

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

На правах рукописи

СЕЛИМОВА
Фатима Насрединовна

ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ
ФУНКЦИИ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР
С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

14.01.01 — Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук
С.Г. Перминова
кандидат медицинских наук
Н.В.Козырина

Москва 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ	14
1.1. Эпидемиология и пути передачи ВИЧ-инфекции	14
1.2. Репродуктивная функция у женщин с ВИЧ-инфекцией	17
1.2.1 Гинекологические заболевания и фертильность ВИЧ-инфицированных женщин	17
1.2.2 Методы реализации репродуктивной функции у женщин с ВИЧ-инфекцией	20
1.3 Репродуктивная функция у мужчин с ВИЧ-инфекцией	22
1.3.1 Фертильность ВИЧ-инфицированных мужчин	22
1.3.2 Обработка спермы у мужчин с ВИЧ-инфекцией	24
1.3.3 Методы реализации репродуктивной функции у мужчин с ВИЧ-инфекцией	26
1.4 Реализация репродуктивной функции в ВИЧ - конкордантных парах	30
1.5 Митохондриальная ДНК гамет	31
1.5.1 Роль кумулюсных клеток в компетентности ооцитов	34
1.5.2 Митохондриальная токсичность антиретровирусной терапии	35
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Материал исследования	40
2.2 Методы исследования	44
2.3 Специальные методы исследования	58
2.3.1 Исследование числа копий мтДНК в клетках кумулюса	58
2.3.2 Исследование числа копий мтДНК в сперматозоидах	59
2.4 Статистический анализ полученных результатов	61
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
3.1 Клинико-anamnestические данные и лабораторные параметры	

супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у женщины	62
3.1.1 Анализ показателей овариального резерва у пациенток исследуемых групп	73
3.2 Клинико-anamнестические данные и лабораторные параметры супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчин	76
3.2.1 Параметры спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, использующих АРВТ	82
3.2.2 Параметры спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, не использующих АРВТ	86
3.3 Анализ основных параметров овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и исходов программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у женщины	90
3.4 Анализ основных параметров овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и исходов программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины	94
3.5 Анализ копийности митохондриальной ДНК гамет при ВИЧ-инфекции	99
3.5.1 Копийность мтДНК в кумулюсных клетках	99
3.5.2 Копийность мтДНК в сперматозоидах	103
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	108
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

ВИЧ-инфекция – эпидемическое заболевание, которое в настоящее время приобрело характер пандемии. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) около 40 млн. человек в мире проживает с ВИЧ-инфекцией [1]. Более 80% ВИЧ-инфицированных находятся в возрасте от 15 до 44 лет, большинство из них планируют беременность [2,3,4].

Использование антиретровирусной терапии (АРВТ) существенно увеличило продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов, в связи с чем, становится актуальным повышение качества их жизни и возможность реализации репродуктивной функции. Более того, при сохраненной фертильности у обоих супругов существует возможность самостоятельного зачатия [5]. Однако результаты ряда исследований показывают снижение фертильности, как женщин, так и мужчин с ВИЧ-инфекцией [3,6,7], что создает предпосылки для реализации репродуктивной функции с использованием программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время влияние ВИЧ-инфекции и/или АРВТ на фертильность, качество гамет и эффективность программ ВРТ у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией недостаточно изучено. Отсутствуют однозначные данные о воздействии ВИЧ-инфекции на овариальный резерв. Так, в исследовании Seifer и соавт. (2007), не было выявлено снижения параметров овариального резерва [8]. Ohl и соавт. (2010), напротив, показали, что у пациенток у ВИЧ-инфицированных женщин уровни ФСГ были на 36% выше,

чем в контрольной группе, в то время как уровни ингибина В и АМГ были на 57% и 23% ниже, соответственно [9]. Обсуждается негативное влияние препаратов АРВТ на качество ооцитов и их способность к оплодотворению. Известно, что нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), которые всегда используются в схемах АРВТ, ингибируя активность фермента-мишени — обратной транскриптазы ВИЧ, нарушают процесс репликации вируса. Однако данная группа препаратов также способна подавлять гамма-полимеразу человека, необходимую для репликации митохондриальной ДНК (мтДНК), что приводит к снижению (истощению, деплеции) содержания мтДНК, увеличению мутации мтДНК [10, 11, 12]. Известно, что существует взаимосвязь между числом копий мтДНК, продукцией АТФ митохондриями и качеством ооцитов, а также потенциалом развития эмбрионов. При этом показано, что ооциты с меньшим количеством копий мтДНК имеют более низкую частоту оплодотворения [10]. Исследования Lopez и соавт. (2008) впервые показали, что в ооцитах ВИЧ-инфицированных женщин с бесплодием, принимающих комбинированную АРВТ, в 32% случаев наблюдалось истощение мтДНК по сравнению с контролем [13, 14].

Обсуждаются особенности овариальной стимуляции у ВИЧ-позитивных женщин. Так, в ряде работ показано, что для стимуляции суперовуляции у ВИЧ-положительных женщин потребовались более высокие дозы гонадотропинов [3, 7, 15, 16]. Авторы также объясняют это возможной овариальной резистентностью, обусловленной негативными эффектами АРВТ на овариальный ответ.

Данные литературы об эффективности программ ВРТ в серодискордантных парах с ВИЧ-инфицированной женщиной противоречивы. Однако большинство из них указывают на более низкую частоту наступления беременности после ЭКО (14,3%-26,3%) по сравнению с аналогичным показателем в парах с негативными по ВИЧ женщинами [3, 7,

17], что объясняют гонадотоксичными эффектами препаратов АРВТ. Это подтверждают результаты исследований Coll и соавт. (2006), Stora и соавт. (2016), показавшие, что у ВИЧ-положительных женщин при использовании собственных ооцитов наблюдалось снижение частоты наступления беременности, тогда как при использовании ооцитов донора этот показатель был сопоставим с эффективностью программ ЭКО у женщин без ВИЧ-инфекции [7,15].

Отсутствует единая точка зрения относительно воздействия АРВТ на характеристики эякулята у ВИЧ-инфицированных мужчин. Согласно данным Nicoroullous и соавт. (2011), АРВТ оказывает негативное влияние на параметры спермы, что проявляется в снижении концентрации, подвижности сперматозоидов, увеличении количества их патологических форм [18]. Robbins и соавт. (2001) напротив, не выявили изменений показателей спермы у мужчин с ВИЧ-инфекцией, принимающих АРВТ [19]. Тем не менее, все чаще появляются сообщения, что использование АРВТ способствует нарушению целостности ДНК сперматозоидов, а также приводит к снижению количества мтДНК [6,20]. Теоретически, проникновение в сперматозоиды препаратов группы НИОТ могут обуславливать митохондриальную токсичность в сперматозоидах, что, в свою очередь, приводит к снижению их подвижности. Однако эта гипотеза нуждается в подтверждении [21].

Результаты анализа исходов циклов ЭКО в серодискордантных парах с ВИЧ-инфицированным мужчиной весьма неоднозначны. По разным данным частота наступления беременности в данной группе пациентов варьирует от 22 % до 45 % [3, 22]. В качестве основной причины низкой эффективности программ ВРТ в данной группе пациентов обсуждается воздействие ВИЧ и АРВТ на митохондриальный потенциал сперматозоидов, как маркер их качества и способности к оплодотворению [159].

Таким образом, на сегодняшний день отсутствуют однозначные данные о влиянии ВИЧ-инфекции и/или АРВТ на фертильность, качество гамет и эффективность программ ВРТ у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией, что является основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования - повышение эффективности и безопасности реализации репродуктивной функции в программах ВРТ у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-anamnestические данные и лабораторные параметры супружеских пар с ВИЧ-инфекцией, обратившихся для оценки фертильности и/или проведения программы ЭКО
2. У ВИЧ-позитивных женщин оценить влияние длительности заболевания и продолжительности антиретровирусной терапии на состояние овариального резерва.
3. У ВИЧ-позитивных мужчин оценить влияние длительности заболевания и продолжительности антиретровирусной терапии на параметры эякулята.
4. Оценить параметры «свежего» цикла, эмбриологического этапа и эффективность программы ЭКО в зависимости от ВИЧ-статуса супружеской пары.
5. Изучить влияние антиретровирусной терапии на качество гамет на основании оценки копийности митохондриальной ДНК в клетках кумулюса и сперматозоидах.
6. Разработать алгоритм подготовки и проведения программ ВРТ у супружеских пар с бесплодием и ВИЧ-инфекцией.

Научная новизна

Получены данные о снижении овариального резерва у женщин с ВИЧ-инфекцией и изменении параметров эякулята у мужчин с ВИЧ-инфекцией в зависимости от длительности заболевания и продолжительности АРВТ.

У женщин с ВИЧ-инфекцией выявлена низкая частота наступления беременности, как в «свежих» циклах, так и криоциклах, что связано с негативным влиянием длительности заболевания и продолжительности АРВТ на качество ооцитов.

Впервые проведена оценка копийности мтДНК в клетках кумулюса женщин с ВИЧ-инфекцией и выявлено значительное снижение числа копий мтДНК, что обусловлено митохондриальной дисфункцией ооцитов при длительном использовании АРВТ.

У мужчин с ВИЧ-инфекцией, длительно принимающих АРВТ, повышено число патологических форм сперматозоидов и индекс фрагментации ДНК сперматозоидов. Концентрация сперматозоидов обратно зависит от «стажа» ВИЧ-инфекции, а число их неподвижных форм имеет прямую зависимость с длительностью заболевания.

У ВИЧ-инфицированных мужчин и тяжелой патологией спермы, длительно использующих АРВТ, снижается число копий мтДНК, лишенной делеций, и тотальной мтДНК.

При повышенной ДНК-фрагментации у мужчин с ВИЧ-инфекцией использование методики физиологической селекции сперматозоидов (PICS1) позволяет достичь эффективности программ ВРТ, сопоставимой с серонегативными по ВИЧ пациентами.

Практическая значимость

Разработаны практические рекомендации по обследованию, подготовке и проведению программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией.

У ВИЧ-инфицированных женщин репродуктивного возраста, не планирующих реализацию репродуктивной функции в ближайшее время, обоснована оценка параметров овариального резерва, и при достижении неопределяемой вирусной нагрузки на фоне АРВТ, показана криоконсервация ооцитов/эмбрионов.

У ВИЧ-инфицированных женщин с бесплодием и/или планирующих беременность после оценки параметров овариального резерва, и при достижении неопределяемой вирусной нагрузки на фоне АРВТ, целесообразно не откладывать проведение ВРТ.

У ВИЧ-инфицированных мужчин с тяжелой патологией спермы и высоким индексом фрагментации ДНК сперматозоидов доказана целесообразность проведения программы ЭКО/ICSI с предварительной физиологической селекцией сперматозоидов (PICSI).

У ВИЧ-инфицированных женщин и мужчин репродуктивного возраста в схемах АРВТ целесообразно использование препаратов АРВТ с известной минимальной митохондриальной токсичностью.

Методология и методы исследования

Настоящая работа была выполнена в 1 гинекологическом отделении (заведующий-к.м.н. А.Н. Абубакиров) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор-академик РАН Г.Т. Сухих), где в период с сентября 2016 и по май 2019 гг. обследовано 360 супружеских пар, обратившихся для оценки фертильности и/или проведения программы ЭКО.

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

Оценка иммунного статуса ВИЧ-инфицированных пациентов (на основании заключений инфекциониста): уровень CD4+ лимфоцитов (% и абсолютное число), CD8+ лимфоцитов (% и абсолютное число), иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+).

Определение абсолютного числа копий мтДНК в клетках кумулюса и сперматозоидах проводилось методом ПЦР в реальном времени.

Анализ индекса фрагментации ДНК сперматозоидов осуществлялся методом TUNNEL.

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с использованием программы IPM SPSS Statistics, версия 22.

Положения, выносимые на защиту

1. Женщины с ВИЧ-инфекцией, планирующие реализацию репродуктивной функции в программах ВРТ, принимают АРВТ (медиана 4 года), имеют длительный «стаж» заболевания (медиана 8 лет), 3 субклиническую стадию ВИЧ-инфекции, преимущественно половой путь инфицирования, неопределяемую вирусную нагрузку и «благополучный» иммунный статус. ВИЧ-позитивных женщин характеризует более раннее начало половой жизни, высокая частота ИППП и осложненных форм воспалительных заболеваний придатков матки, большая распространенность аборт, трубной беременности и преобладание вторичного бесплодия.

2. У пациенток с ВИЧ-инфекцией отмечено снижение параметров овариального резерва при использовании длительной АРВТ. Уровень АМГ существенно снижается при продолжительности АРВТ более 1 года, достигая критического уровня при длительности АРВТ более 5 лет.

3. Мужчины с ВИЧ-инфекцией, планирующие проведение ВРТ, имели небольшой «стаж» заболевания (медиана 5 лет), 3 субклиническую стадию заболевания, неопределяемую вирусную нагрузку, и «благополучный» иммунный статус на фоне АРВТ (медиана 2 года). Путь инфицирования неизвестен более чем у половины пациентов, у каждого четвертого - половой путь, у каждого десятого - употребление наркотиков. Длительный «стаж» ВИЧ-инфекции приводит к снижению концентрации сперматозоидов и увеличению числа неподвижных форм. Продолжительная АРВТ усиливает негативное влияние ВИЧ-инфекции, приводя к увеличению числа патологических форм сперматозоидов и индекса фрагментации ДНК-сперматозоидов.

4. Низкая эффективность программ ВРТ у женщин с ВИЧ-инфекцией обусловлена гонадотоксичными эффектами АРВТ и зависит от ее продолжительности. Максимальное истощение мтДНК в клетках кумулюса отмечено при использовании АРВТ от 1 года до 5 лет приема препаратов. Эффективность программ ВРТ у мужчин с ВИЧ-инфекцией сопоставима с серонегативными по ВИЧ пациентами и обусловлена небольшим «стажем» ВИЧ-инфекции и непродолжительной АРВТ. Гонадотоксичный эффект на содержание мтДНК в сперматозоидах отмечен у пациентов с тяжелой патозооспермией и более длительной АРВТ.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе научного направления исследования, разработке цели и задач исследования, аналитической и статистической обработке полученных данных. Автор лично проводил обследование и ведение пациенток на всех этапах лечения бесплодия методом ЭКО и переноса эмбрионов (ПЭ), включая формирование базы данных о пациентах,

а также анализ клинико-лабораторных показателей и научную интерпретацию результатов исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается количеством пациентов включенных в исследование (360 супружеских пар), использованием современных методов исследования, соответствующих цели и задачам. Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1 – го гинекологического отделения (24.06.2019) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (02.12.2019, протокол № 14).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанная на основании результатов исследования тактика по обследованию, подготовке и проведению программы ЭКО у супружеских

пар с ВИЧ-инфекцией внедрена в практическую деятельность 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы обсуждены на международной научно – практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции» (Санкт – Петербург, 2017), 25 ежегодной конференции COGI (Вена, 2017), всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2018), VI Дальневосточной научно – практической конференции «Дискуссионные вопросы акушерства и гинекологии» (Благовещенск, 2018), конференции «Краеугольные аспекты репродуктивной медицины» (Москва, 2018), XXVIII Ежегодной Международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Уфа, 2018), XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), 34 ежегодной конференции ESHRE (Барселона, 2018), 35 ежегодной конференции ESHRE (Вена, 2019), XX юбилейном Всероссийском научно – образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2019).

По теме диссертации опубликовано 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах компьютерного текста, состоит из введения и 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 17 рисунками. Использованная литература включает 15 работ отечественных и 171 - зарубежных авторов.

Глава 1. ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ (обзор литературы)

1.1. Эпидемиология и пути передачи ВИЧ-инфекции

По состоянию на 31 октября 2019 г. кумулятивное количество зарегистрированных случаев выявления ВИЧ-инфекции среди граждан Российской Федерации составило 1 408 264 человек [2]. В настоящее время, женщины составляют примерно половину взрослого населения с ВИЧ-инфекцией и СПИДом во всем мире [23]. Среди мужчин в возрасте 35–39 лет 3,28 % живут с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции [2]. Более 80% ВИЧ-инфицированных как мужчин, так и женщин находятся в репродуктивном возрасте, поэтому для них актуально планирование беременности [3].

Важно отметить, что в большинстве регионов Российской Федерации (РФ) ВИЧ-инфекция вышла за пределы уязвимых групп населения и активно распространяется в общей популяции. Согласно данным НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, в первом полугодии 2019 г., среди впервые выявленных ВИЧ-позитивных, большинство заразились при гетеросексуальных контактах (58,9%), доля инфицированных ВИЧ при употреблении наркотиков снизилась до 37,4%, а 2,6% больных инфицировались при гомосексуальных контактах [2].

Значительно снизился риск передачи ВИЧ от матери ребенку. В развитых странах, частота вертикальной передачи вируса, при использовании АРВТ, составляет менее 1-2%, в сравнении с 14-42% при отсутствии профилактики [3, 24].

Риск передачи ВИЧ-инфекции зависит от уровня вирусной нагрузки в различных биологических жидкостях ВИЧ-инфицированного. Концентрация вируса меняется в зависимости от развития инфекции и в разных тканях

организма пациента с ВИЧ. Биологические жидкости, в которых вирус содержится в максимальной концентрации (или концентрации, достаточной для заражения) - кровь; сперма; вагинальный секрет; грудное молоко; спинномозговая жидкость [25].

По некоторым данным, у женщин, в возрасте от 15 до 24 лет, риск инфицирования ВИЧ выше в 4-7 раз, по сравнению с мужчинами того же возраста [26], и гетеросексуальный путь передачи вируса составляет до 80% всех новых случаев ВИЧ-инфекции у женщин [27]. Несмотря на прием антиретровирусных препаратов, ВИЧ может обнаружиться в цервикальном секрете при достигнутой в результате лечения концентрации в плазме крови РНК ВИЧ <500 копий/мл у 33% пациенток и <50 копий/мл у 25% пациенток [28]. По данным Самариной А.В. (2014г.) современная АРВТ значительно чаще снижает контагиозность: из 327 наблюдаемых пациенток с неопределяемой вирусной нагрузкой у 307 (95,6%) концентрация ВИЧ в цервикальном секрете была ниже порога определения, но у 4,4% все же вирус определялся [29]. Значение таких концентраций для передачи ВИЧ неясно, так как многочисленные эпидемиологические исследования показывают отсутствие передачи ВИЧ от партнера, длительно получающего эффективную АРВТ в реальной практике [30]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что терапия может существенно снижать риск горизонтальной и вертикальной передачи. Учитывая возможность наличия невысоких концентраций вируса в половых секретах, других факторов влияющих на вирусную нагрузку, специалисты все же рекомендуют даже при вполне успешной АРВТ (по критерию снижения вирусной нагрузки в плазме крови) не практиковать незащищенные половые контакты.

По данным К. Мауег и соавт. (1995), вероятность горизонтальной передачи ВИЧ от мужчины к женщине при однократном половом контакте даже при отсутствии АРВТ составляет лишь 0,2—0,8% [31]. Главным прогностическим критерием передачи ВИЧ-инфекции является уровень ВН в

плазме крови и семенной плазме. Доказана эффективность применения АРВТ в снижении уровня РНК ВИЧ в плазме крови и в снижении риска передачи ВИЧ-инфекции [32]. По результатам исследования, проведенного Del Romero и соавт. (2010), в котором приняли участие 648 серодискордантных гетеросексуальных пар, было выявлено, что половой путь является основным путем инфицирования ВИЧ-инфекцией [33]. В парах, где ВИЧ-инфицированный партнер принимал АРВТ не наблюдалось заражения серонегативного партнера, в то время как в паре, где партнер не получал АРВТ трансмиссия ВИЧ-инфекции составила 9,8%. В первой группе зарегистрировано более 7000 незащищенные половых сношений и наступило 47 естественных беременностей, причем вертикальной передачи ВИЧ не было зарегистрировано, в то время как во второй группе, где имели место 11 000 незащищенных половых сношений и наступили 50 естественных беременностей, вертикальная трансмиссия выявлена в 5 случаях. Последние исследования показали, что более высокие дозы АРВТ, связаны с еще более значительным сокращением передачи ВИЧ-инфекции, особенно если ВИЧ - положительный партнер имеет ≥ 550 CD4+ клеток / мл [34, 35].

Впервые, в 1985 г, Stewart и соавт. отметили, что трансмиссия ВИЧ может осуществляться посредством спермы, используемой при внутриматочной инсеминации [36]. ВИЧ содержится в сперме инфицированного мужчины в виде: 1) свободных РНК – частиц; 2) CD4+ лимфоцитах и макрофагах, которые являются основным резервуаром вируса. Первоначально считалось, что ДНК ВИЧ может присутствовать в сперматозоидах и сперматогониальных стволовых клетках, однако, последующие исследования не выявили наличие рецепторов ВИЧ, необходимых для проникновения в клетку, на поверхности сперматозоидов, а именно CD4, CXCR4 и CCR5 [37,38].

У мужчин, не получающих АРВТ, концентрация ВИЧ-1 РНК в сперме в 10 раз меньше, чем в плазме крови. В ответ на АРВТ происходит

параллельное снижение вирусной нагрузки в спермальной плазме и в крови. Тем не менее, у некоторых пациентов спорадически обнаруживается РНК ВИЧ в сперме, несмотря на стабильный или даже неопределяемый уровень ВН в периферической крови. Persico и соавт. (2006) выявили, что 6 из 7 образцов семенной плазмы, в которых обнаружили вирусные РНК ВИЧ, принадлежали пациентам, получавшим АРВТ [39]. У 4-х мужчин был повышен уровень вирусной нагрузки, у 3-х - неопределяемая вирусемия. Эти данные подтвердили результаты предыдущих сообщений о несоответствии концентрации РНК ВИЧ в крови и семенной плазме [39]. Такие результаты авторы интерпретируют по-разному: 1) частицы ВИЧ могут синтезироваться локально в мужском генитальном тракте, что объясняет наличие отдельных популяций ВИЧ в эпидидимисе и простате [40]; 2) местное воспаление может увеличивать уровни РНК ВИЧ в сперме независимо от концентрации вируса в крови [41].

Таким образом, неопределяемый уровень ВН в плазме крови не гарантирует отсутствие РНК ВИЧ в семенной плазме и цервикальном секрете, что свидетельствует в пользу возможности применения ВРТ с целью снижения рисков горизонтальной передачи ВИЧ.

1.2 Репродуктивная функция у женщин с ВИЧ-инфекцией

1.2.1. Гинекологические заболевания и фертильность ВИЧ-инфицированных женщин

Распространенность бесплодия среди ВИЧ-положительных женщин, на 37 % больше, чем у серонегативных по ВИЧ женщин [42]. Прогрессирование заболевания и низкие значения CD4+ лимфоцитов, являются факторами, снижающими частоту наступления беременности и родов. Подобные выводы были получены и в Российском исследовании «Портрет пациента», проведенном в 27 городах с участием 7000 респондентов [43]. ВИЧ-

инфекция может снижать фертильность посредством различных механизмов. Воспалительные заболевания органов малого таза регистрируются среди ВИЧ-положительных пациенток в 10 раз чаще в сравнении с сексуально активными серонегативными по ВИЧ женщинами [44]. Когортные исследования выявили высокую распространенность заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП) у ВИЧ-1-инфицированных женщин, что также может способствовать риску развития трубного-перитонеального фактора бесплодия [45]. Cohen и соавт. (1998) обследовали 133 женщины с хроническим сальпингитом, верифицированным при лапароскопии и обнаружили, что у ВИЧ-инфицированных гнойные воспалительные tuboовариальные образования развиваются вдвое чаще, чем у женщин без ВИЧ-инфекции (33 % и 15 %, ОШ 2,8) [46]. Более тяжелому течению сальпингита у ВИЧ-1-инфицированных женщин может способствовать иммунодефицит, ассоциированный с ВИЧ.

Такие инфекционные заболевания половых путей, как генитальный герпес, вульвовагинальный кандидоз и бактериальный вагиноз у ВИЧ-инфицированных женщин встречались чаще до внедрения в клиническую практику АРВТ [47]. Главными предикторами частоты и тяжести данных заболеваний являются уровни вирусной нагрузки и CD4+ клеток. На сегодняшний день в связи с частым применением антибактериальных препаратов, отмечается повышение заболеваемости вагинальными микозами [48].

У ВИЧ-инфицированных женщин значительно чаще встречается инфекция, вызванная вирусом папилломы человека (ВПЧ) [49]. Характерным для данной группы пациентов является высокая вирусная нагрузка ВПЧ [50], длительная персистенция и большая распространенность онкогенных подтипов ВПЧ [51]. Риск развития инвазивного рака шейки матки у ВИЧ-положительных женщин повышается почти в 9 раз по сравнению с ВИЧ-негативными женщинами [52]. Данное заболевание считается СПИД-

индикатором с 1993г. Его частота в исследованиях Massad L и соавт. (2004) составила около 1,2 случае на 1000 пациенто-лет [53]. Согласно данным Clifford и соавт. (2005) на фоне приема АРВТ заболеваемость инвазивным раком шейки матки не снижается [54].

Воздействие ВИЧ-инфекции на эндокринную систему проявляется высокой частотой развития дисфункции яичников. Такие нарушения менструальной функции как аменорея, олигоменорея и дисменорея, значительно чаще встречается у женщин с ВИЧ-инфекцией [55]. У ВИЧ-положительных женщин стойкая аменорея встречается в 3 раза чаще по сравнению с ВИЧ-негативными пациентками в той же возрастной группе. Sejtin и соавт. (2006) выявили у 60% ВИЧ-инфицированных женщин длительную аменорею в течение года и более [56].

Schoenbaum и соавт. (2005) показали, что ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия связаны с более ранним возрастом наступления менопаузы [57]. Механизмы, лежащие в основе данных результатов неизвестны.

В настоящее время нет однозначных данных о воздействии ВИЧ-инфекции на овариальный резерв [58]. Seifer и соавт. (2007) оценивая маркеры овариального резерва у 187 ВИЧ-инфицированных фертильных женщин, не выявили снижение таких параметров овариального резерва, как уровень антимюллерова гормона (АМГ) и ингибина В [8, 59]. Напротив, Ohl и соавт. (2010) показали, что у ВИЧ-инфицированных женщин уровни ФСГ были на 36% выше, чем в контрольной группе, в то время как уровни ингибина В и АМГ были на 57% и 23% ниже, соответственно [9]. Существует точка зрения, что ВИЧ-инфекция не оказывает прямого воздействия на ооцит, так как рецепторы к ВИЧ отсутствуют на поверхности ооцитов или кумулюсных клеток, однако в фолликулярной жидкости вирус содержится у 100% пациенток с определяемой и у 60% пациенток с неопределяемой вирусной нагрузкой в плазме крови [9,60]. Эндокринные нарушения у женщин с ВИЧ-инфекцией могут быть рассмотрены как

следствие влияния некоторых антиретровирусных препаратов (ингибиторов протеаз (ИП)) на липидный обмен и резистентность к инсулину, что, в свою очередь, может оказать негативное воздействие на фолликулогенез и процесс овуляции [61].

Таким образом, в связи с иммунодефицитом, ассоциированным с ВИЧ, у женщин с ВИЧ-инфекцией повышается частота вторичного бесплодия и ИППП, а также значительно чаще отмечаются нарушения менструального цикла и ранняя менопауза.

1.2.2 Методы реализации репродуктивной функции у женщин с ВИЧ-инфекцией

При условии сохранения фертильности у обоих супругов в парах с ВИЧ-инфицированной женщиной беременность может быть достигнута путем естественного зачатия в перiovуляторные дни, либо посредством собственноручно производимой инсеминацией спермы – аутоинсеминацией [62]. Если у пары возникают проблемы с проведением данной процедуры, может быть применена методика внутриматочной инсеминации (ВМИ).

При исходном подозрении на снижение фертильности у одного или обоих супругов, или в тех случаях, когда при использовании аутоинсеминации беременность не наступает в течение 6 месяцев, следует рассмотреть возможность использования методов ВРТ [21].

В РФ, согласно приказу Минздрава № 107н от 30 августа 2012 г, по эпидемиологическим показаниям ВРТ проводится в дискордантных по ВИЧ парах на фоне приема АРВТ, при достижении неопределяемого уровня РНК ВИЧ в крови в двух последовательных исследованиях, с интервалом не менее 3 месяцев и после получения консультации врача – инфекциониста Центра по профилактике и борьбе со СПИД [22].

Обсуждаются особенности овариальной стимуляции у ВИЧ-положительных женщин. Так, в ряде работ показано, что для стимуляции

суперовуляции ВИЧ-позитивных женщин потребовались более высокие дозы гонадотропинов, что может быть связано со снижением рецептивности яичниковой ткани вследствие негативного воздействия АРВТ [63, 7, 3, 64]. Напротив, Martinet и соавт. (2006) оценивали овариальный ответ на гонадотропную стимуляцию между 27 ВИЧ-позитивными и 77 ВИЧ-негативными женщинами в программе ЭКО и показали, что ВИЧ-инфицированные пациентки, сопоставимые с контрольной группой по возрасту, длительности и типу бесплодия, количеству хирургических вмешательств в анамнезе, ответили одинаково на стимуляцию суперовуляции [65]. Тем не менее, авторы пришли к выводу, что необходимы дальнейшие исследования, включающие большее число пациентов.

Некоторые исследователи полагают, что использование ВМИ и ЭКО для ВИЧ-инфицированных женщин, является более безопасным, чем применение ICSI [66]. Несмотря на то, что на поверхности ооцитов нет рецепторов ВИЧ, у 60% серопозитивных по ВИЧ женщин с неопределяемым уровнем вирусной нагрузки ВИЧ может определяться в фолликулярной жидкости [66]. Другие считают, что удаление клеток лучистого венца и кумулюсных клеток, окружающих яйцеклетку, при проведении процедуры ICSI и повторное промывание ооцитов, способствует предотвращению вирусного загрязнения, что, в свою очередь, снижает риски вертикальной передачи ВИЧ [67, 68].

Данные литературы об эффективности программ ВРТ в серодискордантных парах с ВИЧ-инфекцией у женщины немногочисленны и противоречивы. Так в 5 из 6 исследований продемонстрирована более низкая частота наступления беременности у ВИЧ-инфицированных женщин в программах ЭКО по сравнению с контрольной группой [65, 3, 14]. Однако только в двух из них зарегистрировано статистически значимое снижение частоты наступления беременности [68, 69]. В остальных исследованиях частота клинической беременности у ВИЧ-инфицированных женщин была

ниже, но статистически не значима [7]. Тем не менее, нельзя не учесть результаты исследований Coll и соавт. (2006), Stora и соавт. (2016) показавшие, что у ВИЧ-положительных женщин при использовании собственных ооцитов наблюдалось снижение частоты наступления беременности, тогда как при использовании ооцитов донора этот показатель был сопоставим с эффективностью программ ЭКО у женщин без ВИЧ-инфекции [15, 7].

Не стоит забывать, у ВИЧ-инфицированных женщин при проведении программ ЭКО следует проводить перенос 1ого эмбриона с целью достижения одноплодной беременности, поскольку осложнения, ассоциируемые с многоплодием, увеличивают риск вертикальной передачи ВИЧ [49, 67, 68].

Таким образом, у женщин с ВИЧ-инфекцией с целью реализации репродуктивной функции предпочтительно использование методов ВРТ. Однако остаются неизученными причины низкой эффективности программы ЭКО в данной группе пациенток.

1.3 Репродуктивная функция у мужчин с ВИЧ-инфекцией

1.3.1. Фертильность ВИЧ-инфицированных мужчин

Несмотря на то, что исследователи не выявили наличие рецепторов ВИЧ на поверхности сперматозоидов, необходимых для проникновения в клетку, а именно CD4, CXCR4 и CCR5 [70], остается много вопросов о влиянии ВИЧ-инфекции на фертильность мужчин. Согласно исследованиям случай-контроль, проведенным в 2007 и 2011 году, целью которых было оценить воздействие ВИЧ на параметры спермы, в основной группе статистически значимо ухудшались такие показатели, как объем, концентрация и общая подвижность сперматозоидов по сравнению с ВИЧ – негативными мужчинами [71, 72, 73]. Однако, данные результаты

сомнительны, если учесть тот факт, что группа ВИЧ-инфицированных мужчин включала пациентов принимавших АРВТ, соответственно, остается неясным, что именно повлияло на параметры спермограммы: сама ВИЧ-инфекция или АРВТ? В ряде других исследований не было выявлено никаких существенных различий в образцах спермы ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных мужчин [74, 75, 76], за исключением тех случаев, когда резко ухудшалось общее состояние пациентов по причине прогрессирующей иммуносупрессии [77]. E.van Leeuwen в 2004 г. провела продольное исследование, сравнивая параметры сперматогенеза у ВИЧ-инфицированных на протяжении 2-х лет [75]. Ни один из параметров статистически значимо не изменился, однако прогрессивная подвижность сперматозоидов была изначально низкой и сохранялась таковой на протяжении всего исследования у пациентов с уровнем CD4+ лимфоцитов меньше 200 клеток/мм³.

Роль АРВТ в развитии изменений показателей спермы остается до конца неясной. Согласно данным Nicoroullos и соавт. (2011), у ВИЧ-инфицированных мужчин, использующих АРВТ наблюдается снижение концентрации и подвижности сперматозоидов, а также увеличение количества их патологических форм [18]. Robbins и соавт. (2001) напротив, при оценке качества спермы у 26 мужчин не выявили отрицательного воздействия АРВТ на параметры спермограммы [16]. Более того, существует мнение, что наличие вирусной нагрузки оказывает неблагоприятное воздействие на качество спермы, поэтому антиретровирусное лечение улучшает качество спермы у мужчин с длительным анамнезом и клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции [77].

