

*На правах рукописи*

КРАЕВАЯ

Елизавета Евгеньевна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор  
доктор биологических наук

Долгушина Наталия Витальевна  
Силачев Денис Николаевич

Официальные оппоненты:

Бицадзе Виктория Омаровна- доктор медицинских наук, профессор РАН, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

Краснопольская Ксения Владиславовна- доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отделения репродуктологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «15» сентября 2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

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

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Показатели эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) за последние годы достигли своего плато и сохраняются на стабильном уровне, составляя 30-35% (В. С. Корсак, А. А. Смирнова, 2017). Для достижения беременности необходимо сочетание двух факторов: наличия эуплоидного эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия, готового к имплантации эмбриона (А. Bashiri, А. Harlev, 2016; К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, 2017). Но даже при проведении преимплантационного генетического тестирования (ПГТ), которое позволяет производить перенос эуплоидных эмбрионов, не удается добиться более высокого показателя частоты наступления беременности (ЧНБ), что может свидетельствовать о нарушении процесса имплантации (А. Alteri, L. Corti, 2019; О.Е. Коротченко, Н.В. Долгушина, 2017).

Наследственная и приобретенная тромбофилия могут быть причиной привычного выкидыша и других осложнений беременности, таких как преэклампсия, задержка роста плода (ЗРП) и мертворождение (G. Kovalevsky, C.R. Gracia, 2004; А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе, 2003), однако этот вопрос до сих пор является дискуссионным (М.А. Rodger, 2010; А.А. Гусина, Н.Б. Гусина, 2016). Возможным механизмом развития осложнений беременности при наличии тромбофилии является тромбоз сосудов плаценты, эндотелиопатия и воспаление, которые могут вызвать нарушение кровоснабжения и функции плаценты (E. Rey, S.R. Kahn, 2003; В.О. Бицадзе, А.Д. Макацария, 2012). По аналогичному пути может нарушаться ранняя имплантация эмбриона и плацентация в программах ВРТ. Ряд исследований подтверждает влияние тромбофилии на исход программ ВРТ (E. Grandone, D. Colaizzo, 2001; F. Azem, 2004; H.S. Qublan, 2006), тогда как в других исследованиях данная взаимосвязь не была доказана (I. Martinelli, 2003). Дебаты по поводу роли тромбофилии в эффективности программ ВРТ усиливаются благодаря появляющимся данным

о влиянии тромбопрофилактики на повышение числа наступивших беременностей у пациенток с повторными неудачами программ ВРТ в анамнезе (Н. Qublan, 2008; В. Urman, 2009).

#### Степень разработанности темы исследования

Наследственная и приобретенная тромбофилия могут быть причиной нарушения имплантации. Возможным механизмом этого является тромбоз в месте сосудов в месте nidации эмбриона, нарушение фибринолиза, эндотелиопатия и воспаление, которые могут вызвать нарушение имплантации. Особую роль в данном взаимодействии играют внеклеточные везикулы. Изучение влияния наследственной и приобретенной тромбофилии с помощью современных методов оценки гемостаза и разработка методов терапии, направленных на улучшение эффективности программ ВРТ, является одним из наиболее многообещающих подходов к решению данной актуальной проблемы репродуктологии.

#### Цель исследования

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

#### Задачи исследования

1. Сравнить клинико-лабораторные данные, параметры гаметогенеза, раннего эмбриогенеза и особенности овариальной стимуляции у пациенток, включенных в исследование, в зависимости от факта наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Проанализировать частоту выявления наследственной (генетической) и приобретенной тромбофилии (персистенция антифосфолипидных антител) у пациенток, включенных в исследование, и оценить влияние различных видов тромбофилии на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
3. Изучить особенности системы гемостаза у пациенток в зависимости от наличия тромбофилии и наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

