=0,2390$) (Рисунок 8).

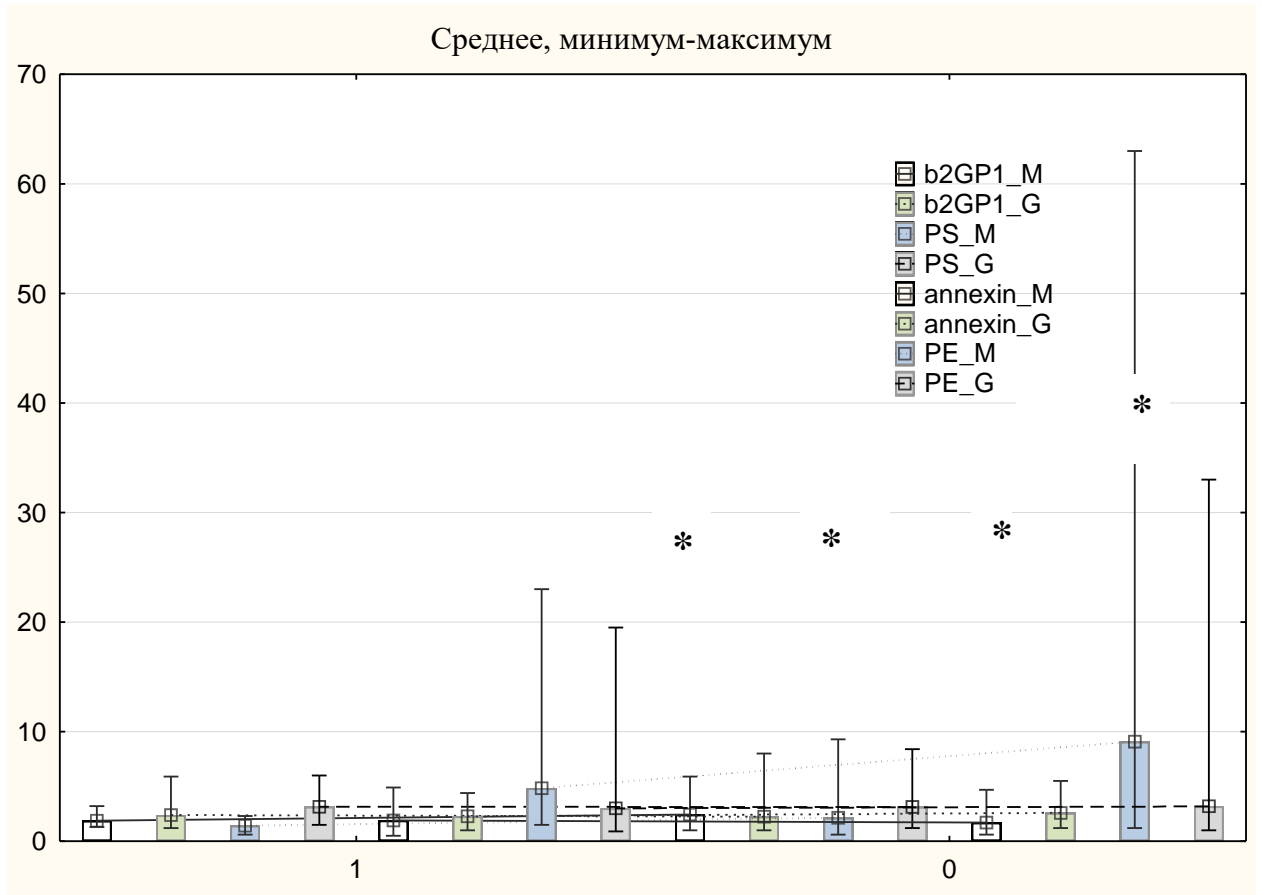


Рисунок 7. Беременность: 1- да, 0 - нет. Уровень антифосфолипидных антител у пациенток групп 1 и 2, Ед/мл; GPI – β 2-гликопротеин-1, PS – фосфатидилсерин, PE – фосфатидилэтаноламин, * $p < 0,05$

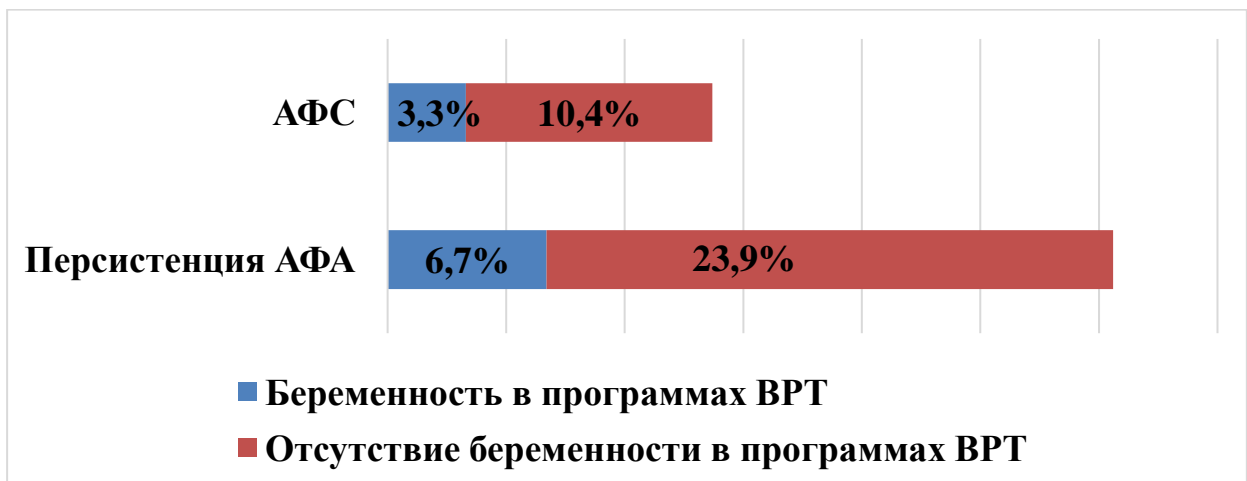


Рисунок 8. Распространенность персистенции АФА в зависимости от наступления беременности в программе овариальной стимуляции и ПЭ.

Из 18 пациенток с персистенцией АФА беременность наступила только у 2-х женщин (11,1%), тогда как у 79 пациенток без персистенции АФА беременность наступила у 28 человек (35,4%) ($p=0,0438$). При проведении многофакторного анализа по влиянию персистенции АФА на ЧНБ в программах ВРТ с учетом возраста пациентов и вида ГТ для овариальной стимуляции в качестве конфаундеров $ОШ_{кор}$ составило **4,34** (95% ДИ=1,04; 20,22). То есть при персистенции АФА шансы наступления беременности в программах ВРТ снижались в 4,34 раза.

Таким образом, в данном исследовании ЧНБ в программах ВРТ не была связана с наличием наследственной тромбофилии, что может быть объяснено низкой распространенностью данного состояния в изучаемой когорте пациенток. При этом персистенция АФА, особенно так называемых некритериальных антител, снижала шансы наступления беременности в 4,34 раза.

3.5. Исследование системы гемостаза

При анализе параметров системы гемостаза в группах в зависимости от наступления беременности не было выявлено разницы между группами в параметрах расширенной гемостазиограммы, ТЭМ и ТД. При проведении корреляционного анализа между уровнем АФА и параметрами ТД были выявлены следующие значимые корреляционные связи большой силы (Таблица 13).

Было отмечено, что до овариальной стимуляции и в день ТВП отмечались положительные корреляционные связи между уровнем АФА с начальной скоростью роста сгустка (V_i) и размером фибринового сгустка (C_s). То есть, чем выше был уровень АФА, тем больше были скорость образования и размер сгустка, что свидетельствует о связи уровня АФА и развития гиперкоагуляционного состояния. Интересно, что при оценке связи уровня АФА и параметров ТД в день ПЭ были выявлены уже не положительные, а отрицательные корреляционные связи уровня АФА с начальной скоростью роста сгустка (V_i), стационарной скоростью роста сгустка (V) и размером фибринового сгустка (C_s). Это

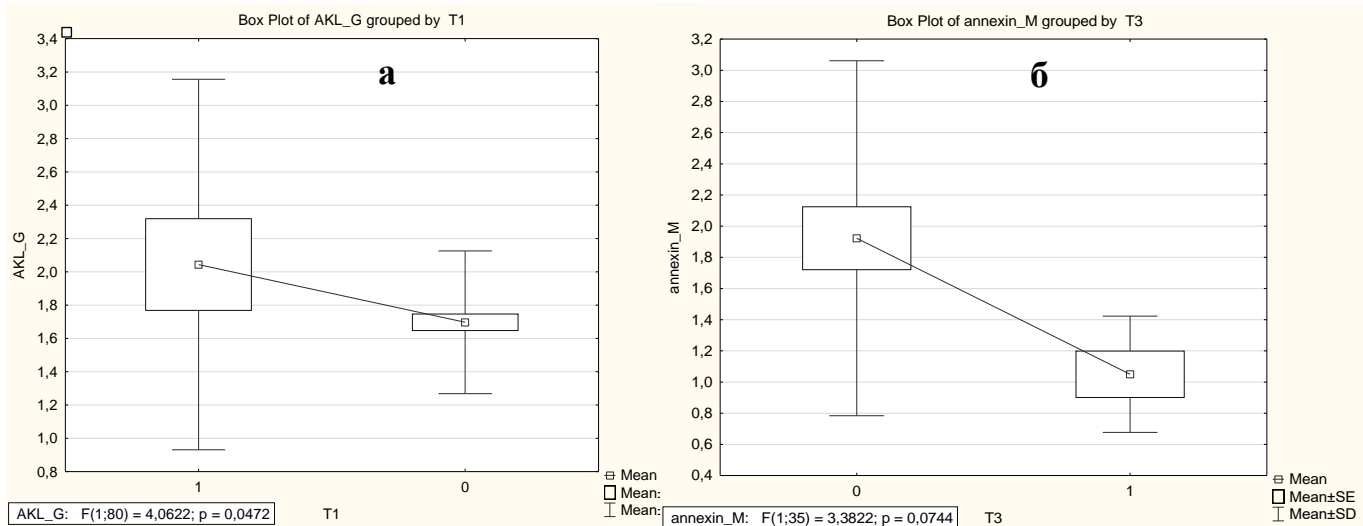
свидетельствует о связи уровня АФА и развития относительного гипокоагуляционного состояния в момент ПЭ. При этом корреляционные связи были отмечены в основном у некритериальных антител (анти-аннексин V, анти-ФЭ, анти-ФС).