Одним из возможных механизмов негативного влияния АРВТ, и, в частности, НИОТ, на качество спермы, могут быть изменения метаболизма сперматозоидов [78, 71, 72] в связи с митохондриальной токсичностью препаратов [79, 80, 81]. В работе Hulgan и соавт. (2003) показано, что неблагоприятное воздействие АРВТ связано с развитием оксидативного

стресса [84]. Образование активных форм кислорода (АФК) увеличивает перекисное окисление липидов и приводит к повреждению хроматина сперматозоидов и нарушению целостности ДНК сперматозоидов [82, 83]. Помимо этого, АФК повреждают мембрану сперматозоидов, в результате чего снижается их подвижность и способность оплодотворять яйцеклетку [84, 85].

В последние годы большое внимание уделяется изучению процента ДНК – фрагментации сперматозоидов, как основной причине мужского бесплодия. Известно, что нарушение целостности ДНК сперматозоидов оказывает негативное влияние на нарушение фертилизации, плохое качество эмбрионов, увеличение частоты самопроизвольных аборт и снижение частоты беременности при естественном зачатии или в программах ВРТ [86, 87, 88]. По данным Savasi и соавт. (2018) индекс фрагментации ДНК сперматозоидов возрастает у ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих АРВТ, по сравнению с пациентами, не принимающими терапию [88].

Таким образом, на сегодняшний день нет однозначных данных о влиянии ВИЧ-инфекции и АРВТ на показатели спермограммы у мужчин с ВИЧ-инфекцией.

1.3.2 Обработка спермы у мужчин с ВИЧ-инфекцией

Для предотвращения передачи ВИЧ – инфекции в серодискордантных парах с ВИЧ-положительным партнером, в 1992 г Sempirini et al., разработали метод обработки спермы "gradient/swim up", основанный на отделении инфицированных CD4+, макрофагов и свободных ВИЧ-частиц от подвижных сперматозоидов. Образцы спермы получают посредством мастурбации после 3-5 дней сексуального воздержания [89].

Метод обработки спермы "gradient/swim up", представляет собой трехступенчатую процедуру. Politch и соавт. (2004) продемонстрировали,

что после данной процедуры около 5 процентов активных фракций сперматозоидов остаются ВИЧ-позитивными, поэтому разработали метод - "двойной трубный градиент", который использует такой же подход, однако, градиент формируется внутри трубки [90]. Этот метод является более легким и быстрым в исполнении, а также более надежным для элиминации ВИЧ по сравнению со стандартным.

Hanabusa и соавт. (2000), считают, что обработка спермы с помощью центрифугирования является недостаточной для удаления РНК ВИЧ из спермы и должна сочетаться с дополнительной обработкой на этапе разделения сперматозоидов [91]. В 2005 г Loskutoff разработал новый метод [92]. Он выдвинул гипотезу, что важным этапом является удаление слоев верхнего градиента плотности (включающих потенциально инфицированную семенную плазму) путем аспирации. Поэтому он изготовил новую полипропиленовую трубку, которая позволяет не только получить доступ к очищенным фракциям сперматозоидов без какого-либо риска их контаминации верхними слоями (потенциально инфицированными), но и облегчает наложение градиентов плотности.

С 1992 г было разработано множество различных методик обработки спермы, большинство из которых основывалось на классическом методе [93, 94, 95, 96]. Однако, все исследователи едины во мнении, что невозможно гарантировать полное отсутствие вирусных частиц в обработанной сперме. Так частота выявляемости РНК ВИЧ методом ПЦР, по разным данным, колеблется от 4 до 10 % при двухградиентном (классическом) методе обработки спермы, и составляет 1,86 % при трехградиентном способе обработки спермы [97, 98].

Таким образом, несмотря на большое разнообразие и постоянное совершенствование методик по обработке спермы, не существует универсального метода, а, следовательно, нет гарантий в полном исключении РНК ВИЧ в обработанной сперме. Поэтому, даже тщательно обработанный

материал целесообразно тестировать на наличие ВИЧ молекулярными методами (РНК ПЦР).

1.3.3 Методы реализации репродуктивной функции у мужчин с ВИЧ-инфекцией

Большое влияние на консультирование ВИЧ-дискордантных пар, желающих иметь детей, оказали опубликованные в январе 2008 года рекомендации Федеральной комиссии по вопросам СПИДа [99]. В заявлении Швейцарской комиссии по вопросам СПИДа (ЕКАФ) утверждалось, что ВИЧ-положительные мужчины не передают ВИЧ при половых контактах при следующих условиях: 1) ВИЧ-инфицированный пациент получает АРВТ; 2) вирусная нагрузка сохраняется на неопределяемом уровне на протяжении как минимум 6 месяцев (подавление виремии); 3) отсутствуют другие инфекции, передаваемые половым путем. Заявление ЕКАФ не исключает остаточного риска передачи инфекции, однако он является настолько небольшим, что им можно пренебречь. Основой для данного вывода послужили результаты долгосрочных исследований по гетеросексуальным серодискордантным парам, желающим иметь детей [100]. В ходе этих исследований не было получено сообщений о передаче ВИЧ-инфекции от партнера, получающего АРВТ или имеющего вирусную нагрузку на фоне отсутствия лечения менее 1000 копий/мл. Данная точка зрения подверглась критике со стороны Wilson и соавт. (2008), так как риск передачи ВИЧ-инфекции в гетеросексуальных парах при применении АРВТ является низким, но не исключен полностью [101]. Vernazza и соавт. (2005) опубликовали протокол химиопрофилактики (PrEP) для минимизации риска ВИЧ-инфицирования серонегативного партнера, включающий следующие рекомендации: 1) АРВТ в непрерывном режиме; 2) вирусная нагрузка ниже уровня ее индикации с помощью ультрачувствительной полимеразной цепной реакции (ПЦР), т.е. при концентрации РНК ВИЧ в плазме крови <10 копий/мл; 3) нормальные

показатели спермограммы (нормозооспермия); 4) отсутствие симптомов половых инфекций, незащищенных половых контактов с другими партнерами; 4) использование теста на овуляцию; 5) предварительная химиопрофилактика тенофовиром 300 мг (первая доза на пике ЛГ, вторая доза через 24 часа); 6) после шести неудачных попыток, необходима оценка фертильности [102]. Не было зарегистрировано ни одного случая заражения ВИЧ-инфекцией. Предварительная химиопрофилактика и своевременное лечение, являются потенциальной альтернативой методам ВРТ для фертильных пар.

Применение программ ВРТ в серодискордантных по ВИЧ супружеских парах показано в следующих случаях: 1) при исходном снижении фертильности у одного или обоих супругов [68]; 2) после шести неудачных попыток «естественного зачатия» в овуляторные дни [100, 21]; 3) при исходном желании ВИЧ-отрицательного партнера с целью минимизации рисков горизонтальной передачи ВИЧ [6]. Не стоит забывать, что большинство мужчин, желающих реализовать репродуктивную функцию с установленным диагнозом ВИЧ, находятся в возрасте 35-40 лет и состоят в браке с супругами аналогичного возраста [95]. В данных парах снижается вероятность наступления «естественной» беременности в силу возраста ВИЧ-отрицательных женщин, что и содействует изначальному выбору программ ВРТ. Большинство специалистов отвергают идею «естественного зачатия» в овуляторные дни и предпочитают сразу применять методы ВРТ с обработанной спермой, включающие в зависимости от клинической ситуации, внутриматочную инсеминацию (ВМИ) или программу ЭКО с применением дополнительной методики интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI) [101, 102].

Впервые программа ВРТ, а именно ВМИ, была предложена серодискордантным парам с ВИЧ-инфицированным мужчиной в Италии, в 1992 года [89]. В Европе и Великобритании имеется огромный опыт работы с

ВМИ и ЭКО у серодискордантных пар с ВИЧ-инфекцией [103]. Однако в последние годы ICSI является единственным рекомендуемым методом в некоторых странах, таких, как США. Авторы этой рекомендации указывают на то, что преимущество ICSI перед ВМИ состоит в уменьшении вероятности инфицирования, поскольку в контакт с ооцитом входит единственный сперматозоид, тем более достоверных сведений о возможности внутриспермальной локализации вируса нет [95]. Более того, частота наступления беременности в программах ЭКО/ICSI выше в 3 раза, чем при использовании ВМИ (40-45% против 10-13%) [104]. Авторы также считают, что нет необходимости в большом количестве сперматозоидов, т.к. после обработки их концентрация снижается до 5% от исходной, что недостаточно для использования при ВМИ [94]. Несмотря на то, что в ряде стран запрещено применение ICSI, что связано с теоритическими рисками инфицирования эмбриона при оплодотворении замороженным сперматозоидом, на сегодняшний день не зарегистрировано ни одного случая диагональной передачи ВИЧ (т.е. от отца к ребенку) в независимости от уровня ВН при использовании данной методики, что сделало ее «золотым стандартом» помощи пациентам с ВИЧ [105, 106, 107].

При высоких уровнях ДНК – фрагментации сперматозоидов в программах ЭКО в ряде случаев применяют методику дополнительного отбора сперматозоидов - PICSИ (physiological intracytoplasmic sperm injection) [108]. Согласно данным Erberelli и соавт. (2017), в циклах ЭКО/ICSI, в которых использовалась методика PICSИ, частота наступления беременности повышалась в 5 раз по сравнению с циклами, где сперма была отобрано только по морфологическим характеристикам [108]. Чашка для селекции сперматозоидов PICSИ используется для отбора зрелых сперматозоидов, предназначенных для ICSI, на основе их способности связывания с гиалуроновой кислотой. На головке зрелого сперматозоида, характеризующегося высокой целостностью цепочки ДНК, расположен

гиалурон-специфичный рецептор, обеспечивающий специфическое связывание его с гиалуроновой кислотой, которая является основным компонентом клеток кумулюса, окружающих ооцит. На поверхности чашки PCSI имеется три микроточки с гиалуроновой кислотой, с которыми связываются зрелые сперматозоиды, таким образом, имитируя физиологические условия [109].

Для анализа эффективности и безопасности методов ВРТ в серодискордантных парах, где мужчина ВИЧ-инфицирован проведены систематические обзоры [106, 110, 6]. Полученные данные весьма неоднозначны, так частота наступления беременности в программах ВРТ варьирует от 22 % до 53,6 % [22]. Мело и соавт. (2008) провели исследование, целью которого явилась оценка морфологических особенностей эмбрионов в программе ЭКО/ICSI с ВИЧ-положительным мужчиной, в сравнении с серонегативными по ВИЧ мужчинами группы контроля с трубно-перитонеальным фактором бесплодия [111]. Полученные результаты продемонстрировали, что частота оплодотворения и дробления эмбрионов не различались в обеих группах. На 5-е сутки культивирования эмбрионы, полученные в серодискордантных по ВИЧ парах, чаще останавливались в развитии. Однако не была выявлена разница в количестве криоконсервированных и перенесенных эмбрионов, в частоте наступления клинической беременности и имплантации.

За время наблюдений не зарегистрировано ни одного случая сероконверсии в программах ВРТ с использованием метода обработки спермы. Однако рандомизированные контролируемые исследования с целью оценки эффективности использованием обработанной спермы до сих пор не проведены, по причине существующего риска передачи ВИЧ-инфекции.

Таким образом, применение ВРТ в серодискордантных супружеских парах с ВИЧ-положительным мужчиной становится необходимым, главным образом, по причине роста бесплодия в данной группе пациентов. Однако не

изучены в полной мере эффективность программ, метод оплодотворения, а также необходимость проведения PCSI.

1.4 Реализация репродуктивной функции в ВИЧ - конкордантных парах

Согласно данным ряда авторов, в парах, где оба партнера ВИЧ – положительны (конкордантных), «естественное зачатие» в овуляторные дни возможно при обязательном использовании АРВТ, неопределяемом уровне вирусной нагрузки в плазме крови и инфицировании одним штаммом ВИЧ. Однако, лабораторные методы по определению штаммов ВИЧ несовершенны ввиду своей трудоемкости и необходимости в высокой квалификации персонала [112]. Более того, известно, что при неопределяемом уровне вирусной нагрузки в плазме крови ВИЧ обнаруживается в других биологических жидкостях обоих партнеров [112, 113]. Учитывая существующие риски, реализацию репродуктивной функции в конкордантных супружеских парах с ВИЧ-инфекцией, следует осуществлять посредством использования методов ВРТ вне зависимости от показателей спермы у мужчины [22]. Такой подход оправдан, в первую очередь, для исключения суперинфицирования обоих супругов. Суперинфекция – процесс, в результате которого клетка, изначально зараженная одним вирусом, ко-инфицируется другим штаммом вируса, что может привести к резистентности антиретровирусной терапии, и, как результат, к более тяжелому течению инфекции [114].

Таким образом, в конкордантных по ВИЧ парах, для безопасной реализации репродуктивной функции и с целью снижения рисков суперинфекции, может быть рекомендовано использование программ ВРТ.

1.5 Митохондриальная ДНК гамет

Во всех эукариотических клетках присутствуют митохондрии – принципиально важные органеллы, играющие ключевую роль в различных биохимических процессах, включая аэробное дыхание и продуцирование энергии. Предполагается, что митохондрии являются эволюционными реликтами древних бактерий-симбионтов [115]. Современные митохондрии — клеточные структуры размером от 0.5 до 10 мкм, обычно вытянутой бобовидной формы. От остального содержимого клетки они отделены двумя мембранами, внешней и внутренней, между которыми имеется пространство. Структуру внешней мембраны полностью кодируют ядерные гены, а структуру внутренней определяет также и ДНК самих митохондрий (мтДНК). Внешняя мембрана митохондрии гладкая, внутренняя же образует выпячивания, называемые кристами. Внутри митохондрий находится матрикс — мелкодисперсное вещество, где располагаются мтДНК, рибосомы, на которых синтезируются белки, а также ферменты некоторых метаболических путей.

Как уже было отмечено, митохондрии содержат свою собственную ДНК, в которой закодирована информация о структуре основных ферментов дыхательной цепи. Весьма оригинальную гипотезу, объясняющую наличие мтДНК, выдвинул американский биохимик Wallace (2005) [116]. Он предположил, что мтДНК — это своего рода сенсор, необходимый клетке для выживания в меняющихся условиях окружающей среды. Поскольку в мтДНК заложена информация об основных ферментах дыхательной цепи, изменение ее структуры отражается на структуре комплексов этой цепи и, соответственно, на количестве вырабатываемой энергии [117].

Основной функцией митохондрий является дыхание и продукция аденозинтрифосфата (АТФ), универсального переносчика энергии в клетке путем окислительного фосфорилирования. Кроме того, биологическими функциями митохондрий являются регуляция апоптоза, цитозольной концентрации кальция, а также синтеза железосерных кластеров – белковых

кофакторов, играющих важную роль в процессе окислительно-восстановительных реакций в клетке.

Митохондрии являются первичным источником эндогенных активных форм кислорода и местом протекания важнейших биохимических процессов в клетке – цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса) и фрагмента орнитинового цикла. Окислительное фосфорилирование требует скоординированной работы пяти ферментных комплексов, расположенных на внутренней мембране митохондрий. Электроны, полученные при окислении жирных кислот или глюкозы, переходят от одного энзимного комплекса к другому, создавая, таким образом, электрохимический градиент для протонов на внутренней мембране, который запускает механизм синтеза АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) с помощью АТФ-синтазы.

На сегодняшний день данные различных исследований противоречивы, и не существует общепринятых нормативов количества копий мтДНК в ооцитах человека. В различных исследованиях число копий мтДНК в ооцитах человека широко варьирует не только между различными пациентками, но и между отдельными ооцитами в одной когорте и оценивается в диапазоне между 10^4 и 10^7 числом копий в одной клетке [117, 118, 119, 120, 121]. Предполагается, что в ооцитах человека содержится 2 молекулы мтДНК, хотя их непосредственное количество никто не изучал, поэтому имеющиеся данные о числе копий мтДНК в ооцитах являются спорными.

Митохондрии ооцитов отличаются от митохондрий соматических клеток не только меньшим размером и сферической формой, но и тем, что репликация и транскрипция в зрелых ооцитах приостанавливается, и процессы вновь запускаются только после оплодотворения [122, 123]. На ранних стадиях эмбриогенеза репликация мтДНК не осуществляется, так как транскрипция митохондриального генома запускается с активацией генома эмбриона примерно через 72 часа [124]. Из этого следует, что число молекул

мтДНК в бластомерах уменьшается с каждым циклом деления.

Однако, в процессе оогенеза, число копий мтДНК увеличивается примерно в 50 раз соответственно объему цитоплазмы от стадии первичной зародышевой клетки до стадии примордиального фолликула [125, 126, 127].

В литературе активно обсуждается связь между числом копий мтДНК, продукцией АТФ митохондриями и качеством ооцитов, а также потенциалом развития эмбрионов в программах ВРТ. Известно, что ооциты с более высокой концентрацией АТФ обладают большим потенциалом к успешному эмбриогенезу и имплантации, в то время как ооциты с более низким числом копий мтДНК, имеют более низкую частоту оплодотворения [128].

Несмотря на постоянное совершенствование критериев отбора эмбрионов в программах ВРТ частота наступления клинической беременности остается низкой [129]. Оплодотворение, деление и нормальное развитие эмбрионов во многом зависит от качества ооцита. Однако ооциты сами по себе не могут быть использованы для прогнозирования исходов программ ВРТ из-за этических соображений.

МтДНК наследуется только по материнской линии, хотя в литературе обсуждался единичный клинический случай передачи мтДНК от отца к ребенку [130, 131], но в других исследованиях не было доказано наследование мтДНК по отцовской линии [132, 133].

Главным источником энергии для осуществления двигательной активности в сперматозоидах млекопитающих также являются митохондрии. Известно, что зрелый сперматозоид человека содержит приблизительно 50–75 митохондрий, в каждой из которых содержится одна копия мтДНК [134]. Основными источниками АТФ в сперматозоидах являются митохондриальное окислительное фосфорилирование и анаэробный гликолиз. В человеческих сперматозоидах в отличие от сперматозоидов быков и мышей, анаэробный гликолиз играет более значимую роль, чем окислительное фосфорилирование [135]. Тем не менее, сперматозоиды могут

оставаться подвижными и в средах с низким содержанием глюкозы за счет окислительного фосфорилирования [136, 137].

Во время сперматогенеза митохондрии сперматозоидов претерпевают резкие морфологические изменения и субклеточную реорганизацию [138]. Для поддержания нормального количества митохондрий в сперматозоидах, репликация мтДНК и субклеточная организация должны точно контролироваться в процессе сперматогенеза.

Согласно последним исследованиям выявлено, что относительное содержание мтДНК значительно снижается в сперме мужчин с олиго- и астенозооспермией [139, 140, 141].

Таким образом, митохондрии не только играют ключевую роль в обеспечении жизнедеятельности, как соматических клеток, так и гамет, но и обеспечивают высокий потенциал эмбриогенеза и имплантации.

1.5.1 Роль кумулюсных клеток в компетентности ооцитов

Кумулюсные клетки, окружающие ооцит, играют ключевую роль в росте и созревании ооцитов, осуществляя метаболизм белков, липидов и углеводов, тем самым обеспечивая энергетический баланс, необходимый для мейоза, оплодотворения яйцеклетки и раннего эмбриогенеза [142]. Ключевую роль в энергетическом метаболизме ооцитов играют митохондрии кумулюсных клеток. В исследовании Desquiret и соавт. (2017) было продемонстрировано, что мтДНК кумулюсных клеток за счет создания большого пула мтДНК способствует нормальному развитию яйцеклетки [143]. В исследовании Pawlak и соавт. (2015) было обнаружено, что количество копий мтДНК в ооцитах свиней коррелирует с количеством копий мтДНК в клетках кумулюса [144,145]. Впоследствии количественная оценка мтДНК кумулюсных клеток была предложена в качестве биомаркера жизнеспособности эмбриона [146]. Однако, Desquiret и соавт. (2017) было продемонстрировано, что количество копий мтДНК кумулюсных клеток

связано не только с качеством эмбрионов, но также зависит от индивидуальных характеристик пациента, что делает невозможным установить общее пороговое значение для всех пациентов [143].

Таким образом, анализ копийности мтДНК кумулюсных клеток может быть использован как один из критериев компетентности ооцитов.

1.5.2 Митохондриальная токсичность антиретровирусной терапии

Внедрение АРВТ позволило существенно улучшить не только качество, но и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов. Хотя большинство пациентов хорошо переносят АРВТ, принимая терапию годами, следует понимать, что препараты, особенно «старой» генерации обладают токсичностью и хорошо изученными побочными эффектами, частый из которых – липодистрофический синдром. Главный механизм в патогенезе вызываемых нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (НИОТ) метаболических нарушений и патологического перераспределения жировой клетчатки — токсическое действие этих препаратов на митохондрии [146].

НИОТ представляют собой пролекарства, которые активируются после попадания в клетку за счет внутриклеточного фосфорилирования [147]. НИОТ-трифосфаты, ингибируя активность фермента-мишени — обратной транскриптазы ВИЧ, нарушают процесс репликации вируса. Однако, данная группа препаратов также способна подавлять гамма-полимеразу человека, необходимую для репликации мтДНК, что приводит к снижению концентрации мтДНК. Поэтому подавление гамма-полимеразы препаратами группы НИОТ приводит к уменьшению концентрации (истощению, деплеции) мтДНК [148]. Роль мтДНК состоит в том, что она кодирует субъединицы ферментов дыхательной цепи, располагающихся на внутренней мембране митохондрий. Таким образом, снижая концентрацию мтДНК, НИОТ приводят к нарушению функции дыхательной цепи, нормальное функционирование которой — обязательное условие многих метаболических

процессов. Дыхательная цепь обеспечивает синтез АТФ (главного «энергоносителя» клетки) и утилизацию восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и восстановленного флавинадениндинуклеотида (ФАДН) - конечных продуктов окисления жирных кислот. Также на внутренней мембране митохондрий располагается фермент дигидрооротатдегидрогеназа (ДГОДГ), необходимый для синтеза пиримидиновых нуклеозидов ДНК [149].

Токсическое повреждение митохондрий развивается медленно и напрямую зависит от концентрации токсического вещества. Изменения метаболизма митохондрий наблюдаются только после уменьшения концентрации мтДНК ниже определенной пороговой величины, индивидуальной для каждого пациента. Однако чаще всего митохондриальная токсичность развивается при длительном применении НИОТ, особенно аналогов тимидина, и ингибиторов протеазы ВИЧ. В связи с этим в первые месяцы приема АРВТ симптомы повреждения митохондрий обычно не появляются. Важно отметить, что препараты группы НИОТ существенно отличаются друг от друга по выраженности токсического действия на митохондрии. Например, абакавир и ламивудин значительно менее токсичны, чем зидовудин, ставудин или диданозин, а зальцитабин, ввиду высокой токсичности, вовсе перестали применять [150]. По этой же причине ВОЗ рекомендует отказаться от применения ставудина. У более современных НИОТ, рекомендованных в первой линии терапии тенофовира, абакавира, эмтрицитабина, ламивудина проявления митохондриальной токсичности минимальны. Митохондриальная токсичность тканеспецифична. Это объясняется тем, что захват неактивной формы НИОТ клетками и их митохондриями, а также переход препарата в активную форму в разных типах клеток различается. Снижение уровня мтДНК клинически может проявляться поражением одного или нескольких органов-мишеней. С целью изучения этой взаимосвязи за последние 25 лет было проведено большое

количество исследований. В литературе описаны следующие клинические проявления токсического повреждения митохондрий при использовании АРВТ: жировая дистрофия печени; печеночная недостаточность и лактоацидоз; гиперлактатемия; миопатия; полинейропатия; липодистрофия; снижение пролиферации лимфоцитов, чаще на фоне иммуносупрессии; отчасти синдром Фанкони и другие нарушения функции почек; остеомалация [151, 152, 153, 154]. При применении зидовудина во время беременности наблюдается снижение концентраций мтДНК в плаценте, а также в пуповинной крови новорожденных [155].

На данный момент, в литературе имеются лишь единичные данные по оценке митохондриального потенциала ооцитов ВИЧ-положительных женщин, получающих АРВТ. Обсуждается влияние АРВТ на качество ооцитов и их митохондриальным потенциал. Lopez и соавт. (2008) впервые выявили, что в ооцитах ВИЧ-инфицированных женщин с бесплодием, принимающих комбинированную АРВТ в 32% случаев наблюдалось истощение мтДНК по сравнению с контролем [14]. По данным Vostan и соавт. (2010) нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (НИОТ) ставудин индуцирует деплецию мтДНК в ооцитах мышей, что может нарушать их способность к оплодотворению и влияет на жизнеспособность эмбрионов [156].

Все чаще появляются сообщения, что прием АРВТ, в частности препаратов нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ), способствует нарушению целостности ДНК сперматозоидов, а также приводит к снижению количества мтДНК [20, 80, 81, 88]. Теоретически, проникновение в сперматозоиды препаратов группы НИОТ, могут обуславливать митохондриальную токсичность сперматозоидов, что, в свою очередь, приводит к снижению их подвижности. Можно выделить несколько основных механизмов возникновения митохондриальной токсичности [20]: 1) прямое ингибирование митохондриальной ДНК-полимеразы; 2) влияние

на цикл Кребса и β -окисление жирных кислот; 3) влияние на эффективность карнитин-зависимого транспорта жирных кислот через мембрану митохондрий; 4) возможное влияние на АМФ-активируемую протеинкиназу, контролирующую энергетический баланс клетки. В настоящее время прямое ингибирование митохондриальной ДНК-полимеразы подробно изучено. Оно характерно для зальцитабина, диданозина, ставудина и, в гораздо меньшей степени, для ламивудина. Эти препараты, вернее их трифосфорилированные формы, терминируют синтез митохондриальной ДНК и ингибируют эксцизионную репарацию дефектов, возникающих в ее структуре [157]. В результате число митохондрий в клетках уменьшается, при этом ДНК мутирует, делеции и большие вставки практически полностью нарушают экспрессию митохондриальных генов. Токсический эффект, обусловленный этим процессом, не зависит от ткани и может быть устранен только отменой препаратов.

Данные литературы, посвященные оценке митохондриального потенциала сперматозоидов немногочисленны и весьма противоречивы. Так, согласно исследованиям Ravili и соавт. (2010), препараты группы НИОТ снижают число копий мтДНК в сперматозоидах [158]. Однако, по данным Van Leewen L и соавт. (2016) количество копий мтДНК в сперматозоидах ВИЧ - инфицированных мужчин, длительно получающих АРВТ, повышается по сравнению с ВИЧ-инфицированными, никогда не принимавшими АРВТ и серонегативными мужчинами [159].

Важно отметить, что противоречивые и неоднозначные данные о влиянии АРВТ на митохондриальный потенциал гамет пациентов с ВИЧ-инфекцией создают предпосылки для проведения дополнительных исследований.

Таким образом, на сегодняшний день отсутствуют однозначные данные о влиянии ВИЧ-инфекции и АРВТ на фертильность, овариальный резерв, качество ооцитов и сперматозоидов и их митохондриальный потенциал.

Остается дискуссионным вопрос относительно исходов программ ВРТ у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения этой проблемы, обуславливая необходимость разработки персонифицированного подхода к реализации репродуктивной функции у супружеских пар с ВИЧ-положительным партнером.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Настоящая работа выполнена в 1 гинекологическом отделении (заведующий - к.м.н. А.Н. Абубакиров) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих), где в период с сентября 2016 и по май 2019 гг. обследовано 360 супружеских пар, обратившихся для оценки фертильности и/или проведения программы ЭКО.

Основную группу исследования составили 189 супружеских пар с ВИЧ-инфекцией. Группу контроля - 171 пара без ВИЧ-инфекции. В основной группе проведено 149 «свежих» циклов ЭКО/ICSI и 103 криопротокола, в контрольной группе - 199 и 95 циклов, соответственно.

Для решения задачи 1 (изучить клинико-anamнестические данные и лабораторные параметры супружеских пар с ВИЧ-инфекцией, обратившихся для оценки фертильности и/или проведения программы ЭКО) были включены 360 супружеские пары:

Группа 1а (n= 95) – супружеские пары с ВИЧ-инфекцией у женщины

Группа 1б (n= 96) – супружеские пары без ВИЧ-инфекции

Группа 2а (n= 94) – супружеские пары с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Группа 2б (n=75) – супружеские пары без ВИЧ-инфекции

Для решения задач 3,4,5 пациенты с коинфекцией хроническим вирусным гепатитом С были исключены из исследования.

Для решения задач 4,5 конкордантные по ВИЧ супружеские пары были исключены из исследования.

Для решения задачи 2 (У ВИЧ – позитивных женщин оценить

влияние длительности и продолжительности антиретровирусной терапии на состояние овариального резерва) были включены 191 супружеская пара:

Группа 1 (n= 95) – пациентки с ВИЧ-инфекцией

Группа 2 (n=96) – пациентки без ВИЧ-инфекции

Для решения задачи 3 (У ВИЧ – позитивных мужчин оценить влияние длительности и продолжительности антиретровирусной терапии на параметры эякулята) были включены 138 супружеских пар:

Группа 1 (n= 63) – супружеские пары с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Группа 2 (n=75) – супружеские пары без ВИЧ-инфекции

Для решения задачи 4 (Оценить параметры стимулированного цикла, эмбриологический этап и эффективность программы ЭКО в зависимости от ВИЧ-статуса супружеской пары) были включены 304 супружеских пар:

Группа 1а (n= 70) – супружеские пары с ВИЧ-инфекцией у женщины

Группа 1б (n=96) – супружеские пары без ВИЧ-инфекции

1а группе проведено 89 «свежих» цикла и 72 криопротокола, в 1б – 113 «свежих» циклов и 56 криопротокола, соответственно.

Группа 2а (n=63) – супружеские пары с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Группа 2б (n=75) – супружеские пары без ВИЧ-инфекции

Во 2а группе проведено 60 «свежих» циклов ЭКО/ICSI и 31 криопротокол, во 2б группе - 86 и 39 циклов, соответственно.

Для решения задачи 5 (Изучить влияние антиретровирусной терапии на качество гамет на основании оценки копийности митохондриальной ДНК в клетках кумулюса и сперматозоидах) были включены 212 пациентов:

Группа 1а (n=78) – образцы клеток кумулюса от 24 женщин с ВИЧ-инфекцией

Группа 1б (n=111) – образцы клеток кумулюса от 34 женщин без ВИЧ-инфекции

Группа 2а (n=58) – образцы спермы мужчин с ВИЧ-инфекцией

Группа 2б (n=96) – образцы спермы мужчин без ВИЧ-инфекции

Критерии включения в основную группу:

1. Пациенты с ВИЧ-инфекцией – 3 субклиническая стадия заболевания, 4А, 4Б, 4В стадии в фазе ремиссии не менее 6 месяцев
2. Прием антиретровирусной терапии не менее 6 месяцев, неопределяемый уровень РНК ВИЧ в 2-х последовательных исследованиях, проеденных с интервалом не менее 3 мес.
3. Заключение инфекциониста о возможности проведения программ ВРТ.
4. Информированное согласие на участие в исследованиях.

Критерии невключения:

Наличие противопоказаний для проведения программ ВРТ

Критерии исключения: для решения задач 3,4,5 пациенты с коинфекцией хроническим вирусным гепатитом С.

Критерии включения в контрольную группу:

1. ВИЧ – отрицательный статус обоих супругов
2. Оплодотворение методом ICSI
3. Перенос 1 эмбриона (группа контроля для женщин с ВИЧ-инфекцией)

Все пациентки, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие в настоящем исследовании).

Дизайн исследования отражен на рисунке 1.

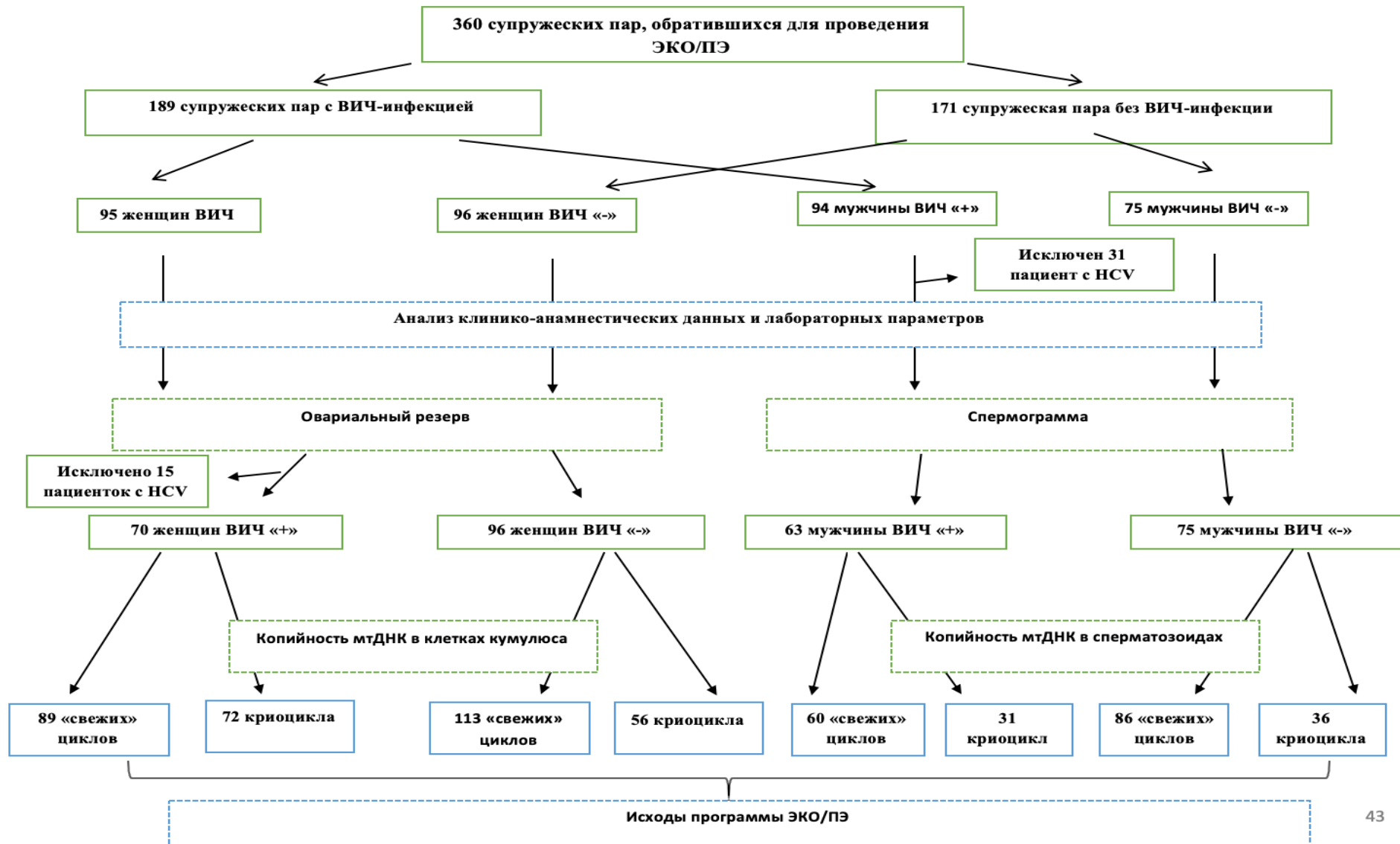


Рисунок 1. Дизайн исследования

2.2 Методы исследования

2.2.1 Общеклинические методы исследования

При первичной консультации производили сбор анамнестических данных у пациентов, который включал возраст, наличие профессиональных вредностей, курения и других «вредных привычек», семейное положение. При первичном осмотре измеряли рост, вес пациентов, оценивали ИМТ, артериальное давление (АД) и пульс. При сборе анамнеза обращали внимание на наследственность, аллергологический анамнез, перенесенные инфекционные и хронические соматические заболевания. Полученные данные вносили в индивидуальную карту пациента. Подробно оценивали характер менструального цикла и особенности его становления (возраст менархе, регулярность и продолжительность цикла, характер менструации, дисменорею), а также репродуктивный анамнез пациенток (количество беременностей, наступивших естественным путем и с помощью ВРТ, срочных и преждевременных родов, аборт, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся, внематочных беременностей, наличие осложненных беременностей и родов, наличие живых детей и их развитие), уточнялось, наступали беременности с настоящим или иным половым партнером. Также выясняли перенесенные гинекологические заболевания, объем перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза. Оценивали наличие перенесенных инфекционных и соматических заболеваний, оперативных вмешательств. У каждой женщины уточняли данные о продолжительности бесплодия, а также о проведенных диагностических и лечебных мероприятиях. Особое внимание уделяли изучению предшествующих попыток ЭКО, а именно: дата и время проведения ВРТ, протокол стимуляции суперовуляции, количество полученных ооцитов, количество полученных эмбрионов и их качество, качество эмбрионов при переносе в полость матки, исход программы.

