

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОХРАНЫ
МАТЕРИНСТВА И МЛАДЕНЧЕСТВА МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЗАЙКОВА ВИКТОРИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЛАЦЕНТАРНЫХ НАРУШЕНИЙ
ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

14.01.01 - Акушерство и гинекология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, доцент
Путилова Наталья Викторовна
кандидат медицинских наук, доцент
Третьякова Татьяна Борисовна

Екатеринбург – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ТЕЧЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	12
1.1. Современные методы вспомогательной репродукции в лечении женского бесплодия.....	12
1.2. Формирование фетоплацентарного комплекса после вспомогательных репродуктивных технологий	14
1.3. Методы криоконсервации эмбрионов (преимущества витрификации эмбрионов).....	22
1.4. Особенности течения беременности и перинатальные исходы в программах экстракорпорального оплодотворения	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1. Дизайн исследования	29
2.2. Клиническая характеристика анализируемых групп больных	32
2.3. Методы исследования	34
2.3.1. Молекулярно-генетические методы исследования.....	35
2.3.2. Исследование системы гемостаза	36
2.3.3. Методы оценки состояния фетоплацентарного комплекса	37
2.3.4. Оценка морфофункционального состояния плацент	37
2.3.5. Иммуногистохимическое исследование плацент (VEGFr1, Аннексин V).....	39
2.3.6. Оценка состояния новорожденного	40
2.3.7. Методы статистической обработки данных	40

3.1. Особенности течения беременности у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса.....	42
3.2. Особенности системы гемостаза в I триместре беременности у пациенток после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения....	44
3.3. Коррекция дезадаптации системы гемостаза после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения	46
3.4. Генетические аспекты гемостазиологических расстройств при беременности в результате экстракорпорального оплодотворения	49
3.5. Роль межгенных взаимодействий в формировании наследственной предрасположенности к гиперкоагуляционным осложнениям гестации у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения.....	60
ГЛАВА 4. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ГЕСТАЦИИ У ПАЦИЕНТОК В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ.....	66
4.1. Правило прогноза гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах экстракорпорального оплодотворения	66
4.2. Правило прогноза вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения.....	73
ГЛАВА 5. ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ ИСХОДЫ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ У ПАЦИЕНТОК ПОСЛЕ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОПЕРЕНОСА В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ.....	82
5.1. Анализ способов родоразрешения и перинатальных исходов у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса	82

5.2. Анализ морфоструктуры плацент у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения	86
5.3. Иммуногистохимическое исследование экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFr1) и Аннексина V в плаценте после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения	92
Заключение	97
Выводы	104
Практические рекомендации	106
Список сокращений	107
Список литературы	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время крайне актуальной проблемой современной медицины является бесплодие в браке. Частота бесплодия в России по эпидемиологическим данным составляет от 10 до 19% [25, 39]. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) сегодня рассматривается как наиболее эффективный метод, позволяющий преодолевать различные формы бесплодия.

По данным литературы, беременности, наступившие в результате ВРТ, имеют ряд особенностей по сравнению со спонтанно наступившими. Известен высокий риск невынашивания беременности, а также развитие фетоплацентарной недостаточности (ФПН), влияющей на перинатальные исходы [28, 57, 71, 83, 125, 140, 142] .

Эффективность программ ВРТ за последние годы достигла своего плато и сохраняется на стабильном уровне, составляя 30-35% [33]. Для достижения беременности необходимо сочетание двух факторов: наличие эуплоидного эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия с высоким потенциалом имплантации эмбриона [163]. К сожалению, сложные взаимодействия эндометриальных и эмбриологических факторов, которые влияют на имплантацию, в основном неизвестны. Причастные причины необъяснимого бесплодия и невынашивания беременности включают наследственные тромбофилии. В настоящее время существуют разногласия относительно влияния наследственной тромбофилии на имплантацию, а, следовательно, и на эффективность программ ВРТ [7, 9, 162]. Среди описанных в литературе преобладающих тромбофилических мутаций, присутствует полиморфизм протромбина (F2), мутация Лейдена (F5), метилентетрагидрофолатредуктазы C667T и некоторых других факторов свертывания, а также дефицит природных

антикоагулянтных белков C и S и антитромбина III [7, 9, 56, 63, 112, 135]. Исследователями также доказана роль мутации гена F5 или F2 в риске развития венозных тромбоемболических осложнений [112]. Однако, в литературе немногочисленны исследования о влиянии тромбофилии на исходы беременности у пациенток в программах ВРТ, авторами изучены полиморфизмы ключевых генов в патологии невынашивания беременности и недостаточно данных о совместном влиянии генов тромбофилии на течение и исход беременности в результате ЭКО.

Считается, что во время стимуляции яичников высокий уровень гормонов и других факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) может создать относительно неблагоприятную среду для имплантации эмбрионов, в то же время, увеличивая риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) [25, 79, 101, 102]. Было высказано предположение, что стратегия замораживания всех эмбрионов с целью их переноса в более позднее время может привести к улучшению показателей беременности и уменьшению осложнений [95, 96, 173].

Криоконсервация эмбрионов является важным инструментом вспомогательной репродукции. Основными причинами, лежащими в основе тренда переноса витрифицированных эмбрионов, являются: новая технология витрификации, рост использования криопротоколов и большое количество исследований, показавших более благоприятные перинатальные и неонатальные исходы [34, 69, 173].

Знания о перинатальных исходах после переноса эмбрионов (ПЭ) в программах ЭКО увеличиваются. В мировой литературе особое внимание уделяется рождению живых детей, так называемый «take-home baby», и недостаточно освещены вопросы формирования фетоплацентарного комплекса после ЭКО, патология формирования которого отражает исход программ ВРТ. Поэтому вопрос о поиске четких критериев состояния и степени нарушения фетоплацентарной системы у женщин после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса позволит прогнозировать на ранних

сроках беременности ту или иную патологию и ее своевременную коррекцию, что будет способствовать улучшению перинатальных исходов.

Цель исследования

Прогнозирование нарушений формирования фетоплацентарного комплекса у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и после криопереноса на основе исследования системы гемостаза и уровня экспрессии проангиогенных факторов.

Задачи исследования

1. Провести клинико-статистический анализ анамнестических данных, течения беременности, родов и перинатальных исходов у пациенток в результате переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса в программах экстракорпорального оплодотворения.
2. Изучить вклад гемостазиологических расстройств и уровня экспрессии проангиогенных факторов в формирование фетоплацентарного комплекса в программах экстракорпорального оплодотворения и оценить морфофункциональное строение плацент.
3. Проанализировать значимость однонуклеотидных замен в генах тромбофилии и фактора роста эндотелия сосудов, и роль межгенных взаимодействий в риске формирования фетоплацентарной недостаточности у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса в программах экстракорпорального оплодотворения.
4. Разработать алгоритм ведения беременности у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и после криопереноса.

Методология и методы исследования

В работе использована общенаучная методология, основанная на системном подходе с применением формально логических, общенаучных и специфических

методов и основах доказательной медицины. Для решения поставленных задач проведено открытое продольное когортное проспективное контролируемое исследование с участием 135 беременных, начиная с 9-10 недель, из которых беременность в результате ЭКО, наступила у 100 человек (основная группа) и 35 условно здоровых женщин со спонтанно наступившей беременностью (контрольная группа); их новорожденные и последы. Основная группа была разделена на 2 подгруппы в зависимости от программы ЭКО: подгруппа 1 – перенос эмбрионов в стимулированном цикле (n=50), подгруппа 2 - перенос витрифицированных эмбрионов (n=50).