Таблица 13

Корреляционная зависимость уровня АФА и параметров тромбодинамики

| Параметры гемостаза | Вид АФА | r | P |
|--|---------------------|---------|--------|
| 1-я точка (до овариальной стимуляции) | | | |
| Vi(1), мкм/мин | анти-ФС IgG | 0,8436 | 0,0350 |
| | анти-аннексин V IgM | 0,8287 | 0,0420 |
| | анти-аннексин V IgG | 0,8134 | 0,0490 |
| Cs(1), мкм | анти-аннексин V IgM | 0,8771 | 0,0220 |
| | анти-аннексин V IgG | 0,8927 | 0,0170 |
| | анти-ФЭ IgM | 0,9229 | 0,0090 |
| | анти-ФЭ IgG | 0,8499 | 0,0320 |
| 2-я точка (в день ТВП) | | | |
| Vi(2), мкм/мин | анти-ФЭ IgM | 0,8396 | 0,0370 |
| | анти-КЛ IgM | 0,9263 | 0,0080 |
| Cs(2), мкм | анти-КЛ IgM | 0,9398 | 0,0050 |
| 3-я точка (в день ПЭ) | | | |
| Vi(3), мкм/мин | анти-β2-ГП-1 IgG | -0,8247 | 0,0430 |
| | анти-аннексин V IgM | -0,9526 | 0,0030 |
| | анти-ФЭ IgM | -0,9049 | 0,0130 |
| | анти-ФЭ IgG | -0,8273 | 0,0330 |
| V(3), мкм/мин | анти-β2-ГП-1 IgG | -0,8860 | 0,0190 |
| | анти-ФС IgG | -0,8564 | 0,0290 |
| | анти-аннексин V IgM | -0,9053 | 0,0130 |
| | анти-аннексин V IgG | -0,8411 | 0,0360 |
| | анти-ФЭ IgM | -0,8457 | 0,0340 |
| | анти-ФЭ IgG | -0,9266 | 0,0080 |
| Cs(3), мкм | анти-β2-ГП-1 IgG | -0,8398 | 0,0360 |
| | анти-ФЭ IgG | -0,9253 | 0,0080 |

При оценке факта формирования спонтанного сгустка в плазме крови, не контактирующей с активирующей поверхностью (Т), было выявлено, что у пациенток, у которых сгусток формировался до овариальной стимуляции, был значимо выше уровень анти-КЛ IgG, а в день ПЭ у пациенток с формированием сгустка был погранично значимо выше уровень анти-аннексин V IgM (Рисунок 9). Остальные АФА не были связаны с формированием спонтанного сгустка.



1 – сгусток сформировался
0 – сгусток не сформировался

Рисунок 9. Связь спонтанного формирования фибринового сгустка в тесте тромбодинамики с уровнем анти-КЛ IgG до овариальной стимуляции (а) и с уровнем анти-аннексин V IgM в день ПЭ (б).

Далее был проведен корреляционный анализ между параметрами ТД и дозой экзогенно вводимых гонадотропинов для овариальной стимуляции, в результате которого была выявлена погранично значимая сильная положительная связь между дозой ГТ и параметром Cs3 ($r=0,7368$, $p=0,0590$).

При проведении корреляционного анализа между уровнем АФА и параметрами ТЭМ были выявлены следующие значимые корреляционные связи большой силы (Таблица 14).

Таблица 14

Корреляционная зависимость уровня АФА и параметров ТЭМ

| Параметры гемостаза | Вид АФА | r | P |
|--|------------------|---------|--------|
| 1-я точка (до овариальной стимуляции) | | | |
| СТ(1) | анти-β2-ГП-1 IgM | -0,8229 | 0,0440 |
| СFT(1) | анти-КЛ IgM | -0,8883 | 0,0180 |
| 2-я точка (в день ТВП) | | | |
| СТ(2) | анти-ФЭ IgG | -0,8172 | 0,0470 |
| МСF(2) | анти-КЛ IgM | 0,8856 | 0,0190 |
| 3-я точка (в день ПЭ) | | | |
| СТ(3) | анти-β2-ГП-1 IgG | -0,8979 | 0,0150 |

При оценке связи параметров ТЭМ и уровня АФА было отмечено, что как до овариальной стимуляции, так и в день ТВП и в день ПЭ отмечались отрицательные корреляционные связи между уровнем АФА со временем начала формирования сгустка (СТ) и скоростью формирования сгустка (СФТ), и положительная корреляционная связь между уровнем АФА и максимальной амплитудой (МСФ). При этом корреляционные связи были отмечены в основном у критериальных антител (анти-КЛ, анти-β2-ГП-1). Фактически системная и объяснимая корреляционная связь была отмечена только между АФА и СТ, согласно которой при более высоком уровне АФА отмечалось меньшее время начала образования сгустка.

Далее был проведен корреляционный анализ между параметрами ТЭМ и дозой экзогенно вводимых гонадотропинов для овариальной стимуляции, в результате которого была выявлена значимая положительная связь средней силы между дозой ГТ и параметром МСФ2 ($r=0,5253$, $p=0,0440$).

Таким образом, ТД является более точным методом определения гипер- и гипокоагуляционного состояния крови по сравнению с ТЭМ, так как все параметры имеют объяснимую корреляционную связь с изучаемыми прокоагулянтными факторами. До овариальной стимуляции и сразу после нее (в день ТВП) более высокий уровень АФА был связан с развитием гиперкоагуляционного состояния, тогда как через 5 дней после прекращения введения ГТ отмечалась обратная тенденция с трендом в сторону развития относительной гипокоагуляции. При этом, как до стимуляции, так и после нее, более высокий уровень АФА был связан со спонтанным формированием фибриновых сгустков, что может свидетельствовать о значительной гиперкоагуляции и присутствии в плазме прокоагулянтных факторов - микровезикул, активированных факторов свертывания, следов тромбопластина. Также в период после овариальной стимуляции была отмечена связь параметров ТД и дозой вводимых ГТ. Также данная связь была отмечена с параметрами ТЭМ.

3.6. Оценка уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови и связь с параметрами гемостаза

Исследование уровня тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови было проведено у 34 пациенток, из них беременность наступила у 10 женщин (группа 1а) и не наступила - у 24 человек (группа 2а).

При сравнении групп не было выявлено значимых отличий в клинико-лабораторных данных пациенток (Таблица 15).

Таблица 15

Клинико-лабораторные данные пациенток групп 1а и 2а

| Показатели | Группа 1а (n = 10) | Группа 2а (n = 24) | р- уровень |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| Возраст женщин, лет* | 33,4±3,6 | 34,6±4,3 | 0,4538 |
| Возраст мужчин, лет* | 35,4±3,8 | 36,9±4,5 | 0,3459 |
| ИМТ, кг/м ² * | 22,8±3,2 | 22,9±3,4 | 0,8927 |
| Возраст менархе, лет* | 13,3±1,0 | 13,4±1,3 | 0,8714 |
| Продолжительность цикла, дней* | 27,7±1,1 | 27,8±2,0 | 0,8953 |
| Продолжительность менструации, дней* | 4,8±1,2 | 5,0±1,0 | 0,6361 |
| Начало половой жизни, лет* | 19,5±2,7 | 19,2±2,3 | 0,7565 |
| Хронический сальпингоофорит** | 5 (50%) | 11 (45,8%) | 0,8244 |
| Наружный генитальный эндометриоз** | 1 (10%) | 7 (29,2%) | 0,2299 |
| Аденомиоз** | 1 (10%) | 5 (20,8%) | 0,4502 |
| Миома матки** | 1 (10%) | 2 (12,5%) | 0,8366 |
| Полипы эндометрия в анамнезе** | 2 (20%) | 6 (25%) | 0,7541 |
| Хламидиоз в анамнезе** | 4 (40%) | 8 (33,3%) | 0,7109 |
| СПКЯ** | 4 (40%) | 3 (12,5%) | 0,0707 |
| Миомэктомия в анамнезе** | 1 (10%) | 2 (8,3%) | 0,8759 |
| Тубэктомия в анамнезе** | 3 (30%) | 6 (25%) | 0,7633 |
| Резекция яичников в анамнезе** | 1 (10%) | 4 (16,7%) | 0,6169 |
| Бесплодие вторичное** | 5 (50%) | 17 (70,8%) | 0,2467 |
| Длительность бесплодия, лет* | 6,3±3,6 | 6,3±3,6 | 0,9951 |
| Количество беременностей*** | 0,5 (0-1) | 1 (0-2) | 0,2122 |
| Количество родов*** | 0 (0-0) | 0 (0-0,5) | 0,8059 |
| Количество попыток ВРТ в анамнезе*** | 0,5 (0-1) | 0 (0-2) | 0,9247 |

*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

**Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

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

Таблица 15 (продолжение)