2.2.2 Обследование ВИЧ-инфицированных пациентов.

1. Длительность инфицирования (лет).
2. Источник инфицирования (парентеральный, употребление наркотиков, гетеросексуальный, другой).
3. Используемые методы контрацепции (барьерная, гормональная, прерванный половой акт).
4. Прием АРВТ (длительность, препараты).
5. Анализ результатов инфекционного обследования проводился на основании документов, предоставленных из Центра профилактики и борьбы со СПИДом не менее 3-х месячной давности.

2.2.3. Гормональное обследование

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

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

Гормональное исследование (единицы измерения)	Нормативные показатели
ЛГ (МЕ/л)	2,3–15,0
ФСГ (МЕ/л)	2,0–10,0
E ₂ (пкмоль/л)	150–480
Прл (мМЕ/л)	100–500
АМГ(нг/мл)	1,0–2,5
ТТГ (мМЕ/л)	1,0–3,8

2.2.4 Ультразвуковое исследование органов малого таза

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

2.2.5 Исследование эякулята

Оценка параметров спермограммы производилась дважды: при предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ЭКО и в день ТВП. Перед проведением ТВП супругу пациентки был рекомендован соответствующий половой режим. Сбор материала производился в стерильный контейнер путем мастурбации после 3-4 дней полового

воздержания в стерильный пластмассовый контейнер для сбора эякулята. При анализе эякулята определяли характеристики клеточных элементов: концентрацию сперматозоидов, их подвижность, наличие морфологических изменений сперматозоидов, количество лейкоцитов, а также количество и типы незрелых клеток сперматогенеза. Также эмбриолог оценивал объем спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, рН.

Оценка параметров спермограммы производилась в соответствии с нормативами ВОЗ (2010) (таблица 2) [160].

Таблица 2 - Нормативные показатели спермограммы

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	>1,5 мл
рН	≥7,2
Вязкость	0,1 – 2,0 см
Время разжижения	<60 мин
Концентрация лейкоцитов	<1 млн/мл
Концентрация сперматозоидов	>15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	>40 млн
Подвижность сперматозоидов	Общая подвижность сперматозоидов ≥ 40 % Сперматозоиды с прогрессивным движением ≥ 32 %
Морфология	≥ 4 % нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	≥ 58 % живых сперматозоидов
Агглютинация	Отсутствует
Клетки сперматогенеза	2 – 4 кл/100

Для оценки патологии эякулята руководствовались следующими критериями:

- аспермия – отсутствие эякулята;
- азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте;

- олигозооспермия – снижение концентрации сперматозоидов ниже <math><15</math> млн/мл;
- астенозооспермия – снижение подвижности сперматозоидов ниже нормальных значений (общая подвижность <math><40\%</math>, сперматозоиды с прогрессивным движением <math><32\%</math>);
- тератозооспермия – повышение количества сперматозоидов с аномальной морфологией (>96 %);
- олигоастенотератозооспермия — сочетание олигозооспермии, астенозооспермии и тератозооспермии;
- астенотератозооспермия – сочетание астенозооспермии и тератозооспермии;
- олиготератозооспермия – сочетание олигозооспермии и тератозооспермии;
- олигоастенозооспермия – сочетание олигозооспермии и астенозооспермии.

Среди патозооспермии выделяли субфертильную сперму и тяжелую патозооспермию.

Критерии тяжелой патологии спермы: концентрация сперматозоидов до 12 млн/мл, сперматозоиды с прогрессивным движением (A+B) - менее 29%, количество патологических форм - более 97%. Сперму расценивали как субфертильную при концентрации сперматозоидов 12-15 млн/мл, наличии более 29% сперматозоидов с прогрессивным движением (A+B) – 30-32% и 97% патологических форм.

Оценка процента сперматозоидов с ДНК-фрагментацией проводилась с помощью метода TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferases (TdT) dUTP end labeling) с помощью набора реактивов фирмы MILLIPORE (США) ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kits. На предметное стекло, покрытое Polysine (Thermo), наносился препарат сперматозоидов, отмытых от спермальной жидкости. Препарат высушивался и фиксировался в 1% растворе параформальдегида в течение 10 минут. Затем дважды промывался в фосфатном буфере и был помещен в раствор этанол/уксусная кислота (2:1)

на 5 минут при -20°C . Затем вновь дважды промывался в фосфатном буфере. Далее на препарат наносился раствор фермента TdT ENZYME (время инкубации 60 минут) и раствор ANTY-DIGOXIGENIN CONJUGATE, содержащий флюоресцентный краситель (rhodamine) и инкубировался в течении 30 минут. В последующем образец спермы вновь дважды промывался в фосфатном буфере и инкубировался в растворе ядерного флюоресцентного красителя DAPI в течение 5 минут. Затем препарат четырежды промывался в фосфатном буфере и покрывался покровным стеклом. Анализ проводился на флюоресцентном микроскопе Olympus с двумя фильтрами - длиной волны 350нм и 560нм. Препарат просматривался в нескольких полях зрения и проводилась оценка 1000 клеток. Полученные изображения анализировались в программе Imedge Pro для подсчета количества ядер сперматозоидов с фрагментацией ДНК и общего количества неповрежденных ядер. В конечном счете, проводился подсчет процентов (среднее значение) фрагментированных ядер в препарате данного пациента.

2.2.6 Стимуляция функции яичников и трансвагинальная пункция фолликулов

Стимуляцию функции яичников проводили в протоколе с антагонистами гонадотропин релизинг-гормона (ант-ГнРГ) и в «длинном» протоколе. У части пациенток ооциты были получены в результате проведения программы ЭКО в естественном цикле, без стимуляции функции яичников.

Стимуляция функции яичников проводилась препаратами менотропина, рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) или корифоллитропин альфа. Доза препарата подбиралась индивидуально в зависимости от возраста пациентки, данных гормонального исследования и количества антральных фолликулов при УЗ-исследовании. После проведения

УЗ-мониторинга при необходимости производилась коррекция дозы препаратов гонадотропинов.

При проведении протокола с ант-ГнРГ введение экзогенных гонадотропинов начинали со 2-3 дня менструального цикла. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм начинали введение ант-ГнРГ с целью предупреждения эндогенных паразитарных пиков лютеинизирующего гормона (ЛГ). Затем препарат ант-ГнРГ вводили ежедневно, включая день назначения триггера овуляции. Триггер овуляции назначали при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17 мм. Для финального созревания ооцитов использовали человеческий хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) в дозе 5 000 – 10 000 МЕ, а при риске развития синдрома гиперстимуляции яичников (при наличии более 15 доминантных фолликулов в обоих яичниках в день назначения триггера овуляции) – агониста гонадотропин релизинг-гормона (а-ГнРГ) в дозе 0,2 мг. При проведении «длинного» протокола введение а-ГнРГ в виде дейли-форм ежедневно начинали с 21-го дня менструального цикла, предшествующего началу стимуляции функции яичников, а введение гонадотропинов начинали со 2-3 дня менструального цикла. Триггер овуляции вводили при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17 мм, в качестве триггера овуляции использовали ХГЧ в дозе 10 000 МЕ.

При проведении программы ЭКО в естественном цикле УЗ-мониторинг осуществляли на 4-5 и 7-8 дни менструального цикла с целью визуализации доминантного фолликула, а затем ежедневно для определения времени назначения триггера овуляции. Триггер овуляции, в качестве которого применяли ХГЧ в дозе 5 000 МЕ, назначали при диаметре доминантного фолликула 17 мм.

Трансвагинальную пункцию (ТВП) яичников у женщин с ВИЧ производили в последнюю очередь в асептических условиях через 35–36 часов после введения препарата ХГЧ под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под

трансвагинальным ультразвуковым контролем с использованием одноразовых игл (Vitrolife IVF Media).

2.2.7. Работа с биоматериалом ВИЧ-инфицированных мужчин

ВИЧ-инфицированный мужчина сдавал сперму путем мастурбации в специально отведённом помещении. Далее контейнер со спермой переносили в эмбриологическую лабораторию, где эмбриолог оценивал показатели спермы.

Алгоритм обработки эякулята

Использовали 100% градиент концентрации (частицы коллоидного кремния, покрытые инертным для клеток веществом силаном) биотехнологической компании Сигма разводили (средой для обработки спермы (СООС) с добавлением Хепеса и белка для стандартных наборов из двух флаконов с концентрацией частиц 80% и 40%. В стерильную коническую пробирку на 15 мл с завинчивающейся крышкой помещали определенный объем градиента с концентрацией 80%, сверху аккуратно наслаивали такой же объем градиента 40%, далее сверху наслаивали такой же объем эякулята. Объемы варьировались от 2,0 мл до 4,0 мл, что зависело от объема эякулята, количества в нем сперматозоидов.

Например, когда получали большой объем эякулята (у мужчин с гиперфункцией семенных пузырьков встречался объем спермы до 10 мл), использовали несколько пробирок с градиентами концентрации. Когда сперматозоидов очень мало и маленький объем спермы, использовали т.н. метод «миниградиент» – в нескольких конических центрифужных пробирках типа Эппендорф на 1,8 или 2,0 мл.

Далее пробирки центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 20 минут. После центрифугирования на дне образуется клеточный осадок, далее выше, слой градиента, далее выше, слой семенной плазмы. На верхней границе градиента находятся клетки, мертвые сперматозоиды,

микроорганизмы. Все сверху аккуратно удаляли пипеткой максимально до осадка.

Далее осадок помещали в другую пробирку с налитой средой для обработки спермы (далее СОС) в объемах от 5 до 10 мл (если много осадка – большой объем СОС, мало – меньший). Осадок равномерно распределяли пипетированием во всем объеме СОС. Потом опять центрифугировали при 1000 об/мин 10–15 минут. Надосадочную жидкость удаляли и процедуру отмывки повторяли (кроме тех случаев, когда очень мало сперматозоидов), в максимальных объемах СОС. Следующим этапом проводили процедуру «swim up» – «всплытие». После последней отмывки и удаления надосадочной жидкости, на еще относительно твердый осадок аккуратно сверху наслаивали среду для обработки спермы около 1,0–2,0 мл. Пробирку под углом 45° помещали в инкубатор или термостат и ждали 1–1,5 ч. Активные сперматозоиды из осадка диффундировали вверх в среду. Их забирали пипеткой (не притрагиваясь к осадку), помещали в другую чистую пробирку и концентрировали мягким центрифугированием.

Осадок делили на порции и замораживали. Далее, одну из порций направляли на исследование для определения РНК вируса в очищенных сперматозоидах. Исследование проводили методом ПЦР в лаборатории Центрального НИИ Эпидемиологии СМД (Центр молекулярной диагностики). При получении отрицательного результата (вирус не обнаружен в сперме), замороженные образцы использовали для оплодотворения в программе ЭКО, если вирус обнаруживали, то оставшуюся часть спермы погружали в 3% раствор Самаровки с экспозицией 60 минут, с последующей утилизацией материала в установленном порядке, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2527-09 [161].

2.2.8 Эмбриологический этап, перенос эмбрионов и посттрансферный период программы ЭКО

Работа эмбриологической лаборатории

Работу с биологическими жидкостями ВИЧ-инфицированных пациентов осуществляли в ламинаре второго класса биологической защиты.

Во время пункции фолликулярную жидкость собирали в 10 мл пробирки для забора ооцит-кумулюсных комплексов, жидкость перемещали в пластиковые чашки Петри (NUNC) 60x15. Чашки с фолликулярной жидкостью просматривали при помощи бинокулярного микроскопа и, при помощи автоматической пипетки, переносили ооцит-кумулюсные комплексы в чашку Петри (NUNC) 35x10 с HEPES содержащей средой (Gamete buffer(COOK)). Далее все манипуляции с ооцитами производили в преэквилибрированных средах (не менее 8 часов при 5,5% CO₂ и температуре 37 C).

Непосредственно после пункции ооцит кумулюсные комплексы отмывали в HEPES содержащей среде (Gamete buffer(COOK)) методом пипетирования, с целью максимально отмыть от фолликулярной жидкости и эритроцитов. Затем ооцит-кумулюсные комплексы помещали в однолуночную чашку Петри (NUNC). Чашки готовили за 12 часов, помещая в центр однолуночной чашки 1 мл среды для оплодотворения (Fertilization medium), которую покрывали 1 мл парафиновым маслом (Origio), в пространство между лункой и бортиком чашки помещали 2 мл среды для оплодотворения (Fertilization medium COOK). Ооцит-кумулюсные комплексы переносили сначала в окололуночное пространство преэквилибрированной чашки Петри, и при помощи автоматической пипетки, отмывали от среды, содержащей HEPES. Затем, кумулюсные комплексы помещали в центральную лунку под слой масла, и инкубировали при 5,5% CO₂ и 37C в течение 1–2 часов. Затем в эту чашку добавляли 200мкл раствора гиалуронидазы (80 м.е/мл SAGE) и интенсивно пипетируя при помощи пипетки для денудации (STRIPPER) с уменьшающимся диаметром (170–140) капилляров, освобождали ооциты от клеток кумулюса. Ооциты оценивали при помощи светового микроскопа,, после чего отделяли зрелые ооциты и помещали их в 4-х луночную чашку для культивирования с 50 мкл капель

среды в каждой из 4х лунок под слоем парафинового масла. Чашка также была преинкубирована при 5,5% CO₂ и 37 С. В каждую из капель помещали не более 5 зрелых ооцитов. Культивирование ооцитов, а затем и эмбрионов ВИЧ-инфицированных пациентов осуществляли в отдельном инкубаторе. Для этого использовали маркированный инкубатор фирмы GALAXY, культивирование происходило в условиях постоянного поддержания уровня CO₂. Уменьшение уровня кислорода, при помощи добавления в атмосферу инкубатора N₂ не использовали.

После оценки ооцитов их вновь помещали в инкубатор и культивировали еще в течение 1–2 часов. Оплодотворение методом ICSI производили через 38–40 часов после введения триггера овуляции.

Во всех случаях, как для конкордантных, так и для дискордантных пар и в контрольной группе оплодотворение происходило методом ICSI. У пациентов с высоким уровнем ДНК – фрагментации (>30%) селекция сперматозоидов проводилась методом PCSI. Прибор для селекции сперматозоидов PCSI представляет собой полистироловую чашку для культивирования с тремя микроточками гиалуроновой кислоты. Гидратацию микроточек выполняли добавлением 10 мкл раствора HTF (раствор имитирующий среду фаллопиевых труб человека). Для подготовки чашки к использованию в нее вводилось культуральное масло. Далее с помощью микропипетки к микроточкам добавляли объем спермы, превышающий объем, используемый для гидратации. Через 30 минут проводилась селекция спермиев, связанных с гиалуроновой кислотой (не смотря на активное биение жгутика у таких спермиев не обнаруживалось поступательное движение).

Затем в чашку 35x10 помещали каплю с подготовленными сперматозоидами, каплю PVP 10мкл, и каплю с HEPES содержащей средой (Gamete buffer – COOK) 10 мкл, куда вносили ооциты. При помощи стеклянных микроинструментов фирмы ORIGIO обездвиженный сперматозоид вводили в цитоплазму ооцита. После ооциты вновь

переносили в 4-х луночную чашку для культивирования со средой для дробления (Cleavege medium COOK) и помещали в инкубатор. Через 16–18 часов визуально оценивали оплодотворение по наличию и числу пронуклеусов. Зиготы с 2мя пронуклеусами переносили в свежую каплю преинкубированной среды для дробления (Cleavege medium COOK) не более 5 зигот в одну каплю. Далее эмбрионы культивировали до 3-х суток.

На 3-и сутки культивирования, эмбрионы переводили в новую 4-х луночную чашку для культивирования с 50 мкл каплей среды для культивирования эмбрионов до стадии бластоцисты (Blastocyst medium COOK) в каждой из 4-х лунок под слоем парафинового масла.

На 5-е сутки культивирования оценивали морфологические характеристики эмбрионов согласно Gardner и соавт. (1994). Все эмбрионы, получившие категорию А или В, признавались перспективными для переноса и криоконсервации.

Эмбрионы переносили в полость матки при помощи катетера Pearl Tip Soft TDT Laboratore CCD. Всем пациенткам проводился перенос одного эмбриона. Для переноса эмбриона за 6–8 часов готовили чашку Петри с центральной лункой. Для этого в центральную лунку чашки (NUNC) вносили 1 мл среды для культивирования эмбрионов до стадии бластоцисты (Blastocyst medium COOK) и инкубировали в при 37 С в 5,5 CO₂. Перенос эмбриона осуществляли под контролем ультразвука, визуально контролируя попадание среды с эмбрионом из катетера в полость матки. После переноса катетер еще раз промывали средой, контролируя визуальное отсутствие эмбрионов в чашке со средой для промывания катетера.

Поддержку посттранферного периода препаратами прогестерона осуществляли по стандартной схеме.

Эмбрионы подлежащие криоконсервации были витрифицированы и помещены на хранение в криобанк. Для хранения биологического материала пациентов с ВИЧ инфекцией использовали специально маркированный Дьюар. Ввели строгий учет всех образцов, помещенных в

него. Практическая работа лаборатории была организована таким образом, что жидкий азот из Дьюара для ВИЧ пациентов не вступает в контакт ни с каким другим биологическим материалом. Все многоразовое лабораторное оборудование для манипуляций в жидком азоте маркировано, как предназначенное для ВИЧ-инфицированных образцов. Хранили отдельно и стерилизовали после каждого применения.

Для витрификации эмбрионов использовали наборы для витрификации фирмы КРИОТЕК (CryoTech).

Растворы имели комнатную температуру. Перед началом процедуры по криоконсервации обязательно подписывали носитель (ФИО пациента, номер носителя, дата заморозки). Каждая бластоциста консервирована отдельно. При криоконсервации эмбриона в первую лунку добавляли 300 мкл ES и переносили туда эмбрион на 15 мин. Во вторую и третью лунки вносили 300 мкл VS. Перед перемещением эмбриона из первой во вторую лунку обязательно промывали капилляр. Во второй лунке с раствором VS эмбрион тщательно отмывали в течение 45–50 сек. Для этого эмбрионы выкладывали на дно лунки, они всплывали, раствор ES убирали, стриппером эмбрион захватывали и помещали на дно, помешивали круговыми движениями. Процедура повторяли 3 раза. Далее эмбрион перекладывали в 3-ю лунку и отмывали таким же образом в течение 20 сек. На носитель помещали эмбрион в минимальном количестве среды. Быстрым движением переносили криотек в ванну с жидким азотом и одевали колпачок от криотека. Криоэмбрион хранили в отдельном Дьюаре для ВИЧ-инфицированных пациентов.

2.2.9 Криопротокол

Проведение криоцикла осуществляли на фоне подготовки эндометрия с использованием препаратов эстрогенов (прогинова в дозе 6 мг/сут или дивигель в дозе 3 гр/сут) и микронизированного прогестерона (утрожестан в дозе 600 мг/сут) под контролем УЗИ. Перенос размороженных после

витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 6-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона под ультразвуковым контролем.

Размораживание эмбрионов

В чашку с центральной лункой добавляли 1 мл среды для бластоцист (Blastocyst medium), 2 мл той же среды в бортик. Среда приэквilibрирована при 5,5% CO₂ и 37°C и в инкубаторе в течение минимум 4 часов. Также нагревали минимум 1 мл среды TS (виалу с плотно закрытой крышкой помещали в инкубатор на 1,5 часа). Все остальные растворы были комнатной температуры. Среду TS наливали в чашку с центральной лункой непосредственно перед разморозкой. Криотек быстрым движением перемещали из азота в TS на 1 минуту и смотрели в бинокляр как эмбрионы отходят с поверхности носителя. Капилляром забирали эмбрионы, перемещали их на дно первой лунки планшета, содержащей 300 мкл раствора DS на 3 мин. Эмбрионы переносили на дно второй лунки, содержащей 300 мкл раствора WS на 5 мин. Далее их переносили на поверхность третьей лунки, содержащей 300 мкл. раствора WS на 1 мин. Когда эмбрионы опускались на дно лунки, перемещали их на поверхность и повторяли эту процедуру несколько раз. После чего переносили эмбрионы в чашку с центральной лункой, содержащую Blastocyst medium. Крышку от чашки Петри подписывалась. Переносили чашку с эмбрионами в инкубатор, дублируя надпись с чашки на этикетку на дверце инкубатора.

Все используемые для манипуляций с ВИЧ-инфицированными пациентами одноразовые инструменты, лабораторный пластик, биологические жидкости были уничтожены согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Отходы класса Б собирали в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) имеющую красную маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Жидкие биологические отходы, использованные одноразовые

колющие (режущие) инструменты и другие изделия медицинского назначения помещали в твердую (непрокальваемую) влагостойкую герметичную упаковку (контейнеры).

2.3 Специальные методы исследования

2.3.1 Исследование копийности мтДНК в клетках кумулюса

В асептических условиях с использованием инвертированного микроскопа клетки кумулюса отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере, а затем помещали в индивидуальные пробирки, содержащие данный буфер. Определение абсолютного числа копий мтДНК осуществляли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для этого из клеток кумулюса выделяли ДНК. Клетки лизировали буфером с гуанидин тиоцианатом в течение 10 минут при температуре 65°C. После этого осуществляли осаждение ДНК изопропанолом в присутствии соосадителя путем центрифугирования образцов при 13 тыс.об/мин в течение 10 мин (Набор Проба-НК-плюс, ООО «ДНК-Технология», Россия). Далее осадок промывали двумя промывочными растворами, высушивали, и ресуспендировали в 50 мкл элюирующего раствора.

Для подсчёта копий мтДНК проводили ПЦР в реальном времени с использованием олигонуклеотидов и TaqMan-проб для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген МТ-ND2-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген МТ-ND4 - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4). Использование праймеров к гену МТ-ND2 позволило оценить содержание тотального пула мтДНК (mtDNAtotal), а праймеров к гену МТ-ND4 - содержание пула полноразмерной мт ДНК, лишенной делеций (mtDNA^{del-}), в частности del mtDNA4977. TaqMan-пробы для фрагментов митохондриальной и геномной ДНК были помечены разными флуорофорами (FAM и HEX), что позволило проводить реакцию в одной пробирке (мультиплексная ПЦР) в двух повторах

для каждого образца. Для обеспечения «горячего старта» использован парафин. В работе использованы реактивы, олигонуклеотиды и TaqMan-пробы и детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Режим амплификации: 80 °С в течение 1 мин, инкубирование при 95 °С в течение 1 мин, а затем 50 циклов: 94 °С в течение 15с и 64°С в течение 20с с измерением уровня флуоресценции на каждом цикле. Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S - leukotriene C4 synthase).

Количество мтДНК относительно геномной определяли методом сравнения пороговых циклов ($2^{\Delta C_p}$) и представляли в относительных единицах (о.е.) по формуле 1:

$$\text{mtDNA/gDNA} = 2^{C_p \text{ gDNA} - C_p \text{ mtDNA}} \text{ (формула 1), где}$$

$C_p \text{ gDNA}$ - значение порогового цикла амплификации геномной ДНК,

$C_p \text{ mtDNA}$ - значение порогового цикла амплификации митохондриальной ДНК.

2.3.2 Исследование копийности мтДНК в сперматозоидах

В асептических условиях с использованием инвертированного микроскопа сперматозоиды отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере, а затем помещали в индивидуальные пробирки, содержащие данный буфер. Определение абсолютного числа копий мтДНК осуществляли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для этого из образца спермы выделяли ДНК. Клетки лизировали буфером с гуанидин тиоцианатом в течение 10 минут при температуре 65°С. После этого осуществляли осаждение ДНК изопропанолом в присутствии соосадителя путем центрифугирования образцов при 13 тыс.об/мин в течение 10 мин (Набор Проба-НК-плюс, ООО «ДНК-Технология», Россия). Далее осадок промывали двумя промывочными растворами, высушивали, и ресуспендировали в 50 мкл элюирующего раствора. Для подсчёта копий мтДНК проводили ПЦР в реальном времени с использованием олигонуклеотидов и TaqMan-проб для амплификации и количественного определения специфических фрагментов

мтДНК (ген MT-ND2-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген MT-ND4 - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4). Использование праймеров к гену MT-ND2 позволило оценить содержание тотального пула мтДНК (mtDNA_{total}), а праймеров к гену MT-ND4 - содержание пула полноразмерной мтДНК, лишенной делеций в данном регионе (mtDNA_{del}-), в частности del mtDNA4977.

Количество мтДНК относительно геномной определяли методом сравнения пороговых циклов ($2^{\Delta C_p}$) и представляли в относительных единицах (о.е.) по формуле 1:

$$\text{mtDNA/gDNA} = 2^{C_p \text{ gDNA} - C_p \text{ mtDNA}} \text{ (формула 1), где}$$

$C_p \text{ gDNA}$ - значение порогового цикла амплификации геномной ДНК,

$C_p \text{ mtDNA}$ - значение порогового цикла амплификации митохондриальной ДНК.

TaqMan-пробы для фрагментов митохондриальной и геномной ДНК были помечены разными флуорофорами (FAM и HEX), что позволило проводить реакцию в одной пробирке (мультиплексная ПЦР) в двух повторах для каждого образца. Для обеспечения «горячего старта» использован парафин. В работе использованы реактивы, олигонуклеотиды и TaqMan-пробы и детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Режим амплификации: 80 °C в течение 1 мин, инкубирование при 95 °C в течение 1 мин, а затем 50 циклов: 94 °C в течение 15с и 64°C в течение 20с с измерением уровня флуоресценции на каждом цикле.

2.4 Статистический анализ полученных результатов

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с использованием программы IPM SPSS Statistics, версия 22.

При анализе количественных данных в группах сравнения определяли вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова, графический

анализ данных). При нормальном виде распределения данных определяли среднее арифметическое (M) со стандартным отклонением (SD), для оценки различий в группах применяли методы параметрической статистики (t-тест для сравнения данных в 2-х группах). При распределении признаков, отличающимся от нормального определяли медиану (Me) и квартили (Q1;Q3), а для оценки различий в группах применяли методы непараметрической статистики (тест Манна-Уитни). Для качественных данных определяли доли и риски (%). Для сравнения категориальных данных в двух и более группах, а также для оценки значимых различий между ними использовали тест χ^2 . Тест χ^2 проводили после построения таблиц сопряженности. Для сравнения бинарных данных мерой сравнения явилось отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом 95% (95% ДИ). Зависимые данные оценивались с помощью коэффициента корреляции. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена или Пирсона. Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-anamнестические данные и лабораторные параметры супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у женщины

Анализ клинико – анамнестических данных показал, что медиана возраста женщин с ВИЧ-инфекцией составила 34 года (31;37). Диагноз ВИЧ-инфекции был поставлен в возрасте 25,5 лет (22,2;30), «стаж» заболевания составил 8 лет (6;11). Путь инфицирования был неизвестен у 38 (40%) пациенток, 7 женщин (7,4%) – указывали на употребление наркотиков. В 1 (1,1%) случае было заражение в медицинском учреждении при использовании нестерильного инструментария. В остальных 49 (51,6%) случаях отмечен половой путь инфицирования.

Преобладала 3 субклиническая стадия заболевания (61,05%). Пациентки со стадией заболевания 4а (32,63%), 4б (4,21%) и 4в (2,11%) находились в фазе ремиссии не менее 6 месяцев (рис. 2).

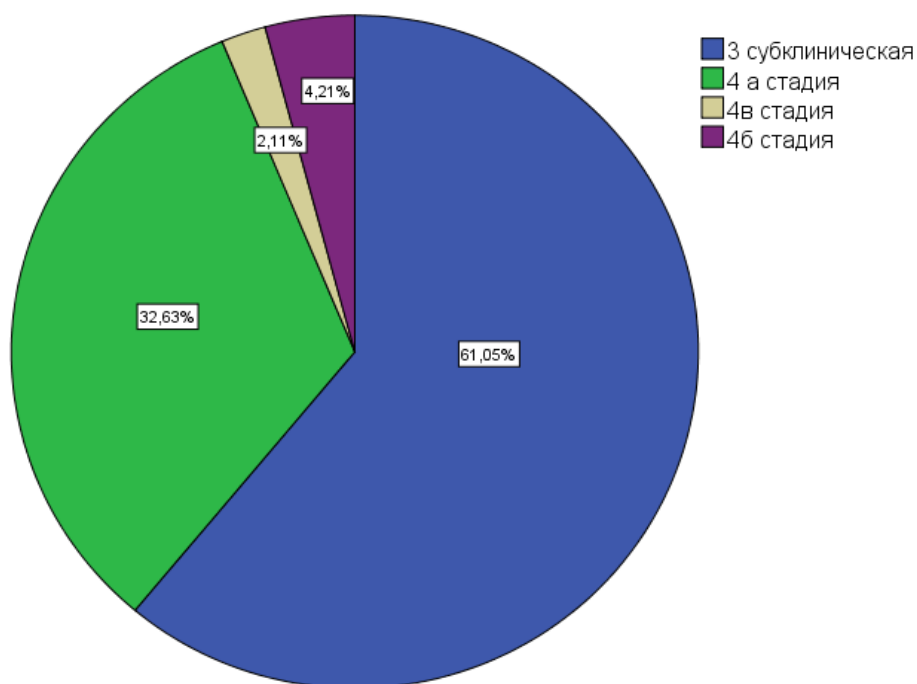


Рисунок 2. Стадии ВИЧ – инфекции у женщин

Все пациентки получали комбинированную АРВТ, из них 84 (88,4%) женщины принимали препараты группы НИОТ в сочетании с ингибиторами протеазы (ИП), 9 (9,5%) пациенток использовали НИОТ+ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ) и 2 (2,1%) женщины - три препарата группы НИОТ.

Медиана продолжительности приема препаратов составила 4 года (2;6,5). Вирусная нагрузка в крови была неопределяемая в 100% случаев. Иммунологический статус ВИЧ-серопозитивных пациенток представлен в таблице 3. Уровни CD3+лимфоцитов (1389 (852;1551)), CD4+ лимфоцитов (622,5 (446,7;808,7), CD8+ лимфоцитов (741 (613;990)) и иммунореактивный индекс (0,85 (0,58;1,06)) свидетельствовала о «благополучном» состоянии иммунной системы.

Таблица 3 - Иммунологический статус пациенток с ВИЧ-инфекцией

Параметры	ВИЧ-инфицированные пациентки n=95
CD3+, мкл в 1 кл	1389 (852;1551)*
CD3+, %	80 (80;80)
CD4+, мкл в 1 кл	622,5 (446,7;808,7)*
CD4+,%	34,5 (30;40)
CD8+, мкл в 1 кл	741 (613;990)*
CD8+,%	37 (33;46)
Иммунореактивный индекс	0,85 (0,58;1,06).

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

У 25 из 95 (26,3%) ВИЧ-серопозитивных женщин выявлен сопутствующий гепатит С. В 19 из 95 (20%) парах половой партнер также имел ВИЧ-положительный статус.

Следует отметить, что в связи с наличием ВИЧ-инфекцией барьерную контрацепцию презервативом использовали только 21 (5,2%) супружеская пара, зачатие в перiovуляторные дни – 3 (0,7 %), тогда как большинство пациентов не применяли методов контрацепции – 69 (17,2%), отсутствие половой жизни имело место у 1 женщины (0,2%).

Анализ клинико-anamнестических данных показал, что пациентки с ВИЧ-инфекцией и ВИЧ-серонегативные женщины были сопоставимы по возрасту (34 и 34 года; $p=0,16$), возрасту менархе (13 и 13 лет; $p=0,16$), длительности менструального цикла (29,9 и 28,7 дней; $p=0,17$) и бесплодия (6,9 и 5,2 лет; $p=0,12$), а также индексу массы тела (ИМТ) (22 и 22 кг/м²; $p=0,62$). Обращает на себя внимание более раннее начало половой жизни у женщин в основной группе (16,9(2,2) и 18,3(2,6); $p<0,001$) (табл. 4).