В работе использованы клиничко-лабораторные, инструментальные, статистические методы исследования. Выбор использованных в работе методов исследования определялся в соответствии с отраслевыми стандартами обследования в акушерстве, рекомендациями по лабораторной диагностике и статистическими исследованиями.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Автором, совместно с научным руководителем, д.м.н., доцентом Путиловой Н.В. и научным руководителем, к.м.н., доцентом Третьяковой Т.Б., определены цель, задачи, разработана методология и дизайн научного исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации. Автором лично проанализированы данные отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, выполнен план обследования, оптимизация алгоритма ведения пациентов по результатам исследования, формирование базы данных пациентов, сбор анамнеза, клиническое обследование пациентов, обработка материала и статистический анализ. Написание текста диссертации и публикаций выполнены в соавторстве с научными руководителями.

Обоснованность выводов и достоверность диссертационного исследования подтверждена достаточным объемом выборок клинических исследований, корректным анализом и интерпретацией полученных результатов, статистической обработкой данных, соблюдением принципов доказательной медицины.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях проблемной комиссии и Ученого совета ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России.

Материалы диссертационной работы доложены на V конгрессе акушеров-гинекологов УФО с международным участием «Перинатальная медицина – от истоков к современности» (Екатеринбург, 2017), на научно-практической конференции «Современные тренды развития репродуктивной и перинатальной медицины» (Екатеринбург, 2018), на VI конгрессе акушеров-гинекологов УФО с международным участием «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине» (Екатеринбург, 2019), VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Малышевские чтения. Демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» образовательный семинар «Репродуктивное здоровье в условиях новой коронавирусной инфекции» (Екатеринбург, 2020).

Положения, выносимые на защиту

1. Фетоплацентарная недостаточность чаще и раньше формируется у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле по сравнению с переносом витрифицированных эмбрионов.
2. Нарушение формирования фетоплацентарного комплекса обусловлено патологией системы гемокоагуляции и снижением уровня экспрессии проангиогенных факторов, что связано с полиморфизмом генов тромбофилии и фактора роста эндотелия сосудов.
3. Разработанные правила прогноза формирования патологии фетоплацентарного комплекса у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения позволяют выделить группу риска для персонифицированного подхода к ведению беременности.

Научная новизна

В результате проведенных исследований впервые определена роль совместного влияния полиморфизма генов, ассоциированных с риском

формирования тромбофилии и фактора роста эндотелия сосудов на гиперкоагуляционные нарушения у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и после криопереноса.

Выявлены наиболее прогностически значимые комбинации аллелей в генотипе, ассоциированные с маркерами нарушений гемостаза, определяющие группы повышенного риска развития осложненного течения беременности после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения.

Разработано и внедрено правило прогноза гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах ЭКО и правило прогноза вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые сведения о роли межгенных взаимодействий в формировании гемостазиологических расстройств при индуцированной беременности с использованием разных программ переноса эмбрионов.

Разработано и внедрено правило прогноза гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле, предложен способ прогнозирования осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО. Доказана перспективность их использования в клинической практике.

Разработан и внедрен в практическое здравоохранение алгоритм ведения беременности у пациенток после переноса эмбрионов в программах ЭКО на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса.

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные результаты исследования внедрены в работу ФГБУ «НИИ ОММ» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Екатеринбург), перинатального центра Тюменской области. Результаты исследования используются в педагогическом процессе для аспирантов и ординаторов ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ и на кафедре акушерства и гинекологии,

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России.

По результатам исследования получено 2 патента на изобретение: 1. Способ прогнозирования гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса «свежих» эмбрионов в программах ЭКО, № 2720241 от 28.04.2020г. 2. Способ прогнозирования вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО, № 2729441 от 06.08.2020.

Оформлено учебное пособие «Прогнозирование гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах экстракорпорального оплодотворения». Екатеринбург, 2020.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, общим объемом 5,43 печатных листа, в том числе 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, из них одна статья в журнале, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Scopus), получено 2 патента на изобретения, оформлено 1 учебное пособие, 3 публикации в материалах конференций и форумов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах печатного текста, иллюстрирована 26 рисунками и 39 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 185 источников, из которых 47 отечественных и 138 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ТЕЧЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

1.1. Современные методы вспомогательной репродукции в лечении женского бесплодия

Экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов (ЭКО, ПЭ) - это технология вспомогательной репродукции, в которой ооциты, извлеченные из бесплодной женщины, оплодотворяют в пробирке. Полученный эмбрион переносится в полость матки [25]. Впервые исследования были проведены на животных еще в 1930-х годах (Norfolk), и первый человеческий ребенок «из пробирки» родился в 1978 году [115]. А в 1984 году родился первый ребенок после переноса размороженных эмбрионов (РЭ). Хотя и был достигнут огромный прогресс в технике процедуры ЭКО, частота наступления беременности остается низкой.

По данным последнего отчета РАРЧ за 2018г. было проведено 158815 циклов ВРТ [32]. Эти статистические данные свидетельствуют о впечатляющем количестве женщин, проходящих лечение от бесплодия.

Во многих странах Европы, в том числе и в Российской Федерации постепенно увеличивается численность женского населения позднего репродуктивного возраста. К 2030г. это количество увеличится на 30% по данным Росстата по сравнению с 2014г. В современной литературе появляется все больше данных об изменении репродуктивного поведения населения, характеризующегося демографическим переходом к малодетной семье, одинаково выраженного как среди городских жителей, так и сельских. Среди причин такого поведения являются материальные и жилищные трудности, социальная активность женщины, а также желание отложить беременность на конец репродуктивного периода. В связи с этим, такие пациенты попадают в группу

женщин со сниженным овариальным резервом и, как следствие, «бедным» ответом на индукцию суперовуляции. Также возрастает число гинекологических и соматических заболеваний, и количество анеуплоидных ооцитов, что значительно снижает частоту наступления беременности [40]. Право на репродуктивный выбор является неотъемлемой частью прав человека. Возможность реализации репродуктивных прав граждан должна гарантироваться государством при помощи специального законодательства.

Применение методов ВРТ в России регламентируется Федеральным законом №323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации (глава 6, статья 55), вступившим в силу 1 января 2012 года, и Приказом №107н Минздрава РФ от 30.08.2012 «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» [5, 13, 16]. В этих документах дано следующее определение вспомогательной репродуктивной технологии: «ВРТ - это методы лечения бесплодия, при применении которых отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне материнского организма (в том числе с использованием донорских и/или криоконсервированных половых клеток, тканей репродуктивных органов и эмбрионов, а также суррогатного материнства)».

В последние годы Федеральное правительство в возрастающих объемах выделяет средства на лечение бесплодия с помощью ВРТ в рамках базовой программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи по программе обязательного медицинского страхования (ОМС). Причем объем помощи в рамках ОМС постоянно расширяется. Так криотехнологии вошли в перечень видов помощи супружеским парам с бесплодием с 2019г. Частота наступления беременности с использованием размороженных эмбрионов (РЭ) 30-35% среди пациенток, лечившихся по программам ОМС. Эти показатели существенно ниже среднероссийских, которые последние 5 лет превышают уровень 45% [32, 34].