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

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

#### Научная новизна

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

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

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

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

#### Практическая значимость

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

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

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

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

#### Методология и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное обследование супружеских пар, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Пациенты были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". На 1-м этапе были изучены клиничко-лабораторные и эмбриологические характеристики, потенциально оказывающие влияние на эффективность программ ВРТ, в группах пациенток в зависимости от факта наступления беременности. На 2-м этапе было проанализировано влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на ЧНБ с учетом клиничко-лабораторных и эмбриологических показателей. На 3-м этапе были изучены особенности системы гемостаза, включая метод тромбодинамики, в группах пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии. На 4-м этапе был исследован уровень тканевого фактора, ассоциированного с внеклеточными везикулами (ТФ-ВВ), в крови пациенток в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии, параметров системы гемостаза и наступления беременности. На 5-м этапе было проанализировано влияние низкомолекулярных гепаринов (НМГ), назначенных в качестве антикоагулянтной или адьювантной терапии, на ЧНБ и частоту живорождения в программах ВРТ.

#### Положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

#### Личный вклад автора

Автор принимал участие в выборе темы научной работы, формулировании цели и задач исследования, в проведении и интерпретации результатов лабораторных обследований, в том числе исследования системы гемостаза, включая метод тромбодинамики, исследования антифосфолипидных антител, в систематизации и статистическом анализе полученных данных. Автором лично осуществлялось обследование и ведение пар на всех этапах лечения бесплодия методами ВРТ: экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и переноса эмбриона (ПЭ) в полость матки.

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

### Апробация работы

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

### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенного исследования нашли применение в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий - д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории клинической иммунологии (заведующий - д.м.н. Кречетова Л.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Сухих Г.Т.). Полученные в результате проведенного исследования материалы включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты исследования изложены в 5 печатных работах, из которых 4 напечатаны в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК: журналах «Акушерство и гинекология» (импакт-фактор 0,860), «Проблемы репродукции» (импакт-фактор 0,534), «Cells» (импакт-фактор 5,656).

### Структура и объем диссертации

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



## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование случай-контроль были включены 105 пар, планирующих лечение бесплодия методами ВРТ, которые были разделены на группы в зависимости от наступления беременности. Пары случай-контроль подбирались в соотношении 1:2 на основании уравнивания по 2-м признакам: врачу акушеру-гинекологу и врачу-эмбриологу, проводивших данную программу. Супружеские пары, у которых в процессе лечения были выявлены критерии исключения, а также не предоставившие полной информации о данных лабораторного обследования, были исключены из исследования. Таким образом, группу 1 составили 30 пациенток с наступившей беременностью, группу 2 – 67 пациенток, у которых беременность не наступила.

Критериями включения в исследование были: отсутствие патологических изменений в кариотипе супругов, возраст пациентки от 18 до 40 лет, индекс массы тела (ИМТ) пациентки 18-29,9 кг/м<sup>2</sup>, овариальная стимуляция с использованием антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ), селективный перенос одной нативной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после трансвагинальной пункции (ТВП), стандартный протокол поддержки посттрансферного периода (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки *per vaginum*), информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критериями не включения в исследование были: противопоказания к проведению лечения методами ВРТ, в том числе генитальный эндометриоз III-IV степени, миома матки крупных размеров, опухоли и опухолевидные образования яичников, тяжелая экстрагенитальная патология, онкологические заболевания, аномалии строения матки, выраженная патоспермия у партнера, снижение овариального резерва (антимюллеров гормон (АМГ)  $\leq 1,1$  нг/мл, количество антральных фолликулов (КАФ)  $\leq 5$ ). Критериями исключения из исследования были: проведение ПГТ в исследуемом цикле, ВРТ с донорскими ооцитами или программа суррогатного

материнства, «бедный» ответ яичников в данном протоколе овариальной стимуляции, отсутствие бластоцист для переноса в данном протоколе овариальной стимуляции, осложнения при проведении ВРТ (развитие синдрома гиперстимуляции яичников средней или тяжелой степени, внутрибрюшное кровотечение, гнойно-воспалительные осложнения в исследуемом цикле ВРТ), отказ пациентки от участия в исследовании.