Таблица 4 - Клинико-лабораторная характеристика пациенток с ВИЧ-инфекцией и серонегативных по ВИЧ женщин

Параметры	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	P
Возраст, лет *	34 (31;37)	34 (30;35)	0,16
Возраст менархе, лет	13,1 (1,4)	13,2(1,1)	0,16
Длительность цикла, дней	29,9(11,6)	28,7 (2,7)	0,17
Начало половой жизни, лет	16,9 (2,2)	18,3 (2,6)	<0,001
Длительность бесплодия, лет	6,9 (4,8)	5,2 (3,6)	0,12
ИМТ, кг/м ² *	22(20;25,7)	22(21;24,5)	0,62

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Анализ причин бесплодия в обеих группах показал (рис.3,4), что наиболее часто встречался трубно-перитонеальный фактор (49,5% и 44,8%, $p=0,52$). Распространенность мужского бесплодия в обеих группах составила 22,1% и 29,2% ($p=0,34$), сочетанного – 15,% и 16,7% ($p=0,58$), неясный генез бесплодия имел место в 4,2% и 8,3 % ($p=0,10$) случаев соответственно. У 2-х пациенток (2,1%) основной группы и у 1 (1,04%) в группе контроля был

диагностирован эндокринный фактор бесплодия ($p=0,99$). У 6 из 95 (6,3%) ВИЧ-серопозитивных пациенток не было диагностировано бесплодие, проведение программы ЭКО осуществлялось по эпидемиологическим показаниям.

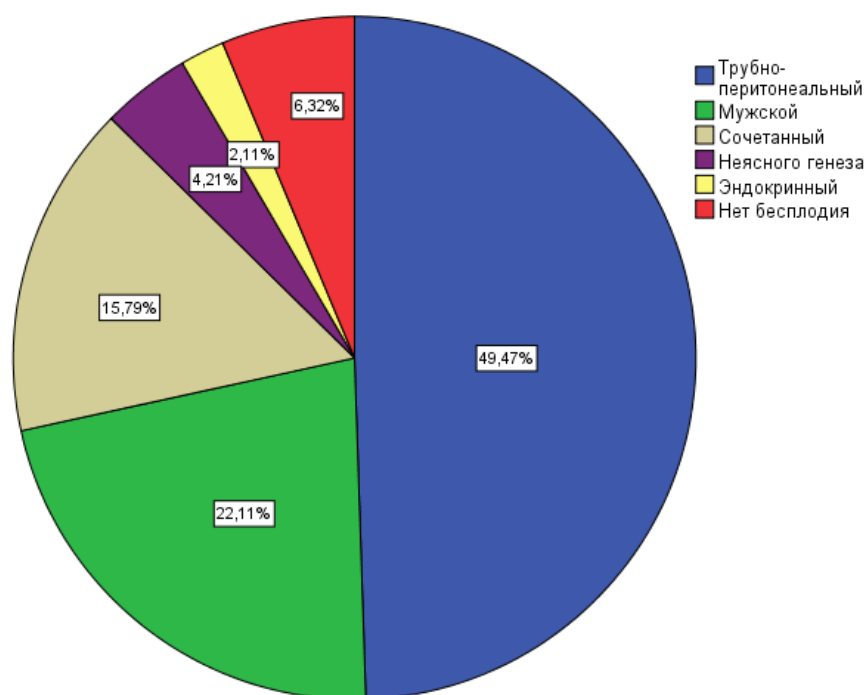


Рисунок 3. Структура бесплодия у ВИЧ-серопозитивных пациенток

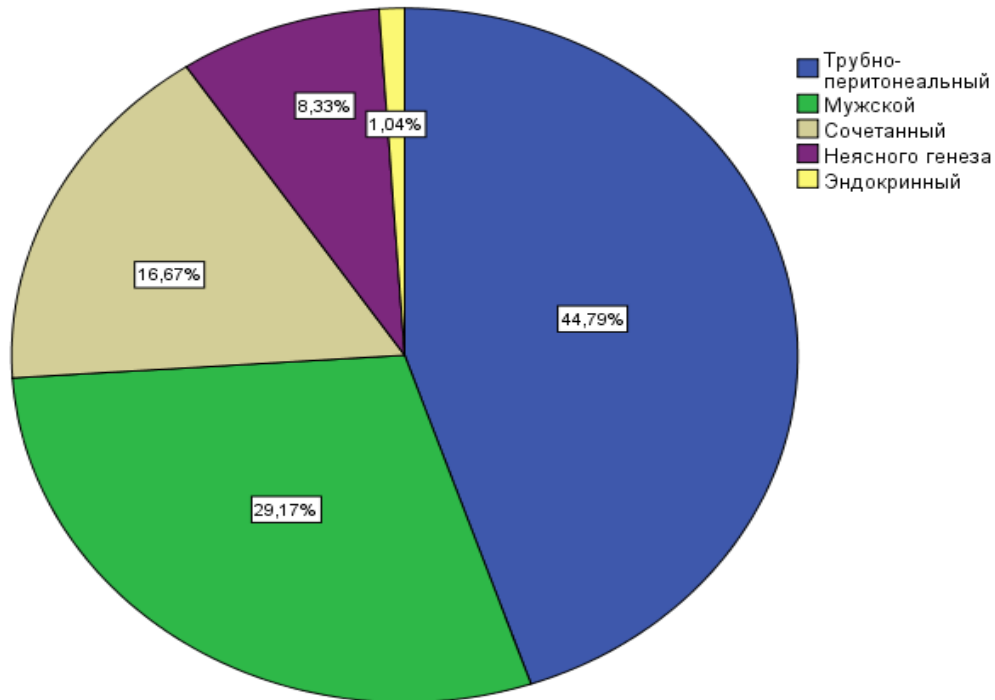


Рисунок 4. Структура бесплодия у пациенток группы контроля

У 60 из 89 (68,1%) ВИЧ-положительных пациенток с бесплодием было диагностировано вторичное бесплодие, что статистически значимо выше по сравнению с ВИЧ-серонегативными женщинами, у которых частота встречаемости этого вида бесплодия составила 38% ($p < 0,001$).

Следует отметить, что искусственный аборт в анамнезе был почти у каждой второй пациентки с ВИЧ-инфекцией (42,1%) и у каждой седьмой серонегативной по ВИЧ женщины (12,5%; $p < 0,001$). Трубная беременность также статистически значимо чаще встречалась в основной группе по сравнению с группой контроля (34,7% и 16,7%; $p = 0,004$). Неразвивающаяся беременность (18,9% и 17,7%; $p = 0,82$) и поздний самопроизвольный выкидыш (5,3% и 1%; $p = 0,09$) наблюдались одинаково часто в обеих группах. Роды в анамнезе отмечены одинаково часто в обеих группах (8,4% и 10,4%; $p = 0,64$).

Большинство пациенток отмечали детские инфекции в анамнезе. В структуре хронических заболеваний преобладали заболевания эндокринной системы и заболевания желудочно–кишечного тракта (табл. 5).

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

Таблица 5 - Структура экстрагенитальных заболеваний пациенток, включенных в исследование

Нозологические формы хронических экстрагенитальных заболеваний	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	p
Детские инфекции	87,5% (83)	88,9% (85)	0,98
Заболевания желудочно-кишечного тракта	2,5% (2)	14,8% (14)	0,16
Заболевания мочевыделительной системы	5,0% (4)	7,4% (7)	0,99
Заболевания сердечно-сосудистой системы	2,5% (2)	0,0% (0)	p= 0,99
Заболевания органов дыхания	2,5% (1)	7,4% (7)	0,72
Заболевания эндокринной системы	7,5% (7)	11,1% (10)	0,94
Миопия различной степени	5,0% (4)	0,0% (0)	0,65

Как видно из данных таблицы 6, в структуре гинекологической патологии у женщин с ВИЧ-инфекцией наиболее часто встречалась патология шейки матки (66,3%), которая была сопоставима с группой контроля (61,3%; $p=0,85$). Чаще всего в основной группе была диагностирована эктопия шейки матки (57,8%), лейкоплакия (2,1%), CIN I и CIN II обнаружены у 2 пациенток (2,1%). В группе контроля частота встречаемости эктопии шейки матки была 59,3% ($p=0,65$), лейкоплакия и CIN II – по 1 случаю (1% и 1%; $p=0,705$ и $p=0,16$). CIN III и рак шейки матки встречались только у пациенток с ВИЧ-инфекцией – по 1 случаю (1,1% и 1,1%; $p=0,32$). Статистически значимо чаще в группе ВИЧ-серопозитивных женщин встречались остроконечные кондиломы, ассоциированные с ВПЧ (12,6% и 3,1%; $p=0,02$). Воспалительные заболевания придатков матки, а именно хронический сальпингоофорит (38,9% и 28,1%; $p=0,11$) и гидросальпинкс (27,4% и 18,8%; $p=0,16$) встречались одинаково часто в обеих группах. Однако осложненные формы воспалительных заболеваний придатков матки наблюдались преимущественно в основной группе (8,4% и 1%; $p=0,01$). Инфекции, передаваемые половым путем (сифилис, хламидиоз) в анамнезе были у 15 (16,4%) женщин с ВИЧ-инфекцией и у 3 (3,2%) без ВИЧ-инфекции ($p=0,007$). Одинаково часто у пациенток обеих групп встречались такие гинекологические заболевания, как миома матки (16,8% и 10,4%; $p=0,19$), НГЭ (12,6% и 18,8%; $p=0,25$) и кисты яичника (10,5% и 8,3%; $p=0,57$).

Таблица 6 - Структура гинекологических заболеваний у обследуемых пациенток

Параметры	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	p
Патология шейки матки:			
Эктопия	55(57,8%)	57(59,3%)	0,65
Лейкоплакия	2 (2,1%)	1(1%)	0,70
CIN I	2 (2,1%)	-	0,56

CIN II	2 (2,1%)	1(1%)	0,16
CIN III	1(1,1%)	-	0,32
Рак шейки матки	1(1,1%)	-	0,32
Остроконечные кондиломы	12(12,6%)	3(3,1%)	0,01
Хронический сальпингоофорит	37(38,9%)	27(28,1%)	0,11
Гидросальпингс	26(27,4%)	18(18,8%)	0,16
Осложненные формы воспалительных образований придатков матки (пиосальпингс, пиовар)	8(8,4%)	1(1%)	0,01
ИППП: Хламидиоз Сифилис	15 (16,4%) 9 (9,7%) 6 (6,7%)	3 (3,2%) 2(2,1%) 1(1,1%)	0,007
Миома матки	16 (16,8%)	10(10,4%)	0,19
Наружный генитальный эндометриоз	12(12,6%)	18(18,8%)	0,25
Киста яичника: Серозная цистаденома Киста желтого тела Фолликулярная киста Эндометриоидная киста	10 (10,5%) 2(2,1%) 1(1,1%) 1(1,1%) 6(6,3%)	8 (8,3%) 4(2,1%) 1(1%) - 5(5,2%)	0,59 0,34 0,65 0,45 0,89

Оперативные вмешательства на органах малого таза были выполнены у 62 из 95 (71%) ВИЧ-инфицированных женщин и у 60 из 96 (62,5%) – в группе контроля. Частота оперативных вмешательств была сопоставима между группами ($p=0,69$).

В структуре объема операций в обеих группах преобладала тубэктомия, причем чаще она проведена в группе женщин с ВИЧ-инфекцией (45,3% и 31,3%; $p=0,04$) (табл. 7). Показаниями для тубэктомии, как видно из таблицы 5, послужили гидросальпинкс (27,4%), осложненные формы

воспалительных образований придатков матки (8,4%) и трубная беременность (34,7%). Частота оперативных вмешательств на органах малого таза в связи с наружным генитальным эндометриозом (12,6% и 18,8%; $p=0,24$) и кистами яичников (10,5% и 8,3%; $p=0,24$) была сопоставима в обеих группах (21,1% и 24%; $p=0,04$). Почти у каждой второй пациентки основной группы (24,2%) и группы контроля (22,9%) в анамнезе был проведен сальпингоовариолиз ($p=0,83$). Одинаково часто в обеих группах встречались такие оперативные вмешательства, как реконструктивно-пластические операции на маточных трубах (6,3% и 4,2%; $p=0,50$), миомэктомия (10,5% и 5,2%; $p=0,17$) и коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза (12,6 и 17,7%; $p=0,32$). Ампутация шейки матки была проведена у 2 пациенток основной группы (2,1%): в 1 случае при CIN III (1,1%), и в 1 случае при раке шейки матки (1,1%). Конизация шейки матки была отмечена одинаково часто в обеих группах (2,1% и 2,1%; $p=0,99$).

Таблица 7 - Структура объема оперативных вмешательств на органах малого таза у обследуемых пациенток

Операции	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	p
Сальпингоовариолизис	23 (24,2%)	22 (22,9%)	0,83
Реконструктивно-пластические операции на маточных трубах	6 (6,3%)	4 (4,2%)	0,50
Тубэктомия	43 (45,3%)	30 (31,3%)	0,04
Операции на яичниках (резекция, диатермокоагуляция, овариоэктомия)	20 (21,1%)	23 (24%)	0,63
Миомэктомия	10(10,5%)	5 (5,2%)	0,17
Коагуляция очагов эндометриоза	12 (12,6%)	17 (17,7%)	0,32
Ампутация шейки матки	2 (2,1%)	0	0,15
Конизация шейки матки	2 (2,1%)	2 (2,1%)	0,99

У 6 (6,2%) пациенток основной группы были выполнены операции на органах брюшной полости: в 2 (2,1%) случаях по поводу острой кишечной непроходимости, в 4 (4,2%) - по поводу перитонита, в исходе острого аппендицита.

Гистероскопия была выполнена у 38 из 95 (40%) пациенток основной группы и у 35 из 96 (36,4%) группы контроля. У 12 из 38 (31,6%) пациенток с ВИЧ-инфекцией и у 9 из 35 (25,7%) контрольной группы патологии выявлено не было ($p=0,41$). У пациенток обеих групп была диагностирована следующая патология: полип эндометрия (39,8% и 45,7%), гиперплазия эндометрия (5,3% и 14,3%), хронический эндометрит (18,4 и 14,3 %) и у 1 пациентки основной группы обнаружен стеноз цервикального канала. Частота выявленной патологии была сопоставима в обеих группах ($p=0,41$).

Гистеросальпингография (ГСГ) была проведена 10 пациенткам из 95 (10,5%) основной группы, и в 50% случаев была диагностирована непроходимость маточных труб, что сопоставимо с контрольной группой ($p=0,13$), где исследованию подверглись 13 женщин из 96 (13,5%), непроходимость маточных труб выявлена у 8 пациенток (61,5%).

Неудачные программы ЭКО в анамнезе были у 12 пациенток (12,6%) с ВИЧ-инфекцией, и у 19 (19,8%) в группе контроля ($p=0,18$). У 4 пациенток (4,2%) основной группы и у 7 (7,3%) пациенток из группы контроля до обращения к нам были проведены эффективные программы ЭКО ($p=0,36$). При этом у 4 пациенток (100%) в группе с ВИЧ-инфекцией диагностирована неразвивающаяся беременность, в группе пациенток без ВИЧ-инфекции: у 4 (57,1%) – неразвивающаяся беременность, в 2 случаях (28,8%) - роды, и у 1 (14,3%) пациентки - внематочная беременность.

При анализе параметров спермограммы партнеров пациенток обеих групп статистически значимых различий выявлено не было. Как видно из представленных данных (табл. 8), у каждого второго мужчины в обеих группах наблюдалась нормозооспермия (58,9% и 55,2%, $p=0,78$). В структуре мужского фактора бесплодия преобладала астенозооспермия (12,6% и 10,4%;

$p=0,54$). У 3 (3,4%) пациенток в группе ВИЧ-положительных женщин и у 2 (2,1%) в группе контроля для оплодотворения была использована сперма после TEZA ($p=0,58$). Сперма донора использовалась у 9 (10,2%) пациенток основной группы, у 3 (3,1%) в контрольной ($p=0,05$).

Таблица 8 - Параметры спермограммы партнеров пациенток обеих групп

Параметры спермограммы	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	p
нормозооспермия	56 (58,9%)	53 (55,2%)	0,78
астенотератозооспермия	6 (6,3%)	7(7,3%)	0,86
астенозооспермия	12 (12,6%)	10 (10,4%)	0,54
тератозооспермия	6 (6,3%)	3 (3,1%)	0,24
олигоастенозооспермия	2 (2,1%)	11 (11,5%)	0,05
олигоастенотератозооспермия	8 (8,4%)	8 (8,3%)	0,38
азооспермия	3 (3,2%)	3 (3,1%)	0,85
олиготератозооспермия	1 (1,1%)	-	0,25
олигозооспермия	1 (1,1%)	1 (1%)	0,89

Таким образом, женщины обеих групп были сопоставимы по возрасту, ИМТ, факторам бесплодия и числу оперативных вмешательств, в том числе на яичниках. Пациентки с ВИЧ-инфекцией имели небольшой «стаж» заболевания и антиретровирусной терапии. Уровни CD4+ лимфоцитов в крови и неопределяемая вирусная нагрузка перед проведением программы ЭКО свидетельствовали о «благополучном» состоянии иммунной системы, несмотря на наличие ВИЧ-инфекции. У ВИЧ – инфицированных женщин отмечено более раннее начало половой жизни, большее число искусственных абортов и внематочной беременности. В структуре гинекологической патологии значимо чаще встречались осложненные формы гнойно-

воспалительных заболеваний придатков матки, остроконечные кондиломы и ИППП.

3.1.1 Анализ параметров овариального резерва у пациенток исследуемых групп

При анализе лабораторных показателей было выявлено, что концентрация АМГ была существенно ниже (1,5 и 2,8 нг/мл; $p < 0,001$) (рис. 5), а уровни ФСГ статистически значимо выше (7,4 и 6,3 МЕ/л; $p = 0,001$) в группе ВИЧ-инфицированных женщин по сравнению с серонегативными по ВИЧ пациентками. Значимых различий в уровнях ЛГ (5,5(4;7,7) и 5,1(3,4;6,7); $p = 0,15$) и E_2 (137,5(77,6;211,3) и 160(107;202); $p = 0,32$) выявлено не было (таб. 9).

Таблица 9 - Концентрация гормонов у пациенток с ВИЧ-инфекцией и серонегативных по ВИЧ женщин

Параметры	ВИЧ «+» n=95	ВИЧ «-» n=96	P
АМГ, нг/мл*	1,5(0,8-3,1)	2,8(1,9-5,7)	<0,001
ФСГ, МЕ/л*	7,4(6,1-9,4)	6,3(5,2-7,3)	0,001
ЛГ, МЕ/л*	5,5(4-7,7)	5,1(3,4-6,7)	0,15
E_2 , пмоль/л*	137,5(77,6-211,3)	160(107-202)	0,32

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

При оценке силы взаимосвязи выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем АМГ и длительностью приема АРВТ ($r = -0,251$; $p = 0,008$) (рис. 5).

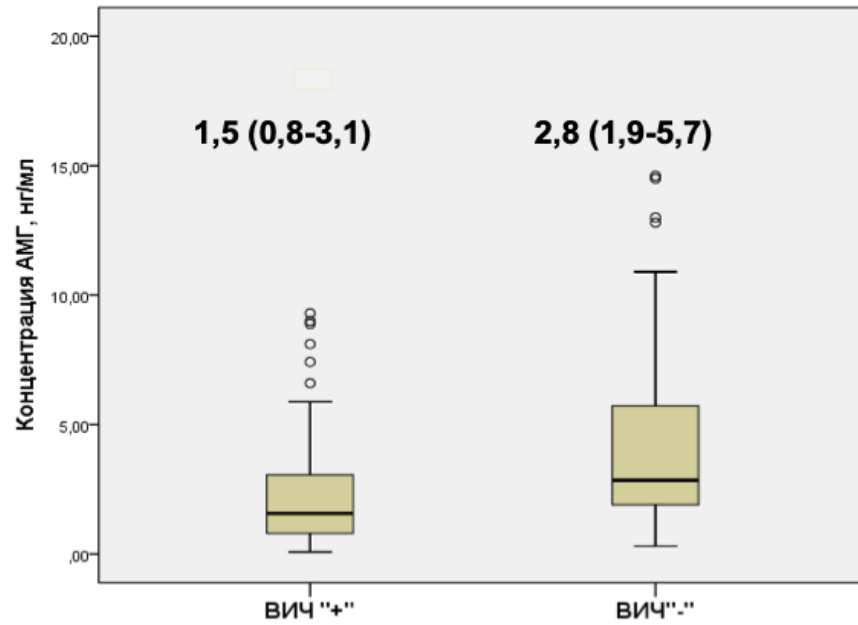


Рисунок 5. Концентрация АМГ у ВИЧ-инфицированных женщин и в группе контроля

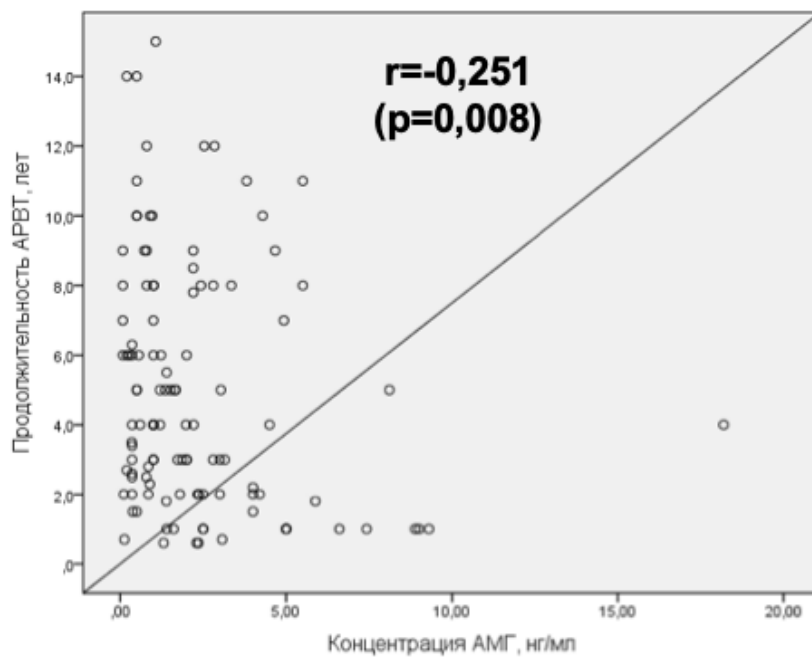


Рисунок 6. Корреляционный анализ уровня АМГ и длительности АРВТ у ВИЧ – положительных женщин

Важно отметить, что при продолжительности АРВТ до 1 года концентрация АМГ была сопоставима с контрольной группой (3,07 нг/мл

(1,9;7) и 2,9 нг/мл (1,9;5,8); $p=0,75$). При приеме АРВТ в течение от 1 года до 5 лет медиана уровня АМГ составила 1,2 нг/мл (0,4;2,5), что было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (2,9 нг/мл (1,9;5,8); $p<0,001$). В случае длительности терапии более 5 лет этот показатель также был существенно ниже, чем в группе пациенток без ВИЧ-инфекции 1,0 нг/мл (0,5;2,4) $p<0,001$ (рис.7).

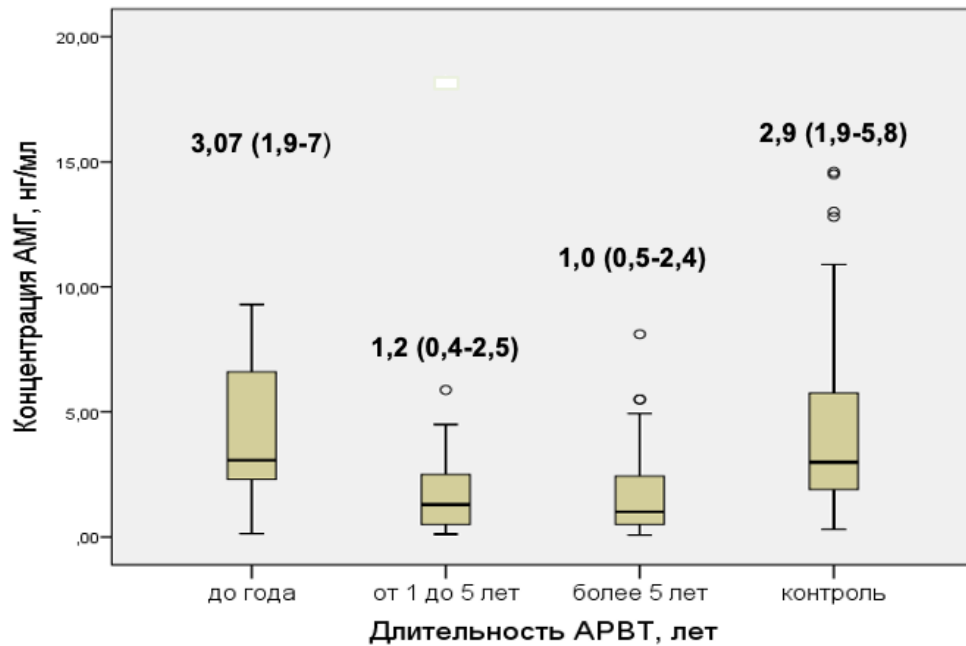


Рисунок 7. Концентрация АМГ в зависимости от длительности АРВТ.

Корреляции между уровнем АМГ и «стажем» ВИЧ-инфекции ($r=-0,003$; $p=0,97$), а также значениями CD4+ лимфоцитов ($r=-0,025$; $p=0,80$) выявлено не было.

Количество антральных фолликулов у ВИЧ-инфицированных женщин было существенно ниже по сравнению с пациентками без ВИЧ-инфекции (7 (2,5;13) и 12 (6,5;18) $p=0,001$).

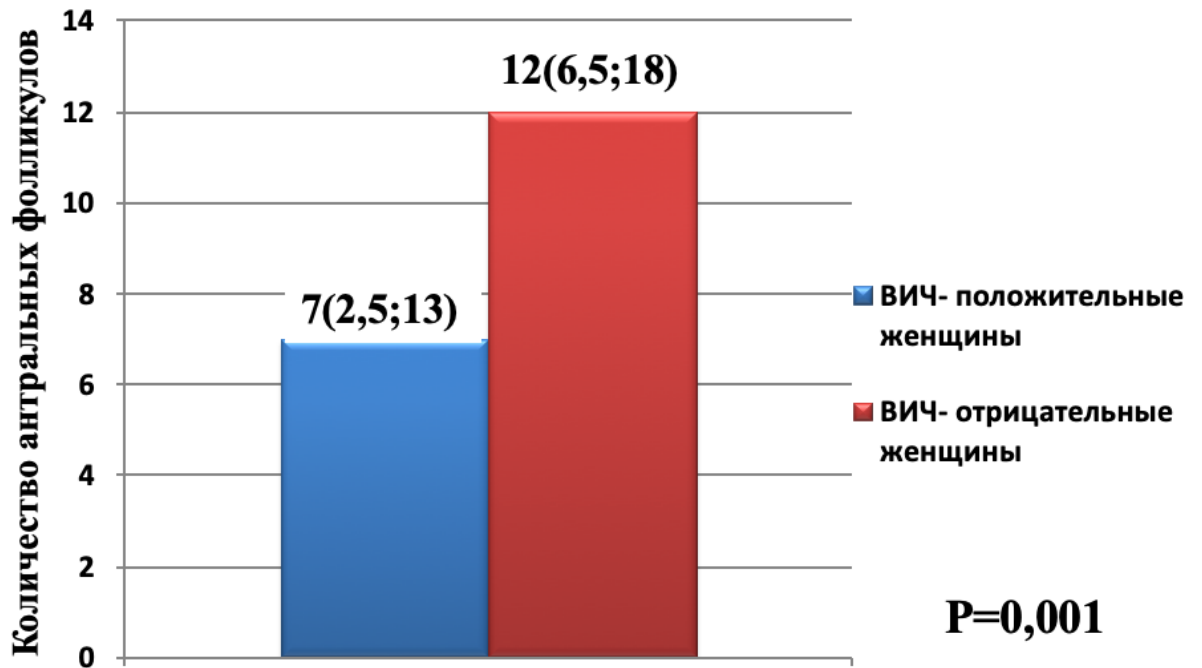


Рисунок 8. Количество антральных фолликулов у женщин с ВИЧ-инфекцией и группы контроля

Таким образом, не смотря на то, что уровни АМГ у женщин с ВИЧ – инфекцией находились в пределах референсных значений, они были значимо ниже по сравнению с ВИЧ-серонегативными пациентками и имели обратную зависимость от длительности АРВТ. Существенное снижение концентрации АМГ наблюдалось после 1 года приема АРВТ. У женщин с ВИЧ-инфекцией снижено количество антральных фолликулов в обоих яичниках.

3.2 Клинико-anamнестические данные и лабораторные параметры супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчин

Анализ клинико – анамнестических данных показал, что медиана возраста ВИЧ-инфицированных мужчин составила 37 лет (33;39). Диагноз ВИЧ-инфекции был поставлен в среднем в возрасте 29 лет (26;32), «стаж» заболевания составил 5 лет (2;11). Путь инфицирования был неизвестен у 60

(63,8%) пациентов, 10 (10,6%) – указывали на употребление наркотиков, в 24 (25,5%) случаях отмечен половой путь инфицирования.

Преобладала 3 субклиническая стадия заболевания (64,9%). Пациенты со стадией заболевания 4а (23,4%), 4б (4,3%) и 4в (7,5%) находились в фазе ремиссии не менее 6 месяцев (рис. 10).

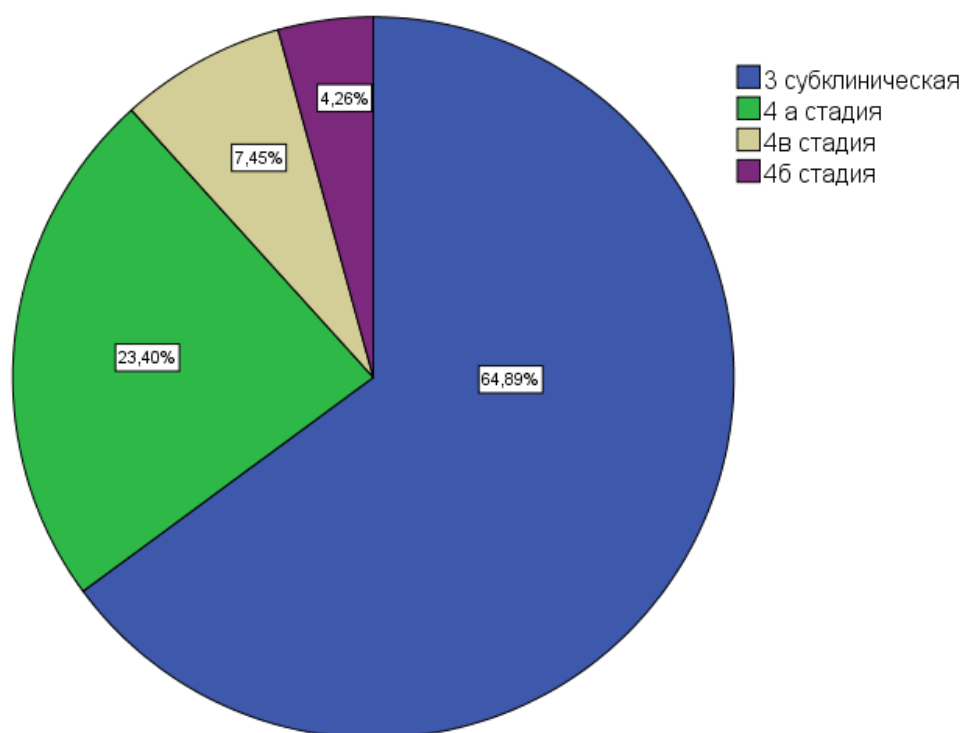


Рисунок 9. Стадии ВИЧ – инфекции у мужчин, участвующих в исследовании

Комбинированную АРВТ получали 79 из 94 пациентов (84%), из них 38 (48,1%) принимали препараты группы НИОТ в сочетании с ННИОТ, 35 (44,3%) - НИОТ + ИП, 5 (6,3%) пациентов – НИОТ+ингибиторы интегразы (ИИ) и 1 (1,3%) пациент - три препарата группы НИОТ. Медиана продолжительности приема препаратов составила 2 года (1;5). Иммунологический статус ВИЧ-серопозитивных пациентов представлен в таблице 9. Уровни CD3+лимфоцитов (1317,5 (214,9;1680)), CD4+лимфоцитов (535 (383;679)), CD8+ лимфоцитов (868 (696;1060)) и

иммунореактивный индекс (0,56 (0,44;0,74)) свидетельствуют о «благополучном» состоянии иммунной системы.

Таблица 10 - Иммунологический статус мужчин с ВИЧ-инфекцией

Параметры	ВИЧ-инфицированные пациента n=94
CD3+, мкл в 1 кл	1317,5 (214,9;1680)
CD3+, %	78,3 (71,1;85,7)
CD4+, мкл в 1 кл	535 (383;679)
CD4+,%	25,5 (20,2;31)
CD8+, мкл в 1 кл	868 (696;1060)
CD8+,%	43 (38,5;50,5)
Иммунореактивный индекс	0,56 (0,44;0,74)

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

У 31 из 94 (32,9%) ВИЧ-серопозитивных мужчин выявлен сопутствующий гепатит С.

Барьерную контрацепцию презервативом использовали 45 пациентов (47,9%), зачатие в перiovуляторные дни – 5 пациентов (5,3 %), не применяли методов контрацепции – 44 (46,8%). Таким образом, в каждом третьем случае в паре с ВИЧ-инфицированным партнером программа ЭКО проводилась по эпидемиологическим показаниям.