В связи с совершенствованием методов ВРТ, дальнейшее их развитие не компенсирует естественных репродуктивных потерь, так как у женщин,

включенных в программу ЭКО, имеются такие факторы дополнительного риска, как возраст, экстрагенитальная патология, гормональные нарушения, отрицательное влияние гонадотропных гормонов на оогенез при стимуляции овуляции [28].

1.2. Формирование фетоплацентарного комплекса после вспомогательных репродуктивных технологий

Особый интерес при использовании методов вспомогательных репродуктивных технологий представляет собой плацента, как главный орган, обеспечивающий формирование и рост плода. По данным литературы, беременности, достигнутые методами ВРТ, имеют высокий риск формирования ФПН [26, 25, 28, 41, 57, 64, 143]. Как известно, адекватное маточно-плацентарное и плодово-плацентарное кровообращение создает оптимальные взаимоотношения между матерью и плодом, при нарушении которых происходят структурно-функциональные изменения, которые могут привести к патологии внутриутробного развития плода и перинатального периода [26, 31, 43, 98, 179].

Сохранение беременности, наступившей в результате применения методов ВРТ, определяется рядом факторов, наиболее важными из которых являются гемостазиологические, поскольку для нормального формирования плаценты должна успешно пройти I и II волна инвазии трофобласта, что напрямую связано с гемостазиологическим равновесием. В результате полноценной инвазии клеток трофобласта происходят морфологические изменения сосудов, которые проявляются увеличением диаметра сосуда и возникновением автономности (отсутствием реакции на влияние вазопрессорных медиаторов). Гемодинамические процессы в единой функциональной системе мать-плацента-плод являются одними из ведущих факторов, обеспечивающих нормальное течение беременности и рост плода [3, 45, 46, 90, 158].

Известно, что нарушение первой волны инвазии цитотрофобласта в стенку децидуальных артерий приводит к ранним спонтанным абортам, неудачам ЭКО,

маточным кровотечениям в I триместре беременности. Недостаточность второй волны инвазии трофобласта заключается в снижении кровоснабжения плаценты и плода, реализации ФПН с идиопатической задержкой развития роста плода (ЗРП) [55, 83, 119].

Нормальное развитие плаценты также зависит от достаточной оксигенации и обмена веществ через плаценту, который обеспечивается гемохориальной плацентацией. Для этого необходима соответствующая трансформация материнских спиральных артерий миометрия трофобластом при его инвазии. В результате формируется оптимальный контакт между маткой и плацентой и хорошо развитая сосудистая сеть, которая напрямую зависит от удачной инвазии трофобласта, процессов васкулогенеза и ангиогенеза [31, 35, 45, 55, 83, 132, 139].

В последнее десятилетие, как в России, так и за рубежом разработаны и внедрены в практику определенные методы коррекции гемостазиологических расстройств при процессах дезадаптации системы гемостаза во время беременности и родов [5, 7, 11, 21, 22, 48, 55, 65, 109, 175].

Как правило, физиологическая беременность, также как и патологическая, с первых дней протекает с явлениями гиперкоагуляции и сопровождается комплексом динамических реакций в системе мать-плацента-плод, которые направлены на поддержание материнского гомеостаза в новых, изменившихся условиях. Участие плаценты в интеграции большинства обменных процессов между организмами матери и плода несомненно. Нарушение основных функций плаценты – транспортной, эндокринной, трофической, метаболической — в ответ на различные патологические состояния материнского организма влекут за собой прогрессирование ФПН, хроническую гипоксию, задержку развития и гибель плода [3, 7, 28, 38].

Плацента растет быстро и постоянно должна удовлетворять увеличивающиеся метаболические потребности растущего плода. Поэтому сосудистая сеть плаценты обладает пластичностью и динамически изменяется в течение беременности. В ходе васкулогенеза новые капилляры образуются путем

миграции и дифференцировки клеток-предшественников эндотелиальных клеток — гемангиобластов [38, 72, 121].

Ангиогенез — чрезвычайно сложный процесс, на который влияют многочисленные факторы, разделяющиеся на проангиогенные и ингибиторы ангиогенеза. Мощным проангиогенным фактором является VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), в связи с чем, существует множество исследований, демонстрирующих его участие в формировании сосудистой сети плаценты. В эмбриональном периоде образование новых сосудов происходит путем дифференцировки эндотелиальных клеток от гемангиобластов. В дальнейшем, после рождения, в определенные физиологические и/или патологические состояния (менструальный цикл, беременность, заживление и восстановление ран и др.) формируются новые сосудистые сети путем ангиогенеза на уже существующих сосудах. В то же время, полученные данные свидетельствуют об участии VEGF в патологическом ангиогенезе, индуцируя развитие и прогрессирование определенных патологических состояний в постнатальном периоде, таких как: опухолевый рост, диабетическая ретинопатия, воспалительные и ишемические процессы, преэклампсия и др. [1, 18, 37, 157].

Ген VEGF расположен на хромосоме в 6p21.3 и кодирует восемь экзонов и семь интронов. Это гликозилированный митоген, который секретируется эмбриональными трофобластами во время имплантации эмбриона, тем самым поддерживая целостность тканей растущего плода. VEGF способствует развитию уже существующих (ангиогенез) и сосудов *de novo* (васкулогенез) во время роста эмбриона. VEGF в основном участвует в формировании кровеносных сосудов плода и развитии материнских сосудов, фетоплацентарной циркуляции и успешной имплантации эмбриона. Частота экспрессии VEGF увеличивается с развитием беременности, что позволяет предположить, что VEGF является важным фактором в развитии сосудов плаценты. По мере прогрессирования физиологической беременности уровень VEGF в материнской крови возрастает на протяжении всего срока, особенно после 30 недель. На поздних стадиях ангиогенеза макрофаги, фибробласты и гладкомышечные клетки секретируют

антиангиогенные факторы, тормозящие миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, не снижая их жизнеспособности. Наиболее выраженные изменения продукции сосудистых факторов роста выявлены у пациенток с преэклампсией, суб- и декомпенсированной ФПН. Определение уровня факторов роста в сыворотке крови беременных женщин позволяет прогнозировать развитие и уточнять степень тяжести преэклампсии и ФПН для выбора акушерской тактики и сроков родоразрешения. У женщин с развившимися осложнениями во время беременности выявлены более низкие показатели факторов роста плаценты в ранние сроки [1, 18, 37, 157].

В семейство VEGF входит несколько групп: А, В, С, D, Е. Выделяют его следующие изоформы: VEGF145, VEGF165, VEGF180, VEGF183, VEGF206, которые различаются по способности взаимодействовать с компонентами экстрацеллюлярного матрикса и рецепторами клеточной поверхности. Преобладают растворимые изоформы: VEGF165 и VEGF121, а VEGF189 и VEGF206, находящиеся в связанном состоянии и мобилизирующиеся только в результате протеолиза [24].