Клинико-лабораторные показатели пациенток групп 1а и 2а

| Показатели | Группа 1а (n = 10) | Группа 2а (n = 24) | p- уровень |
|--|-----------------------|-----------------------|---------------|
| Аллергические заболевания** | 3 (30%) | 6 (25%) | 0,7633 |
| Заболевания ЖКТ** | 2 (20%) | 7 (29,2%) | 0,5809 |
| Заболевания мочевыделительной системы** | 3 (30%) | 7 (29,2%) | 0,9612 |
| Гипотиреоз компенсированный** | 3 (30%) | 2 (8,3%) | 0,1149 |
| Варикозное расширение вен нижних конечностей** | 2 (20%) | 8 (33,3%) | 0,4368 |
| ТЭО в личном или семейном анамнезе** | 2 (20%) | 5 (20,8%) | 0,9563 |
| ФСГ, мЕд/мл* | 5,7±1,3 | 5,8±1,3 | 0,8111 |
| ЛГ, мЕд/мл* | 7,3±1,1 | 7,1±1,7 | 0,7910 |
| Е2, пмоль/л* | 187,0±63,0 | 180,6±41,6 | 0,7281 |
| Пролактин, мЕд/л* | 323,9±85,1 | 376,2±116,5 | 0,2094 |
| Т, нмоль/л* | 1,3±0,7 | 1,3±0,7 | 0,9702 |
| ДГЭА-С, мкмоль/л* | 4,6±3,0 | 5,5±2,2 | 0,3406 |
| АМГ, нг/мл* | 3,0±2,0 | 2,7±3,0 | 0,4654 |
| ТТГ, мЕд/л* | 1,9±0,7 | 2,2±1,1 | 0,4157 |
| Т4 _{св.} , пмоль/л* | 16,7±2,6 | 14,1±2,7 | 0,1526 |
| • рФСГ | 3 (30%) | 8 (33,3%) | 0,8498 |
| • ФСГ/ЛГ | 7 (70%) | 16 (66,7%) | |
| Суммарная доза ГТ, МЕ* | 1297,5±282,9 | 1425,0±416,1 | 0,3834 |
| Патоспермия** | 5 (50%) | 18 (75%) | 0,1556 |
| Среднее количество ОКК на 1 пациентку*** | 8 (6-12) | 6 (3-9) | 0,2264 |
| Среднее количество зрелых ооцитов на 1 пациентку*** | 6 (5-8) | 5 (2-6) | 0,1509 |
| Среднее количество зигот на 1 пациентку*** | 5,5 (3-8) | 3 (2-5) | 0,1509 |
| Средний уровень фертилизации* | 0,87±0,16 | 0,87±0,19 | 0,9888 |
| Среднее количество бластоцист на 1 пациентку*** | 3,5 (3-7) | 3 (2-4,5) | 0,1456 |
| Средний уровень бластуляции* | 0,93±0,11 | 0,94±0,13 | 0,7713 |
| Среднее количество бластоцист отличного качества на 1 пациентку*** | 1,5 (1-3) | 1 (0-2) | 0,1456 |

*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

**Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

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

Далее был исследован уровень антифосфолипидных антител классов IgM и IgG к КЛ, β 2-ГП-1, аннексину V, ФС, ФЭ, и определен ВА. У пациенток группы 2а отмечалось значимое повышение только анти-аннексин V IgG антител (Таблица 16).

Таблица 16

Уровень антифосфолипидных антител у пациенток групп 1а и 2а

| Показатели | Группа 1а (n = 10) | Группа 2а (n = 24) | p-уровень |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| ВА | 1,01±0,00 | 0,98±0,05 | 0,1069 |
| анти-КЛ IgM, Ед/мл | 1,41±0,32 | 1,53±0,54 | 0,5116 |
| анти-КЛ IgG, Ед/мл | 1,58±0,54 | 1,68±0,43 | 0,5726 |
| анти- β 2-ГП-1 IgM, Ед/мл | 1,90±0,40 | 1,90±0,50 | 0,9988 |
| анти- β 2-ГП-1 IgG, Ед/мл | 2,11±1,08 | 1,86±0,38 | 0,3370 |
| анти-аннексин V IgM, Ед/мл | 1,64±1,22 | 1,30±0,66 | 0,3013 |
| анти-аннексин V IgG, Ед/мл | 1,87±0,44 | 2,73±1,11 | 0,0246 |
| анти-ФС IgM, Ед/мл | 1,47±0,48 | 1,46±0,57 | 0,9550 |
| анти-ФС IgG, Ед/мл | 2,88±0,55 | 2,78±0,77 | 0,7230 |
| анти-ФЭ IgM, Ед/мл | 5,72±6,47 | 4,91±3,23 | 0,6304 |
| анти-ФЭ IgG, Ед/мл | 3,33±5,73 | 2,20±0,93 | 0,3486 |

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, t-тест

При изучении параметров системы гемостаза в группах в зависимости от наступления беременности не было выявлено разницы между группами в параметрах расширенной гемостазиограммы, ТЭМ и ТД.

Уровень тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами (ТФ-ВВ), в плазме крови был несколько выше у пациенток группы 2а, хотя и не статистически значимо. При этом он увеличивался после овариальной стимуляции по сравнению с исходным уровнем (Рисунок 10).

Мы провели корреляционный анализ по выявлению взаимосвязи между уровнем ТФ-ВВ в плазме крови и клинико-лабораторными данными пациенток. Была выявлена сильная положительная погранично значимая корреляционная связь уровня ТФ-ВВ с уровнем IgM к ФС ($r=0,8978$), IgG к ФС ($r=0,9438$), IgM к КЛ ($r=0,8978$), IgG к КЛ ($r=0,8635$).

При проведении корреляционного анализа между разницей (дельтой) уровня ТФ-ВВ до и после овариальной стимуляции была выявлена сильная положительная

корреляционная связь с числом тромбоцитов в день ТВП ($r=0,9560$, $p=0,0440$) и уровнем антител класса М к фосфолипидам: к КЛ, к ФС и к аннексину V ($r=0,9560$, $p=0,0440$). Значимой связи с параметрами ТД выявлено не было.

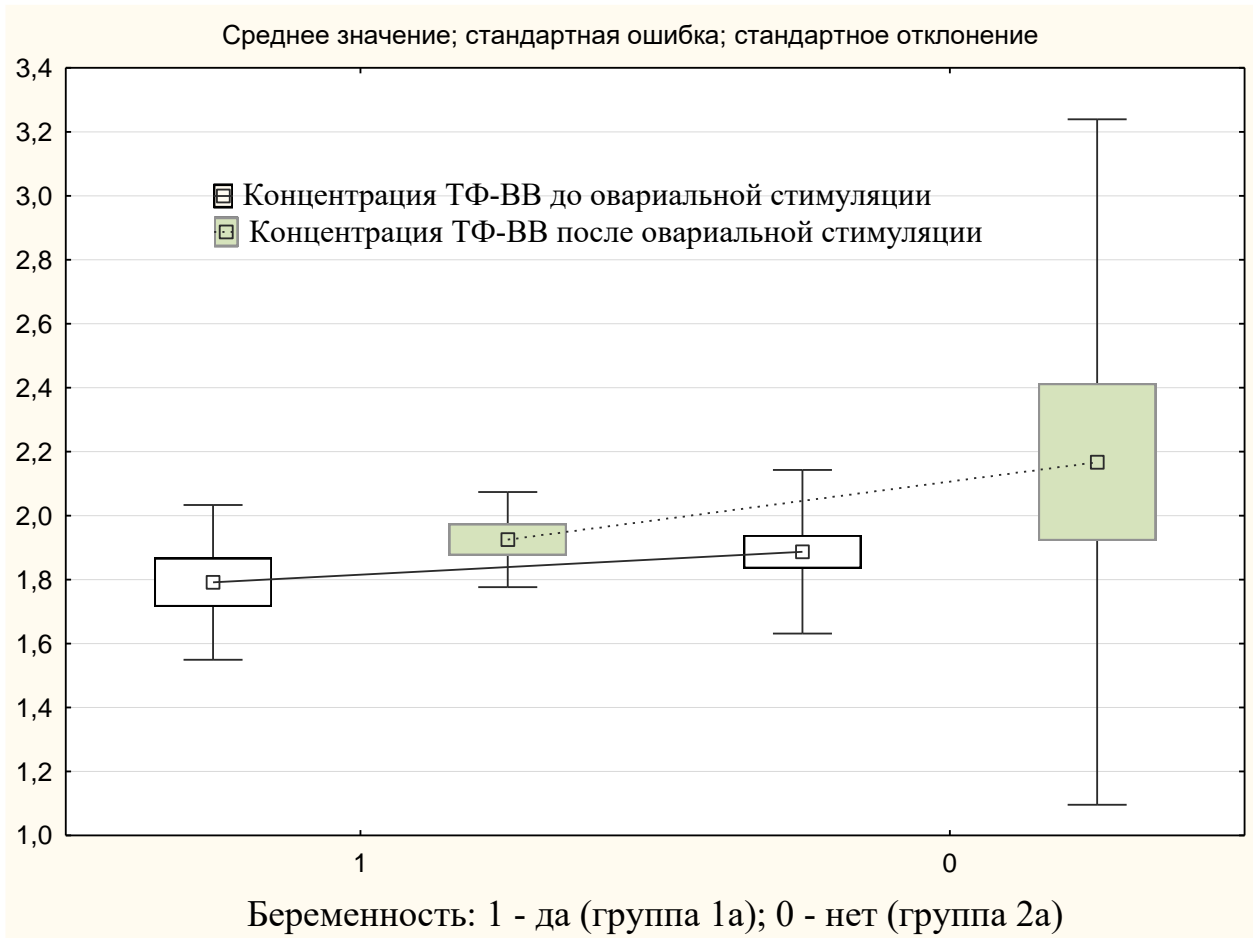


Рисунок 10. Уровень тканевого фактора (пг/мл), ассоциированного с внеклеточными везикулами плазмы крови, до и после овариальной стимуляции у пациенток групп 1а и 2а.

Таким образом, уровень тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови связан с уровнем АФА: чем выше уровень АФА, тем выше количество ТФ-ВВ. Также выявлена прямая корреляционная связь между уровнем ТФ-ВВ и числом тромбоцитов.