В группе ВИЧ-положительных мужчин распространенность мужского бесплодия составила 30,1%, трубно-перитонеального – 25,4%, эндокринного – 3,1% , сочетанного – 15,8%, неясный генез встречался в 6,3% случаев (рис.10).

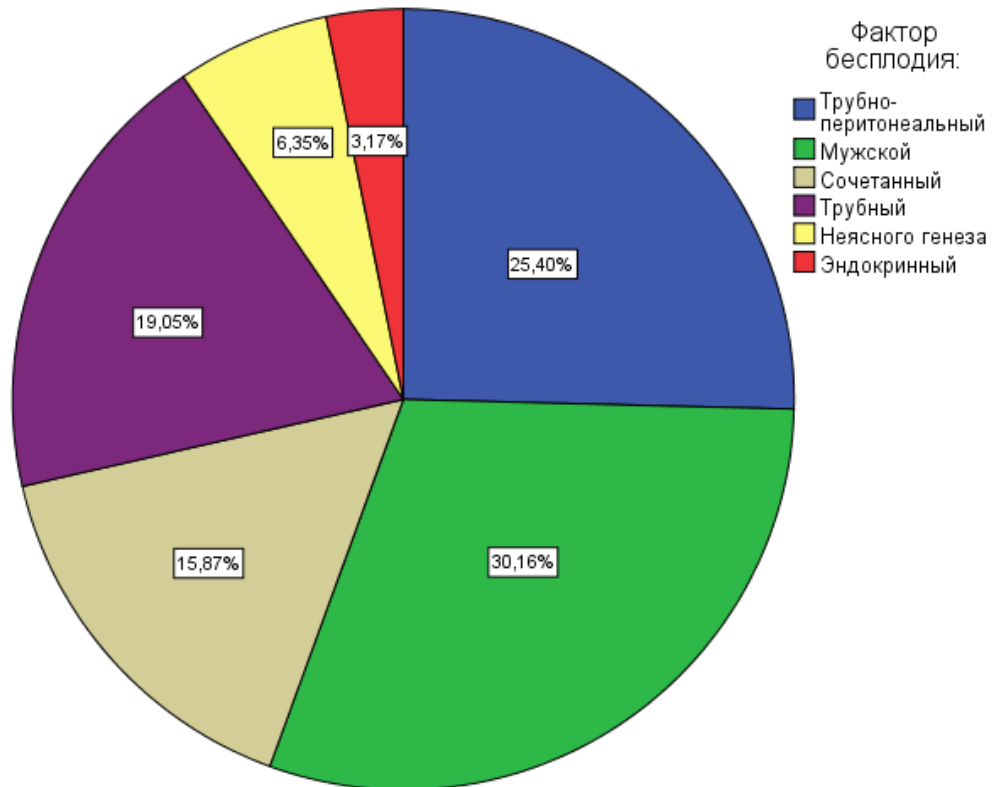


Рисунок 10. Распространенность факторов бесплодия в парах с ВИЧ-инфекцией у мужчины

В группе контроля чаще всего диагностирован трубно-перитонеальный фактор бесплодия (30,6%), распространенность мужского бесплодия составила 24%, сочетанного – 18,6%, эндокринного – 4%, неясный генез встречался в 14,6 % случаев. Различий между факторами бесплодия в обеих группах выявлено не было ($p=0,26$).

Далее из основной группы была исключена 31 пара с коинфекцией гепатитом С.

Анализ клинико-anamnestических данных показал, что пациентки из супружеских пар обеих групп были сопоставимы по возрасту (33 и 32 года; $p=0,42$), возрасту менархе (13 и 13 лет; $p=0,33$), длительности менструального цикла (28 и 28 дней; $p=0,87$) и продолжительности бесплодия (4 и 4 года; $p=0,99$) (табл. 11).

Таблица 11 - Клинико-лабораторная характеристика пациенток из супружеских пар с ВИЧ-положительным партнером и контрольной группы

Параметры	ВИЧ «+» n=63	ВИЧ «-» n=75	P
Возраст, лет	33 (30;37)	32 (30;35)	0,42
Возраст менархе (лет)	13 (12;14)	13(12;14)	0,33
Длительность цикла(дней)	28 (29;30)	28 (29;30)	0,87
Начало половой жизни (лет)	18 (17;20)	18 (17;20)	0,63
Длительность бесплодия, лет	4 (2;7)	4 (3;6)	0,99
ИМТ, кг/м ²	24,2(20;27,6)	23(21;25,2)	0,37
АМГ, нг/мл	2,9(1,3;5,1)	2,8(1,9;5,7)	0,56
ФСГ, МЕ/л	7,2(5,5;9,1)	6,3(5,1;8,0)	0,27
ЛГ, МЕ/л	5,2(3,5;7,3)	4,4(3,3;6,7)	0,39
Е2, пмоль/л	105,5(40,9;196,3)	104(45;165)	0,42

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Также пациентки обеих групп были сопоставимы по ИМТ и уровням гормонов: АМГ, ФСГ, ЛГ, и Е2.

В структуре гинекологической патологии у женщин в парах с ВИЧ-инфицированным мужчиной не было выявлено статистически значимых различий (табл. 12).

Таблица 12 - Структура гинекологических заболеваний пациенток из супружеских пар с ВИЧ-положительным партнером и контрольной группы

Параметры	ВИЧ «+» n=63	ВИЧ «-» n=75	p
Патология шейки матки	8 (12,6%)	5(6,7%)	0,13
Хронический сальпингоофорит	17(26,9%)	22(29,3%)	0,71
Гидросальпингс	4(6,3%)	5(6,7%)	0,75
Миома матки	7 (11,1%)	8(10,7%)	0,54
Наружный генитальный эндометриоз	8(12,7%)	13(17,3%)	0,88
Киста яичника	19(10,5%)	15 (8,3%)	0,14

Оперативные вмешательства на органах малого таза были выполнены статистически значимо чаще в группе контроля, а именно у 41 из 63 (54,7%), в отличие от женщин в группе с ВИЧ-положительным мужчиной (17 из 63 (26,9%) ($p=0,03\%$).

В структуре объема оперативных вмешательств (табл.13) в основной группе одинаково часто встречались сальпингоовариолизис (12,7%) и коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза (12,6%), в контрольной группе частота данных вмешательств составила 20 % и 17,3%, соответственно ($p=0,60$; $p=0,88$). Операции на яичниках проводились в 28% случаев в контрольной группе и только в 7% в основной группе ($p=0,07$). Менее распространенным и сопоставимыми по частоте встречаемости в обеих группах были следующие оперативные вмешательства: тубэктомия (9,5% и 22,7%; $p=0,14$) и миомэктомия (6,3% и 6,7%; $p=0,75$), пластика маточных труб (1,6% и 0%; $p=0,21$).

Таблица 13 - Объем оперативных вмешательств у пациенток из супружеских пар с ВИЧ-положительным партнером и контрольной группы

Операции	ВИЧ «+» n=63	ВИЧ «-» n=75	p
Сальпингоовариолизис	8 (12,7%)	15 (20%)	0,60
Пластика маточных труб	1(1,6%)	-	0,21
Тубэктомия	6 (9,5%)	17 (22,7%)	0,14
Операции на яичниках (резекция, диатермокоагуляция, овариоэктомия)	7 (11,1%)	21 (28%)	0,07
Миомэктомия	4(6,3%)	5 (6,7%)	0,75
Коагуляция очагов эндометриоза	8 (12,6%)	13 (17,3%)	0,88

Гистероскопия была выполнена у 15 из 63 (23,8%) пациенток основной группы и у 23 из 75 (30,6%) группы контроля. У 2 из 15 (13,3%) пациенток

основной и у 5 из 23 (21,7%) контрольной группы патологии выявлено не было ($p=0,41$). У пациенток обеих групп была диагностирована следующая патология: полип эндометрия (40% и 65,1%), гиперплазия эндометрия (13,3% и 4,3%), хронический эндометрит (5 и 2 %). Частота выявленной патологии была сопоставима в обеих группах ($p=0,27$).

Таким образом, анализ клинико – анамнестических и лабораторных данных показал, что пациентки обеих групп находились в репродуктивном возрасте и были сопоставимы по факторам бесплодия, показателям овариального резерва, структуре гинекологических заболеваний и объему оперативных вмешательств в анамнезе.

3.2.1 Параметры спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, использующих АРВТ

На данном этапе работы мы провели сравнительный анализ показателей спермограммы у 51 пациента с ВИЧ-инфекцией, принимающих АРВТ с нормальными показателями спермограммы по критериям ВОЗ (2010г) у 64 серонегативных по ВИЧ пациента. Проведена оценка 97 и 111 образцов спермы соответственно.

При анализе результатов спермограмм было показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов в 48,4 % случаев (47 из 97 образцов спермы) наблюдается нормозооспермия. В структуре патозооспермии (рис. 11) преобладала тератозооспермия (40%), в 22% и 16 % случаев наблюдалась олигоастенотеротозооспермия и астенотератозооспермия соответственно. Другая патология спермы (астенозооспермия – 8%, олигоастенозооспермия – 4%, олигозооспермия – 2%, азооспермия – 4%) встречалась существенно реже.

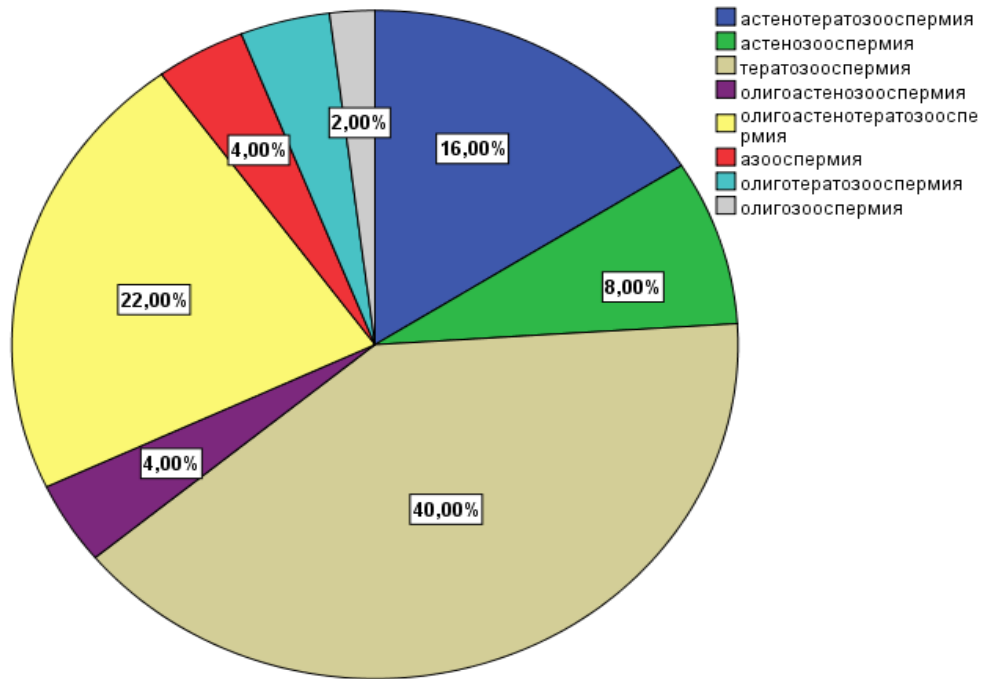


Рисунок 11. Структура патозооспермии у мужчин с ВИЧ-инфекцией, принимающих АРВТ

Пациенты основной и контрольной групп были сопоставимы по возрасту (36 (33;39) и 36 лет (32;37,5); $p=0,54$). Как видно из представленных в таблице 13 данных, количество лейкоцитов (0,2 млн (0,1;0,8) и 0,2 млн (0,1;0,7); $p=0,51$), круглых клеток (0,4 (0,2;1,1) и 0,5(0,3;1,3); $p=0,10$), уровень рН (7,5(7,3;7,7) и 7,6(7,3;7,8); $p=0,35$), число непрогрессивно-подвижных форм сперматозоидов (7 % (5;11) и 7% (5;9); $p=0,176$ и MAR – тест (7 % (1;15) и 4 % (0;13,7); $p=0,47$) находились в пределах нормативных значений и были одинаковы в обеих группах (табл.14).

Другие параметры не имели существенных отклонений от нормы, однако объем эякулята (2,7 (2;3,4) и 3,1 (2,3;4), $p=0,003$), общее количество сперматозоидов (89,1 (47,3;153) и 198,8 (138,5;272,8), $p<0,001$), концентрация (36 (21;52) и 63,5 (46;91), $p<0,001$), количество прогрессивно – подвижных (40 (31;53) и 55 (48,7;62,2), $p<0,001$) и жизнеспособных (78 (71,5;81) и 84(82;87), $p<0,001$) было статистически значимо ниже, а число неподвижных (50 (39;55,5) и 38 (31,7;2,2), $p<0,001$) существенно выше, чем в группе мужчин с нормозооспермией.

Доля патологических форм сперматозоидов у ВИЧ – инфицированных мужчин была существенно выше по сравнению с ВИЧ-серонегативными здоровыми мужчинами (97% (96;98) и 96% (95;96); $p < 0,001$). Более того, при проведении корреляционного анализа установлена умеренная отрицательная взаимосвязь числа аномальных сперматозоидов и уровня CD⁺ лимфоцитов ($r = -0,362$; $p = 0,02$).

Таблица 14 - Показатели спермограммы ВИЧ-инфицированных мужчин, получающих АРВТ в сравнении со здоровыми ВИЧ-негативными пациентами

Показатель	ВИЧ «+» n= 97	ВИЧ «-» n= 111	P
Объем	2,7 (2,0;3,4)	3,1 (2,3;4,1)	0,003
Лейкоциты	0,2 (0,1;0,8)	0,2 (0,1;0,7)	0,51
Круглые клетки	0,4 (0,2;1,1)	0,5(0,3;1,3)	0,10
Общее количество	89,1 (47,3;153,0)	198,8(138,5;272,8)	<0,001
Концентрация в 1 мл	36(21;52)	63,5(46;91)	<0,001
pH	7,5(7,3;7,7)	7,6(7,3;7,8)	0,35
Прогрессивно-подвижные (категория А)	10(5;16)	17(14,7;21)	<0,001
Прогрессивно-подвижные (категория В)	31(22,7;38)	38(33;42,2)	<0,001
А+В	40(31;53)	55(48,7;62,2)	<0,001
Непрогрессивно-подвижные	7(5;11)	7(5;9)	0,17
PR+NP	50(44;59)	61,5(57;68,2)	<0,001
Неподвижные	50(39;55,5)	38(31,7;42,2)	<0,001
Жизнеспособные	78(71,5;81)	84(82;87)	<0,001
Патологические формы	97(96;98)	96(95;96)	<0,001
MAR тест	7(1;15)	4(0;3,7)	0,47

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Далее в основной группе исследования проведена оценка силы взаимосвязи между показателями спермы, которые существенно отличались от нормозооспермии, и длительностью заболевания, АРВТ, уровнями CD4+лимфоцитов в крови (табл. 15). Была выявлена статистически значимая отрицательная взаимосвязь между длительностью заболевания и концентрацией ($r = -0,242$; $p = 0,02$), числом прогрессивно–подвижных

категории «в» ($r=-0,241$; $p=0,02$), прогрессивно–подвижных + непрогрессивно–подвижных сперматозоидов (PR+NP) ($r=-0,276$; $p=0,01$). Также обнаружена положительная корреляция между длительностью ВИЧ-инфекции и количеством неподвижных сперматозоидов ($r = 0,220$; $p=0,04$).

Длительность АРВТ отрицательно коррелировала с числом прогрессивно–подвижных сперматозоидов категории «в» ($r=-0,224$; $p=0,03$) и PR+NP ($r=-0,255$; $p=0,02$). Обнаружена статистически значимая положительная взаимосвязь между количеством прогрессивно–подвижных сперматозоидов категории «в» ($r=0,294$; $p=0,03$) и уровнем CD4+ лимфоцитов.

Таблица 15 - Корреляционная зависимость между параметрами спермограммы ВИЧ-инфицированных пациентов и длительностью заболевания, АРВТ, уровнями CD4+лимфоцитов

Показатель	«Стаж» ВИЧ- инфекции*	р	Длительность АРВТ*	р	Уровень CD4+*	Р
Объем	0,021	0,84	-0,151	0,15	0,238	0,08
Общее количество	-0,226	0,06	-0,129	0,23	-0,076	0,59
Концентрация	-0,242	0,02	-0,078	0,45	-0,178	0,18
Прогрессивно- подвижные (категория А)	-0,150	0,16	-0,153	0,15	-0,257	0,06
Прогрессивно- подвижные (категория В)	-0,241	0,02	-0,224	0,03	0,294	0,03
А+В	-0,141	0,17	-0,108	0,30	0,001	0,99
PR+NP	-0,276	0,01	-0,255	0,02	-0,051	0,72
Неподвижные	0,220	0,04	0,126	0,24	-0,034	0,81
Жизнеспособные	-0,195	0,42	-0,191	0,43	0,180	0,67
Патологические	0,122	0,34	0,175	0,17	-0,362	0,02
Фрагментация ДНК сперматозоидов	0,200	0,49	0,504	0,06	-0,097	0,78

*коэффициент корреляции Спирмена

Оценка процента фрагментации ДНК сперматозоидов показала, что данный показатель был существенно выше у ВИЧ – инфицированных

пациентов, по сравнению со здоровыми ВИЧ – отрицательными мужчинами (15,8 % (12,4;23) и 9,95% (7,32;12,4); $p=0,001$). Значимой взаимосвязи между уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и длительностью заболевания ($r=0,200;p=0,49$), уровнем CD4+ лимфоцитов ($r=-0,097;p=0,78$) выявлено не было. Имеется тенденция к корреляции уровня фрагментации ДНК сперматозоидов с продолжительностью АРВТ ($r=0,504;p= 0,06$). Однако данный показатель статистически не значим.

Таким образом, у ВИЧ – инфицированных пациентов, принимающих АРВТ, повышалась фрагментация ДНК сперматозоидов и увеличивалось число патологических форм сперматозоидов. Доля аномальных форм сперматозоидов была выше при низких показателях CD4+ лимфоцитов. Концентрация сперматозоидов снижалась, а количество их неподвижных форм увеличивалось при длительном «стаже» ВИЧ-инфекции. АРВТ оказывало негативное влияние на подвижность сперматозоидов.

3.2.2 Параметры спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, в зависимости от использования АРВТ

Мы провели клинико-anamнестический анализ группы мужчин с ВИЧ-инфекцией, не использующих АРВТ. Медиана возраста мужчин в данной группе составила 33 года (31;39), а «стаж» ВИЧ-инфекции на момент включения в исследование составил 2,5 года (0,4;4,5). Путь инфицирования в группе пациентов с ВИЧ-инфекцией, не использующих АРВТ был неизвестен у 12 (80%) пациентов, в 3 (20%) случаях был зарегистрирован половой путь передачи; 3 субклиническую стадию заболевания (80%) имели 12 пациентов, остальные 3 пациента – стадию заболевания 4а (20%).

Медиана вирусной нагрузки в группе пациентов, не применяющих АРВТ, составила 19957,5 копий/мл (1800;39982,75); 1 пациент из 15 имел неопределяемый уровень вирусной нагрузки (6,7%). В группе пациентов без АРВТ уровень CD4+ составил 452 мкл в 1 кл (382;663); CD8+ - 965 мкл в 1 кл (769;1162); иммунореактивный индекс - 0,5 (0,33;0,59).

Далее мы провели сравнительный анализ показателей спермограммы у 51 пациента с ВИЧ-инфекцией, принимающих АРВТ и у 15 мужчин с ВИЧ-инфекцией, не получающих терапию. Проведена оценка 97 и 25 образцов спермы соответственно.

В группе пациентов, использующих АРВТ, в структуре патозооспермии преобладала тератозооспермия (40%), а в 22% и 16 % случаев наблюдалась олигоастенотеротозооспермия и астенотератозооспермия соответственно. Другая патология спермы (астенозооспермия – 8%, олигоастенозооспермия – 4%, олигозооспермия – 2%, азооспермия – 4%) встречалась существенно реже. В группе пациентов, не использующих АРВТ, преобладала нормозооспермия (80 %). Патология спермы встречалась лишь в 20 % случаев: 4% - астенотератозооспермия; 4% - астенозооспермия; 12% - тератозооспермия. Таким образом, патозооспермия встречалась статистически значимо чаще в группе пациентов, принимающих АРВТ (80% и 20%; $p=0,001$).

В группе ВИЧ-положительных пациентов, не использовавших АРВТ выявлено статистически значимо повышение общего количества сперматозоидов (89,1 (47,3;153,0) и 154,1 (89;266); $p=0,006$), их концентрация (36(21;52) и 64 (42,5;88); $p<0,001$) и количество жизнеспособных (78(71,5;81)и 83 (79;87); $p=0,003$) форм (табл.16).

Таблица 16 - Показатели спермограммы у ВИЧ-инфицированных мужчин

Показатель	ВИЧ «+» с АРВТ n= 97	ВИЧ «+» без АРВТ n= 25	p
Объем	2,7 (2,0;3,4)	3(2;3,9)	0,36
Лейкоциты	0,2 (0,1;0,8)	0,1(0,1;0,35)	0,08
Круглые клетки	0,4 (0,2;1,1)	0,4(0,1;0,65)	0,36
Общее количество	89,1 (47,3;153,0)	154,1(89;266)	0,006
Концентрация в 1 мл	36(21;52)	64(42,5;88)	<0,001
pH	7,5(7,3;7,7)	7,45(7,2;7,5)	0,29
Прогрессивно-подвижные (категория А)	10(5;16)	15(7,75;21)	0,06

Прогрессивно-подвижные (категория В)	31(22,7;38)	34(22,75;38)	0,36
А+В	40(31;53)	48(35,5;52,6)	0,21
Непрогрессивно-подвижные	7(5;11)	7(4;10)	0,55
Общая подвижность (PR+NP)	50(44;59)	56(47,2;61,7)	0,12
Неподвижные	50(39;55,5)	44(38,7;53)	0,35
Жизнеспособные	78(71,5;81)	83(79;87)	0,003
Патологические	97(96;98)	96(94,5;96,5)	0,006
Фрагментация ДНК	15,8(12,4;23)	14(10,9;20,5)	0,53

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Количество патологических форм сперматозоидов было статистически значимо выше в группе пациентов, принимающих АРВТ (97 (96;98) и 96 (94,5;96,5); $p=0,006$). Более того, при проведении корреляционного анализа установлена умеренная отрицательная взаимосвязь числа аномальных сперматозоидов и уровня CD4+ лимфоцитов ($r = -0,362$; $p=0,02$).

В группе пациентов без АРВТ, была выявлена статистически значимая положительная взаимосвязь между уровнем CD4+ лимфоцитов, объемом эякулята ($r=0,778$; $p=0,01$) и количеством прогрессивно-подвижных сперматозоидов категории «в» ($r=0,667$; $p=0,05$) (рис. 12). Также была обнаружена статистически значимая отрицательная взаимосвязь уровня вирусной нагрузки и объема эякулята ($r = -0,669$; $p=0,03$) (рис. 13).

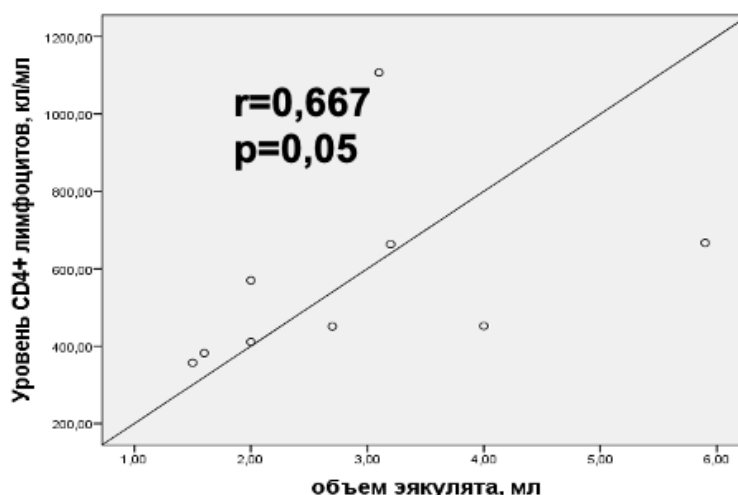


Рисунок 12. Корреляционный анализ уровня CD4+ лимфоцитов и объема эякулята у ВИЧ – инфицированных мужчин, не получающих АРВТ

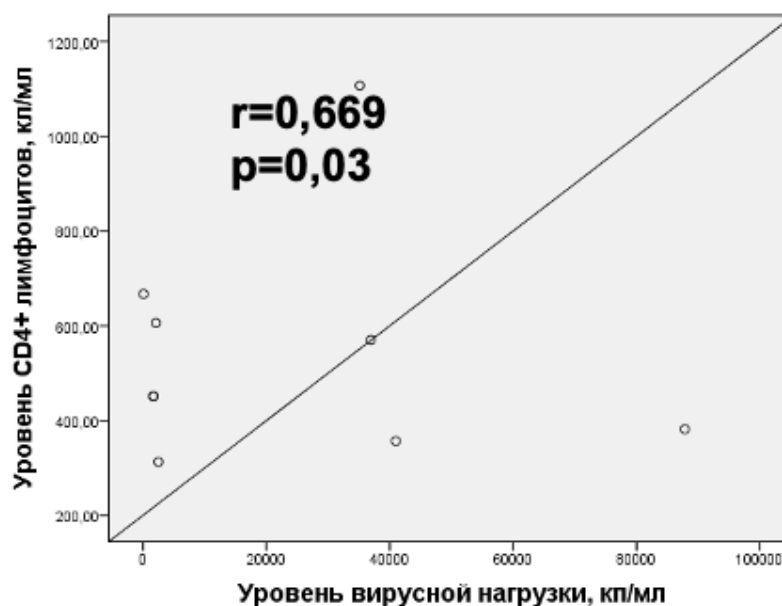


Рисунок 13. Корреляционный анализ уровня CD4+ лимфоцитов и объема вирусной нагрузки у ВИЧ – инфицированных мужчин, не получающих АРВТ

При оценке процента фрагментации ДНК сперматозоидов было выявлено, что данный показатель был выше у ВИЧ – инфицированных пациентов, принимающих АРВТ по сравнению с ВИЧ – положительными мужчинами, не использовавшими терапию (15,8 % (12,4;23) и 14% (10,9;20,5); $p=0,53$). Однако статистически значимых отличий выявлено не было. Значимой взаимосвязи между индексом фрагментации ДНК сперматозоидов и длительностью заболевания ($r=0,200;p=0,49$ и $r=-0,371;p=0,46$), уровнем CD4+ лимфоцитов ($r=-0,097;p=0,78$ и $r=0,400;p=0,60$) в обеих группах выявлено не было.

Таким образом, АРВТ при ВИЧ – инфекции у мужчин оказывало негативное влияние на показатели спермограммы. Объем эякулята и количество прогрессивно–подвижных сперматозоидов категории «в» зависило от состояния иммунной системы и уровня вирусной нагрузки в крови.

3.3. Анализ основных параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа и исходы программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у женщины

На данном этапе работы мы провели сравнительный анализ параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа у 70 женщин с ВИЧ-инфекцией (группа 1а) и у 96 пациенток – без ВИЧ-инфекции (группа 1б). В 1а группе проведено 89 стимулированных цикла и 72 криопротокола, в 1б – 113 стимулированных циклов и 56 криопротокола, соответственно.

Анализ параметров «свежего» цикла у пациенток с ВИЧ-инфекцией не выявил существенных различий в стартовой (225(168,7;300) и 225(225;225); $p=0,07$) и суммарной дозе гонадотропинов (2100 (1612;2475) и 1950 (1650;2250); $p=0,07$), а также продолжительности стимуляции (10 (9;10) и 10 (9;10); $p=0,17$) по сравнению с контрольной группой. Частота использования различных препаратов гонадотропинов и протоколов стимуляции так же была сопоставима в обеих группах (табл. 17).

Таблица 17 - Особенности протоколов стимуляции овуляции в группах сравнения

Показатели	ВИЧ «+» (n=89)	ВИЧ «-» (n=113)	p
Вид протокола			
Протокол с антГнРГ, %	78 (76,4%)	90 (79,6%)	0,20
Модифицированный протокол с антГнРГ, %	14 (15,7%)	15(13,3%)	
Длинный протокол, %	4 (4,4%)	8 (7,1%)	
ЭКО в естественном цикле, %	3 (3,4%)	0	
Вид ГТ			
Менотропины, %	7(8,1%)	7(6,2%)	0,38
рФСГ, %	19 (22,1%)	29(25,7%)	
Комбинация рФСГ/менотропины, %	46(53,6%)	67 (59,3%)	
Корифоллитропин альфа, %	14(16,3%)	10(8,8%)	
Длительность стимуляции, дней*	10 (9;10)	10 (9;10)	0,17

Стартовая доза гонадотропинов, МЕ*	225(168,7;300)	225(225;225)	0,07
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ*	2100 (1612;2475)	1950 (1650;2250)	0,15

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Анализ эмбриологического этапа показал (таб. 18), что у пациенток с ВИЧ-инфекцией было получено меньшее количество ооцитов (6(3;11) и 10(7;15,5); $p < 0,001$), зрелых ооцитов (5(2;10) и 8 (5;12); $p < 0,001$), зигот (4(2;7) и 7 (4;10); $p < 0,001$), эмбрионов на стадии дробления (4(2;7) и 6 (4;10); $p < 0,001$), бластоцист (1(0;3) и 3(1;6); $p < 0,001$) и криоконсервированных эмбрионов (1(0;2) и 2(0;4); $p = 0,02$) по сравнению с контрольной группой. Отмечено существенно меньшее количество бластоцист отличного (18(20,2%) и 48(42,9%); $p = 0,001$), хорошего (43(48,3%) и 69(61,6%); $p = 0,05$) и удовлетворительного качества (36(40,4%) и 67 (59,6%); $p = 0,006$) у ВИЧ-инфицированных пациенток, в отличие от группы женщин без ВИЧ-инфекции.

Таблица 18 - Характеристика основных параметров эмбриологического этапа у пациенток с ВИЧ-инфекцией и серонегативных по ВИЧ женщин

Параметры	ВИЧ «+» (n=89)	ВИЧ «-» (n=113)	p
Получено ооцитов*	6(3;11)	10 (7;15,5)	<0,001
Количество зрелых ооцитов (MII)*	5(2;10)	8(5;12)	<0,001
Количество зигот (2 PN)*	4(2;7)	7(4;10)	<0,001
Аномальное оплодотворение (3и > PN)	0,24(0,9)	0,08(0,2)	0,08
Количество эмбрионов на стадии дробления*	4(2;7)	6(4;10)	<0,001
Количество бластоцист*	1(0;3)	3(1;6)	<0,001
Число криоконсерв. эмбрионов*	1(0;2)	2 (0;4)	0,02
Качество эмбрионов			
Отличные	18(20,2%)	48(42,9%)	<0,001
Хорошие	43(48,3%)	69(61,6%)	0,05
Удовлетворительные	36(40,4%)	67(59,8%)	0,006

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль

Перенос эмбриона был выполнен в 52 из 89 (85%) стимулированных циклов у ВИЧ-инфицированных пациенток и в 96 из 113 (58,4%) циклов в контрольной группе. Селективный перенос одного эмбриона проводился в 100% случаев. День переноса в группе 1а составил 4,5 (3;5), в группе 1б - 5 (4;5).

Перенос эмбриона не осуществлялся в 36 из 89 (40,4%) «свежих» циклов в группе ВИЧ – инфицированных женщин и в 16 из 113 (14%) циклов в контрольной группе ($p=0,08$). В основной группе пациенток в 3 (8,3%) случаях ооциты не были получены, в 5 (13,9%) – полученные ооциты не оплодотворились. Причинами отмены переноса в основной группе также послужили: в 10 (62,5%) случаях в связи с риском развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ); в 6 (16,7%) – с плохим качеством полученных эмбрионов; 5 (13,9%) – с сегментацией цикла и накоплением эмбрионов; в 4 (11,1%) – необходимостью для последующей криоконсервации по причине проведения предимплантационной генетической диагностики (ПГД); в 3 (8,3%) – с тонким эндометрием. В группе серонегативных женщин отмена переноса наблюдалась в 10 (27,8%) случаях в связи с риском развития СГЯ, в 4 (25%) – по причине проведения ПГД, в виду отсутствия эмбрионов пригодных к переносу - в 1 случае (6,3%) и сегментации цикла также в 1 случае (6,3%).

Анализ исходов «свежих» циклов показал (рис. 14), что у пациенток с ВИЧ-инфекцией по сравнению с серонегативными по ВИЧ женщинами выявлена более низкая частота биохимической (10(19,2%) и 35(36,5%), $p=0,03$) и клинической (6(11,5%) и 30(31,3%), $p=0,008$) беременности, а также родов (4(7,7%) и 25 (23,9%); $p=0,007$). Не было выявлено различий в частоте неразвивающейся беременности (2(3,8%) и 6(6,2%); $p=0,92$) и позднего самопроизвольного выкидыша (0 (0%) и 1(1%); $p=0,46$) в обеих группах.

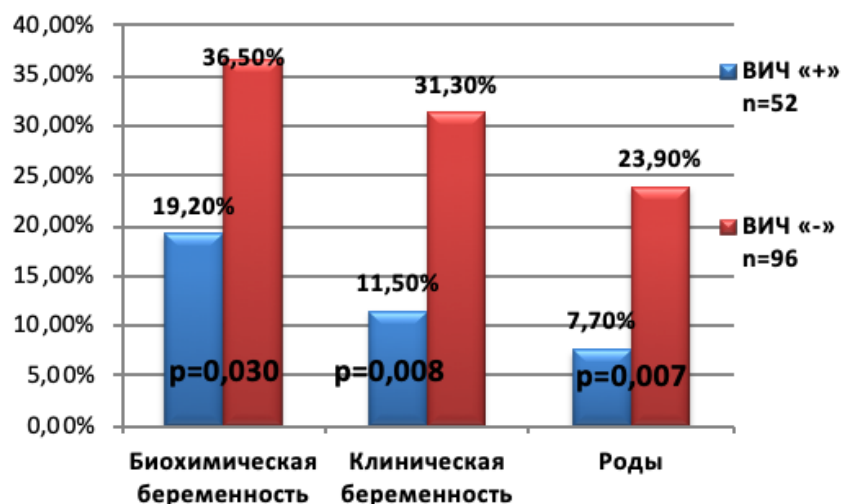


Рисунок 14. Исходы «свежих» циклов у пациенток с ВИЧ-инфекцией

При анализе 72 криоциклов, проведенных в основной группе, были исключены 17 программ с использованием ооцитов донора и 1 программа с переносом донорского эмбриона.