Специальные методы исследования включали: обследование на наследственные тромбофилии (наличие гомозиготной или гетерозиготной мутации гена протромбина (FII) *G20210A*, гомозиготной или гетерозиготной мутации гена фактора V (FV) *G1691A* (мутация Лейдена), гомозиготной или гетерозиготной мутации гена PAI-1 *675 4G/5G* с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и определение активности антитромбина-III, протеина С, и протеина S); определение волчаночного антикоагулянта (ВА) в плазме крови двумя независимыми тестами, включающими скрининговые и подтверждающие пробы; определение антител класса M/G к фосфолипидам (АФА) (к кардиолипину (КЛ),  $\beta$ 2-гликопротеину-I ( $\beta$ 2-ГП-1), аннексину V, фосфатидилсерину (ФС) и фосфатидилэтаноламину (ФЭ) с помощью иммуноферментного анализа); проведение теста тромбодинамики; определение уровня ТФ-ВВ в плазме крови. Антитела и ВА определялись дважды: до овариальной стимуляции и через 12 недель на фоне наступившей беременности или отсутствии ее. Исследование гемостаза проводилось 3 раза: до овариальной стимуляции, в день ТВП и в день ПЭ. Тест тромбодинамики (ТД) проводили с помощью диагностической лабораторной системы «Регистратор Тромбодинамики Т-2» (ООО Гемакор, Россия). Оценивались основные параметры тромбодинамики: начальная скорость образования сгустка ( $V_i$ , мкм/мин), скорость роста сгустка ( $V$ , мкм/мин), размер фибринового сгустка через 30 минут ( $C_s$ , мкм), формирование спонтанного сгустка в объеме плазмы крови, не контактирующем с активирующей поверхностью вставки (Т).

Критерием наследственной тромбофилии было наличие хотя бы одной из перечисленных мутаций генов системы гемостаза: гомозиготная или гетерозиготная мутация гена протромбина (FII) *G20210A*, гомозиготная или гетерозиготная мутация гена фактора V (FV) *G1691A* (мутация Лейдена), дефицит антитромбина-III <60%, протеина C <50% и протеина S <55%. Критерием приобретенной тромбофилии было двукратное с интервалом 12 недель повышение выше референсных значений уровня критериальных АФА: ВА, и/или антител класса IgM/IgG к КЛ, и/или антител класса IgM/IgG к  $\beta$ 2-ГП1 (Клинические рекомендации МЗ РФ «Профилактика венозных тромбоэмболических состояний в акушерстве и гинекологии», 2014), или некритериальных АФА: антител класса IgM/IgG к аннексину V и/или ФС и/или ФЭ.

Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) или комбинированных препаратов ФСГ и лютеинизирующего гормона (ЛГ). В качестве триггера овуляции использовался хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 8 000 - 10 000 МЕ. ТВП осуществлялась через 36 часов после введения триггера овуляции. Оплодотворение ооцитов осуществлялось методом ЭКО или, по показаниям, интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Оценку морфологии эмбрионов проводили на 5-е сутки культивирования по классификации Гарднера. ПЭ в полость матки осуществлялся на 5-е сутки после ТВП в нативном цикле. В полость матки переносили одну бластоцисту хорошего или отличного качества. Ведение посттрансферного периода и диагностика беременности осуществлялись по стандартным методикам.

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

Результаты исследования и их обсуждение

На 1-м этапе были изучены клинико-лабораторные показатели пациенток в 2-х группах сравнения. Было установлено, что пары, у которых беременность наступила, были младше, и им чаще назначали препараты рФСГ для овариальной стимуляции. Остальные параметры не отличались значимо между группами. Данные факторы были учтены при проведении многофакторного анализа по оценке влияния тромбофилии на эффективность программ ВРТ (Таблица 1).