VEGF повышает выработку N0 и P912 (простаглицлин), вызывая вазодилатацию, антитромботический эффект, снижает адгезию лейкоцитов, обладает противовоспалительными свойствами. Эти данные свидетельствуют о защитных функциях сосудистых факторов роста [24, 37]. Не исключается и его роль в развитии СГЯ. Гемоконцентрация и активация коагуляционного каскада, повышенная активность комплексов тромбин—антитромбин и плазмин—антиплазмин, повышенный уровень тромбоцитов и повышенный уровень фибриногена - все это было зарегистрировано у пациентов с СГЯ и индуцировало гиперкоагуляцию [133].

VEGF связывается с тремя рецепторами тирозинкиназы, посредством которых и взаимодействует с клеткой, способствует активации этого фермента и фосфорилирует остатки тирозина, активируя таким образом несколько внутриклеточных сигнальных путей. Существует три типа рецепторов VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. Члены семейства VEGF также могут

взаимодействовать с другими белками, такими как нейропилины, интегрины, кадгерины или гепаринсульфатные протеогликаны. Ко-рецепторы нейропилина-1 и нейропилина-2 являются нетирозинкиназными рецепторами и избирательно присоединяются к определенным подтипам или изоформам VEGF (таким как VEGF-A165). Нейропилины усиливают функции VEGFR-2 и VEGFR-3, направляя миграцию эндотелиальных клеток в ангиогенезе [24, 172].

Рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 экспрессируются преимущественно на сосудистых эндотелиальных клетках, в то время как VEGFR-3 – только эндотелиальными клетками лимфатических сосудов [24]. Помимо эндотелиальных клеток существуют и другие клетки, которые могут связываться с VEGFR-1: воспалительные, опухолевые клетки, моноциты, макрофаги, трофобласты и др. VEGFR-1 играет важную роль в миграции эндотелиальных клеток, моноцитов, макрофагов и гемопоэтических стволовых клеток, так как главным образом вовлекается в патологический ангиогенез. VEGFR-1 имеет в 10 раз более высокое сродство к VEGF, чем VEGFR-2, и более низкую активность тирозинкиназы. Последние данные о биологической роли VEGFR-1 в васкулогенезе в эмбриональном развитии противоречивы; большинство авторов утверждают, что VEGFR-1 играет роль в дифференцировке и миграции эндотелиальных клеток, но не в их пролиферации [180].

Молекулярные механизмы, связанные с участием гена VEGFR-1 в васкулогенезе, до конца не изучены, и до сих пор существуют аспекты, требующие уточнения. По-видимому, VEGFR-1 ингибирует проангиогенные сигналы на ранней стадии развития, предотвращая связывание VEGF с VEGFR-2, который экспрессируется на новообразованных эндотелиальных клетках (зная, что VEGFR-2 оказывает стимулирующее действие на пролиферацию эндотелиальных клеток) [38].

Иммуноферментный анализ сыворотки крови беременных показал, что уровень VEGF незначительно меняется в течение беременности, но резко возрастает в послеродовом периоде. В свою очередь, при иммуногистохимических (ИГХ) исследованиях установлено, что экспрессия

VEGF-A и его рецепторов наиболее интенсивна на ранних сроках беременности. С увеличением срока гестации выраженность их уменьшается. На более поздних сроках гестации одной из основных функций VEGF является обеспечение повышенной жизнеспособности эндотелиоцитов и стабилизации сосудистого русла [122, 165].

Считается, что полиморфизмы гена VEGF -2578 C>A, расположенные в области промотора, и +936 C>T в нетранслируемой области играют эффективную роль в регуляции продукции VEGF. Обнаружено, что замена аллеля A в месте аллеля C в положении -2578 и аллеля T в месте аллеля C в положении +936 изменяет продукцию VEGF, тем самым участвуя в обструкции плацентарного ангиогенеза, что приводит к ранним спонтанным абортam. Следовательно, полиморфизм гена VEGF может выступать в качестве важного модулятора развития фетоплацентарного комплекса [60].

Мощной антикоагулянтной способностью обладает Аннексин V (плацентарный антикоагулянтный протеин I, сосудистый антикоагулянт α) относится к эндотелиальным факторам и является мембранным белком с молекулярной массой 35кД, который представлен, главным образом, в эндотелии клеток и плаценте. Основной функцией аннексина V является участие в процессе свертывания крови посредством мощной антикоагулянтной способности. Такой антикоагулянтный эффект объясняется возможностью белков вытеснять протеины коагуляции с фосфолипидных поверхностей. Антитромботическое действие его базируется на способности образовывать двухмерные кластеры на поверхности клеток. При этом молекулы аннексина V образуют на поверхности трофобласта межмолекулярные комплексы с множеством соединений по типу «щита», формирование которого играет тромборегуляторную роль в области контакта с кровеносными сосудами [1, 29, 30, 131].

Во многом механизмы эндотелиальной дисфункции и системы гемостаза генетически запрограммированы. В настоящее время большая роль отводится полиморфизму генов тромбофилии и сосудисто-эндотелиальных факторов роста в формировании эндотелиальной дисфункции. Учитывая особенности

физиологической адаптации системы гемостаза к беременности, абсолютное большинство различных форм тромбофилии клинически манифестирует именно в течение гестационного процесса, приводя к серьезным осложнениям [3, 9, 12, 27, 99]. Известна их взаимосвязь с неудачами имплантации эмбриона, привычным невынашиванием беременности, развитием преэклампсии, ФПН, патологическим прикреплением плаценты и пуповины в ходе васкулогенеза [15, 23, 40, 111, 127].

К преобладающим тромбофилическим мутациям относится полиморфизм гена протромбина (F2), мутация Лейдена (F5), метилентетрагидрофолатредуктазы C667T и некоторых других факторов свертывания, а также дефицит природных антикоагулянтных белков C и S и антитромбина III. Почти все эти врожденные тромбофилии наследуются аутосомно-доминантным способом. Большие когортные исследования показывают, что у женщин с гомозиготной мутацией гена F5 или F2 риск развития венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) увеличивается в 80 раз, в то время как, при гетерозиготном носительстве – в 2,7 и в 3,8 раз соответственно [112]. В крупном исследовании неблагоприятных исходов беременности наличие генетической тромбофилии ассоциировалось с повышенным риском невынашивания, преждевременной отслойкой плаценты и преэклампсией [63].

В последние годы активно изучается вопрос влияния тромбофилии на эффективность методов ВРТ. Недавний мета-анализ, включающий 8 исследований, показал высокий риск неудач ВРТ у пациентов с мутацией Лейдена. Исследование других полиморфизмов генов тромбофилии не показало достоверных отличий по эффективности программ ВРТ [67].

В настоящее время активно изучается роль совместного влияния генов тромбофилии на течение беременности и исход программ ВРТ. В частности, небольшое исследование пациентов с тремя и более неудачными попытками ЭКО показало, что мутации Лейдена и мутации в гене протромбина были более распространенными в группе с неудачами ЭКО по сравнению с группой, где беременность наступила самостоятельно [135]. Другое исследование показало наличие любой из следующих наследственных тромбофилий: F2, F5,

метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), дефицит белка S, дефицит белка C или дефицит антитромбина III, чаще встречалось у пациентов с рецидивирующими неудачами имплантации, особенно если у них было неясное бесплодие по сравнению с женщинами со спонтанно наступившей беременностью [162]. Аналогичное исследование, тестирующее тот же набор генов, показало комбинации двух или более из этих мутаций, которые чаще встречались в группе с неудачными попытками ЭКО по сравнению с контрольной группой пациентов, у которых беременность наступила с первой попытки или женщин с самостоятельной беременностью [120].