В криоциклах также выявлена более низкая частота биохимической (15(27,8%) и 33(56,9%), $p=0,002$) и клинической (12(22,2%) и 29(50%), $p=0,002$) беременности, а также родов (6(11,1%) и 22(37,9%); $p=0,001$) у пациенток с ВИЧ-инфекцией по сравнению с контрольной группой. Также статистически значимых различий в обеих группах не было выявлено в частоте неразвивающейся беременности (6(11,1%) и 8(13,7%); $p=0,89$) и позднего самопроизвольного выкидыша (0 (0%) и 2(3,4%); $p=0,16$) (рис. 15).

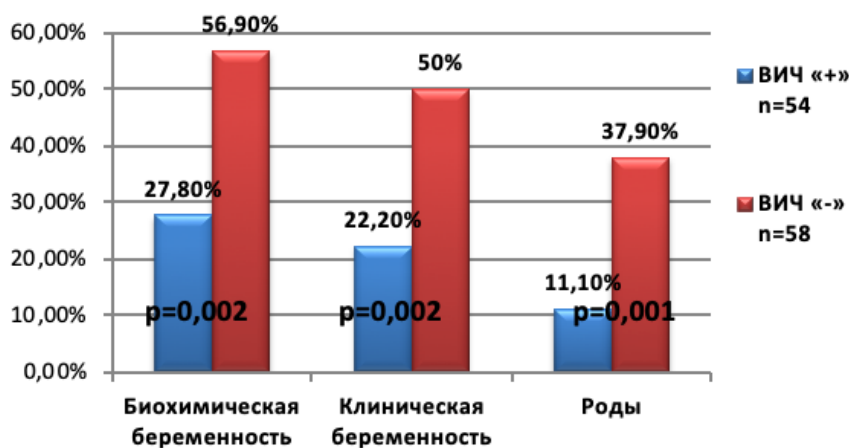


Рисунок 15. Исходы криоциклов у пациенток с ВИЧ-инфекцией

ОШ наступления клинической беременности в программе ЭКО у пациенток с ВИЧ инфекцией составило 2,8 (95%ДИ=1,6;4,9), живорождения – 4,3 (95%ДИ=2,1;8,8).

Таким образом, анализ основных параметров овариальной стимуляции, показал, что пациентки обеих групп были сопоставимы по длительности стимуляции, стартовой и суммарной дозе используемых гонадотропинов. При этом у женщин с ВИЧ - инфекцией было получено существенно меньшее число ооцитов, зрелых ооцитов, зигот, эмбрионов на стадии дробления и бластоцист. У ВИЧ-инфицированных пациенток выявлена низкая частота биохимической, клинической беременности и родов живым плодом как в «свежих» циклах, так и в криоциклах.

3.4 Анализ основных параметров овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и исходов программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Далее проведен сравнительный анализ параметров овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и исходов программ ВРТ у 63 супружеских пар (группа 2а) с ВИЧ-инфекцией у мужа и у 75 ВИЧ – серонегативных пар (группа 2б). Во 2а группе проведено 60 стимулированных циклов ЭКО/ICSI и 31 криопротокол, во 2б группе - 86 и 39 циклов, соответственно.

Анализ параметров «свежего» цикла у супружеских пар с ВИЧ-положительным мужчиной не выявил существенных различий в стартовой (225 (150;300) и 225 (150;300)); $p=0,03$) и суммарной дозе гонадотропинов (2137 (1518;2531) и 2100 (1800;2625); $p=0,26$), и продолжительности стимуляции (10 (9;10) и 10 (9;10); $p=0,58$) по сравнению с контрольной группой. Частота использования различных препаратов гонадотропинов и протоколов стимуляции так же была сопоставима в обеих группах (табл. 18)

Таблица 18 - Особенности протоколов стимуляции овуляции в супружеских парах с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Показатели	Группа 2а (n=60)	Группа 2б (n=86)	р
Вид протокола			
Протокол с ант-ГнРГ, %	45 (75%)	45 (75%)	0,25
Модифицированный протокол с ант-ГнРГ, %	12 (20%)	12 (20%)	
Длинный протокол, %	3 (5%)	3 (5%)	
• ЭКО в естественном цикле, %	0	1(1,2%)	
Вид ГТ			
Менотропины, %	3(5%)	7 (8,2%)	0,09
рФСГ, %	17 (28,2%)	24 (28,2%)	
Комбинация рФСГ/менотропины, %	36 (60%)	39 (45,9%)	
Кориоллитропин альфа, %	4 (4,6%)	15 (17,6%)	
Длительность стимуляции, дней*	10 (9;10)	10 (9;10)	0,58
Стартовая доза гонадотропинов, МЕ*	225 (150;300)	225 (150;300)	0,38
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ*	2137 (1518;2531)	2100 (1800;2625)	0,26

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

При анализе основных параметром эмбриологического этапа программы ЭКО у супружеских пар обеих групп (табл. 19), не было выявлено статистически значимых различий в количестве ооцитов (8(5;14) и 7(4;13); $p=0,28$), зрелых ооцитов (7(4;11) и 6 (3,7;9); $p=0,22$), зигот (6(3;9) и 5 (3;8); $p=0,54$), эмбрионов на стадии дробления (6(3;9) и 5 (2;7,2); $p=0,92$), бластоцист (2(0;5) и 3 (1;5); $p=0,35$) и криоконсервированных эмбрионов (1(0;3) и 2(0;3); $p=0,69$;). Также супружеские пары обеих групп были сопоставимы по количеству бластоцист отличного (18(30%) и 37(43%); $p=0,11$), хорошего (34(65,7%) 59(68,6%); $p=0,140$) и удовлетворительного качества (27(45%) и 49 (57%); $p=0,15$)).

Таблица 19 - Характеристика основных параметров эмбриологического этапа супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины и серонегативных по ВИЧ пар

Параметры	Группа 2а (n=60)	Группа 2б (n=86)	P
Получено ооцитов*	8 (5;14)	7(4;13)	0,28
Количество зрелых ооцитов (M II)*	7 (4;11)	6 (3,7;9)	0,22
Количество зигот (2 PN)*	6 (3;9)	5 (3;8)	0,54
Аномальное оплодотворение (3и более PN), (M±m)	0,10(0,3)	0,13(0,3)	0,56
Количество эмбрионов на стадии дробления*	6 (3;9)	5 (2;7,2)	0,92
Количество бластоцист*	2(0;5)	3 (1;5)	0,35
Число криоконсервированных эмбрионов*	1 (0;3)	2 (0;3)	0,69
Качество эмбрионов			
Отличные	18 (30%)	37 (43%)	0,11
Хорошие	34(56,7%)	59(68,8%)	0,14
Удовлетворительные	27(45%)	49(57%)	0,15

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Поскольку у каждого третьего мужчины с ВИЧ-инфекцией наблюдалась повышение фрагментации ДНК сперматозоидов, в 21 из 60 циклов оплодотворение ооцитов проводилось методом PICSI.

Перенос эмбриона был выполнен в 31 из 60 (51,7%) циклов в группе с ВИЧ-инфицированным мужчиной и в 63 из 86 (73%) циклов в контрольной группе. Количество перенесенных эмбрионов в основной группе – 1,26 (0,4), в контрольной - 1,41(0,4) (p=0,14). В обеих группах перенос эмбрионов чаще осуществлялся на 5 сутки (5(3;5) и 5(3;5), p=0,14).

Анализ эффективности программ ЭКО/ICSI показал (рис. 16), что супружеские пары с ВИЧ-положительным мужчиной были сопоставимы с контрольной группой по частоте наступления биохимической (8(25,8%) и 21(33,3%), p=0,45) и клинической (6(19,4%) и 17(27%), p=0,41)

беременности, а также родов (5(16,1%) и 11 (17,5%); $p=0,87$). Не было выявлено различий в частоте неразвивающейся беременности ((0%) и 5(7,9%); $p=0,10$) и внематочной беременности (1 (4,3%) и 1(1,6%); $p=0,45$) в обеих группах. Следует отметить, что во всех случаях наступления клинической беременности в группе ВИЧ-инфицированных оплодотворение ооцитов проводилось методом ICSI с предварительной селекцией сперматозоидов методом PICSI.

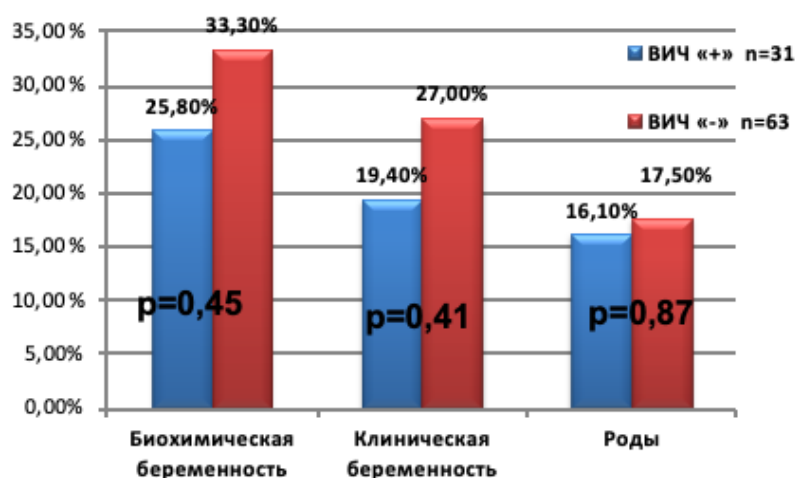


Рисунок 16. Исходы «свежих» циклов ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины

В криоциклах (рис. 17), также не было выявлено различий в частота биохимической (10(32,2%) и 14(35,9%), $p=0,81$), клинической (7(22,6%) и 10(25,6%), $p=0,82$), неразвивающейся (3(10%) и 3(7,7%), $p=0,39$) беременности, а также родов (4(12%) и 7(17,9%); $p=0,77$) у пациенток с ВИЧ-инфицированным мужчиной по сравнению с контрольной группой.

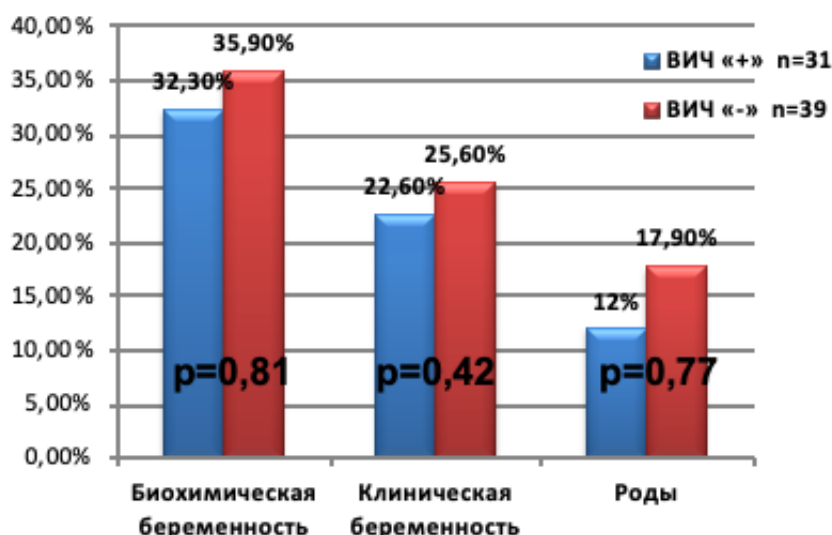


Рисунок 17. Исходы криоциклов у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины

Перенос эмбриона не осуществлялся в 36 из 89 (46,6%) стимулированных циклов в группе с ВИЧ – инфицированным мужчиной и в 22 из 86 (26%) циклов в контрольной группе ($p=0,03$). В основной группе пациентов в 1 (3,6%) случае ооциты не оплодотворились. Причинами отмены переноса в основной группе также послужили: в 11 (39,3%) случаях в связи с риском развития СГЯ; в 6 (21,4%) – с плохим качеством полученных эмбрионов; в 8 (28,6%) – необходимостью для последующей криоконсервации по причине проведения ПГД; в 2 (7,1) – с тонким эндометрием. В группе серонегативных мужчин отмена переноса наблюдалась в 4 (18,2%) случаях в связи с риском развития СГЯ, в 16 (72,7%) – по причине проведения ПГД, в 2 (9,2%) в виду отсутствия эмбрионов пригодных к переносу.

Таким образом, у супружеских пар с ВИЧ-инфицированным мужчиной по сравнению с контрольной группой не было выявлено статистически значимых различий в протоколах овариальной стимуляции и характеристиках эмбриологического этапа. Также не было выявлено значимых различий в частоте наступления беременности и родов в сравниваемых группах, как в «свежих» циклах, так и в криопротоколах. Сопоставимая частота наступления клинической беременности в группе с

ВИЧ-инфицированных мужчиной и контрольной группой может быть связана с применением дополнительной методики селекции сперматозоидов – PICSI.

3.5 Анализ копийности митохондриальной ДНК гамет при ВИЧ-инфекции

3.5.1 Копийность мтДНК в кумулюсных клетках

На следующем этапе работы мы провели анализ копийности мтДНК в 110 образцах кумулюсных клеток, полученных от женщин с ВИЧ-инфекцией и в 111 – без ВИЧ-инфекции.

Оценка содержания мтДНК показала, что число копий мтДНК в клетках кумулюса у ВИЧ-инфицированных пациенток было статистически значимо ниже, чем у женщин без ВИЧ-инфекции (566,7(229,1) и 639,7(197) о.е; $p=0,02$) (рис. 18).

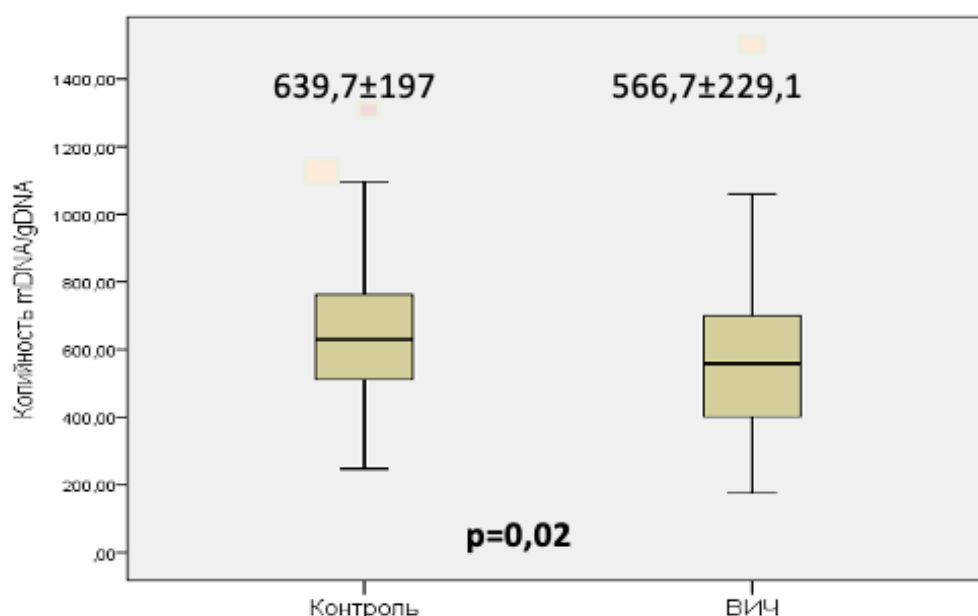


Рисунок 18. Копийность мтДНК в кумулюсных клетках

Более того, в основной группе исследования копийность мтДНК в клетках кумулюса существенно отличалась в зависимости от стадии ВИЧ-

инфекции (рис. 19). Так, при 4а стадии вторичных заболеваний число копий мтДНК в кумулюсных клетках составила 535,2(256,4) о.е., что статистически значимо ниже, чем при 3 субклинической стадии заболевания (588,6(208,1) о.е) и в контрольной группе (639,7(197) о.е.) ($p=0,01$).

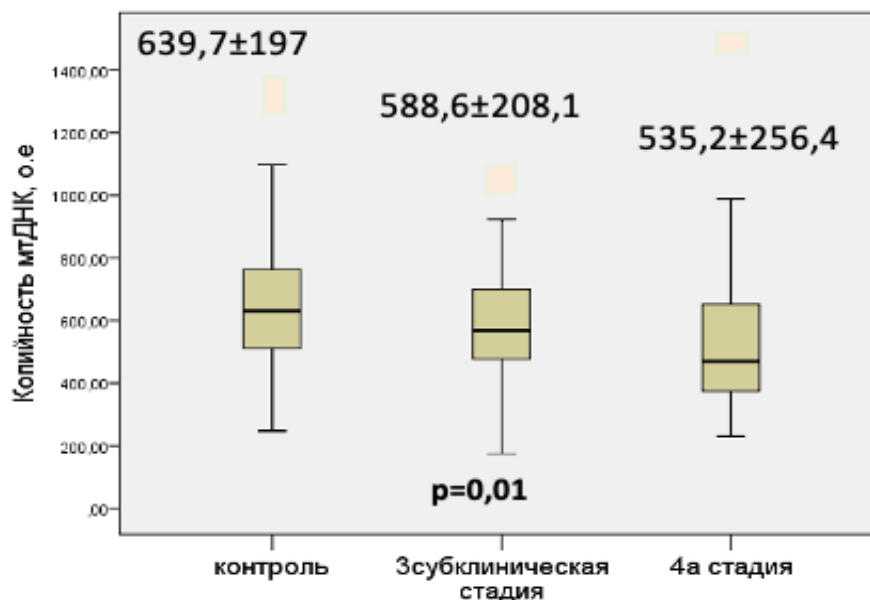


Рисунок 19. Копийность мтДНК в кумулюсных клетках у ВИЧ-инфицированных в зависимости от стадии заболевания

Оценка силы взаимосвязи не выявила корреляционной зависимости копийности мтДНК в кумулюсных клетках с возрастом пациенток в обеих группах ($r=0,153$; $p=0,18$ и $r=0,164$; $p=0,08$ соответственно), а также с длительностью бесплодия ($r=0,300$; $p=0,07$ и $r=-0,041$; $p=0,67$). В основной группе исследования число копий мтДНК в клетках кумулюса не зависело от «стажа» ВИЧ-инфекции ($r=-0,132$; $p=0,26$), уровня CD4+лимфоцитов ($r=0,037$; $p=0,74$), CD8+лимфоцитов ($r=0,020$; $p=0,91$) и значений ИРИ ($r=-0,231$; $p=0,27$). В обеих группах не обнаружена корреляционная зависимость между количеством мтДНК в кумулюсных клетках и значениями ИМТ, концентрациями гормонов, стартовой и суммарной дозой гонадотропинов, длительностью стимуляции, эмбриологическими показателями (табл. 20).

Таблица 20 - Корреляционная зависимость копийности мтДНК в клетках кумулюса

Параметры	Копийность мтДНК в кумулюсных клетках			
	ВИЧ «+»*	p	ВИЧ «-»*	p
Возраст	0,153	0,18	0,164	0,08
Длительность бесплодия	0,300	0,07	-0,041	0,67
«Стаж» ВИЧ-инфекции	-0,132	0,26	-	-
Уровень CD4+лимфоцитов	-0,037	0,74	-	-
Уровень CD8+лимфоцитов	0,020	0,91	-	-
ИРИ	-0,231	0,27	-	-
ИМТ	0,168	0,35	0,260	0,09
Концентрация АМГ	-0,045	0,72	0,078	0,43
Концентрация ФСГ	0,054	0,66	0,010	0,92
Концентрация Е2	-0,213	0,10	0,160	0,18
Стартовая доза индуктора	0,066	0,57	-0,096	0,34
Суммарная доза индуктора	0,032	0,79	-0,094	0,35
Число полученных ооцитов	-0,013	0,91	0,028	0,77
Количество ооцитов МП	-0,042	0,71	0,001	0,98
Количество зигот (2PN)	-0,077	0,50	-0,005	0,95
Количество дробящихся эмбрионов	0,044	0,70	0,052	0,58
Количество бластоцист	0,005	0,96	0,088	0,35

*Коэффициент корреляции Пирсона

Выявлена обратная зависимость копийности мтДНК в клетках кумулюса от длительности АРВТ ($r=-0,228$; $p=0,04$) (рис. 20).

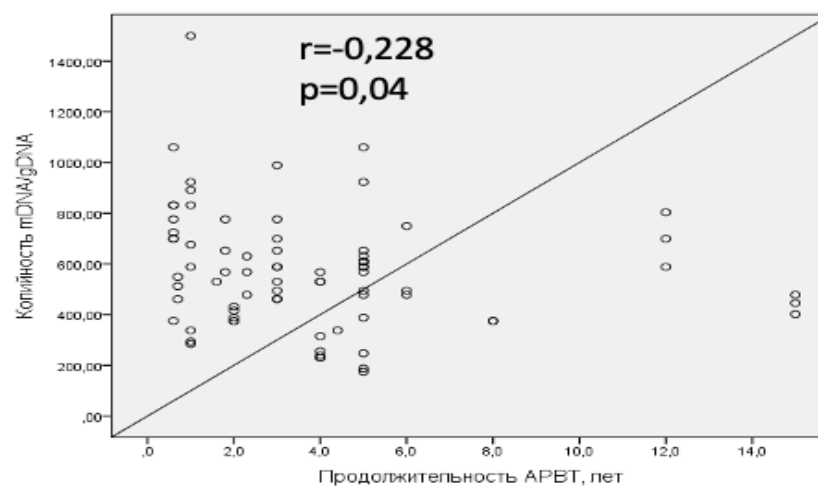


Рисунок 20. Корреляционный анализ копийности мтДНК и продолжительности АРВТ у ВИЧ – инфицированных женщин.

Более того при продолжительности АРВТ до 1 года копияность мтДНК в кумулюсных клетках была сопоставима с контрольной группой (677,1(292,7) и 639,7(197,9) о.е; $p=0,46$). При приеме АРВТ в течение от 1 года до 5 лет копияность мтДНК в кумулюсных клетках составила 505,3(175,0) о.е, что было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (639,7(197,9) о.е; $p=0,001$). В случае длительности терапии более 5 лет этот показатель также был существенно ниже, чем в группе пациенток без ВИЧ-инфекции (522,7(203) о.е; $p=0,04$) (рис. 21).

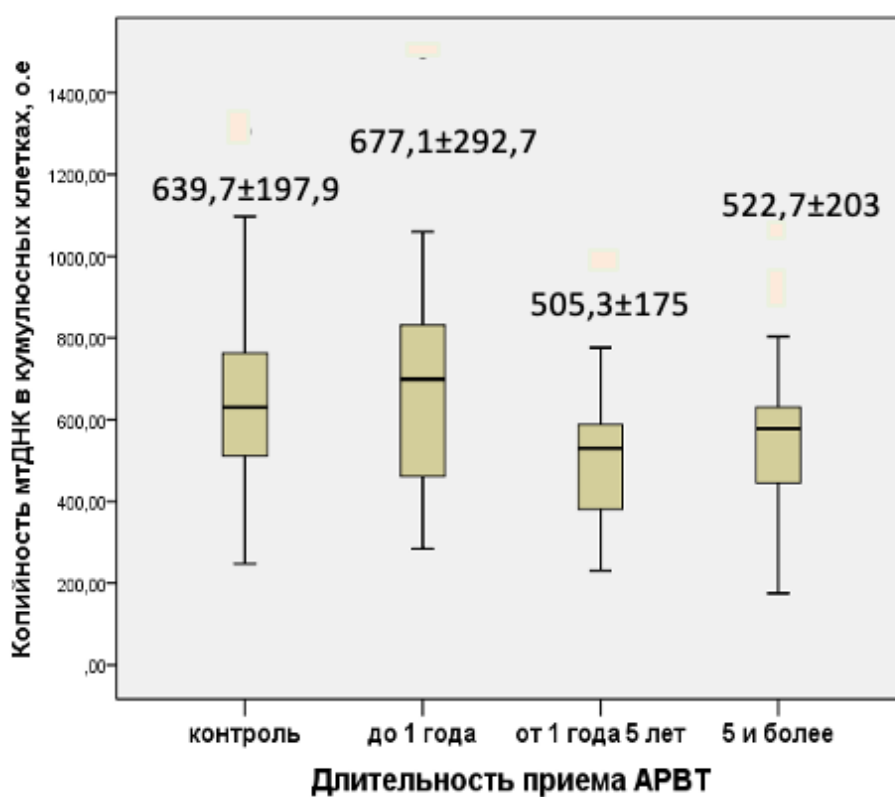


Рисунок 21. Копийность мтДНК в кумулюсных клетках в зависимости от длительности АРВТ

Таким образом, копияность мтДНК в кумулюсных клетках у женщин с ВИЧ – инфекцией была значительно ниже по сравнению с ВИЧ-серонегативными пациентками и имела обратную зависимость от длительности АРВТ. Существенное снижение копияности мтДНК в кумулюсных клетках наблюдалось после 1 года приема АРВТ. Копийность

мтДНК снижалась с прогрессированием стадии ВИЧ и при длительном приеме АРВТ.

3.5.2 Копийность мтДНК в сперматозоидах

Далее мы провели анализ количества мтДНК лишенной делеций (mtDNA^{del-}), тотальной мтДНК (mtDNA^{total}) и их соотношения между собой (mtDNA^{total} / mtDNA^{del-}) в 154 образцах спермы, полученных от 58 мужчин с ВИЧ-инфекцией и 96 пациентов – без ВИЧ-инфекции.

Как видно из представленных в таблице 21 данных, количество mtDNA^{del-} в обеих группах составило 1,9(0,9;5,9) и 2,4 (1,9;5,6) о.е.; (p=0,54) соответственно; mtDNA^{total} – 5,4 (3,7;9,8) и 5,5(3,5;8,2), о.е; (p=0,62); mtDNA^{total} / mtDNA^{del-} – 2,4(1,5;3,9) и 1,9 (1,3;3,0), (p=0,09). Медиана копийности mtDNA^{total}, mtDNA^{del-}, а также mtDNA^{total} / mtDNA^{del-} были сопоставимы между группами.

Таблица 21 - Копийность мтДНК в сперматозоидах у ВИЧ-положительных пациентов

Показатели*	ВИЧ + (n=58)	ВИЧ - (n=96)	p
mtDNA ^{del-*}	1,9 (0,9;5,9)	2,4(1,9;5,6)	0,54
mtDNA ^{total*}	5,4(3,7;9,8)	5,5 (3,5;8,2)	0,62
mtDNA ^{total} / mtDNA ^{del-}	2,4(1,5;3,9)	1,9(1,3;3,0)	0,09

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

Далее образцы спермы были разделены на нормозооспермию, субфертильную сперму и тяжелую патозооспермию.

В группе с ВИЧ-положительными мужчинами нормозооспермия встречалась в 56,9% случаев, субфертильная сперма – 29%, выраженная патозооспермия – 24,1 %; в контрольной группе – 65,%, 9,4% и 25%, соответственно (p=0,22) (табл. 22).

Таблица 22 - Доля патозооспермии в зависимости от ВИЧ-инфекции

Показатели	ВИЧ + n=58	ВИЧ - n=96	p
Нормозооспермия	33(56,9%)	63(65,6%)	0,84
Субфертильная сперма	11(19%)	9(9,4%)	0,07
Тяжелая патозооспермия	14(24,1%)	24(25%)	0,89

В структуре патозооспермии не было выявлено статистически значимых различий в обеих группах ($p=0,39$). В обеих группах преобладала тератозооспермия (20,7% и 16,7%) (табл. 23).

Таблица 23 - Структура патозооспермии в исследуемых группах

Виды патозооспермии	ВИЧ + n=25	ВИЧ - n=33	p
астенотератозооспермия	3(5,2%)	7(7,3%)	0,45
астенозооспермия	5(8,6%)	4(4,2%)	0,85
тератозооспермия	12(20,7%)	16(16,7%)	0,56
олигоастенозооспермия	-	2(2,1%)	0,89
олигоастенотератозооспермия	4(6,9%)	2(2,1%)	0,12
азооспермия	1(1,7%)	-	0,98
олиготератозооспермия	-	1(1%)	0,78
олигозооспермия	-	1(1%)	0,78

Далее проводился анализ копийности мтДНК сперматозоидов в зависимости от показателей спермограммы (при нормозооспермии, субфертильной сперме и выраженной патозооспермии).

В исследуемых группах пациентов с нормозооспермией количество $mtDNA^{del-}$ составило 2,5(1,6;5,1) и 2,1 (1,4;3,5) о.е., ($p=0,98$); $mtDNA^{total}$ – 1,7 (0,8 ;5,5) и 2(1,1;3,1) о.е., ($p=0,22$); $mtDNA^{total} / mtDNA^{del-}$ – 5,8(3,5;10,2) и 4,9 (3,2; 7,2), ($p=0,27$). Таким образом копийность мтДНК при нормозооспермии была сопоставима между группами независимо от наличия ВИЧ-инфекции (табл. 24).

Таблица 24 - Копийность мтДНК в исследуемых группах при нормозооспермии

Показатели	ВИЧ + n=25	ВИЧ - n=33	p
mtDNA ^{del-*}	2,5 (1,6;5,1)	2,1(1,4;3,5)	0,98
mtDNA ^{total*}	1,7(0,8;5,5)	2(1,1;3,1)	0,22
mtDNA ^{total} / mtDNA ^{del-}	5,8(3,5;10,2)	4,9(3,2;7,2)	0,27

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

В исследуемых группах пациентов с субфертильной спермой количество mtDNA^{del-} составило 3 (1,5; 4) и 2,1 (1,5; 3,5) о.е., (p=0,62); mtDNA^{total} – 1,8 (0,5;4,5) и 2,3(0,8; 5,1) о.е., (p=0,67); mtDNA^{total} / mtDNA^{del-} – 4,5(4,2; 8) и 4,2 (2,8;6), (p=0,44). Таким образом, копияность мтДНК при субфертильной сперме была сопоставима между группами пациентов с ВИЧ-инфекцией и без нее (табл. 25).

Таблица 25 - Копийность мтДНК в исследуемых группах при субфертильной сперме

Показатели	ВИЧ + n=11	ВИЧ - n=9	p
mtDNA ^{del-*}	3(1,5;4)	2,1(1,5;3,5)	0,62
mtDNA ^{total*}	1,8(0,5;4,5)	2,3(0,8;5,1)	0,67
mtDNA ^{total} / mtDNA ^{del-}	4,5(4,2;8)	4,2(2,8;7,6)	0,44

* показатели представлены в виде Ме (Q1;Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

В группе пациентов с выраженной патозооспермией также не было выявлено статистически значимых различий в копияности мтДНК (p=0,33) в зависимости от ВИЧ-инфекции: количество mtDNA^{del-} составило 1,7 (1;2,4) и 1,4 (1,1;1,8) о.е., (p=0,22); mtDNA^{total} – 3,7 (1,7;3,7) и 5,3(2,5; 12,1) о.е., (p=0,24); mtDNA^{total} / mtDNA^{del-} – 5,5(3,7; 10,2) и 8,2 (5,5; 15,2) (табл. 26).

Таблица 26 - Копийность мтДНК в исследуемых группах при тяжелой патозооспермии

	ВИЧ + n=14	ВИЧ - n=24	p
mtDNA ^{del-*}	1,7(1;2,4)	1,4(1,1;1,8)	0,22
mtDNA ^{total*}	3,7(1,7;3,7)	5,3(2,5;12,1)	0,24
mtDNA ^{total} / mtDNA ^{del-}	5,4(3,7;10,2)	8,2(5,5;15,2)	0,33

* показатели представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 (нижний) квартиль, Q3 – 75 (верхний) квартиль.

При оценке силы взаимосвязи значимая корреляция была выявлена только в группе с тяжелой патозооспермией. В данной группе была обнаружена отрицательная корреляция между длительностью АРВТ и копийностью mtDNA^{total} ($r=-0,627;p=0,01$), а также длительностью АРВТ и копийностью mtDNA^{del-} ($r=-0,542;p=0,04$). Выраженная отрицательная корреляция была выявлена между уровнем CD4+ и mtDNA^{total} / mtDNA^{del-} ($r=-0,629;p=0,03$). Не было выявлено статистически значимых различий в копийности мтДНК в сперматозоидах у мужчин с ВИЧ – инфекцией и контрольной группы при разных видах патозооспермии. Копийность мтДНК в эякуляте ВИЧ-инфицированных мужчин имела обратную зависимость с длительностью АРВТ только при тяжелой патозооспермии.

Таким образом, у женщин с ВИЧ-инфекцией отмечалась высокая частота искусственных абортов, осложненных форм гнойно-воспалительных заболеваний придатков матки, ИППП и вторичного бесплодия. Выявлено, что в данной группе пациентов отмечается снижение параметров овариального резерва, частоты наступления беременности и родов. Также продемонстрировано, что у пациенток с ВИЧ-инфекцией снижается копийности мтДНК в клетках кумулюса, что сопряжено с длительным приемом АРВТ и стадией ВИЧ-инфекции.

У ВИЧ – инфицированных мужчин, принимающих АРВТ, повышается фрагментация ДНК сперматозоидов и увеличивается число патологических форм сперматозоидов. При этом частота патозооспермии напрямую зависит

при длительном «стажа» ВИЧ-инфекции. АРВТ оказывает негативное влияние на подвижность сперматозоидов. У ВИЧ-положительных пациентов, не использующих АРВТ, при высоких уровнях вирусной нагрузки снижается объем эякулята и этот же параметр возрастает при увеличении уровня CD4+ лимфоцитов. Отмечена обратная зависимость у мужчин с ВИЧ-инфекцией между длительностью АРВТ и количеством мтДНК, лишенной делеций и тотальной мтДНК в сперматозоидах.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение продолжительности и улучшение качества жизни лиц, живущих с ВИЧ, феминизация и выход эпидемии из уязвимых групп населения в общую популяцию обосновывает необходимость изучения особенностей фертильности и реализации репродуктивной функции, в том числе с использованием ВРТ у данной категории супружеских пар.