Таблица 1

Клинико-лабораторные показатели пациентов групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 30)	Группа 2 (n = 67)	p-уровень
Возраст женщин, лет**	32,3±3,2	34,0±4,1	<b>0,0438</b>
Возраст мужчин, лет**	33,1±4,1	36,5±5,3	<b>0,0030</b>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> **	22,6±2,4	22,7±2,3	0,8408
Длительность бесплодия, лет**	5,5±3,4	6,1±3,5	0,4555
Тромбоэмболические осложнения (ТЭО) в личном или семейном анамнезе*	3 (10%)	8 (11,9%)	0,7805
ФСГ, мЕд/мл**	5,7±1,3	6,2±1,8	0,1935
АМГ, нг/мл**	3,2±3,0	2,6±3,1	0,5067
Вид гонадотропина для овариальной стимуляции*			
рФСГ	19 (63,3%)	26 (38,8%)	<b>0,0251</b>
ФСГ/ЛГ	11 (36,7%)	41 (61,2%)	
Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку***	6 (4-8)	5 (3-7)	0,2235
Среднее число бластоцист на 1 пациентку***	3,5 (2-6)	3 (2-5)	0,5250

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

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

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

На 2-м этапе было проанализировано влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на ЧНБ с учетом клинико-лабораторных и эмбриологических показателей. Распространенность наследственных тромбофилий высокого риска ТЭО была низкая в обеих группах: не было выявлено мутации гена FII, распространенность мутации гена FV составила 3% и была представлена только в гетерозиготном варианте. Активность важнейших

естественных антикоагулянтов находилась в пределах нормы за исключением 4-х пациенток. Таким образом, частота наследственной тромбофилии высокого риска ТЭО в исследуемой группе пациенток составила 7,2%.

Отмечалось значимое повышение уровня критериальных (к  $\beta 2$ -ГП-1) и некритериальных антител класса М (к ФС, ФЭ и аннексину V) у пациенток группы 2. У 18 пациенток (18,5%) уровень АФА выше референсных значений был выявлен дважды с интервалом в 12 недель: у 2 пациенток группы 1 (6,7%) и у 16 пациенток группы 2 (23,9%) ( $p=0,0438$ ). При этом отмечалась персистенция некритериальных антител - к ФС, ФЭ и аннексину V с конверсией IgM на IgG. При указании на ТЭО или привычный выкидыш в анамнезе у 8 пациенток с персистенцией АФА был диагностирован АФС: у 1 пациентки группы 1 (3,3%) и у 7 пациенток группы 2 (10,4%) ( $p=0,2390$ ) (Таблица 2).

Таблица 2

## Уровень антифосфолипидных антител у пациенток групп 1 и 2

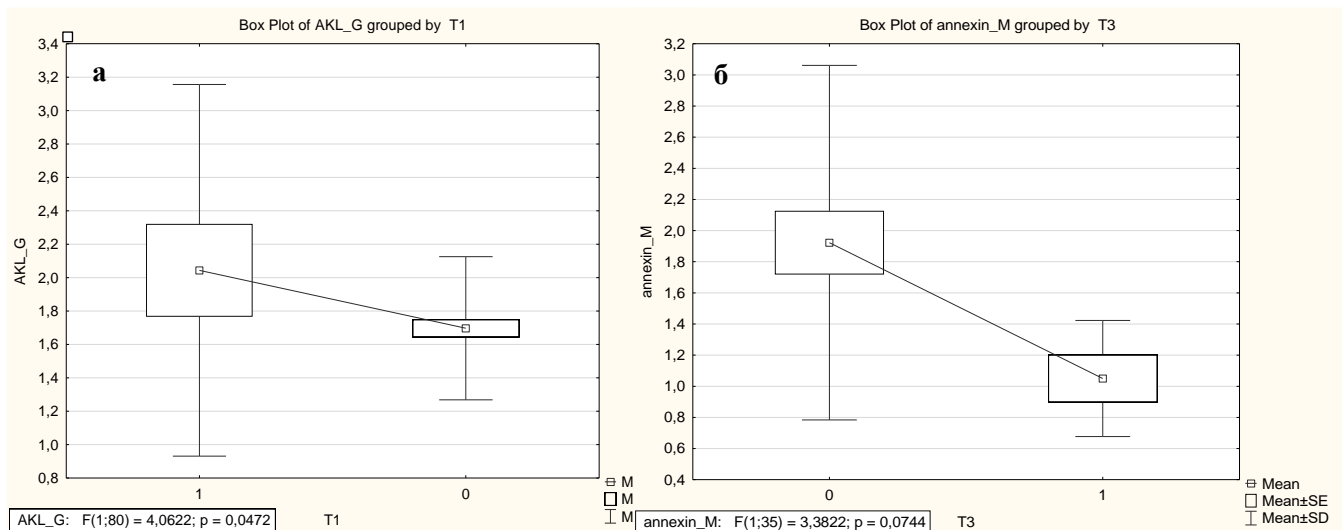
Показатели	Группа 1 (n = 30)	Группа 2 (n = 67)	p-уровень
ВА	1,00±0,04	0,99±0,05	0,4804
анти-КЛ IgM, Ед/мл	1,74±0,64	2,06±1,29	0,2027
анти-КЛ IgG, Ед/мл	1,83±0,54	1,74±0,68	0,5379
анти- $\beta 2$ -ГП-1 IgM, Ед/мл	1,94±0,73	2,43±1,04	<b>0,0203</b>
анти- $\beta 2$ -ГП-1 IgG, Ед/мл	2,33±1,00	2,26±1,02	0,7693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