3.7. Назначение низкомолекулярных гепаринов пациенткам в программах ВРТ

Некоторым пациенткам, включенным в исследование, были назначены препараты НМГ с начала овариальной стимуляции для профилактики ТЭО или со дня переноса эмбриона в полость матки в качестве адъювантной терапии в программах ВРТ (для повышения ЧНБ). Всего НМГ были назначены 41 пациентке в профилактической дозе 0,3-0,4 мл. Было выявлено, что пациентки, получавшие НМГ, имели большую вероятность наступления беременности (18 из 30 пациенток, получивших НМГ, 60%, vs. 23 из 67 пациенток, не получивших НМГ, 34,3%), $p=0,0179$, $ОШ_{кор}=2,87$ (95% ДИ=1,18; 6,97) (с учетом выявленных конфаундеров) (Рисунок 11).

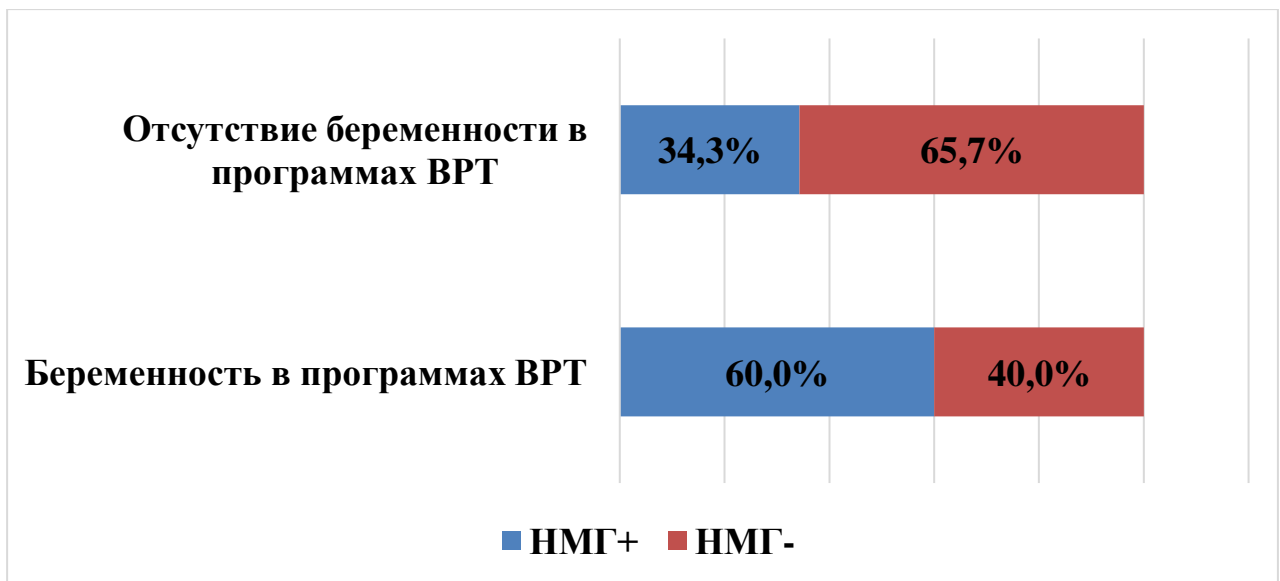


Рисунок 11. Вероятность ЧНБ в программах ВРТ в зависимости от назначения НМГ.

Терапия НМГ была продолжена до момента теста на ХГ и, далее, во время беременности в случае ее наступления. Дозы НМГ подбирались с учетом массы тела пациентки и были профилактическими. Контроль осуществлялся с помощью развернутой гемостазиограммы, ТЭМ и теста тромбодинамики с кратностью 1 раз в 3 недели, и контроля уровня АФА 1 раз в 12 недель.

Показаниями для назначения НМГ являлись повторные неудачные попытки переноса эмбрионов в программах ВРТ (НМГ в данном случае назначались в качестве адьювантной терапии) (у 20 человек), персистенция АФА (у 10 человек) и отягощенный личный (2 человека) или семейный тромботический анамнез в сочетании с другими факторами риска ТЭО (у 9 человек). Пациентки с наследственной тромбофилией высокого риска ТЭО (7 человек) были также отнесены к данной группе.

Таким образом, назначение НМГ способствовало увеличению шансов наступления беременности в 2,87 раза, что может быть связано с противовоспалительным, антикомплементарным и антитромботическим действием НМГ.

3.8. Исходы программ ВРТ

Как было отмечено выше, в наблюдаемой когорте пациенток беременность наступила у 30 и не наступила у 67 женщин. Из 30 забеременевших женщин у 2-х была выявлена персистенция АФА (6,6%), тогда как из 67 женщин персистенция АФА была выявлена у 16 (23,8%) ($p=0,0438$). Все пациентки наблюдались в течение всей беременности. Из 30 забеременевших пациенток НМГ были назначены 18 женщинам (60%) в связи с показаниями, указанными в главе 3.7.

Беременность закончилась срочными родами живым плодом у 23 пациенток (76,7%), у 7 пациенток случился самопроизвольный выкидыш в сроке до 12 недель беременности (23,3%). Следует отметить, что среди пациенток, получавших НМГ, самопроизвольный выкидыш произошел у 2-х из 18 (11,1%), тогда как из не получавших НМГ - у 5 из 12 пациенток (41,7%) (ОШ=5,7; 95% ДИ=0,84; 48,2). При этом, выкидыши произошли у пациенток, у которых НМГ были назначены в качестве адьювантной терапии. У всех пациенток с персистенцией АФА или ТЭО в анамнезе, получавших НМГ, беременность закончилась живорождением.

Таким образом, роды в срок живым плодом произошли у 16 из 18 пациенток, получавших НМГ (88,9%): у 7 из 7 (100%), которым НМГ были назначены по

показаниям, и у 9 из 11, которым НМГ были назначены в качестве адъювантной терапии (81,8%); и у 7 из 12 пациенток, не получавших НМГ (58,3%) (Рисунок 12).

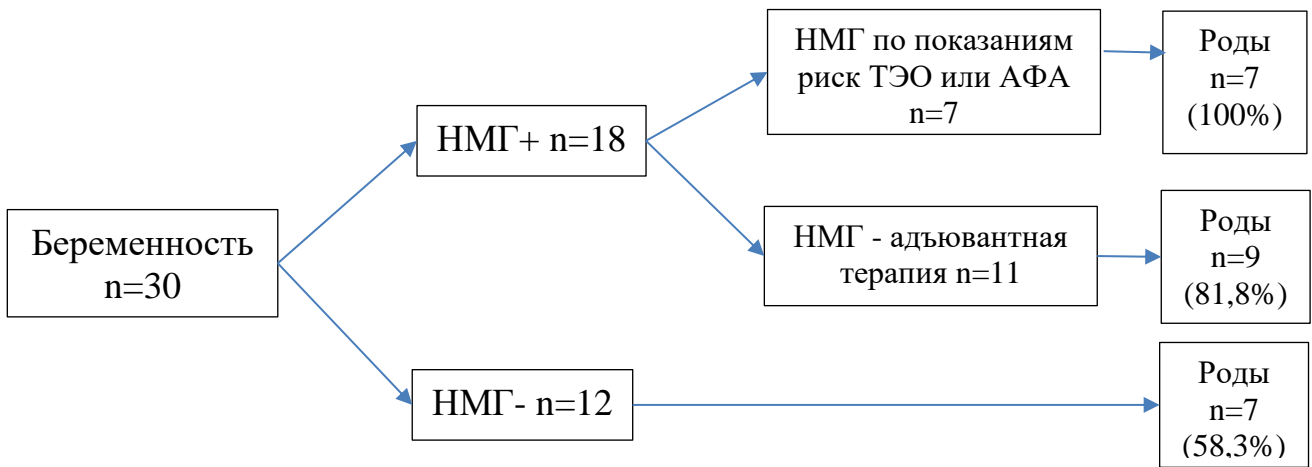


Рисунок 12. Исходы беременности у наблюдаемых пациенток.

Таким образом, назначение НМГ в программах ВРТ увеличивало шансы живорождения и снижало риск самопроизвольного выкидыша в 5,7 раз. Пациенткам, у которых НМГ были назначены по показаниям, беременность заканчивалась живорождением в 100% наблюдений.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе проведенного исследования были проанализированы клинико-лабораторные данные пациентов и получены закономерные данные, свидетельствующие о влиянии возраста на ЧНБ в программах ВРТ. Среди забеременевших пациенток средний возраст был на 2 года меньше, пациенток позднего репродуктивного возраста было в 3,5 раз меньше по сравнению с группой контроля. Как следствие, более молодым пациенткам чаще назначаются препараты рФСГ для овариальной стимуляции по сравнению с гонадотропинами, содержащими ФСГ и ЛГ. Также было отмечено, что в группе с наступившей беременностью возраст мужчин был в среднем на 3 года меньше. Возрастной фактор является значимым в репродукции. Способность к зачатию снижается с возрастом как у женщин, так и у мужчин. Для женщины в возрасте 40 лет шансы наступления беременности не превышают 5%, при этом риск самопроизвольного прерывания беременности на ранних сроках составляет от 34 до 52% [110], [111]. Причины, которые приводят к снижению фертильности в старшей группе пациентов, это накопление с течением времени различных соматических и гинекологических заболеваний, повышенный риск хромосомных аномалий ооцитов, а, значит, и эмбрионов, тенденция к снижению овариального резерва, что снижает шансы наступления как спонтанной беременности, так и беременности, наступившей в результате ВРТ [110]. Возрастной фактор был учтен нами в качестве конфаундера при расчете скорректированного ОШ влияния тромбофилии на ЧНБ в программах ВРТ.