И наоборот, существуют также многочисленные исследования, которые опровергают идею наследственной тромбофилии, влияющей на результаты ЭКО. В исследовании, проведенным Steinvil et al. не было достоверной разницы между количеством предшествующих неудачных циклов ВРТ и генетической тромбофилией. Напротив, женщины, у которых была активирована резистентность к протеину C и/или мутация F5 имели значительно более высокие показатели эффективности ЭКО по сравнению с контролем. Носительство тромбофилии не было связано с неблагоприятными репродуктивными исходами [59].

Очевидно, что в литературе существует значительное количество разногласий относительно роли наследственной тромбофилии в недостаточности имплантации и исходах ЭКО. Несоответствующие результаты между ретроспективными исследованиями и небольшими проспективными исследованиями затрудняют анализ. Многие исследователи считают, что у каждой пациентки, вступающей в программу ЭКО, должен оцениваться риск тромботических осложнений с учетом возраста, соматических заболеваний, наличия ожирения, отягощенного анамнеза по сердечно-сосудистой патологии и венозной тромбоэмболии, а также выявленных при обследовании лабораторных маркеров риска тромбофилии [73, 111]. На фоне стимуляции овуляции в программах ЭКО у большинства женщин отмечаются изменения параметров гемостазиограммы, которые зачастую, при отсутствии своевременной коррекции, могут привести к неблагоприятным исходам, как для матери, так и для плода [111].

Таким образом, основным преимуществом нестимулированных (естественных) циклов является отсутствие экзогенной стимуляции, которая сводит к минимуму побочные эффекты овариальной стимуляции, и, за исключением редких случаев, приводит к передаче только одного эмбриона, тем самым максимально приближая наступление беременности в результате ЭКО к естественному зачатию [97, 140]. Кроме того, есть данные, что перинатальные исходы у младенцев, зачатых после минимальной стимуляции в протоколах ЭКО, лучше при учете веса при рождении [152].

1.3. Методы криоконсервации эмбрионов (преимущества витрификации эмбрионов)

Криоконсервация ооцитов и эмбрионов является важным аспектом вспомогательных репродуктивных технологий. Его широкое применение позволило повысить безопасность и эффективность процедур ЭКО. Доля криоконсервированных циклов переноса эмбрионов по сравнению со свежими циклами в Европе растет. В целом было подсчитано, что криоконсервированные циклы составляли 32% переносов в 2011 году по сравнению с 28% в 2010 году. В некоторых странах, таких как Швейцария, Финляндия, Нидерланды, Швеция и Исландия, доля криоконсервированных переносов эмбрионов превышает 50% [88].

Улучшение условий культивирования эмбрионов позволило получать большее количество эмбрионов хорошего качества. В последние годы принята стратегия «заморозить все», которая становится принятой и ценной альтернативой переносу эмбрионов в стимулированном цикле. Используется криоконсервация всех яйцеклеток или эмбрионов хорошего качества, полученных в цикле ЭКО, для последующего переноса в более подходящее время в связи с медицинской необходимостью или желанием пациентки [66, 92, 123, 134, 150, 159, 181]. С целью снижения количества многоплодных беременностей, и, соответственно связанных с ними осложнений, активно практикуют селективный перенос одного эмбриона (eSET). В программах ВРТ частота селективного

переноса одного эмбриона в Австралии, Финляндии, Бельгии и Швеции, составляет более 50% [164]. Использование методов криоконсервации увеличивает кумулятивную частоту наступления беременности, позволяет избежать повторных циклов стимуляции суперовуляции, снизить риск развития СГЯ, тем самым повышая эффективность и безопасность ВРТ [46, 78]. В последующем, эти эмбрионы могут быть использованы после неудачного переноса нативных эмбрионов. Или же, в случае успешного завершения беременности, при желании семейной пары иметь еще детей, данные программы могут быть реализованы позже. Таким образом, криоконсервация эмбрионов является альтернативным вариантом использования оставшихся эмбрионов [79, 80, 91, 94, 106, 147].

На сегодняшний день существует два основных метода криоконсервации – медленное замораживание и витрификация. Преимущества медленного замораживания заключаются в том, что имеется низкий риск контаминации во время процедуры и данный метод не требует высоких навыков манипуляции. Однако медленное замораживание имеет высокий риск повреждения клеток эмбриона в связи с образованием внеклеточного льда. Витрификация применяется в качестве альтернативы техники медленного замораживания, и представляет собой процесс, сочетающий применение концентрированных растворов с быстрым охлаждением для предотвращения образования льда. В основе метода витрификации лежит ультрабыстрая технология охлаждения, в результате которой удается избежать повреждения клетки, так как не образуются кристаллы льда. В ходе процедуры биологический материал подвергается воздействию более высоких, по сравнению с методом медленного замораживания, концентраций криопротекторов, а затем погружается в жидкий азот [80, 81].

По данным литературы отмечена более высокая выживаемость оттаянных бластоцист после витрификации, по сравнению с использованием метода медленного замораживания, и находится в пределах 57 – 92%, 72 – 100% соответственно [74, 77, 80, 125].

Процесс витрификации ооцитов имеет определенные особенности, связанные с рядом цитологических и молекулярно-биохимических особенностей ооцита. Следует отметить, что не все яйцеклетки подвергаются витрификации. Для криоконсервации пригодны только ооциты, находящиеся на стадии метафазы II деления, которая характеризуется наличием активного аппарата веретена деления [71, 181]. Развитие методов витрификации с 1985 года привели к созданию нынешней процедуры криоконсервации. Особенно появление метода Cryotop (Kitazato Corporation, Fuji, Japan) с использованием менее токсичной среды и обеспечения ультрабыстрой скорости охлаждения и нагревания, что позволило провести криоконсервацию неоплодотворенных ооцитов человека, которые раньше ассоциировались с низкой выживаемостью после оттаивания и низкими нормальными показателями оплодотворения [74].

В современной литературе достаточно много научных исследований и статей посвящено сравнению двух методов криоконсервации: медленное замораживание и витрификация. В частности, в своей научной работе «Криоконсервация ооцитов и эмбрионов» Lisbet Van Landuyt 2012г., указала несколько преимуществ техники витрификации над медленным замораживанием:

1. Исключается риск образования внеклеточных или внутриклеточных кристаллов льда, которые могут повреждать клетку.

2. Во время витрификации клетки теряют воду или обезвоживаются прежде, чем будут криоконсервированы. С другой стороны, при медленном замораживании обезвоживание клетки запускается при инициации внеклеточной кристаллизации (сидинге) в результате повышения концентрации соли во внеклеточном пространстве. Такое повышение концентрации соли называется «эффектом растворения» и, как известно, является губительным для клеток. Во время витрификации такого внеклеточного повышения концентрации соли не происходит, следовательно, отсутствует риск возникновения «эффекта растворения».

3. При витрификации процесс криоконсервации происходит очень быстро, и, следовательно, возможный ущерб, причиняемый замораживанием, практически исключается [181].