Проведено проспективное клиническое исследование, цель которого основывалась на гипотезе о том, что у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией, использующих АРВТ снижается частота наступления беременности в связи с возникающей митохондриальной дисфункцией гамет. В исследование было включено 360 супружеских пар, обратившиеся для оценки фертильности и проведения программ ВРТ, в том числе 189 супружеские пары с ВИЧ-инфекцией, и 171 пара - группа контроля. В исследование вошли 95 женщин и 94 мужчины с ВИЧ-инфекцией. В группе ВИЧ-положительных женщин было проведено 89 «свежих» циклов ЭКО/ICSI и 72 криоцикла. В группе ВИЧ-положительных мужчин – 60 «свежих» циклов ЭКО/ICSI и 31 криоцикл, соответственно.

На первом этапе нашего исследования был проведен анализ клинико – анамнестических и лабораторных данных в дискордантных по ВИЧ-инфекции пар.

Пациентки с ВИЧ-инфекцией имели длительный «стаж» заболевания (8 лет, (6;11)) и в 100% случаев принимали препараты АРВТ (4 года, (2;6,5)), преобладала 3 субклиническая стадия заболевания (61,05%). Уровни CD4+ лимфоцитов (622,5 мкл в 1 кл, (446,7;808,7)), CD8+ лимфоцитов (741 мкл в 1 кл, (613;990)) в крови, иммунореактивный индекс (0,85 (0,58;1,06) и неопределяемая вирусная нагрузка перед проведением программы ЭКО свидетельствовали о «благополучном» состоянии иммунной системы, несмотря на наличие ВИЧ-инфекции.

Среди факторов бесплодия в обеих группах наиболее часто встречался трубно-перитонеальный фактор (49,5% и 44,8%). Различий между факторами бесплодия обеих групп выявлено не было ($p=0,91$). Наши результаты согласуются с данными других исследователей [162]. Так, в работе Santulli и соавт. (2011) также было показано, что мужской фактор бесплодия в дискордантных супружеских парах с ВИЧ-инфекцией у женщины встречался существенно реже, чем в контрольной группе (37,3% и 57,1%; $p=0,01$) [164].

Среди ВИЧ-положительных женщин отмечалось более раннее начало половой жизни (16,9(2,2) и 18,3(2,6); $p<0,001$) по сравнению с аналогичным параметром в контрольной группе, и как результат, большая распространенность аборт в основной группе (42,1% и 12,5%; $p=0,001$), что и объясняет преобладание вторичного бесплодия в исследуемой когорте пациенток (68,1% и 38%; $p<0,001$). Полученные данные согласуются с данными зарубежных авторов, согласно которым у ВИЧ-положительных пациенток отмечается высокая частота абортов и, как следствие, вторичного бесплодия [162].

Нарушений менструального цикла у ВИЧ-инфицированных женщин в нашем исследовании выявлено не было. Вопрос о влиянии ВИЧ-инфекции на менструальный цикл остается спорным. В ранних исследованиях сообщалось о более частых нарушениях менструального цикла у женщин с ВИЧ-инфекцией, включая олигоменорею и аменорею неизвестной этиологии [57,163]. В отличие от этих ранних результатов, Santulli и соавт. (2011), не выявили нарушений менструального цикла у ВИЧ-серопозитивных женщин, [164]. Большинство авторов считают, что при оптимальном иммунном статусе нарушения регулярности менструального цикла наблюдаются реже и отражает улучшение общего состояния здоровья пациентов с ВИЧ-инфекцией при широком доступе к антиретровирусной терапии [164,43]. В нашем исследовании пациентки с ВИЧ-инфекцией имели сохраненный иммунный статус. Возможно, с этим связано отсутствие у них нарушений менструального цикла.

Одним из факторов, которые, как известно, негативно влияют на исход циклов ВРТ является высокий ИМТ пациентки. В нашей работе ИМТ у женщин с ВИЧ-инфекцией был сопоставим с таковым у пациенток без ВИЧ-инфекции (22 и 22; $p=0,62$). В литературе представлены противоречивые данные. Так, в исследовании Santulli и соавт. (2011) показано, что ВИЧ-инфицированные женщины имели более высокий ИМТ, чем ВИЧ-серонегативные пациентки (24,2 и 22,9, $p=0,03$) [164]. Nurudeen и соавт. (2013) напротив показали, что ВИЧ-инфицированные пациентки и женщины без ВИЧ-инфекции имели аналогичный ИМТ [166].

В ходе нашего исследования, было выявлено, что высокая частота встречаемости ИППП (16,4% и 3,2%; $p=0,007$) и осложненных форм воспалительных заболеваний придатков матки (8,4% и 1%; $p=0,01$) у женщин с ВИЧ-инфекцией по сравнению с серонегативными по ВИЧ женщинами обусловило большую частоту трубной беременности (34,7% и 17,7%; $p=0,004$) в данной группе больных. Большинство исследований подтверждают, что трубная беременность у пациенток с ВИЧ-инфекцией встречается чаще, чем у неинфицированных женщин [165].

Согласно данным Ahdieh и соавт (2001), и Jamieson и соавт (2002), у ВИЧ-инфицированных женщин значительно чаще встречается инфекция, вызванная ВПЧ [50, 51]. Мы получили аналогичные данные, так у пациенток основной группы значимо чаще в анамнезе были диагностированы остроконечные кондиломы (12,6% и 3,1%; $p=0,01$), вызываемые ВПЧ, по сравнению с женщинами из группы контроля.

Среди оперативных вмешательств на органах малого таза в группе ВИЧ-положительных женщин значимо чаще преобладала тубэктомия (45,3% и 31,3%; $p=0,04$), показаниями для которой явились гидросальпинкс (27,4%), осложненные формы воспалительных образований придатков матки (8,4%) и трубная беременность (34,7%). Согласно данным ряда исследований, в группе ВИЧ-инфицированных женщин наиболее распространенным

оперативным вмешательством также является тубэктомия по причине воспалительных заболеваний придатков [164, 166].

Далее мы оценивали состояние овариального резерва на основании концентрации гормонов и числа антральных фолликулов. Обращает внимание, что пациентки обеих групп были сопоставимы по возрасту (34 и 34 года; $p=0,16$), количеству оперативных вмешательств на яичниках (21,1% и 24%; $p=0,63$) и индексу массы тела (ИМТ) (22 и 22 кг/м²; $p=0,62$). Однако было выявлено снижение параметров овариального резерва у женщин с ВИЧ-инфекцией, так концентрация АМГ была существенно ниже (1,5 и 2,8 нг/мл; $p<0,001$), а уровни ФСГ статистически значимо выше (7,4 и 6,3 МЕ/л; $p=0,001$) в группе ВИЧ-инфицированных женщин по сравнению с серонегативными по ВИЧ пациенткам, хотя оба показателя и находились в пределах нормативных значений. У женщин с ВИЧ-инфекцией было снижено количество антральных фолликулов по сравнению с серонегативными по ВИЧ-женщинами контроля (7 (2,5;13) и 12 (6,5;18) $p=0,001$). Была обнаружена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем АМГ и длительностью приема АРВТ ($r=-0,251$; $p=0,008$) и существенное снижение концентрации АМГ при продолжительности АРВТ более 1 года (2,9 нг/мл (1,9;5,8); $p<0,001$), достигающее критического уровня при длительности терапии более 5 лет (1,0 нг/мл (0,5;2,4); $p<0,001$). Полученные данные могут свидетельствовать о гонадотоксичном эффекте ВИЧ и/или АРВТ в изучаемой группе женщин. Однако мы не можем разделить влияние ВИЧ и АРВТ на концентрацию АМГ, так как в данной работе препараты получали все пациентки. В настоящее время нет единой точки зрения о влиянии ВИЧ-инфекции на овариальный резерв. Так, результаты исследования Ohl и соавт. (2010), показали, что концентрация ФСГ у женщин с ВИЧ-инфекцией была на 37% выше, чем в контрольной группе, а уровни ингибина В и АМГ на 57% и 23% были ниже [9]. В работе Scherzer (2015), концентрация АМГ была на 16% ниже при неопределяемой вирусной нагрузке и на 26% ниже с определяемой

вирусной нагрузкой по сравнению с неинфицированными женщинами. Полученные данные авторы связывают с влиянием самого вируса, поскольку была показана прямая зависимость уровня АМГ и CD4+ лимфоцитов в крови [167]. Данные других исследований свидетельствуют о том, что у пациентки с ВИЧ-инфекцией имеют нормальные параметры овариального резерва [162,164,166,168,169].

Анализ клинико – анамнестических и лабораторных данных пациенток в парах с ВИЧ-инфицированным мужчиной показал, что женщины были в репродуктивном возрасте, имели регулярный характер менструального цикла, а также сопоставимы по факторам бесплодия, преимущественно трубно-перинеального генеза, и показателям нормального овариального резерва. Далее проводился анализ параметров спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, использующих АРВТ.

Мужчины с ВИЧ-инфекцией имели небольшой «стаж» заболевания (5 лет, (2;9)) и в 100% случаев принимали препараты АРВТ (1,5 года, (1;4)), преобладала 3 субклиническая стадия заболевания (64,89%). Уровни CD4+ лимфоцитов (535,5 мкл в 1 кл, (367;653)) в крови и неопределяемая вирусная нагрузка свидетельствовали о «благополучном» состоянии иммунной системы, несмотря на наличие ВИЧ-инфекции.

Мы не нашли существенных отличий в количестве лейкоцитов (0,2 млн (0,1;0,8) и 0,2 млн (0,1;0,7); $p=0,51$), круглых клеток (0,4 (0,2;1,1) и 0,5 (0,3;1,3); $p=0,10$), уровне рН (7,5(7,3;7,7) и 7,6(7,3;7,8); $p=0,35$), числе непрогрессивно-подвижных форм сперматозоидов (7 % (5;11) и 7% (5;9); $p=0,17$) и показателях MAR – теста (7 %(1;15) и 4 % (0;13,7); $p=0,47$) у ВИЧ – инфицированных мужчин по сравнению с пациентами без ВИЧ-инфекции. Полученные результаты согласуются с данными большинства исследователей [167, 168, 169]. Vujan и соавт. (2007), напротив, у мужчин с ВИЧ-инфекцией обнаружили увеличение уровня рН, а Dondero и соавт. (1996) – большее количество круглых клеток [72, 172].

Факторами, которые определяют сперматологическую функцию являются жизнеспособность, подвижность и морфология сперматозоидов, а также состав семенной жидкости. Общее число сперматозоидов в эякуляте и концентрация сперматозоидов—параметры, которые связаны как со временем и эффективностью достижения самостоятельной беременности, так и прогнозируют зачатие [72]. В нашем исследовании объем эякулята (2,7 (2;3,4) и 3,1 (2,3;4), $p=0,003$), общее количество (89,1 (47,3;153) и 198,8 (138,5;272,8), $p<0,001$), концентрация (36 (21;52) и 63,5 (46;91), $p<0,001$), количество прогрессивно – подвижных (40 (31;53) и 55 (48,7;62,2), $p<0,001$) и жизнеспособных сперматозоидов (78 (71,5;81) и 84(82;87), $p<0,001$) не имели существенных отклонений от нормы, однако было статистически значимо ниже, а число неподвижных форм (50 (39;55,5) и 38 (31,7;42,2), $p<0,001$) существенно выше, чем в группе мужчин с нормозооспермией. Полученные данные можно объяснить небольшим «стажем» ВИЧ-инфекции (медиана 5 лет) и недлительной АРВТ (медиана 1,5 года). Вероятно, при включении в анализ пациентов с более длительным заболеванием и продолжительной АРВТ, вышеуказанные параметры окажутся ниже нормативных значений. Данное предположение подтверждает наличие отрицательной взаимосвязи между длительностью заболевания и концентрацией ($r = -0,242; p=0,02$), числом прогрессивно–подвижных категории «в» ($r=-0,241; p=0,02$), общей подвижностью сперматозоидов (PR+NP) ($r=-0,276; p=0,01$). Вujan и соавт. (2007), Garrido соавт. (2005) не выявили взаимосвязи между параметрами спермы и продолжительностью лечения [72, 95].

Известно, что вероятность наступления беременности определяется долей прогрессивно–подвижных сперматозоидов в эякуляте [72]. В нашей работе количество прогрессивно–подвижных сперматозоидов у ВИЧ–инфицированных находилось в пределах референсных значений, однако было статистически значимо меньше по сравнению со здоровыми ВИЧ–негативными пациентами (40% (31;53) и 55%(48,7;62,2), $p<0,001$). При этом количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов категории «в»

отрицательно коррелировало с длительностью ВИЧ-инфекции ($r=-0,241$; $p=0,02$), продолжительностью АРВТ ($r=-0,224$; $p=0,03$) и имело прямую зависимость с уровнем CD4+ лимфоцитов ($r=0,294$; $p=0,03$). Положительная корреляция между уровнем CD4+ лимфоцитов и подвижностью сперматозоидов была обнаружена и в исследованиях Dondero и соавт. (1996), Muller CH и соавт. (1998), Garrido и соавт. (2005) [172, 171, 95]. Более низкие уровни CD4 + лимфоцитов (<200 мм³) были связаны со значительно более низким процентом подвижности сперматозоидов. У пациентов без ВИЧ-инфекции наблюдался существенно больший объем эякулята, концентрация и подвижность сперматозоидов, чем у ВИЧ-инфицированных пациентов. Общее количество сперматозоидов было сопоставимо между группами [170, 172, 95].

Анализ образцов спермы показал, что у каждого второго (51,6%) пациента с ВИЧ-инфекцией наблюдалась патозооспермия. В структуре изменений преобладала тератозооспермия (40%). Полученные результаты согласуются с данными литературы. Снижение процента морфологически нормальных сперматозоидов показано и в ряде других исследований [72, 170, 171, 172]. В работе Duloust E и соавт.(2002), напротив, показано, что у пациентов с ВИЧ-инфекцией процент морфологически нормальных сперматозоидов был сопоставим с ВИЧ – серонегативным контролем [172].

В нашем исследовании доля аномальных сперматозоидов не зависела от «стажа» ВИЧ-инфекции и продолжительности АРВТ и имела обратную зависимость с уровнями CD4+ лимфоцитов ($r = -0,362$; $p=0,02$). Существенная обратная корреляция между значениями CD4+ и количеством патологических форм сперматозоидов была показана в работе Dondero и соавт. (1996) [172]. Полученные данные авторы объясняют снижением уровня тестостерона в крови у ВИЧ-инфицированных с низкими показателями CD4+лимфоцитов, что приводит к дефектам созревания сперматозоидов [13]. Muller CH и соавт. (1996), также отметили, что у ВИЧ – инфицированных доля аномальных сперматозоидов значимо выше, чем у

здоровых без ВИЧ-инфекции мужчин [170]. Исследователи считают, что многие ВИЧ-серопозитивные мужчины имеют нормальный анализ спермы, но по мере прогрессирования заболевания увеличивается количество патологических форм сперматозоидов [170].

Оценка индекса фрагментации ДНК сперматозоидов показала, что данный показатель был существенно выше у ВИЧ – инфицированных пациентов, по сравнению со здоровыми ВИЧ – отрицательными мужчинами (15,8 % (12,4;23) и 9,95% (7,32;12,4); $p=0,001$). Умеренная корреляция между значениями индекса фрагментации ДНК сперматозоидов и продолжительностью АРВТ ($r=0,504$; $p=0,06$) была статистически не значима, что можно объяснить недлительным приемом АРВТ в нашем исследовании (медиана 1,5 года). В литературе обсуждается возможное влияние АРВТ на целостность ДНК сперматозоидов. Так, Savasi и соавт. (2018), при сравнении уровня фрагментации сперматозоидов у мужчин с ВИЧ – инфекцией, принимающих АРВТ и без таковой обнаружили повышение данного показателя у 67,9 и 37,5% ($p=0,02$) мужчин соответственно [88]. В исследовании Frainais и соавт. (2010), также показано существенное увеличение индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с ВИЧ – инфекцией, получающих АРВТ в сравнении с пациентами без ВИЧ – инфекции (6,38% против 3,39%, $p < 0,05$). Авторы считают, что как прямые, так и косвенные эффекты ВИЧ могут изменить ядерную ДНК сперматозоидов, но некоторые антиретровирусные препараты могут повредить ее [174].

Анализ параметров спермограммы у ВИЧ-положительных пациентов, не применяющих АРВТ, показал, в данной группе пациентов статистически значимую отрицательную взаимосвязь уровня вирусной нагрузки и объема эякулята ($r = -0,669$; $p=0,03$), а также значимую положительную взаимосвязь между уровнем CD4+ лимфоцитов и объемом эякулята ($r=0,778$; $p=0,01$), что подтверждает данные вышеуказанного исследования. Полученные данные можно объяснить тем, что повышение уровня вирусной нагрузки и снижение

уровня CD4+ лимфоцитов создают предпосылки для развития инфекционно-воспалительных осложнений, в частности, приводит к обструкции семявыносящих протоков и снижению объема эякулята у ВИЧ-инфицированных пациентов. Это, в свою очередь, оказывает негативное влияние на фертильность мужчин в данной группе пациентов. В ходе исследования Kehl 2011 и соавт. (2011), было так же выявлено выявлено, что у мужчин с ВИЧ, не получавших АРВТ снижается объем эякулята и, соответственно, концентрация сперматозоидов, что свидетельствует об отрицательном влиянии на сперматогенез самого вируса [71]. Более того, существует мнение, что наличие вирусной нагрузки оказывает неблагоприятное воздействие на качество спермы у мужчин с длительным анамнезом заболевания и/или наличием симптомов [77].

Такие параметры, как общее количество сперматозоидов (89,1 (47,3;153,0) и 154,1 (89;266); $p=0,006$), их концентрация (36(21;52) и 64 (42,5;88); $p<0,001$) и количество жизнеспособных (78(71,5;81)и 83 (79;87); $p=0,003$) форм были статистически значимо выше в группе ВИЧ-положительных пациентов без АРВТ, по сравнению с ВИЧ-положительными мужчинами на терапии, не смотря на наличие определяемой вирусной нагрузки в 93,3 % случаев. Полученные данные можно объяснить статистически значимо меньшим «стажем» ВИЧ-инфекции (2,5 года; $p<0,001$) в данной группе мужчин и отсутствием тяжелого иммунодефицита, несмотря на отсутствие АРВТ.

В группе пациентов без АРВТ была выявлена статистически значимая положительная взаимосвязь между уровнем CD4+ лимфоцитов и количеством прогрессивно-подвижных сперматозоидов категории «в» ($r=0,294$; $p=0,03$ и $r=0,667$; $p=0,05$). Похожие результаты были получены в ряде исследований, согласно которым более низкие уровни CD4+ лимфоцитов были связаны со значительно более низкой долей подвижных форм сперматозоидов [40, 173, 174].

На втором этапе нашего исследования был проведен анализ основных параметров овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и исходов программы ЭКО у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией.

Анализ параметров «свежего» цикла не выявил существенной разницы в стартовой, суммарной дозах гонадотропинов, а также длительности стимуляции у женщин с ВИЧ-инфекцией по сравнению с пациентками без ВИЧ-инфекции. В ряде работ, напротив, показано, что для стимуляции суперовуляции ВИЧ-серопозитивных женщин потребовались более высокие дозы гонадотропинов, что авторы объясняют возможной овариальной резистентностью, обусловленной негативными эффектами АРВТ на яичники [3,7,15,16]. С другой стороны, Martinet и соавт. (2006), отмечает нормальную реакцию яичников на стимуляцию у ВИЧ-инфицированных без иммунодефицита [65].

У пациенток с ВИЧ-инфекцией было получено меньшее количество ооцитов (6(3;11) и 10(7;15,5); $p<0,001$), зрелых ооцитов (5(2;10) и 8 (5;12); $p<0,001$), зигот (4(2;7) и 7 (4;10); $p<0,001$), эмбрионов на стадии дробления (4(2;7) и 6 (4;10); $p<0,001$) и бластоцист (1(0-3) и 3(1-6); $p=0,0001$) криоконсервированных эмбрионов (1(0;2) и 2(0;4); $p=0,02$) по сравнению с контрольной группой. Меньшее количество полученных ооцитов у женщин с ВИЧ-инфекцией можно объяснить исходно более низким уровнем АМГ. Отмечено существенно меньшее количество эмбрионов (бластоцист) отличного (18(20,2%) и 48(42,9%); $p=0,001$), хорошего (43(48,3%) и 69(61,6%); $p=0,05$) и удовлетворительного качества (36(40,4%) и 67 (59,6%); $p=0,006$) у ВИЧ-инфицированных пациенток, в отличие от группы женщин без ВИЧ-инфекции. В основной группе исследования наблюдалась высокая частота отмены лечебных циклов ЭКО/ICSI (40,4%) (отсутствие ооцитов, признаков оплодотворения, качество эмбрионов, проведение ПГД, риск СГЯ, тонкий эндометрий) в отличие от группы контроля (14%), но статистически значимых различий зарегистрировано не было. По данным литературы частота отмены цикла у женщин с ВИЧ-инфекцией по сравнению с

контролем составила 15,2% и 4,9% ($p < 0,05$), что авторы связывают с неблагоприятным воздействием АРВТ на качество ооцитов [3].

Как в «свежих», так и в криоциклах у пациенток с ВИЧ-инфекцией по сравнению с серонегативными по ВИЧ женщинами выявлена более низкая частота биохимической (19,2% и 36,5%, $p = 0,003$; 27,8% и 56,9%, $p = 0,002$), клинической (11,5% и 31,3%, $p = 0,008$; 22,2% и 50%, $p = 0,002$) беременности и родов (7,7% и 23,9%, $p = 0,007$; 11,1% и 37,9%; $p = 0,001$). Полученные нами данные согласуются с результатами ряда других авторов [5,13,29]. Напротив, в исследованиях Martinet и соавт. (2006), Santulli и соавт. (2011), Nurudeen и соавт. (2013), Prisant и соавт. (2010) показано, что частота клинической беременности у женщин с ВИЧ-инфекцией была сопоставима с контрольной группой серонегативных по ВИЧ пациенток [65,164,166,162]. Причина низкой эффективности остается до конца неясной. Обсуждается возможное негативное влияние АРВТ на потенциал ооцитов, что снижает их способность к оплодотворению. Косвенным подтверждением негативного воздействия АРВТ на качество ооцитов является сопоставимая со здоровым контролем частота наступления беременности при использовании ооцитов донора [7, 15].

При анализе параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа супружеских пар с ВИЧ-инфекцией у мужчины не было выявлено существенных различий по сравнению с группой контроля. Частота биохимической (25,8% и 33,3%, $p = 0,45$; 32,2% и 35,9%, $p = 0,81$), клинической (19,4% и 27%, $p = 0,41$; 22,6% и 25,6%, $p = 0,82$) беременности и родов (16,1% и 17,5%; $p = 0,87$; 12% и 17,9%; $p = 0,77$) также была сопоставима, как в «свежих» циклах, так и в криоциклах. Согласно данным литературы, частота наступления беременности в парах с ВИЧ-положительным мужчиной в программах ВРТ варьирует от 33 % до 45% [6]. Наши данные подтверждаются исследованием Melo и соавт. (2008), которые провели оценку морфологических особенностей эмбрионов в программе ЭКО/ICSI с ВИЧ-положительным мужчиной. Авторы не выявили различий в частоте

оплодотворения, дробления, в количестве криоконсервированных эмбрионов, а также в частоте наступления беременности в двух группах [111]. Следует отметить, что в нашем исследовании во всех случаях наступления клинической беременности в «свежем» цикле у пациентов с ВИЧ-инфекцией оплодотворение ооцитов проводилось методом PICSI. Мы полагаем, что это одна из возможных причин сопоставимой между группами частоты наступления беременности, так как по результатам ряда исследований, применение методики селекции сперматозоидов PICSI в программах ЭКО/ICSI повышает частоту наступления клинической беременности в 5 раз по сравнению с выбором сперматозоидов по морфологическим характеристикам [109].

На третьем этапе нашего исследования был проведен анализ копийности мтДНК в 78 образцах кумулюсных клеток, полученных от женщин с ВИЧ-инфекцией и в 111 – без ВИЧ-инфекции и 154 образцов спермы: полученных от 58 мужчин с ВИЧ-инфекцией и 96 – без ВИЧ-инфекции.

В настоящее время проведено много исследований по оценке митохондриальной дисфункции в различных тканях у пациентов с ВИЧ-инфекцией, так как известно, что препараты группы НИОТ, которые всегда используются в схемах АРВТ, подавляют гамма-полимеразу человека, необходимую для репликации мтДНК, как результат наблюдается снижение копийности мтДНК, увеличение ее мутаций [10, 11, 12].

Более того, митохондриальная токсичность препаратов тканеспецифична, поскольку активация НИОТ различается в разных типах клеток. В литературе имеется большое количество исследований, посвященных изучению содержания мтДНК в адипоцитах, миоцитах, гепатоцитах, клетках нервной, почечной и костной ткани [153, 154, 155, 156]. Исследователями показано, что возникающий при приеме НИОТ дефицит мтДНК нарушает нормальное функционирование практически всех органов и систем. Тем не менее, имеются лишь единичные данные по изучению

копийности мтДНК ооцитов [14], а исследования на кумулюсных клетках, которые отражают компетентность ооцитов к оплодотворению, не проводились вовсе.

По результатам нашего исследования выявлен существенно более низкий уровень мтДНК в клетках кумулюса у женщин с ВИЧ-инфекцией по сравнению со здоровым контролем (566,7(229,1) и 639,7(197) о.е.; $p=0,02$). Полученными данными можно объяснить низкую частоту наступления беременности в программе ЭКО у ВИЧ-инфицированных женщин. Нами показана обратная зависимость числа копий мтДНК в кумулюсных клетках с длительностью АРВТ ($r=-0,228$; $p=0,04$). Эти данные подтверждают сведения о том, что токсическое повреждение митохондрий зависит от продолжительности воздействия препаратов [176]. Более того, число копий мтДНК в клетках кумулюса начинало снижаться после 1 года АРВТ. Аналогичные результаты были представлены в исследованиях Z. Dai и соавт. (2015), Masyeni S. И соавт. (2018) при изучении содержания мтДНК в плазме и мононуклеарных клетках периферической крови. Авторами было показано снижение мтДНК после 12 месяцев АРВТ препаратами НИОТ [177, 178].

Анализ копийности мтДНК в эякуляте показал, что у ВИЧ-инфицированных пациентов количество мтДНК лишенной делеций (1,9 (0,9;5,9) и 2,4 (1,9;5,6) о.е.; ($p=0,54$)), уровень тотальной мтДНК (5,4 (3,7;9,8) и 5,5 (3,5; 8,2), о.е; ($p=0,62$)) и соотношение $mtDNA_{total} / mtDNA_{del-}$ (2,4(1,5 ; 3,9) и 1,9 (1,3;3,0), ($p=0,09$)) были сопоставимы с ВИЧ-серонегативным контролем. Возможно, отсутствие изменений в содержании мтДНК у ВИЧ-инфицированных связано с тем, что в данное исследование включены пациенты с недлительным приемом препаратов (2 года (1;5 лет)). Поскольку в исследование были включены пациенты с различными показателями спермограммы, мы разделили образцы спермы на нормозооспермию, субфертильную сперму и тяжелую патозооспермию. Различий в содержании тотальной мтДНК и мтДНК лишенной делеций между группами также не

было выявлено. Однако, при тяжелой патозооспермии у мужчин с ВИЧ-инфекцией было показано, что чем длительнее АРВТ, тем меньше содержание тотальной мтДНК ($r=-0,627;p=0,01$) и мтДНК лишенной делеций ($r=-0,542;p=0,04$). Более того, чем ниже уровень CD4+ лимфоцитов в крови, который отражает состояние иммунной системы, тем больше делеций мтДНК в сперме, определяемое по соотношением $mtDNA_{total} / mtDNA_{del}$ ($r=-0,629;p=0,03$). Wu H. et al (2019) полагают, что увеличение количества делеций мтДНК в сперматозоидах является маркером патозооспермии и отражает негативные изменения показателей спермы [179]. Таким образом, и в нашем исследовании снижение тотальной мтДНК и увеличение делеций мтДНК отражало именно выраженные изменения в сперме у ВИЧ-инфицированных мужчин, длительно принимающих АРВТ. Известно, что у мтДНК, в отличие от геномной, отсутствуют защитные гистоны и богатая антиоксидантами цитоплазма [180], которые способствуют репарации ДНК, что делает мтДНК более уязвимой для делеций и повреждений [181]. Препараты АРВТ могут ингибировать репарацию дефектов, возникающих в структуре мтДНК, тем самым приводя к повышению количества копий мтДНК и $mtDNA_{del+}$ [182]. Также препараты АРВТ способствуют образованию АФК и увеличивают перекисное окисление липидов, приводя к развитию окислительного стресса и повреждению хроматина сперматозоидов и сперматогенеза, что в свою очередь приводит к повышению $mtDNA_{del+}$ и развитию митохондриальной дисфункции в сперматозоидах [82]. В литературе представлены противоречивые данные. Так, исследования Diehl S и соавт. (2003), свидетельствуют об отсутствии различий в содержании мтДНК между пациентами с ВИЧ-инфекцией, получающими и не получающими АРВТ по сравнению с ВИЧ-отрицательными мужчинами [183]. В исследовании White D.J. и соавт. (2010), напротив было продемонстрировано, что у пациентов, длительно принимающих АРВТ, определяются делеции в мтДНК сперматозоидов, в отличие от пациентов с ВИЧ, никогда не получавших терапию [184].

Таким образом, использование АРВТ наряду с улучшением качества и увеличением продолжительности жизни позволяет пациентам с ВИЧ-инфекцией реализовать репродуктивную функцию. ВРТ являются не только способом преодоления бесплодия в данной группе больных, а также мерой профилактики инфицирования здорового партнера. Однако длительный прием препаратов АРВТ оказывает гонадотоксичный эффект у ВИЧ-инфицированных женщин, снижая копийность мтДНК в кумулюсных клетках, как результат, низкая эффективность программы ЭКО. Митохондриальная токсичность АРВТ у мужчин с ВИЧ-инфекцией проявляется только при длительном приеме препаратов у пациентов с тяжелой патологией спермы. В связи с этим, пациентам с ВИЧ-инфекцией следует стремиться к более ранней реализации репродуктивной функции и/или сохранению своего генетического материала.

ВЫВОДЫ

1. Женщины с ВИЧ-инфекцией репродуктивного возраста (34 года, (31-37)) с длительностью заболевания 8 лет (6;11), преимущественно половым путем инфицирования (51,6%) и 3-ей субклинической стадией заболевания (61,05%), имели неопределяемую вирусную нагрузку на фоне АРВТ (4 года, 2;6,5 лет), медиану уровня CD4+ 622,5 (446,7;808,7) мкл/кл.

2. Для ВИЧ-положительных женщин характерно более раннее начало половой жизни (16,9(2,2) и 18,3(2,6); $p < 0,001$), высокая частота ИППП (16,4% и 3,2%; $p = 0,007$), осложненных форм воспалительных заболеваний придатков матки (8,4% и 1%; $p = 0,01$), высокая частота аборт (42,1% и 12,5%; $p = 0,001$), трубной беременности (34,7% и 17,7%; $p = 0,004$) и преобладание вторичного бесплодия (68,1% и 38%; $p < 0,001$).

3. У женщин с ВИЧ-инфекцией ниже уровни АМГ (1,5 (0,8;3,1) и 2,8 (1,9;5,7) нг/мл; $p < 0,001$); число антральных фолликулов (7 (2,5;13) и 12 (6,5;18) $p = 0,001$) и выше концентрация ФСГ (7,4 (6,1;9,4) и 6,3(5,2;7,3) МЕ/л; $p = 0,001$) по сравнению с пациентками без ВИЧ - инфекции. Уровень АМГ обратно коррелирует с длительности АРВТ ($r = -0,251$; $p = 0,008$) и существенно снижается при продолжительности АРВТ более 1 года (2,9 нг/мл (1,9;5,8); $p < 0,001$), достигая критического уровня при длительности АРВТ более 5 лет (1,0 нг/мл (0,5;2,4); $p < 0,001$).

4. Мужчины с ВИЧ-инфекцией (37 лет, (33;39)) имели длительность заболевания 5 лет (2;9), преимущественно 3 субклиническую стадию заболевания (64,89%), неопределяемую вирусную нагрузку на фоне АРВТ (2 года, 1;5 лет), медиану уровня CD4+ - 535 (383;679) мкл/кл. Путь инфицирования был неизвестен у 63,8% пациентов, 10,6% – указывали на употребление наркотиков, в 25,5% случаях отмечен половой путь инфицирования.

5. У ВИЧ – инфицированных мужчин, принимающих АРВТ, увеличивается число патологических форм сперматозоидов (97 (96;98) и 96 (94,5;96,5); $p = 0,006$), которое обратно коррелирует с уровнем CD4+ ($r = -$

0,362; $p=0,02$). Концентрация сперматозоидов ($r= -0,242$; $p=0,02$) обратно зависит от «стажа» ВИЧ-инфекции, а число их неподвижных форм ($r = 0,220$; $p=0,04$) имеет прямую зависимость с длительностью заболевания. АРВТ повышает индекс фрагментации ДНК сперматозоидов (15,8 % и 9,95%; $p=0,001$). У ВИЧ-положительных пациентов, не использующих АРВТ, при высоких уровнях вирусной нагрузки снижается объем эякулята ($r = -0,669$; $p=0,03$), тогда как при использовании АРВТ и увеличении уровня CD4+ лимфоцитов ($r=0,667$; $p=0,05$) объем эякулята возрастает.