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

Из 18 пациенток с персистенцией АФА беременность наступила только у 2-х женщин (11,1%), тогда как у 79 пациенток без персистенции АФА беременность наступила у 28 человек (35,4%) ( $p=0,0438$ ). При проведении многофакторного анализа по влиянию персистенции АФА на ЧНБ в программах ВРТ с учетом конфаундеров скорректированное отношение шансов

(ОШ) составило 4,34 (95% ДИ=1,04; 20,22). То есть при персистенции АФА шансы наступления беременности в программах ВРТ снижались в 4,34 раза.

На 3-м этапе были изучены особенности системы гемостаза в зависимости от наличия наследственной и/или приобретенной тромбофилии. До овариальной стимуляции и сразу после нее (в день ТВП) более высокий уровень АФА был связан с развитием гиперкоагуляционного состояния, тогда как через 5 дней после прекращения введения гонадотропинов отмечалась обратная тенденция с трендом в сторону развития относительной гипокоагуляции (Рисунок 1).



1 – сгусток сформировался  
0 – сгусток не сформировался

Рисунок 1. Связь спонтанного формирования фибринового сгустка в тесте тромбодинамики с уровнем анти-КЛ IgG до овариальной стимуляции (а) и с уровнем анти-аннексин V IgM в день ПЭ (б).

При этом, как до стимуляции, так и после нее, более высокий уровень АФА был связан со спонтанным формированием фибриновых сгустков, что может свидетельствовать о значительной гиперкоагуляции и присутствии в плазме прокоагулянтных факторов - микровезикул, активированных факторов свертывания, следов тромбопластина. При проведении корреляционного

анализа между параметрами ТД и дозой экзогенно вводимых гонадотропинов для овариальной стимуляции была выявлена статистически значимая сильная положительная связь между дозой гонадотропинов и параметром Cs(3) ( $r=0,7368$ ,  $p=0,05$ ).

На 4-м этапе был исследован уровень ТФ-ВВ в крови 34 пациенток, из которых у 10 беременность наступила (группа 1а), а у 24 - не наступила (группа 2а). При сравнении групп не было выявлено значимых отличий в клиничко-лабораторных данных пациенток. Уровень ТФ-ВВ в плазме крови был несколько выше у пациенток группы 2а, хотя и не статистически значимо. При этом он увеличивался после овариальной стимуляции по сравнению с исходным уровнем (Рисунок 2).