Успехи витрификации зависят от большого количества факторов [17, 77, 125]. В первую очередь, от «достаточной» проникающей способности криопротекторов и дегидратации под воздействием непроникающих криопротекторных веществ во время витрификации, что непосредственно связано со специфическими характеристиками проницаемости ооцитов для воды и криопротекторов и, следовательно, эти характеристики должны учитываться при проведении процедуры витрификации [74, 76, 144].

В связи с успешным развитием современных технологий ВРТ, весьма важным вопросом являются конечные исходы данных программ, а именно анализ здоровья детей, рожденных в результате применения методов витрификации.

1.4. Особенности течения беременности и перинатальные исходы в программах экстракорпорального оплодотворения

«Хороший перинатальный исход» среди детей, родившихся после ВРТ, определяют как одноплодные роды в сроке гестации ≥ 37 недель и массой тела при рождении ≥ 2500 г [130]. Однако до конца не изучено воздействие ВРТ на организм матери и плода. Хорошо известно, что беременности, наступившие в результате ВРТ, имеют значительно более высокий риск многоплодной беременности и неблагоприятных перинатальных исходов, в том числе преждевременных родов, низкого веса при рождении, врожденных пороков развития [10, 52, 69, 97, 107, 116, 140, 141, 166, 148]. Некоторые исследования показали повышенный риск развития преэклампсии, гестационной артериальной гипертензии, предлежания плаценты, гестационного сахарного диабета после ВРТ [19, 95, 96, 100, 117, 118, 124, 138].

Лежащие в основе этиологии этих неблагоприятных перинатальных исходов в значительной степени неизвестны, но факторами риска считают:

нарушение репродуктивной функции супружеской пары, использование гормональной стимуляции и различных методов ВРТ [56, 147, 84, 108, 154, 174].

Знания об акушерских и перинатальных исходах между беременностями, наступившими в результате ПЭ в стимулированном цикле и в криопротоколе, увеличиваются. Исследования доказывают, что здоровье новорожденных, родившихся с использованием переноса РЭ более благоприятное, чем здоровье детей, рожденных после переноса эмбрионов в стимулированном цикле [14, 123, 164]. Недавние исследования показали, что при беременности, наступившей в результате переноса витрифицированных эмбрионов, ниже риск преждевременных родов и низкого веса детей при рождении по сравнению с ПЭ в стимулированном цикле. Также при таких беременностях выявлен повышенный риск высокого веса у новорожденных [68, 182]. В современной литературе описаны случаи более высокого риска врожденных пороков развития у детей, рожденных в результате переноса размороженных эмбрионов по сравнению с ПЭ в стимулированном цикле [70].

В имеющихся публикациях нет единого подхода к критериям включения и исключения, учету материнского фактора, оцениваемым параметрам. Оценка состояния фетоплацентарного комплекса в данных исследованиях не проводилась. Исследования проводились внутри отдельных программ экстракорпорального оплодотворения, основным критерием изучения являлось рождение живого ребенка, так называемый, «take-home baby». В нескольких рандомизированных исследованиях показано, что перенос витрифицированных эмбрионов имеет ряд таких преимуществ, как частота наступления беременности, рождение живого ребенка и возможность переноса эмбрионов в естественном цикле, когда экзогенное гормональное влияние отсутствует, либо сведено к минимуму, что в свою очередь максимально приближает наступление беременности в результате ЭКО к естественному зачатию [93, 155, 161, 171].

В некоторых работах учитывался метод оплодотворения — ИКСИ и ЭКО [151, 183, 160, 170]. Большинство исследований использовали нативные циклы

как контрольную группу. Некоторые авторы проводили сравнение исходов после переноса РЭ с исходами при спонтанных беременностях [53, 62, 82, 120].

Имеются данные о более высоком риске вставания плаценты при беременности, наступившей в результате переноса криоконсервированных эмбрионов (7,7% по сравнению с нативными циклами – 2,5%) [117, 126]. Патогенез этого состояния не определен, но прослеживается связь с нарушением децидуализации эндометрия и отклонениями в ремоделировании материнских сосудов [105].

По данным различных исследований, частота преждевременных родов при одноплодной беременности у пациенток после переноса РЭ была ниже по сравнению с ПЭ в стимулированном цикле [87, 129, 137, 151, 173]. У других авторов подобного различия найдено не было [142, 169].

В другом исследовании, проведенном в 2010 году Pelkonen et al., при сравнении исходов в циклах ВРТ с использованием как нативных, так и размороженных эмбрионов, частота преждевременных родов была достоверно выше, по сравнению со спонтанно наступившими беременностями [153].

В большинстве исследований, которые посвящены анализу акушерских и перинатальных исходов после переноса РЭ, оценка показателя частоты родов не проводилась [136, 167].

Проведенные в скандинавских странах исследования выявили, что удельный вес родоразрешения путем операции кесарева сечения в программах ЭКО при одноплодной беременности был выше после переноса РЭ при сравнении с нативными циклами и почти в 2 раза превышал данный показатель при сравнении с группой, включающей спонтанно наступившие беременности [110].

Дальнейшие исследования состояния фетоплацентарного комплекса у женщин, беременность которых наступила в результате переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса, а также выделение четких критериев состояния и степени нарушения фетоплацентарной системы у данной категории женщин позволит прогнозировать на ранних сроках беременности ту или иную патологию и ее своевременную коррекцию. Сравнительные исследования

состояния фетоплацентарной системы в программах ЭКО с переносом эмбрионов в стимулированном цикле, и в криопротоколах как на фоне заместительной гормональной терапии, так и в естественном цикле позволят оценить перинатальные исходы в программах ЭКО.

Влияние методов ВРТ на течение беременности и оценка перинатальных исходов у данной категории женщин остается спорными. Исследование фетоплацентарной функции, особенно васкулогенеза и ангиогенеза в программах ЭКО, является важным для прогнозирования течения беременности и улучшения перинатальных исходов.

Материалы главы 1 опубликованы в следующих работах

1. Шумовская, В.В. Особенности формирования фетоплацентарного комплекса после переноса свежих и витрифицированных эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова, Д.О. Мазуров // Акушерство и гинекология. – 2018. № 10. С. 20-24.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Категория:

В исследование были включены 135 пациенток с 9-10 недель беременности, у 100 из которых беременность наступила в результате экстракорпорального оплодотворения и 35 женщин со спонтанно наступившей беременностью; их новорожденные и последы.

В ходе исследования все пациентки были разделены на 2 группы: основную и контрольную (рисунок 1).

Основную группу (n=100) составили пациентки, беременность которых наступила после ЭКО, их новорожденные и последы.

Эта группа была поделена на 2 подгруппы, в зависимости от программы ЭКО:

1 подгруппа – пациентки, беременность которых наступила в результате переноса эмбрионов в стимулированном цикле (базовая программа ЭКО) (n = 50);

2 подгруппа – пациентки, беременность которых наступила в результате переноса размороженных эмбрионов (n = 50).

Контрольную группу составили 35 условно здоровых пациенток со спонтанно наступившей беременностью, их новорожденные и последы.

Критерии включения пациенток в основную группу:

- пациентки, беременность которых наступила после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и витрифицированных эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения, начиная с 9-10 недельного срока гестации.