6. У ВИЧ- позитивных женщин в программе ЭКО снижено число ооцитов (6(3;11) и 10(7;15,5); $p<0,001$), зрелых ооцитов (5(2;10) и 8 (5;12); $p<0,001$), зигот (4(2;7) и 7 (4;10); $p<0,001$), эмбрионов на стадии дробления (4(2;7) и 6 (4;10); $p<0,001$), бластоцист (1(0;3) и 3(1;6); $p<0,001$) и криоконсервированных эмбрионов (1(0;2) и 2(0;4); $p=0,02$). Эффективность программ ВРТ у пациенток с ВИЧ-инфекцией значимо ниже, чем у здоровых женщин, как в «свежих» циклах ЭКО/ICSI (клинической беременности (11,5% и 31,3%, $p=0,008$) и родов живым плодом (7,7% и 23,9%, $p=0,007$)), так и в криоциклах (клинической (22,2% и 50%, $p=0,002$) беременности и родов живым плодом (11,1% и 37,9%; $p=0,001$)).

7. У ВИЧ-инфицированных женщин число копий мтДНК в клетках кумулюса значимо ниже, чем у женщин без ВИЧ-инфекции (566,7(229,1) и 639,7(197) о.е; $p=0,02$) и обратно зависит от стадии ВИЧ-инфекции: 4а стадия - 535,2(256,4) о.е., 3 субклиническая стадия - 588,6(208,1) о.е. Копийность мтДНК обратно зависит от длительности АРВТ ($r=-0,228$; $p=0,04$) и значимо снижается при продолжительности АРВТ от 1 года до 5 лет (505,39(175,0) и 639,7(197,9) о.е; $p=0,001$) и более (520,7(203) и 639,7(197,9) о.е; $p=0,04$).

8. У мужчин с ВИЧ-инфекцией при тяжелой патозооспермии длительность АРВТ отрицательно коррелирует с количеством мтДНК, лишенной делеций ($r=-0,542$; $p=0,04$) и тотальной мтДНК ($r=-0,627$; $p=0,01$). Выраженная отрицательная корреляция выявлена между уровнем CD4+ и $mtDNA^{total} / mtDNA^{del-}$ ($r=-0,629$; $p=0,03$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Женщинам с ВИЧ-инфекцией показано проведение скрининга концентрации АМГ. При уровне АМГ менее 1 нг/мл и длительности АРВТ более 1 года рекомендуется не откладывать реализацию репродуктивной функции.

2. Пациенткам с ВИЧ-инфекцией, не принимающим АРВТ и планирующим беременность, показано назначение препаратов с заведомо известной меньшей митохондриальной токсичностью и при достижении неопределяемого уровня вирусной нагрузки в крови дважды с интервалом не менее 3 месяцев – проведение программы ЭКО по эпидемиологическим показаниям или с целью лечения бесплодия.

3. Пациенткам с ВИЧ-инфекцией, откладывающим реализацию репродуктивной функции и не принимающим АРВТ, показано назначение препаратов с заведомо известной меньшей митохондриальной токсичностью и при достижении неопределяемого уровня вирусной нагрузки в крови дважды с интервалом не менее 3 месяцев – проведение программы ЭКО с криоконсервацией ооцитов/эмбрионов.

4. При проведении программы ЭКО у ВИЧ-инфицированных женщин показано оплодотворение ооцитов методом ICSI и перенос одного эмбриона.

5. Мужчинам с ВИЧ-инфекцией, не принимающим АРВТ, показано назначение препаратов с заведомо известной меньшей митохондриальной токсичностью. При достижении неопределяемого уровня вирусной нагрузки в крови дважды с интервалом не менее 3 месяцев показано проведение программы ЭКО по эпидемиологическим показаниям или с целью лечения бесплодия.

6. Мужчинам с ВИЧ-инфекцией, принимающим АРВТ показана оценка параметров спермограммы, обработка спермы с использованием

метода двойного градиента и swim – up, тестирование на наличие ДНК/РНК ВИЧ.

7. При отсутствии ДНК/РНК ВИЧ в сперме возможно проведение программы ЭКО/ICSI. При наличии РНК/ДНК ВИЧ в сперме – направление к инфекционисту для продолжения АРВТ или использование спермы донора.

8. При тяжелой патозооспермии и высоким индексом фрагментации ДНК сперматозоидов показано проведение программы ЭКО, оплодотворение ооцитов с использованием метода PICSI.

9. Мужчинам с ВИЧ-инфекцией, откладывающим реализацию репродуктивной функции, показано проведение обработки, тестирования спермы на наличие РНК/ДНК ВИЧ и криоконсервация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМГ - антимюллеровский гормон
- АРВТ – антиретровирусная терапия
- аГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- антГнРГ – антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
- АДФ – аденозиндифосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- ВИЧ - вирус иммунодефицита человека
- ВМИ – внутриматочная инсеминация
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ЗППП – заболевания, передаваемые половым путем
- ВПЧ - вирус папилломы человека
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ДГОДГ - дигидрооротатдегидрогеназа
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЕЦ – естественный цикл
- ИП - ингибиторы протеазы
- ИППП – инфекции передающиеся половым путем
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИМТ – индекс массы тела
- ЛГ - лютеинизирующий гормон
- МЕ – международные единицы
- мтДНК – митохондриальная ДНК
- НАДН - никотинамидадениндинуклеотид
- НИОТ - ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
- ОТ – обратная транскриптаза (1)
- Прл - пролактин

- ПЦР – полимеразноцепная реакция
- ПЭ – перенос эмбрионов
- рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- РФ – Российская Федерация
- СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
- СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников
- СОС – среда для обработки спермы
- СЦ – стимулированный цикл
- ТВП – трансвагинальная пункция
- ТТГ – тиреотропный гормон
- ТПФ - трубно-перитонеальный фактор бесплодия
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ФАДН - флавинадениндинуклеотид
- ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
- ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
- чМГ – человеческий менопаузальный гонадотропин
- ЧНБ – частота наступления беременности
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
- ИБ – иммунный блок
- ICSI - IntraCytoplasmic Sperm Injection - введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
- CIN (Cervical intraepithelial neoplasia) - цервикальная интраэпителиальная неоплазия
- E2 - эстрадиол
- ЕКАФ – федеральная комиссия по вопросам СПИДа
- HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesions) - высокий класс плоскоклеточных интраэпителиальных поражений
- MESA – microsurgical epididymal sperm aspiration – микрохирургическая биопсия яичника

PICSI – physiological intracytoplasmic sperm injection – физиологическая
интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов

TESA – testicular sperm extraction – биопсия тканей яичника

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень от 25.07.2019.
2. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Справка от 30.06.2019.
3. Immune activation response in chronic HIV-infected patients: influence of Hepatitis C virus coinfection / M. Márquez [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10(3)
4. Achieving safe conception in HIV-discordant couples: the potential role of oral preexposure prophylaxis (PrEP) in the United States / M.A. Lampe [et al.] // Am J Obstet Gynecol. – 2011. – Vol. 204(6)
5. Bujan L., Pasquier C. People living with HIV and procreation: 30 years of progress from prohibition to freedom? // Human Reproduction. – 2016. – Vol. 31(5). – P. 918–925.
6. Reproductive assistance in HIV serodiscordant couples / V. Savasi [et al.] // Human Reproduction Update. – 2013. – Vol. 19 (2). – P. 136–150.
7. Women infected with human immunodeficiency virus type 1 have poorer assisted reproduction outcomes: a case-control study / C. Stora [et al.] // Fertil Steril. – 2016. – Vol. 105 (5). – P. 1193-1201.
8. Biologic markers of ovarian reserve and reproductive aging: application in a cohort study of HIV infection in women. / D. Seifer [et al.] // Fertil. Steril. – 2007. – Vol. 88. – P. 1645–1652.
9. Alterations of ovarian reserve tests in human immunodeficiency virus (HIV)-infected women / J. Ohl [et al.] // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2010. – Vol. 38. – P. 313–317.
10. Mitochondrial aging is accelerated by anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations. / B. Payne [et al.] // Nat. Genet. – 2011. – Vol. 43. – P. 806–810.

11. Blood mitochondrial DNA mutations in HIV-infected women and their infants exposed to HAART during pregnancy. / M. Jitratkosol [et al.] *AIDS*. – 2012. – Vol. 26. – P. 675–683.
12. Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies. / C. Morén [et al.] // *AIDS*. – 2015. – Vol. 29 (1). – P. 5–12.
13. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. / C. Morgan [et al.] // *Hum. Reprod. Mol.* – 2001. – Vol. 7, № 5. – P. 425–429.
14. Mitochondrial DNA depletion in oocytes of HIV-infected antiretroviral-treated infertile women / S. López [et al.] // *Antiviral Therapy*. – 2008. – Vol. 13. – P. 833–838.
15. Decreased pregnancy rate after in-vitro fertilization in HIV-infected women receiving HAART / O. Coll [et al.] // *AIDS*. – 2006. – Vol. 20. – P. 121–123.
16. Outcome of ICSI in HIV-1-infected women / P. Terriou [et al.] // *Human Reprod.* – 2005. – Vol. 20 (10). – P. 2838–2843.
17. IVF-ICSI in HIV positive and sero-discordant couples: results of five-years of experience / P. Santulli [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24. – P. 342.
18. A decade of the sperm-washing programme: correlation between markers of HIV and seminal parameters / D. Nicopoullos [et al.] // *HIV Med.* – 2011. – Vol. 12. – P. 195–201.
19. Antiretroviral therapy effects on genetic and morphologic end points in lymphocytes and sperm of men with human immunodeficiency virus infection / W. Robbins [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 184. – P. 127–135.
20. Does antiretroviral therapy affect DNA integrity in spermatozoa of HIV-1 infected patients? / M. Oneta [et al.] // In: 27th Annual Meeting of ESHRE, Stockholm, Sweden, 3 July–6 July, 2011.
21. Reproduction and fertility in human immunodeficiency virus type-1 infection / E. Van Leeuwen [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2007. – Vol. 13, № 2. – P. 197–206.

22. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples / V. Savasi [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 772–777.
23. Sexual behaviour of people living with HIV in London: implications for HIV transmission / J. Elford [et al.] // *AIDS.* – 2007. – Vol. 21 (Suppl. 1). – P. S63–S70.
24. Особенности реализации репродуктивной функции у женщин с ВИЧ-инфекцией / Ф.Н. Селимова, С.Г. Перминова, Е.В. Митюрин [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2017. - № 11. – С. 24-29.
25. Маркин В.А. Оценка минимальных инфицирующих доз ВИЧ при распространении инфекции // *Вопросы вирусологии.* – 2012. - № 1. – С. 4-8.
26. AIDS Global Report, 2010. [Electronic resource] // Mode of access: http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm.
27. Simon V., Ho D.D., Abdool K.Q. HIV/AIDS epidemiology, aetiology, prevention, and treatment // *Lancet.* – 2006. – Vol. 368. – P. 489–504.
28. American College of Obstetricians and Gynecologists. Gynecologic care for women with human immunodeficiency virus. Practice Bulletin No. 117. // *Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 117. – P. 1492–1509.
29. Determinations of HIV-1 shedding in the genital tract of women / A. Kovacs [et al.] // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 1593-1601.
30. Risk of sexual transmission of human immunodeficiency virus with antiretroviral therapy, suppressed viral load and condom use: a systematic review. / J. LeMessurier [et al.] // *CMAJ.* – 2018. – Vol. 19, № 190. – P. 1350-1360.
31. Mayer K., Anderson D.J. Detection of human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen from seropositive men using the polymerase chain reaction DNA amplification technique // *Fertil. Steril.* – 1991. – Vol. 55. – P. 588-599.

32. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV / J. Castilla [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2005. – Vol. 40. – P. 96–101.
33. Combined antiretroviral treatment and heterosexual transmission of HIV-1: cross sectional and prospective cohort study / J. Del Romero [et al.] // *Br. Med. J.* – 2010. – Vol. 340. – P. 2205.
34. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy / M. Cohen [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 365. – P. 493–505.
35. HIV-1 transmission among HIV-1 discordant couples before and after the introduction of antiretroviral therapy / S. Reynolds [et al.] // *AIDS.* – 2011. – Vol. 25. – P. 473–477.
36. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) by artificial insemination by donor / G. Stewart [et al.] // *Lancet.* – 1985. – Vol. 2. – P. 581–585.
37. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization / G. Nuovo [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1994. – Vol.144 (6). – P. 1142–1148.
38. HIV-1 chemokine co-receptor CCR5 is expressed on the surface of human spermatozoa / B. Muciaccia [et al.] // *AIDS.* -2005. – Vol. 19 (13). – P. 1424–1426.
39. Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and in situ PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure / T. Persico [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21. – P. 1525–1530.
40. Insemination with isolated and virologically tested spermatozoa is a safe way for HIV-1 virus sero-discordant couples with an infected male partner to have a child. / L. Bujan [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82. – P. 857–862.
41. Coombs R., Reichelderfer P., Landay A. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women // *AIDS.* – 2003. – Vol. 17 (4). – P. 455–480.

42. Социально-демографический портрет пациента, живущего с ВИЧ, посещающего центры СПИД в России / А.В. Покровская [и др.] // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88 (11). – С. 12-16.
43. Pregnancy rates and predictors of conception, miscarriage and abortion in US women with HIV / L. Massad [et al.] // AIDS. – 2004. – Vol. 18. – P. 281–286.
44. Parson T., Brigham K. Fertility Rate of HIV-infected Women Is 37 Percent Less Than That of Healthy Women // Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (May 15, 2000).
45. Shannon J., Benrubi G. Epidemiology of pelvic inflammatory disease at University Medical Centre, Jacksonville // J. Fla Med. Assoc. – 1991. – Vol. 78 – P. 158–161.
46. Coll O., Lopez M., Hernandez S. Fertility choices and management for HIV-positive women // Curr. Opin. HIV AIDS. – 2008. – Vol. 3. – P. 186–192.
47. Effect of human immunodeficiency virus type 1 infection upon acute salpingitis: a laparoscopic study / C. Cohen [et al.] // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 178. – P. 1352–1358.
48. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation / M. Ellis [et al.] // J. Infect. Dis. – 1988. – Vol. 158. – P. 1268–1276.
49. Watts D., Springer G., Minkoff H. Occurrence of vaginal infections among HIV-Infected and high-risk HIV- uninfected women: longitudinal findings of the Women's Interagency HIV Study // J. AIDS. – 2006. – Vol. 43. – P. 161-168.
50. Ahdieh L., Klein R., Burk R. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women // J. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 184. – P. 682-690.

51. Jamieson D., Duerr A., Burk R. Characterization of genital human papillomavirus infection in women who have or who are at risk of having HIV infection // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 186. – P. 21-27.
52. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and -18 high-risk HpV types / N. McKenzie [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2010. – Vol. 116 (3). – P. 572.
53. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS / S. Mbulaiteye [et al.] // *J. AIDS.* – 2003. – Vol. 32. – P. 527-533.
54. Low incidence of invasive cervical cancer among HIV-infected US women in a prevention program / L. Massad [et al.] // *AIDS.* – 2004. – Vol. 18. – P. 109–113.
55. Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy / G. Clifford [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. - Vol. 97. – P. 425-432
56. Menstrual function in human immunodeficiency virus-infected women without acquired immunodeficiency syndrome / K. Chirgwin [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* – 1996. - Vol. 12. – P. 489–494.
57. Effects of human immunodeficiency virus on protracted amenorrhea and ovarian dysfunction / H. Cejtin [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2006. - Vol. 108. – P. 1423–1431.
58. HIV infection, drug use, and onset of natural menopause / E. Schoenbaum [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. - Vol. 41. – P. 1517.
59. Особенности реализации репродуктивной функции у женщин с бесплодием и ВИЧ-инфекцией в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Е.В. Митюрин, С.Г. Перминова, Ф.Н. Селимова [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2017. - № 10. – С. 70-77.
60. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes / B. Vaccetti [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 1998. – Vol. 41. – P. 41–67.

61. In vitro fertilization in HIV positive women: potential mother and embryo viral transmission risk / L. Frodsham [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19 (1). – P. 103.
62. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases / Y. Englert [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – Vol. 10. – P. 149–162.
63. Краснопольская К.В, Назаренко Т.А., Гафуров Ю.Т. Место вспомогательных репродуктивных технологий в реализации репродуктивной функции у ВИЧ-инфицированных // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2013. - № 3. – С. 47-55.
64. Kambin S., Batzer F. Assisted reproductive technology in HIV serodiscordant couples // *Sex Reprod. Menopause.* – 2004. – Vol. 2. – P. 92–100.
65. Ovarian response to stimulation of HIV-positive patients during IVF treatment: a matched, controlled study / V. Martinet [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. - Vol. 21. – P. 1212–1217.
66. Bagratee J.S. HIV/AIDS and reproduction: Background and indication for treatment // *Fertility Studies and Reproductive Medicine.* – 2007. – Vol. 68. – P. 414-419.
67. In vitro fertilization in HIV positive women: potential mother and embryo viral transmission risk / L. Frodsham [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19 (Suppl. 1). – P. 103.
68. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 month experience / J. Ohl [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18 (6). – P. 1243-1249
69. Краснопольская К.В, Назаренко Т.А., Гафуров Ю.Т. Место вспомогательных репродуктивных технологий в реализации репродуктивной функции у ВИЧ-инфицированных // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2013. - № 3. – С. 47-55.

70. HIV-1 chemokine co-receptor CCR5 is expressed on the surface of human spermatozoa / B. Muciaccia [et al.] // *AIDS*. – 2005. - Vol. 19 (13). – P. 1424–1426.
71. HIV-infection and modern antiretroviral therapy impair sperm quality / S. Kehl [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2011. - Vol. 284 (1). – P. 229–233.
72. Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment / L. Bujan [et al.] // *J. Androl.* – 2007. - Vol. 28 (3). – P. 4
73. Реализация репродуктивной функции у мужчин с ВИЧ-инфекцией / Ф.Н. Селимова, С.Г. Перминова, Е.В. Митюрина [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2018. - № 5. – С. 36-43.
74. Semen quality in HIV patients under stable antiretroviral therapy is impaired compared to WHO 2010 reference values and on sperm proteome level. / A. Pilatz [et al.] // *AIDS*. – 2014. - Vol. 28 (6). – P. 875–880.
75. Semen parameters of a semen donor before and after infection with human immunodeficiency virus type 1: case report / E. Van Leeuwen [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. - Vol. 19 (12). – P. 2845–2848.
76. Semen quality remains stable during 96 weeks of untreated human immunodeficiency virus-1 infection / E. Van Leeuwen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. - Vol. 90 (3). – P. 636–641.
77. Drobnis E, Nangia K. Impacts of medications on male fertility // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. - Vol. 11. – P. 163-169.
78. Thorne C., Patel D., Newell M.L. Increased risk of adverse pregnancy outcomes in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy in Europe // *AIDS*. – 2004. - Vol. 18. – P. 2337-2339.
79. Антиретровирусная терапия оказывает негативный эффект на показатели спермограммы у мужчин, инфицированных ВИЧ / Е.В. Митюрина, С.Г. Перминова, Ф.Н. Селимова [и др.] // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2019. – Т. 20, № 1. – С. 99-107.

80. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: Mitochondrial toxicity as common pathway / K. Brinkman [et al.] // *AIDS*. – 1998. - Vol. 12. – P. 1735–1744.
81. Lewis W., Dalakas M.C. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs // *Nature Medicine*. – 1995. - Vol. 1. – P. 417–422.
82. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection / T. Hulgán [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2003. - Vol. 37. – P. 1711–1717.
83. Aitken R., Koppers A. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa // *Asian J. Androl.* – 2011. - Vol. 13. – P. 36–42.
84. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress / C. Blumer [et al.] // *British Journal of Urology International*. – 2012. - Vol. 109. – P. 259–265.
85. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы) / М.В. Божедомов [и др.] // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2011. - № 3. – С. 15-21.
86. Evenson D.P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): 30 years of experience with the SCSA // *Biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*. – 2011. - Vol. 78. – P. 125–149.
87. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis / H. Springer [et al.] // *Human Reproduction*. – 2012. - Vol. 27. – P. 2908–2917.
88. Effects of Antiretroviral Therapy on Sperm DNA Integrity of HIV-1-Infected Men / V. Savasi [et al.] // *American Journal of Men's Health*. – 2018. - Vol. 12 (6). – P. 1824–1831.
89. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners / A. Semprini [et al.] // *Lancet*. – 1992. - Vol. 340. – P. 1317–1319.
90. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile

sperm by the double tube gradient method versus other methods / J. Politch [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. - Vol. 81. – P. 440–447.

91. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1 / H. Hanabusa [et al.] // *AIDS.* – 2000. - Vol. 14. – P. 1611–1616.

92. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen / N. Loskutoff [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. - Vol. 84. – P. 1001–1010.

93. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1 / S. Kato [et al.] // *AIDS.* – 2006. - Vol. 20. – P. 967-973.

94. Sauer M., Chang P. Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1-seropositive men to father seronegative children by means of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. - Vol. 186. – P. 627–633.

95. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing / N. Garrido [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. - Vol. 20. – P. 1028–1034.

96. ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner / L. Mencaglia [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. - Vol. 20. – P. 2242–2246.

97. Semen residual viral load and reproductive outcomes in HIV-infected men undergoing ICSI after extended semen preparation / M. Zamora [et al.] // *Reprod. Biomed.* – 2016. - Vol. 32 (6). – P. 584-590.

98. Oliva G., Pons J. Lavado de semen en parejas VIH serodiscordantes para su uso en técnicas de reproducción humana asistida. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2004.

99. Pre-exposure prophylaxis and timed intercourse for HIV-discordant couples willing to conceive a child / P. Vernazza [et al.] // *AIDS.* – 2011. - Vol. 25.

– P. 2005–2008.

100. Natural pregnancies in HIV-serodiscordant couples receiving successful antiretroviral therapy / P. Barreiro [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2006. - Vol. 43. – P. 324–326.

101. Relation between HIV viral load and infectiousness: a model-based analysis / D. Wilson [et al.] // *Lancet.* – 2008. - Vol. 372. – P. 314–320.

102. Pre-exposure prophylaxis and timed intercourse for HIV-discordant couples willing to conceive a child / P. Vernazza [et al.] // *AIDS.* – 2011. - Vol. 25. – P. 2005–2008.

103. Riley L., Yawetz S. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 32-2005. A 34-year-old HIV-positive woman who desired to become pregnant // *N. Engl. J. Med.* – 2005. - Vol. 353. – P. 1725–1732.

104. Ruibal M., Larcher J. Riesgo de transmisión del HIV en parejas serodiscordantes en tratamiento de fertilidad // *Reproduccion.* – 2009. - Vol. 24. – P. 115–127.

105. Integration of immunodeficiency virus in oocytes via intracytoplasmic injection: possible but extremely unlikely / M. Steenvoorden [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2012. - Vol. 98 (1). – P. 173–177.

106. Systematic review of the effectiveness and safety of assisted reproduction techniques in couples serodiscordant for human immunodeficiency virus where the man is positive / R. Vitorino [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. - Vol. 95. – P. 1684–1690.

107. Никитин С.В., Мусатов В.Б. Вспомогательные методы репродукции и ВИЧ // *Материалы 3-й международного конгресса по репродуктивной медицине // Проблемы репродукции.* – 2009. – Спец. вып. – С. 286.

108. Erberelli R., Salgado R., Wolf W. Hyaluronan-binding system for prerm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility // *LBRA Assist. Reprod.* – 2017. - Vol. 21 (1). – P. 2-6.

109. Sperm selection for ICSI using hyaluronan binding in males with high DNA fragmentation does not appear to select against sperm chromosome aneuploidies / C. Pospisi [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2018. - Vol. 4. – P. 293-294.

110. Eke A., Oragwu C. Sperm washing to prevent HIV transmission from HIV-infected men but allowing conception in sero-discordant couples [Electronic resource] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2011. - CD008498.

111. Human immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) infection in serodiscordant couples (SDCs) does not have an impact on embryo quality or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome / M. Melo [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. - Vol. 89 (1). – P.141–150.

112. Либман Г., Макадон Х.Дж. ВИЧ-инфекция : пер. с англ. / Под ред. А.И. Мазуса, Т.П. Бессараба. - М: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 560 с.

113. Detectable HIV in semen from HIV positive men on HAART with undetectable serum viral load / C. Gilling-Smith [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. - Vol. 23 (Suppl. 1). – P. 152.

114. Triple HIV-1 infection / A. Van der Kuyl [et al.] // *N Engl J Med* 2005; Vol. 352: 2557—2559.

115. Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. - Vol. 39. – P. 359-407.

116. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome / T. Santos [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2006. - Vol. 85, № 3. – P. 584-591.

117. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes / C. Morgan [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. - Vol. 7, № 5. – P. 425–429.

118. The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility / T. Wai [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2010. - Vol. 62. – P. 52–62.

119. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR / N. Steuerwald [et al.] // *Zygote.* – 2000. - Vol. 9. – P. 209–215.

120. Wilding M. Mitochondria and human preimplantation embryo development // *Reproduction*. – 2009. - Vol. 137. – P. 619–624.

121. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice / N. Larsson [et al.] // *Nat. Genet.* – 1998. - Vol. 18. – P. 231–236.

122. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells / J. John [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. - Vol. 16, № 5. – P. 488–509.

123. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos / M. Wilding [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2001. - Vol. 16, № 5. – P. 909–917.

124. Does mtDNA nucleoid organization impactging? / X. Bogenhagen [et al.] // *Gerontol.* – 2010. - Vol. 45, № 7–8. - P. 473–477.

125. Wai, T., Teoli E. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes / *Nat. Genet.* – 2008. - Vol. 40, № 12. – P. 1484–1488.

126. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes / M. Cree [et al.] // *Nat. Genet.* – 2008. - Vol. 40, № 2. – P. 249–254.

127. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes / M. Morgan [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. - Vol. 7, № 5. – P. 425–429.

128. Bromer J.G., Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 2008. - Vol. 20 (3). – P. 234-413.

129. Перспективы исследования маркеров клеток кумулюса для оценки качества ооцитов и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Н.А. Сафронова [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2015. - №12. – С. 21-25.

130. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution / R. Taylor [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2003. – Vol. – 89. – P. 521–524.
131. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies / M. Filosto [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2003. - Vol. 54. – P. 524–526.
132. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy / K. Brinkman [et al.] // *Lancet.* – 1999. - Vol. 354. – P. 1112–1115.
133. Kakuda T.N. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity // *Clin. Ther.* – 2000. - Vol. 22. – P. 685–708.
134. Michaels G., Hauswirth W., Laipis P. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells // *Dev. Biol.* – 1982. - Vol. 94. – P. 246–251.
135. Schwartz M., Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. - Vol. 347. – P. 576-580.
136. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice / N. Larsson [et al.] // *Nat. Genet.* – 1998. - Vol. 18. – P. 231–236.
137. Downregulation of Tfam and mtDNA copy number during mammalian spermatogenesis / A. Rantanen [et al.] // *Mamm. Genom.* – 2001. – Vol. 12. – P. 787–792.
138. Hamada A. The role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility // *Open Reprod. Sci. J.* – 2011. – Vol. 3. – P. 27–41.
139. Xiao Sun. Mitochondria: transportation, distribution and function during spermiogenesis // *Biosci. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 1. – P. 97–109.

140. Santos J. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 5. – P. 553–572.
141. Pelliccione F. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 2. – P. 641–646.
142. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality / V. Desquirit-Dumas [et al.] // *Human Reproduction.* – 2017. - Vol. 32, №. 3. – P. 607–614.
143. Mitochondria and mitochondrial DNA in porcine oocytes and cumulus cells - A search for developmental competence marker / P. Pawlak [et al.] // *Mitochondrion.* – 2015. – Vol. 27. – P. 48-55.
144. Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF / M. Onigo [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 33 (3). – P. 367-371.
145. Paternal inheritance of mitochondrial / M. Schwartz [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. - Vol. 347, № 8. – P. 576–580.
146. Lewis W., Day B., Copeland W. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2003. – Vol. 2. – P. 812–822.
147. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice / N. Larsson [et al.] // *Nat. Genet.* – 1998. - Vol. 18. – P. 231–236.
148. Walker U., Bickel M., Lütke Volksbeck S. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor-associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients / *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2002. – Vol. 29. – P. 117–121.
149. Carr A., Miller J., Law M., Cooper D. A syndrome of lipoatrophy, lactic acidaemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome //

AIDS. – 2000. – Vol. 14. – P. F25–F32.

150. Bolhaar M., Karstaedt A. A high incidence of lactic acidosis and symptomatic hyperlactatemia in women receiving highly active antiretroviral therapy in Soweto, South Africa // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 45. – P. 254–260.

151. Balcarek K., Venhoff N., Deveaud C. Role of Pyrimidine Depletion in the Mitochondrial Cardiotoxicity of Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors / *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2010. – Vol. 55. – P. 550–557.

152. Venhoff N., Lebrecht D., Deveaud C. Oral uridine supplementation antagonizes the peripheral neuropathy and encephalopathy induced by antiretroviral nucleoside analogues / *AIDS.* – 2010. – Vol. 24. – P. 345–352.

153. McComsey G., Ward D., Hesselthaler S. Improvement in lipotrophy associated with highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients switched from stavudine to abacavir or zidovudine: the results of the TARHEEL study // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 38. – P. 263–270.

154. Wanner D., Tyndall A., Walker U. Tenofovir induced osteomalacia // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1001–1003.

155. Gingelmaier A., Grubert T., Kost B. Mitochondrial toxicity in HIV type-1-exposed pregnancies in the era of highly active antiretroviral therapy // *Antivir. Ther.* – 2009. – Vol. 14. – P. 331–338.

156. Nucleoside analog stavudine depletes mitochondrial DNA with no organelle loss in mouse oocytes / A. Bostan [et al.] // *Curr. HIV Res.* – 2010. – Vol. 8(2). – P. 127-133.

157. Effects of zidovudine, stavudine and beta-aminoisobutyric acid on lipid homeostasis in mice: possible role in human fat wasting / C. Maisonneuve [et al.] // *Antivir. Ther.* – 2004. – Vol. 9 (5). – P. 801-810.

158. Decrease of mitochondrial DNA level in sperm from patients infected with human immunodeficiency virus-1 linked to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor / L. Pavili [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94 (6). – P.

2151-2156.

159. Increase of spermatozoal mtDNA copy numbers during first twelve weeks / M.P. Van Leewen [et al.] // UvA-DARE (Digital Academic Repository). – 2016.

160. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека – пер. с англ. / Под ред. Л.Ф. Курило. – М., 2012.

161. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" от 9 декабря 2010 г.

162. HIV-1 or hepatitis C chronic infection in serodiscordant infertile couples has no impact on infertility treatment outcome / N. Prisant [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 93 (3). – P. 1020–1023.

163. Effect of HIV infection on menstrual cycle length / S. Harlow [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2000. – Vol. 24. – P. 68–75.

164. HIV-positive patients undertaking ART have longer infertility histories than age-matched control subjects / P. Santulli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95 (2). – P. 507–512.

165. Savasi V., Antonazzo P., Personeni C. Heterotopic pregnancy in HIV women. Pelvic inflammatory disease // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 372 (21). – P. 2039–2048.

166. Reproductive outcomes of HIV seropositive women treated by assisted reproduction / S.K. Nurudeen [et al.] // *Journal of Women's Health.* – 2013. – Vol. 22 (3). – P. 243–249.

167. Impact of CD4+ lymphocytes and HIV infection on Anti-Müllerian Hormone levels in a large cohort of HIV-infected and HIV-uninfected women / R. Scherzer [et al.] // *Am. J. Reprod Immunol.* – 2015. – Vol. 73 (3). – P. 273-284.

168. ART outcome in HIV-infected patients / Y. Manigart [et al.] // *Human Reproduction.* – 2006. – Vol. 21 (11). – P. 2935–2940.

169. A systematic, multidisciplinary approach to address the reproductive needs of HIV-seropositive women / N. Douglas [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2009. – Vol. 19 (2). – P. 257–263.
170. Muller C., Coombs R., Krieger J. Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men // *Andrologia*. – 1998. – Vol. 30 (Suppl. 1). – P. 15–22.
171. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. / J. Nicopoulos [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19. – P. 2289–2297.
172. Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection / F. Dondero [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11. – P. 765–768.
173. Semen alterations in HIV-1-infected men / E. Dulioust [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 2112–2118.
174. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients / C. Frainais [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 2010. – Vol. 27 (7). – P. 415–421.
175. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes / P. Reynier [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 7 (5). – P. 425–429.
176. Mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells in ART untreated & stavudine/zidovudine treated HIV-1-infected patients / S. Dhakshinamoorthy [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2018. – Vol. 148 (2). – P. 207–214.
177. Plasma Mitochondrial DNA Levels as a Biomarker of Lipodystrophy Among HIV-Infected Patients Treated with Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) / Z. Dai [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2015. – Vol. 15 (10). – P. 975–979.
178. Evaluation of antiretroviral effect on mitochondrial DNA depletion among HIV-infected patients in Bali / S. Masyeni [et al.] // *AIDS*. – 2018. – Vol. 10. – P. 145–150.

179. Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility treatment // H. Wu [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2019. – Vol. 38 (1). – P. 66-75.

180. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa / S. Kao [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 4 (7). – P. 657-666.

181. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells / H. Lee [et al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 348 Pt. 2. – P. 425.

182. Effects of zidovudine, stavudine and beta-aminoisobutyric acid on lipid homeostasis in mice: possible role in human fat wasting. / C. Maisonneuve [et al.] // *Antivir. Ther.* – 2004. – Vol. 9 (5). – P. 801-810.

183. Mitochondrial DNA and sperm quality in patients under antiretroviral therapy / S. Diehl [et al.] // *AIDS.* – 2003. – Vol. 17. – P. 450-451.

184. Sperm mitochondrial DNA deletions as a consequence of long term highly active antiretroviral therapy / J. White [et al.] // *AIDS.* – 2001. - Vol. 15. - P. 1061–1062.

Алгоритм подготовки и проведения ВРТ у супружеских пар с ВИЧ-инфекцией