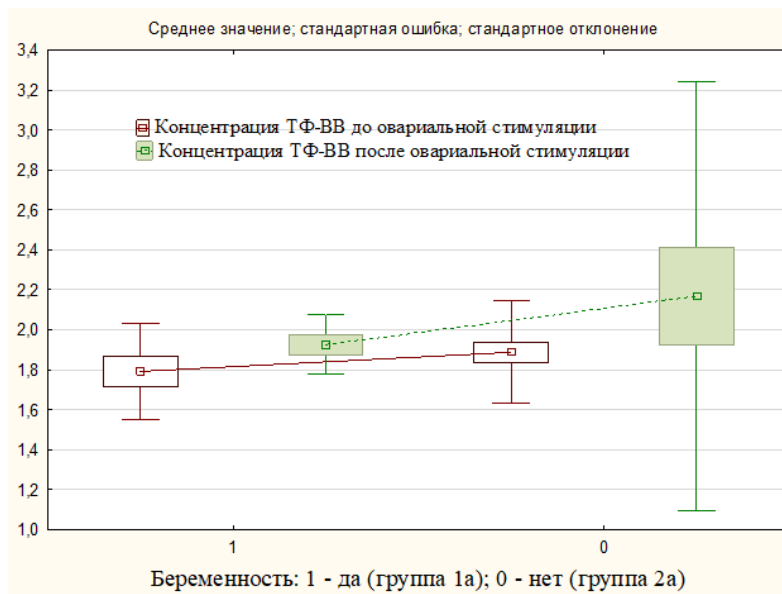


Рисунок 2. Уровень тканевого фактора (пг/мл), ассоциированного с внеклеточными везикулами плазмы крови, до и после овариальной стимуляции у пациенток групп 1а и 2а.

Уровень ТФ-ВВ в плазме крови был связан с уровнем АФА: чем выше уровень АФА, тем выше количество ТФ-ВВ: уровнем антител класса М к КЛ, к ФС и к аннексину V ( $r=0,9560$ ,  $p=0,0440$ ). Также была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем ТФ-ВВ и числом тромбоцитов ( $r=0,9560$ ,  $p=0,0440$ ).

На 5-м этапе было проанализировано влияние НМГ, назначенного в качестве антикоагулянтной или адъювантной терапии, на ЧНБ и частоту живорождения в программах ВРТ. Всего НМГ были назначены 41 пациентке в профилактической дозе 0,3-0,4 мл. Показаниями для назначения НМГ явились повторные неудачные попытки ПЭ в программах ВРТ (НМГ в данном случае назначались в качестве адъювантной терапии) (у 20 человек), персистенция АФА (у 10 человек) и отягощенный личный (2 человека) или семейный тромботический анамнез в сочетании с другими факторами риска ТЭО (у 9 человек). Пациентки с наследственной тромбофилией высокого риска ТЭО (7 человек) были также отнесены к данной группе. Было выявлено, что пациентки, получавшие НМГ, имели большую вероятность наступления беременности (18 из 30 пациенток, получивших НМГ, 60%, vs. 23 из 67 пациенток, не получивших НМГ, 34,3%),  $p=0,0179$ ,  $ОШ_{кор}=2,87$  (95% ДИ=1,18; 6,97) (с учетом выявленных конфаундеров). Терапия НМГ была продолжена до момента теста на ХГ и, далее, во время беременности в случае ее наступления. Таким образом, назначение НМГ способствовало увеличению шансов наступления беременности в 2,87 раза, что может быть связано с противовоспалительным, антикомплементарным и антитромботическим действием НМГ.