Критерии исключения из исследования:

- пациентки с многоплодной беременностью;
- пациентки с гестационным сахарным диабетом на инсулинотерапии;
- пациентки с ВИЧ, вирусными гепатитами;
- тяжелая экстрагенитальная патология;
- пациентки с врожденными пороками развития плода;
- пациентки с врожденными пороками развития внутренних половых органов;
- пациентки с миомами матки больших размеров и тяжелой формой аденомиоза;
- синдром гиперстимуляции яичников.

Методология исследования: открытое продольное когортное контролируемое исследование.

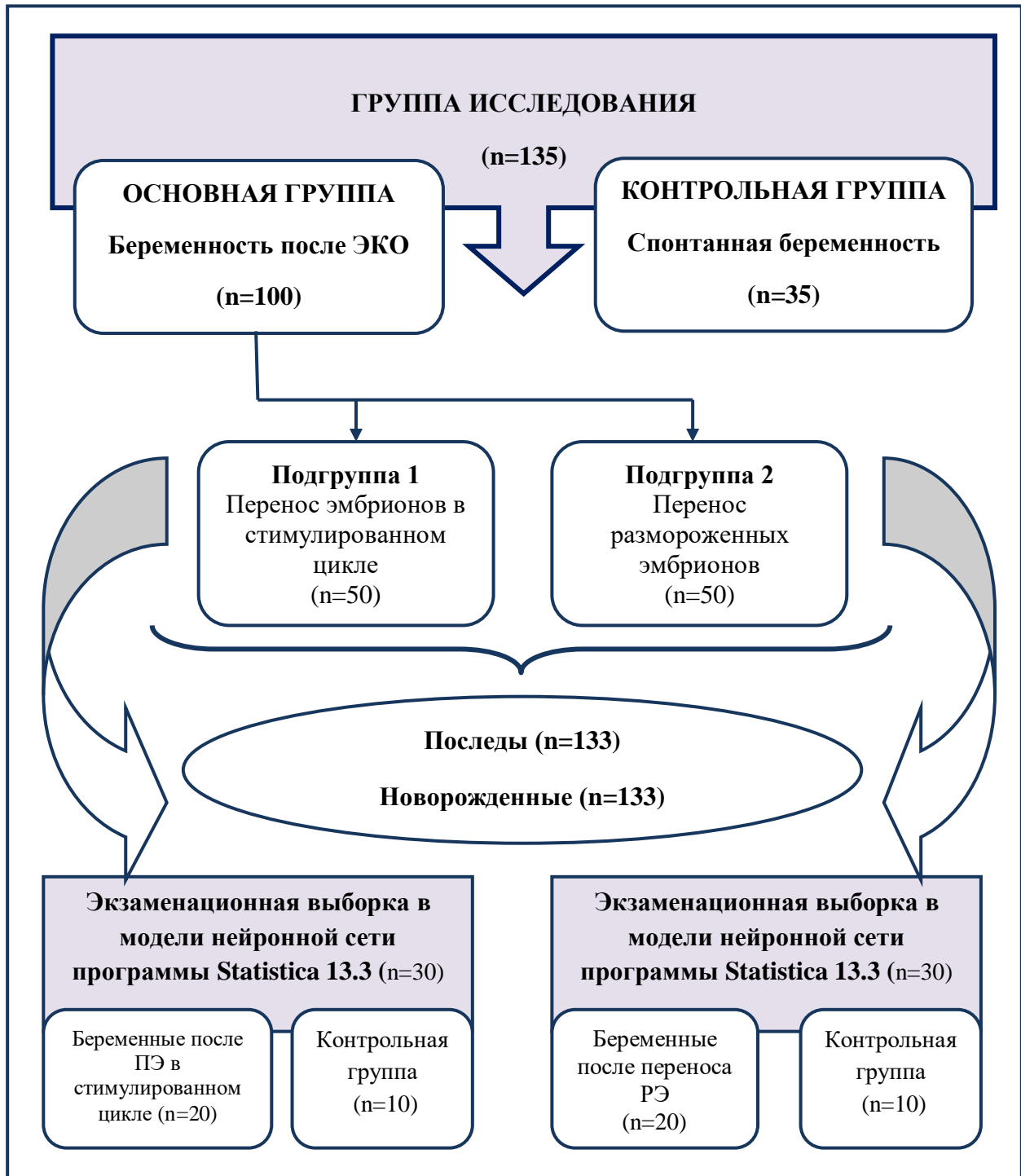


Рисунок 1 - Дизайн исследования

2.2. Клиническая характеристика анализируемых групп больных

Средний возраст пациенток основной группы достоверно выше возраста пациенток группы контроля - $34,7 \pm 0,4$ лет, против $31 \pm 0,9$ лет соответственно ($p < 0,05$). По подгруппам основной группы различий по возрасту пациенток не выявлено (таблица 1).

При анализе соматического статуса пациенток исследуемых групп статистически значимых различий в частоте встречаемости хронических форм заболеваний внутренних органов у беременных выявлено не было ($p > 0,05$).

Таблица 1 - Структура возрастной патологии и соматический статус у пациенток основной и контрольной групп исследования

Особенности анамнеза	Основная группа ЭКО (n=100)	Подгруппа 1 (n=50)	Подгруппа 2 (n=50)	Контрольная группа (n=35)
Средний возраст, лет	$34,7 \pm 0,4^*$	$35,1 \pm 0,5$	$34,2 \pm 0,6$	$31,0 \pm 0,9$
Заболевания ЖКТ, %	20	22	18	17,1
Заболевания почек, %	21	22	20	14,3
Заболевания ССС, %	11	12	10	8,6
Неспецифические заболевания легких, %	8	8	8	5,7
Эндокринная патология, %	26	28	24	14,3
Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в основной и контрольной группах				

Так заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у пациенток основной и контрольной групп встречались примерно с одинаковой частотой: 20% против 17,1% соответственно ($p > 0,05$).

Хронические заболевания почек несколько чаще встречались в основной группе – 21%, против группы контроля – 14,3%, однако достоверных отличий получено не было ($p > 0,05$).

Заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) были выявлены у 11% пациенток основной группы в сравнении с контрольной группой, где встречаемость данной патологии составила 8,6% случаев ($p > 0,05$).

Хронические неспецифические заболевания легких были выявлены с одинаковой частотой у пациенток в программах ЭКО – 8% случаев против 5,7% пациенток контрольной группы ($p > 0,05$).

Сопутствующая эндокринная патология в виде гипотиреоза, диффузного токсического зоба или аутоиммунного тиреоидита была диагностирована у 26% пациенток после ПЭ в программах ЭКО и 14,3% пациенток контрольной группы ($p>0,05$).