На втором этапе нами было оценено влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на ЧНБ с учетом выявленных конфаундеров. Распространенность критериальных генетических дефектов гемостаза в изучаемой выборке была очень низкой: не было выявлено мутации гена FII, распространенность мутации гена FV составила 3% и была представлена только в гетерозиготном варианте. Активность важнейших естественных антикоагулянтов находилась в пределах нормы за исключением 4-х пациенток группы 2, у которых

активность протеина S была ниже референтного значения. Средняя активность всех антикоагулянтов не отличалась между 2-мя группами пациенток. Из некритериальных генетических дефектов гемостаза нами была оценена лишь распространенность дефекта гена PAI-1 675 4G/5G, которая была высокой, составив 28,8% для гомозиготной формы и 43,3% для гетерозиготной формы полиморфизма, однако и не отличалась в 2-х группах пациенток. Низкая распространенность критериальных мутаций в нашей выборке соответствовала общероссийской - 3-7% для гетерозиготной мутации FV, 2-6%, - для гетерозиготной мутации FII [27]. Распространенность мутации PAI-1 также соответствовала общероссийской - до 50% для гетерозиготной и 26% для гомозиготной формы полиморфизма гена [29]. Не выявленное нами влияние представленных мутаций на ЧНБ в программах ВРТ согласуется с имеющимися данными литературы. Так, в мета-анализе Di Nisio et al. (2011) не было выявлено негативного влияния генетических тромбофилий на исходы программ ВРТ [41], а в исследовании Goppel et al., наоборот, был отмечен обратный эффект: у носительниц Лейденской мутации беременность в результате программ ВРТ наступала вдвое чаще [28]. Аналогично в ретроспективном исследовании Steinvil et al. (2012) были получены данные о том, что у пациенток с неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе доля наследственной тромбофилии была не выше, чем у фертильных женщин, и не ассоциировалась с имплантационными неудачами [39]. В мета-анализе Tan X. et al. (2016) было также выявлено, что мутации генов системы гемостаза не влияют на успех имплантации вне зависимости от возраста, причины бесплодия и количества попыток программ ВРТ в анамнезе [40]. Есть, конечно, исследования, в которых получен обратный результат, свидетельствующий о негативном влиянии наследственной тромбофилии на результаты программ ВРТ. Так, в работе Qublan et al. (2006) 68,9% женщин с 2 и более неэффективными программами ВРТ оказались носительницами по меньшей мере одной мутации наследственной тромбофилии по сравнению с 25% в группе женщин с наступившей беременностью в результате ВРТ [10]. В исследовании Grandone et al. мутация фактора Лейден превалировала (14,4%) у

женщин с повторными неудачами программ по сравнению с группой контроля (1%) [11]. В исследовании Azem et al. (2014) выявлена более высокая частота носительства мутаций генов тромбофилии у женщин с 4 и более неэффективными программами ВРТ по сравнению с группой фертильных женщин или пациенток, забеременевших в первом цикле ВРТ [9]. Мета-анализ, проведенный Di Nisio et al. (2011), показал, что наличие мутации гена FV в 3 раза увеличивало риск неудач имплантации. Данные противоречия в имеющихся исследованиях могут быть объяснены обсервационным дизайном исследований, недостаточным числом наблюдений, различным подходом к формированию групп сравнения и другими особенностями дизайна, и свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса.

Что касается приобретенной тромбофилии, то в нашем исследовании мы сделали допущение о приравнивании к тромбофилии не только критериальных, но и некритериальных АФА. При этом мы также допустили, что будем считать тромбофилией персистенцию антител даже при отсутствии клинического диагноза (ТЭО или синдрома потери плода в анамнезе). При этом нами были получены данные, свидетельствующие о важности именно некритериальных антител в исходах программ ВРТ. Изначально у пациенток группы 2 отмечалось однократное значимое повышение уровня как критериальных (к $\beta 2$ -ГП-1), так и некритериальных антител класса М (к ФС, ФЭ и аннексину V). Однако персистенция антител была отмечена лишь для некритериальных антител - к ФС, ФЭ и аннексину V с конверсией IgM на IgG. При этом персистенция некритериальных антител снижала шансы наступления беременности в 4,34 раза. Наши данные совпали с рядом проведенных исследований, в которых изучалась взаимосвязь между АФА и ЧНБ. В исследовании Di Rosa et al. (2019) у пациенток с повышенным титром АФА в анамнезе чаще встречались указания на неудачи имплантации в программах ВРТ [50]. При этом чаще отмечалась персистенция ВА (53,49%), АКЛ (44,19%) и анти- $\beta 2$ -ГП1 (25,58%). В мета-анализе Di Nisio et al. (2011) было выявлено, что персистенция АФА увеличивала риск неудач программ ВРТ в 3,3 раза, при этом АФА, играющими роль в имплантационных неудачах,

были некритериальные антитела - к ФС, фосфатидилинозитолу, фосфатидной кислоте и фосфатидилглицеролу [41]. Аналогичные данные были получены отечественными исследователями (Khizroeva et al, 2018), согласно которым частота носительства АФА у пациенток с неудачными исходами программ ВРТ была выше по сравнению с пациентками с состоявшейся беременностью: у 42,9% в группе пациенток с отсутствием беременности после ВРТ и у 19,1% забеременевших после ВРТ [51]. При этом чаще выявлялись анти-β2-ГП1 (31,4%), антитела к аннексину V (24,7%) и АКЛ (8,9%). Представленным данным о влиянии АФА на ЧНБ оппонирует Chighizola et al. (2014), согласно исследованию которого был сделан вывод о том, что достоверная связь между повышенными титрами АФА и бесплодием, а также исходами ВРТ, в настоящее время не является доказанной [45]. Таким образом, данные литературы о влиянии АФА на результаты программ ВРТ являются противоречивыми, что объясняется обсервационным дизайном проведенных исследований, и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса.

На третьем этапе нашего исследования были изучены особенности системы гемостаза, включая метод тромбодинамики, в группах пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии и наступления беременности. При анализе параметров системы гемостаза в группах в зависимости от наступления беременности не было выявлено различия между группами в параметрах расширенной гемостазиограммы, ТЭМ и ТД. Однако была выявлена сильная корреляционная связь параметров ТД и уровнем АФА. До овариальной стимуляции и в день ТВП зависимость была такова: чем выше был уровень АФА, тем больше были скорость образования и размер сгустка, что свидетельствует о связи уровня АФА и развития гиперкоагуляционного состояния. В день ПЭ были выявлены уже не положительные, а отрицательные корреляционные связи уровня АФА с начальной скоростью роста сгустка, стационарной скоростью роста сгустка и размером фибринового сгустка. Это свидетельствует о связи уровня АФА и развития относительного гипокоагуляционного состояния в момент ПЭ. При этом корреляционные связи были отмечены в основном у некритериальных антител

(анти-аннексин V, анти-ФЭ, анти-ФС). Также была выявлена сильная положительная корреляционная связь между параметрами ТД и дозой экзогенно вводимых гонадотропинов для овариальной стимуляции. При проведении подобного анализа между уровнем АФА и параметрами ТЭМ выраженных корреляционных связей зарегистрировано не было. Поэтому, мы сделали вывод, что в нашей группе пациентов ТД является наиболее точным и комплексным методом исследования системы гемостаза, отражающая зависимость системы гемостаза от АФА и ятрогенного фактора - экзогенных ГТ. Действительно, данные литературы свидетельствуют о том, что ТД является новым перспективным методом обследования нарушений свертывания крови, учитывающая физиологические особенности процесса свертывания [55]. Наши данные согласуются с данными литературы, в которых было доказано прокоагулянтное действие АФА, связанное с повреждением эндотелия сосудов, активацией молекул адгезии, активацией системы комплемента, повышенной продукцией провоспалительных цитокинов [49].

На четвертом этапе была исследована активность тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, в плазме крови пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии, параметров системы гемостаза и наступления беременности.

Известно, что под действием АФА происходит активация клеток сосудистого русла (эндотелиоцитов, тромбоцитов, моноцитов) и, как следствие, увеличение продукции этими клетками ВВ, в том числе экзосом и микровезикул [112]–[115]. Микровезикулы в этом контексте наиболее изучены. По сравнению со здоровыми людьми у пациентов с АФА наблюдается значительно повышенный уровень циркулирующих эндотелиальных и тромбоцитарных микровезикул, с которыми ассоциирован иммунологически и функционально активный тканевой фактор. Помимо того, что ВВ – маркеры клеточной активации, они несут биоактивные липиды, белки, нуклеиновые кислоты, среди которых микроРНК. Потенциально при высоких уровнях АФА внеклеточные везикулы могут стимулировать тромбоз зависимым и независимым от тканевого фактора путем, а также в результате

активации клеток эндотелия сосудов. Механизмы тромбообразования под действием АФА-индуцированных внеклеточных везикул до сих пор не вполне изучены. Также требуются дополнительные экспериментальные доказательства того, что ВВ (у пациентов с АФА) могут служить полезным и надежным биомаркером риска тромбообразования и осложнений беременности [112]–[115].

Так, в ходе данной работы было выявлено, что высокий уровень АФА в плазме крови пациенток до стадии овариальной стимуляции коррелирует с высоким уровнем ТФ-ВВ и, как было отмечено выше, с большей скоростью образования и размера сгустка (при анализе тромбодинамики) и значительным снижением шансов наступления беременности.

Полученные результаты согласуются с работой Баландиной А.Н. [116] и коллег, в которой они методом тромбодинамики показали положительную связь между повышенной скоростью образования сгустка у пациенток до стадии овариальной стимуляции и неудачей в программе ВРТ. При этом, они заметили, что все изменения гемостаза (гиперкоагуляционное состояние) в процессе медикаментозных и инвазивных манипуляций в программе ВРТ (при овариальной стимуляции, пункции фолликулов, переносе эмбриона) не коррелируют с успехом (не влияют на успех) программы [116].

Таким образом, наряду с уровнем АФА и параметрами тромбодинамики, уровень ТФ-ВВ (измеренный до овариальной стимуляции) также может быть ценным прогностическим маркером риска тромбообразования и неудач в программах ВРТ.