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



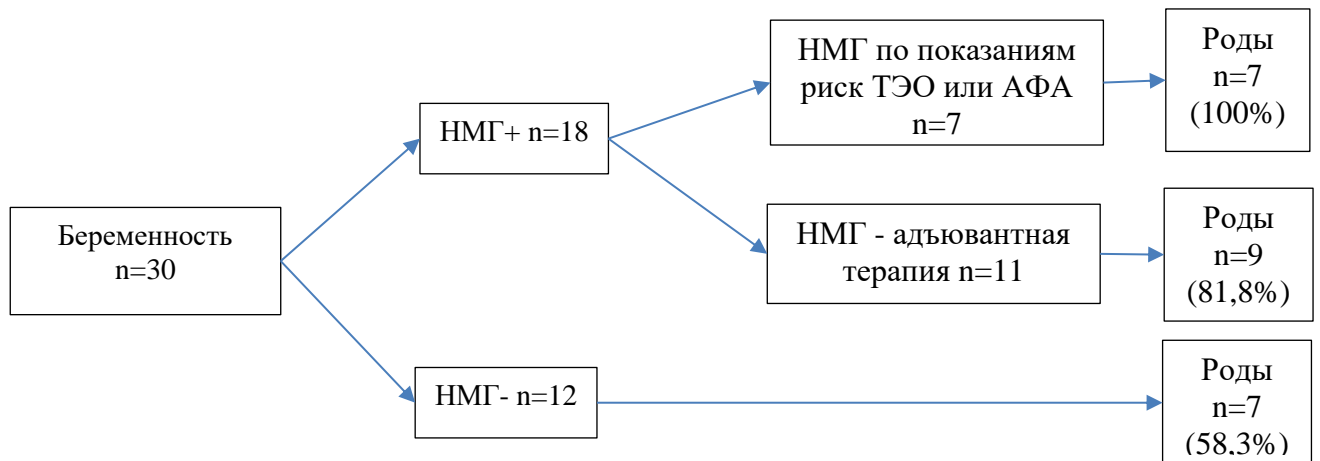


Рисунок 3. Исходы беременности у наблюдаемых пациенток.

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

На основании полученных данных, был составлен алгоритм обследования и лечения бесплодия у пациенток с тромбофилией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (Рисунок 4).



Рисунок 4. Алгоритм обследования и лечения бесплодия у пациенток с тромбофилией в программах ВРТ.

## ВЫВОДЫ

1. Распространенность наследственной тромбофилии высокого риска тромбозэмболических осложнений (мутации FII *G20210A*, FV *G1691A*, дефицит антитромбина-III, протеина С, протеина S) у пациенток с бесплодием, проходящих лечение с помощью методов ВРТ, является низкой и составляет 7,2%. Напротив, встречаемость персистенции повышенного уровня антифосфолипидных антител (уровень выше референсных значений,

измеренный дважды с интервалом 12 недель) является достаточно высокой и составляет 18,5%.

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

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

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

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

6. Назначение низкомолекулярных гепаринов в программах ВРТ увеличивает шансы наступления беременности в 2,9 раз (95% ДИ=1,2; 6,9), шансы живорождения - в 5,7 раз, что может быть связано с противовоспалительным, антикомплементарным и антитромботическим действием НМГ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам группы риска развития тромбоэмболических осложнений, а также с повторными неудачными попытками переноса

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

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

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

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

5. Пациенткам с повторными неудачными попытками переноса эмбрионов в программах ВРТ, особенно при выявлении персистенции повышенного уровня антифосфолипидных антител, могут быть рекомендованы профилактические дозы низкомолекулярных гепаринов со дня переноса

эмбриона в полость матки в качестве адьювантной терапии, так как показана большая частота наступления беременности при их назначении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий / **Е.Е. Краевая**, Н.В. Долгушина // *Акушерство и гинекология*. -2019. -№8-. -С. 20-25.
2. Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на коагуляционный гемостаз яичника / **Е.Е. Краевая**, Д.Н. Силачев, О.С. Безнощенко, К.В. Горюнов, Ю.А. Шевцова, А.А. Хуторненко, Н.П. Макарова, Л.В. Кречетова, Т.Ю. Иванец, А.В. Полетаев, Е.А. Калинина, Н.В. Долгушина, Г.Т. Сухих // *Проблемы репродукции*. -2020. -Т.26. -№2. -С. 6-14.
3. Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation / D. Silachev, K. Goryunov, M. Shpilyuk, O. Beznoschenko, N. Morozova, **Е. Kraevaya**, V. Popkov, I. Pevzner, L. Zorova, E. Evtushenko, N. Starodubtseva, A. Kononikhin, A. Bugrova, E. Evtushenko, E. Plotnikov, D. Zorov, G. Sukhikh // *Cells*. -2019. -№8. -pii: E258.
4. Результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с персистенцией антифосфолипидных антител / **Е.Е. Краевая**, Н.В. Долгушина, И.В. Менжинская, М.А. Шпилюк, О.С. Безнощенко, Л.В. Кречетова // *Акушерство и гинекология*. -2020. - №4. -С. 97-103.
5. Влияние персистенции антифосфолипидных антител на исходы программ ВРТ / **Е.Е. Краевая**, Н.В. Долгушина, И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко, М.А. Шпилюк, Л.В. Кречетова // *Материалы XIV Международного конгресса по репродуктивной медицине*. - М., 2020. - С.254-256.