На пятом этапе было проанализировано влияние НМГ, назначенного в качестве антикоагулянтной или адьювантной терапии, на ЧНБ и частоту живорождения в программах ВРТ. Было выявлено, что назначение НМГ способствовало увеличению шансов наступления беременности в 2,87 раза. Также назначение НМГ увеличивало шансы живорождения и снижало риск самопроизвольного выкидыша в 5,7 раз. А у пациенток, у которых НМГ были назначены по показаниям в качестве профилактики ТЭО, беременность заканчивалась живорождением в 100% наблюдений. Положительное действие

НМГ на процессы имплантации и плацентации опосредуются многими факторами. Помимо непосредственного антикоагулянтного и антитромботического действия, НМГ оказывают противовоспалительное действие, которое осуществляется за счет ингибирования TNF- α , продуцируемого макрофагами, иммуномодулирующее действие - через систему E-кадгерина и инсулиноподобный фактор роста, антиапоптотическое действие – через влияние на клетки трофобласта через эпителиальный фактор роста (EGF), взаимодействие с матриксными металлопротеиназами и усиление инвазивных свойств бластоцисты [49], [58]. Наши данные подтверждают результаты многих исследований. Так, исследование Di Simone N. продемонстрировало, что добавление НМГ в культуру клеток трофобласта повышает инвазивную способность и дифференцировку трофобласта [59]. Согласно Кохрановскому обзору 2015 г. профилактические дозы НМГ со дня ТВП фолликулов или ПЭ в полость матки по сравнению с отсутствием терапии или плацебо увеличивали ЧНБ и частоту живорождения в 1,6 и 1,7 раз соответственно [66]. В рандомизированном клиническом испытании, проведенным Urman et al. (2009), выявлена большая доля живорождения в группе эмпирического назначения НМГ у пациенток с идиопатическими неудачами программ ВРТ в анамнезе [14]. Есть и противоположные данные, свидетельствующие об отсутствии эффекта НМГ на ЧНБ. Так, мета-анализ Seshadri et al. (2012), не выявил эффективности рутинного применения НМГ в программах ВРТ [63]. Авторы мета-анализа пришли к выводу, что затруднительно сделать вывод о целесообразности назначения НМГ в силу того, что в исследованиях были слишком гетерогенные группы пациенток, различались время начала и продолжительность терапии НМГ. В ретроспективном когортном исследовании Siristatidis et al. (2018) назначение НМГ пациенткам с имплантационными потерями в анамнезе в программах ВРТ не показало преимуществ в плане ЧНБ по сравнению с группой контроля [64]. Рандомизированное исследование Lodigiani et al. (2017), в котором НМГ назначался в режиме ежедневных инъекций на протяжении всего протокола овариальной стимуляции, также было продемонстрировано отсутствие увеличения ЧНБ и живорождения [65]. Таким образом, применение НМГ в протоколах ВРТ с

целью повышения ЧНБ до сих пор является спорным и дискуссионным вопросом. Требуется дальнейшие исследования для подтверждения эффективности их применения в качестве адъювантной терапии в программах ВРТ.

На основании полученных данных, был составлен алгоритм обследования и лечения бесплодия у пациенток с тромбофилией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (Рисунок 13).



Рисунок 13. Алгоритм обследования и лечения бесплодия у пациенток с тромбофилией в программах ВРТ.

ВЫВОДЫ

1. Распространенность наследственной тромбофилии высокого риска тромбоэмболических осложнений (мутации FII *G20210A*, FV *G1691A*, дефицит антитромбина-III, протеина C, протеина S) у пациенток с бесплодием, проходящих лечение с помощью методов ВРТ, является низкой и составляет 7,2%. Напротив, встречаемость персистенции повышенного уровня антифосфолипидных антител (уровень выше референсных значений, измеренный дважды с интервалом 12 недель) является достаточно высокой и составляет 18,5%.

2. В отличие от наследственной тромбофилии, не оказывающей значимого влияния на исходы программ ВРТ, персистенция повышенного уровня антифосфолипидных антител снижает шансы наступления беременности в 4,3 раза (95% ДИ=1,04; 20,2).

3. Антифосфолипидные антитела, оказывающие негативное влияние на частоту наступления беременности в программах ВРТ, в основном представлены так называемыми некритериальными антителами (к фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину и аннексину V) с постепенной конверсией антител класса IgM на IgG.

4. Параметры тромбодинамики (метод комплексной оценки состояния системы гемостаза) имеют прямую сильную корреляционную связь с уровнем как критериальных, так и некритериальных антифосфолипидных антител. Максимальная связь уровня антифосфолипидных антител с параметрами тромбодинамики в программах ВРТ имеет место после проведенной овариальной стимуляции и напрямую связана с дозой вводимых экзогенных гонадотропинов.

5. Персистенция повышенного уровня антифосфолипидных антител в плазме крови коррелирует с повышенным содержанием тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами, что может быть причиной развития гиперкоагуляционного состояния системы гемостаза.

6. Назначение низкомолекулярных гепаринов в программах ВРТ увеличивает шансы наступления беременности в 2,9 раз (95% ДИ=1,2; 6,9), шансы

живорождения - в 5,7 раз, что может быть связано с противовоспалительным, антикомплементарным и антитромботическим действием НМГ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам группы риска развития тромбоемболических осложнений, а также с повторными неудачными попытками переноса эмбрионов в программах ВРТ, рекомендовано определение уровня антифосфолипидных антител дважды с интервалом в 12 недель (для подтверждения их персистенции), и должно включать определение как критериальных (антитела к кардиолипину, $\beta 2$ -ГП-1 классов IgM/IgG, ВА), так и некритериальных антител (антитела к фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину, аннексину V классов IgM/IgG).

2. Пациенткам программ ВРТ группы риска развития тромбоемболических осложнений рекомендовано проведение теста тромбодинамики совместно со стандартной гемостазиограммой и тромбозластометрией, так как данное исследование обладает большей диагностической точностью выявления как гипер-, так и гипокоагуляционного состояния свертывания крови.

3. Пациенткам программ ВРТ группы риска развития тромбоемболических осложнений рекомендовано назначение минимально возможных доз гонадотропинов для овариальной стимуляции, так как большая доза вводимых экзогенно вводимых гонадотропинов вызывает гиперкоагуляционное состояние свертывания крови согласно данным глобальных тестов оценки плазменного гемостаза (как тромбозластометрии, так и тромбодинамики).

4. Пациенткам программ ВРТ группы риска развития тромбоемболических осложнений (наличие личного и семейного отягощенного тромботического анамнеза, наследственной или приобретенной тромбофилии высокого риска тромбоемболических осложнений) рекомендовано назначение профилактических доз низкомолекулярных гепаринов со дня начала овариальной стимуляции до получения заключения теста на ХГ, и пролонгирование терапии во время беременности в случае ее наступления.

5. Пациенткам с повторными неудачными попытками переноса эмбрионов в программах ВРТ, особенно при выявлении персистенции

повышенного уровня антифосфолипидных антител, могут быть рекомендованы профилактические дозы низкомолекулярных гепаринов со дня переноса эмбриона в полость матки в качестве адъювантной терапии, так как показана большая частота наступления беременности при их назначении.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКЛ – антитела к кардиолипину

АМГ - антимюллеров гормон

ант-ГнРГ - антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

АТ-III – антитромбин - III

АФА – антифосфолипидные антитела

АФС – антифосфолипидный синдром

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ВА – волчаночный антикоагулянт

ВВ – внеклеточные везикулы

ВКМ – внутриклеточная масса

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ГТ – гонадотропины

ДВС – синдром диссеминированного внутреннего свертывания крови

ДГЭАС - дегидроэпиандростерон-сульфат

95% ДИ – 95% доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е2 - эстрадиол

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ЗРП – задержка роста плода

ИКСИ - (от *англ.* – intracytoplasmic sperm injection, ICSI) интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ИЛВ – «интралюминарные везикулы»

ИМТ- индекс массы тела

КАФ – количество антральных фолликулов

КЛ - кардиолипин

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МВТ – мультивезикулярные тельца

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

НМГ – низкомолекулярные гепарины

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс
ОШ - отношение шансов
ОШ_{кор} - скорректированное отношение шансов
ПГТ - преимплантационное генетическое тестирование
ПДФ – продукты деградации фибрина/фибриногена
ПИ – протромбиновый индекс
ПЭ - перенос эмбрионов
РНК – рибонуклеиновая кислота
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
рФСГ - рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
СГЯ - синдром гиперстимуляции яичников
СПКЯ - синдром поликистозных яичников
Т - тестостерон
ТВП – трансвагинальная пункция яичников
ТД - тромбодинамика
ТТГ - тиреотропный гормон
Т₄_{св} - свободный тироксин
ТФ – тканевой фактор
ТФЭ – трофэктодерма
ТЭГ – тромбоэластография
ТЭМ - тромбоэластометрия
ТЭО – тромбоэмболические осложнения
УЗИ - ультразвуковое исследование
ФИ - фосфатидилинозитол
ФС – фосфатидилсерин
ФХ - фосфатидилхолин
ФЭ - фосфатидилэтаноламин
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
β-ХГ - β-субъединица хорионического гонадотропина
ХГ - хорионический гонадотропин
ЧНБ - частота наступления беременности

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

APC – активированный протеин С

СFT - время формирования сгустка

Cs - размер фибринового сгустка

СТ - время коагуляции

FII – фактор II

FV – фактор V

MCF - максимальная амплитуда

РАI-1 - ингибитор активатора плазминогена 1 типа

T - формирование спонтанного сгустка в объеме плазмы крови, не контактирующей с активирующей поверхностью вставки

V - стационарная скорость роста сгустка

Vi - начальная скорость образования сгустка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Корсак, В.С. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2015г / В.С. Корсак, А.А. Смирнова, О. В. Шурыгина // Проблемы репродукции.- 2017.- Т. 23, № 5.- С. 8–22.
- [2] Bashiri, A. Recurrent pregnancy loss : evidence-based evaluation, diagnosis and treatment / A. Bashiri, A. Harlev, A. Agarwal // L.: "Springer". -2016.- P. 19-34.
- [3] Aneuploidy Screening using Next Generation Sequencing / C.Cinnioglu [et al.] // Methods Mol. Biol.- 2019.- № 1885.- P. 85–102.
- [4] Assessment of pre-implantation genetic testing for embryo aneuploidies: A SWOT analysis / A.Alteri [et al.] // Clin. Genet.- 2019.- Vol. 95, № 4.- P. 479–487.
- [5] Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis / G. Kovalevsky [et al.] // Arch. Intern. Med.- 2004.- Vol.164, № 5.- P. 558–63.
- [6] Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy / Kupferminc M.J. [et al.] // N. Engl. J. Med.- 1999.- Vol. 341, № 5.- P. 384.
- [7] The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies / M.A. Rodger [et al.] // PLoS Med.- 2010.- Vol. 7, № 6. - pii:1000292.
- [8] Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis / E. Rey [et al.] // Lancet (London, England).- 2003.- Vol. 361, № 9361.- P. 901–8.
- [9] Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures / F. Azem [et al.] // Hum. Reprod.- 2004.- Vol. 19, № 2.- P. 368–70.
- [10] Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure / H. S. Qublan [et al.] // Hum. Reprod.- 2006.- Vol. 21, № 10.- P. 2694–8.
- [11] Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure / E. Grandone [et al.] // Fertil. Steril. - 2001.- Vol. 76, № 1.- P.201–2.
- [12] Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia / I. Martinelli [et al.] // Haematologica.- 2003.- Vol. 88, № 7.- P. 789–93.

[13] Low-molecular-weight heparin in the treatment of recurrent IVF-ET failure and thrombophilia: a prospective randomized placebo-controlled trial / H.Qublan [et al.] // Hum. Fertil. (Camb).- 2008.- Vol. 11, № 4.- P.246–53.

[14] Luteal phase empirical low molecular weight heparin administration in patients with failed ICSI embryo transfer cycles: a randomized open-labeled pilot trial / B. Urman [et al.] // Hum. Reprod.- 2009.- Vol. 24, № 7.- P. 1640–7.

[15] Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2015г. [Электронный ресурс] - 2015.- Режим доступа: www.rahr.ru/d_registr_otchet/RegistrART2017.pdf.

[16] Влияние резекции яичников на их функциональный резерв / В. С. Корсак [и др.] // Пробл.репрод.- 1996.- Т. 2, № 4.- С. 63–67.

[17] Вартамян, Э.В. Роль сочетанной патологии в неудачных протоколах ЭКО / Э.В. Вартамян, Е.Ю. Мартышкина, К.А. Цатурова // Акушерство, гинекология и репродукция.- 2011.- Т. 5, № 4.- С. 25-43.

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

[19] Gardner, D. K.. Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives, III Chinese Version / D. K.Gardner [et al.] // L.: "Informa healthcare". - 2009.-506 с.

[20] Recurrent implantation failure: definition and management / C. Coughlan [et al.] // Reprod. Biomed. Online.- 2014.- Vol. 28, № 1.- P.14–38.

[21] What should we focus on before preimplantation genetic diagnosis/screening? / Z. Zheng [et al.] // Arch Med Sci.- 2018.- Vol.14, № 5.- P.1119-1124.

[22] Abnormal embryonic development diagnosed embryoscopically in early intrauterine deaths after in vitro fertilization: a preliminary report of 23 cases / T. Philipp [et al.] // Fertil Steril.- 2004.- Vol.- 82, № 5.- P. 1337—1342.

[23] Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss / S.D. Spandorfer [et al.] // Fertil Steril.- 2004.- Vol. 81, № 5.- P. 1265—1269.

[24] Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ

"Профилактика венозных тромбозов и тромбоэмболических состояний в акушерстве и гинекологии". [Электронный ресурс] - 2014.- Режим доступа: http://roag-portal.ru/recommendations_obstetrics.

[25] Inherited and acquired thrombophilias / M. P. Rambaldi [et al.] // *Reprod. Sci.* - 2014.- Vol. 21, № 2.- P. 167–82.

[26] Кузнецова, И.В. Возможности снижения перинатального и акушерского риска у женщин с тромбофилиями / И.В. Кузнецова, Г.А. Суханова // *Эффективная фармакотерапия.*- 2017.- № 25.- С. 14–21.

[27] Макацария, А. Д. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике / А. Д. Макацария, В.О. Бицадзе // М.: Триада-Х.- 2003.- 904 с.

[28] Selected pressure for factor V Leiden mutation and embryo implantation / W. Göpel [et al.] // *Lancet.*- 2001.- Vol. 358.- P. 1238-1239.

[29] Ходжаева, З.С. Основы профилактики и лечения наследственных тромбофилий / З.С. Ходжаева // *Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии.*- 2010.- № 4.- С. 26-31.

[30] Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages / T. Buchholz [et al.] // *Hum. Reprod.*- 2003.- Vol. 18, № 11.- P. 2473–2477.

[31] Hsu, E. Biochemistry, Antithrombin III / E. Hsu, L. Moosavi // *StatPearls [Internet].*- 2019.

[32] Saturation Mutagenesis of the Antithrombin Reactive Center Loop P14 Residue Supports a Three-step Mechanism of Heparin Allosteric Activation Involving Intermediate and Fully Activated States / R. Roth [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2015.- Vol. 47, № 290.- P. 28020–36.

[33] Hypercoagulability / B. Senst [et al.] // *StatPearls [Internet].*- 2020.

[34] Gupta, A. Protein C Deficiency / A. Gupta, S. Patibandla // *StatPearls [Internet].*- 2019.

[35] Protein S Deficiency / A. Gupta [et al.] // *StatPearls [Internet].*- 2019.

[36] Consensus on the investigation of thrombophilia in women and clinical management / C. Mac Donald Bley Nascimento [et al.] // Einstein (Sao Paulo).- 2019.- Vol.17, № 3.- pii:AE4510.

[37] Акиньшина, С.В. Патогенез и профилактика тромбозмболических осложнений, связанных с использованием вспомогательных репродуктивных технологий / С.В. Акиньшина, А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе // Медицинский совет.- 2014. - № 9.- С. 84–89.

[38] Тромбозмболические осложнения, связанные с использованием вспомогательных репродуктивных технологий. Синдром гиперстимуляции яичников / В.О. Бицадзе [и др.] // Практическая медицина.- 2013.- № 7.- С. 20–31.

[39] Association of common thrombophilias and antiphospholipid antibodies with success rate of in vitro fertilisation / A. Steinvil [et al.] // Thromb. Haemost. - 2012.- Vol. 108, № 6.- P. 1192–7.

[40] Association between in vitro fertilization outcomes and inherited thrombophilias: a meta-analysis / X. Tan [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet.- 2016. - Vol. 33, № 8.- P. 1093–8.

[41] Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis / M. Di Nisio [et al.] // Blood.- 2011.- Vol. 118, № 10.- P. 2670–8.

[42] Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ "Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация". [Электронный ресурс] -2019. - Режим доступа: http://www.rahr.ru/d_index/.pdf.

[43] The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Inherited Thrombophilias in Pregnancy // - Practice Bulletin N.197. - 2018.

[44] The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). Reducing the Risk of Venous Thromboembolism during Pregnancy and the Puerperium. - 2015. Green-top guideline N. 37a.

[45] Chighizola, C. B. Antiphospholipid antibodies and infertility / C. B. Chighizola, G. R. De Jesus // Lupus.- 2014.- Vol. 23, № 12.- P. 1232–8.

[46] The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).

Antiphospholipid syndrome // - 2012. - Practice bulletin N.132.

[47] Jeve, Y. B. Evidence-based management of recurrent miscarriages / Y. B. Jeve, W. Davies // *J. Hum. Reprod. Sci.*- 2014.- Vol. 7, № 3.- P. 159–69.

[48] Rand, J. H., Wolgast, L. R. Dos and don'ts in diagnosing antiphospholipid syndrome / J. H. Rand, L. R. Wolgast // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.*-2012. Vol. 2012.- P. 455–9.

[49] Макацария, А.Д. Антифосфолипидный синдром – иммунная тромбофилия в акушерстве и гинекологии (монография) / А.Д. Макацария [и др.]. М.: "Триада- X". -2007.- 485 с.

[50] In vitro fertilization and autoimmunity: Evidence from an observational study / R. Di Rosa [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*- 2019.- Vol. 234.- P. 137–142.

[51] In vitro fertilization outcomes in women with antiphospholipid antibodies circulation / J. Khizroeva [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.*- 2020.- Vol. 33, № 12.- P. 1988-1993.

[52] The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage.- 2011 (Update 2017).- Green-top Guideline№17.

[53] Чернышева, Г.Г. Д-димер – тест выбора в диагностике нарушений системы гемостаза у больных с ишемической болезнью сердца / Г.Г. Чернышева, О.А. Попова, Е.Ю. Таращук // *Тромбоз, гемостаз и реология.* - 2011.- Т. 1, № 45.- С. 69–76.

[54] Ярец, Ю. И. Тромбоэластография: основные показатели, интерпретация результатов: практическое пособие для врачей / Ю. И. Ярец. Гомель: МЗ респ. Беларусь.- 2018.- 26 с.

[55] Тромбодинамика: новый подход к диагностике нарушений системы гемостаза / А. Н. Баландина [и др.] // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.*- 2018.- Т. 17, № 4.- С. 114-126.

[56] Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ "Синдром гиперстимуляции яичников: диагностика, лечение, профилактика,

интенсивная терапия". [Электронный ресурс] -2019.- Режим доступа: http://roag-portal.ru/recommendations_gynecology.

[57] Nelson, S.M. The potential role of heparin in assisted conception / S.M. Nelson, I.A. Greer // Hum. Reprod.- 2008.- Vol. 6, № 14.- P. 623-645.

[58] The presence of heparins during decidualization modulates the response of human endometrial stromal cells to IL-1 β in vitro / J. Spratte [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet.- 2016.- Vol. 33, № 7.- P. 949–57.

[59] Low-molecular weight heparin induces in vitro trophoblast invasiveness: role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors / N. Di Simone [et al.] // Placenta. - 2007.- № 28.- P. 298–304.

[60] Glycosaminoglycans increase levels of free and bioactive IGF-I in vitro / A.V. Moller [et al.] // European Journal of Endocrinology.- 2006.- Vol. 155.- P. 297-305.

[61] Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis / D.I. Lebovic [et al.] // Hum. Reprod.- 2000.- Vol. 15.- P. 67–77.

[62] Heparin acts synergistically with interleukin-11 to induce STAT3 activation and in vitro osteoclast formation / K.J. Walton [et al.] // Blood.- 2002.- Vol. 100.- P. 2530-2536.

[63] Effect of heparin on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis / S. Seshadri [et al.] // Reprod. Biomed. Online.- 2012.-Vol. 25, № 6.- P. 572–84.

[64] Administration of low-molecular-weight heparin in patients with two or more unsuccessful IVF/ICSI cycles: a multicenter cohort study / C. Siristatidis [et al.] // Gynecol Endocrinol.- 2018.- Vol. 9, № 34.- P. 747-751.

[65] The effect of parnaparin sodium on in vitro fertilization outcome: A prospective randomized controlled trial / C. Lodigiani [et al.] // Thromb Res.- 2017.- Vol. 159. - P. 116–121.

[66] Heparin for assisted reproduction / M. A. Akhtar [et al.] // Cochrane database Syst. Rev.- 2013.- P. CD009452.

[67] Ata, B. Thrombophilia and assisted reproduction technology-any detrimental impact or unnecessary overuse? / B. Ata, B. Urman // J. Assist. Reprod. Genet.- 2016.-

Vol. 33, № 10.- P. 1305–1310.

[68] Aspirin for in vitro fertilisation / C. S. Siristatidis [et al.] // *Cochrane database Syst. Rev.*- 2016.- P. CD004832.

[69] Clemmens, H. Extracellular vesicles: translational challenges and opportunities / H. Clemmens, D. W. Lambert // *Biochem. Soc. Trans.* - 2018.- Vol. 46, № 5.- P. 1073–1082.

[70] Machtinger, R. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation / R. Machtinger, L. C. Laurent, A. A. Baccarelli // *Hum. Reprod. Update.*- 2016.- Vol. 22, №2.- P. 182–193.

[71] Vidal, M. Exosomes: Revisiting their role as "garbage bags" / M. Vidal // *Traffic.*- 2019.- Vol. 20, № 11.- P. 815–828.

[72] *Metabolomics Applied to the Study of Extracellular Vesicles* / C. Williams [et al.] // *Metabolites.*- 2019.- Vol. 9.- № 11.- P. 276.

[73] *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study* / M. P. Zaborowski [et al.] // *Bioscience.*- 2015.- Vol. 65, № 8.- P. 783–797.

[74] Cocucci, E. Shedding microvesicles: artefacts no more / E. Cocucci, G. Racchetti, J. Meldolesi // *Trends Cell Biol.*- 2009.- Vol. 19, № 2.- P. 43–51.

[75] Février, B. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages / B. Février, G. Raposo // *Curr. Opin. Cell Biol.*- 2004. - Vol. 16, № 4.- P. 415–421.

[76] Skotland, T. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward / Skotland T., Sandvig K., Llorente A. // *Prog. Lipid Res.*- 2017.- Vol. 66.- P. 30–41.

[77] Meldolesi, J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication / J. Meldolesi // *Curr. Biol.*- 2018.-Vol. 28, № 8.- P. R435-R444.

[78] Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins / R. M. Johnstone [et al.] // *J. Cell. Physiol.*- 1991.- Vol. 147, № 1.- P. 27–36.

[79] Decker, C. J. The exosome: a versatile RNA processing machine / C. J. Decker // *Curr. Biol.*- 1998.- Vol. 8, № 7.- P. R238-240.

[80] Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules / H. F. Heijnen [et al.] // *Blood*.- 1999.- Vol. 94, № 11.- P. 3791–3799.

[81] Xu, R. A Protocol for Isolation and Proteomic Characterization of Distinct Extracellular Vesicle Subtypes by Sequential Centrifugal Ultrafiltration / R. Xu, R. J. Simpson, D. W. Greening // *Methods Mol. Biol.*- 2017.- Vol. 1545. - P. 91–116.

[82] Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes / D.-S. Choi [et al.] // *Mass Spectrom. Rev.*- 2015.- Vol. 34, № 4.- P. 474–490.

[83] Proteomic insights into extracellular vesicle biology - defining exosomes and shed microvesicles / D. W. Greening [et al.] // *Expert Rev. Proteomics*.- 2017. - Vol. 14, № 1.- P. 69–95.

[84] The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization / R. Szatanek [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.*- 2017.- Vol. 18.- № 6.- P.1153.

[85] Hosseini-Beheshti, E. Extracellular vesicles and microvascular pathology: Decoding the active dialogue / E. Hosseini-Beheshti, G. E. R. Grau // *Microcirc.*- 2019.- Vol. 26, № 2.- p. e12485.

[86] Iba, T. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy / T. Iba, H. Ogura // *J. Intensive Care*.- 2018.- Vol. 6. -P. 68.

[87] Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin / C. Tripisciano [et al.] // *Sci. Rep.*- 2017.- Vol. 7, № 1.- P. 1–11.

[88] Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation / D.N. Silachev [et al.] // *Cells*.- 2019.- Vol. 8, № 3.- pii: E258.

[89] Hisada, Y. Measurement of tissue factor activity in extracellular vesicles from human plasma samples / Y. Hisada, N. Mackman // *Res. Pract. Thromb. Haemost.*- 2018.- Vol. 3, № 1.- P. 44–48.

[90] Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation / T. Nielsen [et al.] // *J. Extracell. Vesicles*. -2018.- Vol. 7, № 1.- P. 1454777.

[91] Sadallah, S. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity / S.

Sadallah, C. Eken, J. A. Schifferli // *Clinical and Experimental Immunology*. - 2011.- Vol. 163, № 1.- P. 26–32.

[92] Extracellular vesicles and coagulation in blood from healthy humans revisited / R. J. Berckmans [et al.]// *J. Extracell. Vesicles*.- 2019.- Vol. 8, № 1.- P. 1688936.

[93] Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation / R. L. Koshiar [et al.]// *PLoS One*.- 2014.- Vol. 9, № 8.- P. e104200.

[94] Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis / M. Zarà [et al.]// *Int. J. Mol. Sci*.- 2019.- Vol. 20, № 11.- pii: E2840.

[95] Enhanced expression of cell-specific surface antigens on endothelial microparticles in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation / H. Matsumoto [et al.]// *Shock*.- 2015.- Vol. 43, № 5.- P. 443–449.

[96] Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro / R. Lacroix [et al.]// *Blood*.- 2007.- Vol. 110, № 7.- P. 2432–2439.

[97] Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction / B. Steppich [et al.]// *Thromb. Haemost*.- 2005.- Vol. 93, № 1.- P. 35–39.

[98] Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions / S. Srikanthan [et al.]// *Thromb. Haemost*.- 2014.- Vol. 12, № 11.- P. 1906–1917.

[99] Phosphatidylserine externalization and procoagulant activation of erythrocytes induced by *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin / S.M. Qadri [et al.]// *J. Cell. Mol. Med*.- 2016.- Vol. 20, № 4.- P. 710–720.

[100] Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health and Disease / C. Simon [et al.]// *Endocr. Rev*.- 2018.- Vol. 39, № 3.- P. 292–332.

[101] Zhang, W. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis / W. Zhang,

X. Ou, X. Wu // *Int. J. Oncol.*- 2019.- Vol. 54, № 5.- P. 1719–1733.

[102] Preeclampsia and Extracellular Vesicles / S. I. Gilani [et al.] // *Curr. Hypertens. Rep.*- 2016.- Vol. 18, № 9.- P. 68.

[103] Procoagulant extracellular vesicles in amniotic fluid / L. Hell [et al.] // *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*- 2017.- Vol. 184.- P. 12-20.

[104] Extracellular vesicles and reproduction–promotion of successful pregnancy / D. Tannetta [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.*- 2014.- Vol. 11, № 6.- P. 548–563.

[105] Di Pietro, C. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle / C. Di Pietro // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2016.- Vol. 33, № 3.- P. 303–311.

[106] Procoagulant tissue factor-exposing vesicles in human seminal fluid / C. Franz [et al.] // *J. Reprod. Immunol.*- 2013.- Vol. 98, № 1-2.- P. 45–51.

[107] Kurian, N. K. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy / N. K. Kurian, D. Modi.// *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2019.- Vol. 36, № 2.- P. 189–198.

[108] Almiñana, C. Extracellular Vesicles in the Oviduct: Progress, Challenges and Implications for the Reproductive Success / C. Almiñana, S. Bauersachs // *Bioengineering.*- 2019.- Vol. 6, № 2.- P. 32.

[109] Тромбодинамика: новый подход к диагностике нарушений системы гемостаза / А.Н. Баландина [и др.] // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.*- 2018.- Т.17, №4.- С.114-126.

[110] Сыркашева, А. Г. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы) / А. Г. Сыркашева, Е. О. Ильина, Н. В. Долгушина// *Гинекология.*- 2016.- Т. 3.- С. 40–43.

[111] Мишиева, Н. Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва: дисс. д-ра. мед. наук: 14.01.01 / Н.Г. Мишиева. М., 2008.- 307 с.

[112] Chaturvedi, S. Extracellular Vesicles in the Antiphospholipid Syndrome / S. Chaturvedi, R. Alluri, K. R. McCrae // *Semin. Thromb. Hemost.*- 2018.- Vol. 44, № 5.- P. 493–504.

[113] Plasma microparticle tissue factor activity in patients with antiphospholipid antibodies with and without clinical complications / R. Willemze [et al.] // *Thromb. Res.* - 2014.- Vol. 133, № 2.- P. 187–189.

[114] A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles / M. Wu [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* - 2015. - Vol. 13, № 10.- P. 1928–40.

[115] Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations / S. Chaturvedi [et al.] // *Thromb. Res.* 2015.- Vol. 135, № 1.- P. 102–8.

[116] An enhanced clot growth rate before in vitro fertilization decreases the probability of pregnancy / A.N. Balandina [et al.] // *PLoS One.* - 2019. -Vol, 14. № 5.- p. e0216724.