Основными показаниями к проведению ЭКО в подгруппе 1 было женское бесплодие трубного происхождения – 66% ($n=33$), в подгруппе 2 – бесплодие, связанное с отсутствием овуляции – 40% ($n=20$) (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика бесплодия в программах ЭКО

Вид бесплодия	МКБ-10	Подгруппа 1 ($n=50$)	Подгруппа 2 ($n=50$)
<i>Первичное, %</i>	-	46 ($n=23$)	58 ($n=29$)
<i>Вторичное, %</i>	-	54 ($n=27$)	42 ($n=21$)
Трубного происхождения, %	N97.1	66 ($n=33$)*	18 ($n=9$)
Связанное с отсутствием овуляции, %	N97.0	14 ($n=7$)*	40 ($n=20$)
Связанное с мужским фактором, %	N97.4	10 ($n=5$)	18 ($n=9$)
Другие формы женского бесплодия, %	N97.8	6 ($n=3$)	8 ($n=4$)
Неясное, %	N97.9	4 ($n=2$)	16 ($n=8$)

Примечание: * различия статистически значимы при сравнении по подгруппам основной группы, $p<0,05$

Анализ числа попыток ВРТ среди пациенток основной группы не показал достоверных отличий (таблица 3). Стоит отметить, что в обеих подгруппах в преобладающем количестве беременность наступала с 1 попытки – у 56% женщин подгруппы 1 и у 46% - подгруппы 2 ($p>0,05$).

Таблица 3 – Число попыток ВРТ у пациенток в программах ЭКО

Попытки ВРТ	Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) ($n=50$)		Подгруппа 2 (Криоперенос) ($n=50$)	
	абс.	%	абс.	%
1 попытка	28	56	23	46
2 попытки	14	28	22	44
3 и более попыток	8	16	5	10

При изучении акушерского анамнеза пациенток исследуемых групп отмечено, что самопроизвольные выкидыши чаще встречались в основной группе по сравнению с группой контроля – 21% и 5,7% соответственно ($p<0,05$).

Достоверно чаще после ПЭ в стимулированном цикле (подгруппа 1) в анамнезе были внематочные беременности - 22% против 6% в подгруппе 2 (витрифицированные эмбрионы) и против 2,9% в контрольной группе, ($p < 0,05$). По подгруппам основной группы достоверных различий по этому осложнению получено не было: 20% в подгруппе 1 и 22% в подгруппе 2 ($p > 0,05$) (таблица 3). Внематочные беременности также чаще встречались в основной группе и составили 14% против группы контроля – 2,9% ($p < 0,05$). По данному осложнению также были найдены достоверные отличия внутри основной группы: 22% в подгруппе 1 и 6% в подгруппе 2 ($p < 0,05$) (таблица 4).

Гинекологические заболевания в виде миомы матки небольших размеров и эндометриоза достоверно чаще встречались в основной группе – 27% по сравнению с группой контроля – 8,6% ($p < 0,05$), по подгруппам достоверных различий по этому параметру не было – 34% и 20% соответственно в 1 и 2 подгруппе ($p > 0,05$) (таблица 4).

Таблица 4 – Акушерско-гинекологический анамнез у пациенток основной и контрольной групп исследования

Особенности анамнеза	Основная группа ЭКО (n=100)	Подгруппа 1 (n=50)	Подгруппа 2 (n=50)	Контрольная группа (n=35)
Первородящие, %	78	76	80	60
Повторнородящие, %	22	24	20	40
Внематочная беременность, %	14*	22 [^]	6	2,9
Регрессирующая беременность, %	9*	8	10	2,9
Самопроизвольный выкидыш, %	21*	20	22	5,7
Преждевременные роды, %	3	4	2	0
Гинекологические заболевания, %	27*	34	20	8,6
Примечание: * различия статистически значимы при сравнении основной и контрольной группы, $p < 0,05$ [^] различия статистически значимы при сравнении по подгруппам основной группы, $p < 0,05$				

По остальным параметрам акушерско-гинекологического анамнеза пациентки исследуемых групп были сравнимы.

2.3. Методы исследования

Все пациентки проходили полное клинико-лабораторное обследование, предусмотренное приказом Министерства здравоохранения РФ №572н.

Выбор использованных в работе методов исследования определялся в соответствии с отраслевыми стандартами объемов обследования в акушерстве, рекомендациями по лабораторной диагностике системы гемостаза, молекулярно-генетическими, морфологическими, иммуногистохимическими и статистическими исследованиями.

2.3.1. Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетическое типирование женщин по полиморфным вариантам генов, ассоциированных с риском развития эндотелиальной дисфункции и тромбофилии, проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Образцы ДНК получали из венозной крови, используя наборы реагентов и протоколы для выделения ДНК. «Проба РАПИД-ГЕНЕТИКА» или «Проба ГС-ГЕНЕТИКА» (ООО «НПО ДНК-технология» и «НПО ТЕСТГЕН», Россия). Для оценки количества выделенной ДНК использовался набор реагентов для контроля забора материала методом ПЦР (ООО «НПО ДНК-технология» и «НПО ТЕСТГЕН», Россия).

На полученных образцах в режиме «реального времени» проводили ПЦР с использованием комплектов реагентов и протокола для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития эндотелиальной дисфункции и тромбофилии.

Регистрация и учет результатов проводились автоматическим программным обеспечением для детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»), Россия, регистрационное удостоверение № ФСР 2007/01250).

В работе изучено 8 полиморфных вариантов в генах, ассоциируемых с риском развития тромбофилии и 2 – с риском развития эндотелиальной дисфункции. Исследуемые локусы и полиморфизмы представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Исследуемые гены и полиморфизмы

Ген	Полиморфизм	OMIM (rs)	Белковый продукт
F5	1691 G>A	2227400	Коагуляционный фактор 5
F2	20210 G>A	176930	Коагуляционный фактор 2 (протромбин)
F7	10976 G>A	227500	Коагуляционный фактор 7 (проконвертин)
FGB	455 G>A.	134830	В-фибриноген
FXIII	103 G>T (Val34Leu)	134570	А-субъединица свертывающего фактора XIII
PAI-I	675 5G>4G	173360	Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа
ITGA2	807 C>T	192974	Тромбоцитарный рецептор к коллагену - гликопротеин Ia
ITGB3	1565 T>C	173470	Гликопротеин IIIa тромбоцитов
VEGF-A	2578 C>A 936 C>T	6999473025039	Фактор роста эндотелия сосудов

2.3.2. Исследование системы гемостаза

Лабораторная диагностика системы гемостаза осуществлялась на коагулографе серии Helena, модель Helena AC-4 (HELENA BioSciences Europe, Великобритания) использовались реагенты и расходные материалы к коагулографу серии Helena (HELENA BioSciences Europe, Великобритания) и тромбоэластографу TEG, регистрационный номер ФС№2006/2518, США, расходные материалы для TEG ФС№2006/2519, США.

Для оценки состояния плазменного звена гемостаза определялось активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), характеризующее эффективность внутреннего пути активации коагуляции; тромбиновое время (ТВ), характеризующее превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина; уровень фибриногена (ФГ), международное нормализованное отношение (МНО), характеризующие эффективность внешнего пути свертывания крови; признаки тромбинемии – растворимые комплексы фибрин-мономеров (РФМК).

Для более детальной оценки состояния системы гемостаза применялась тромбоэластография.

При тромбоэластографии определялись: время реакции (**R**), характеризует I и II фазы коагуляции (образование тромбопластина и тромбина); время образования сгустка (**K**), отображает III фазу свертывания крови (образование фибрина); максимальная амплитуда (**MA**), определяющая плотность сгустка; **ANGLE**,

отображающий скорость роста фибриновой сети и её структурообразование; коагуляционный индекс **CI**, являющийся интегральным показателем коагуляции и **LY30**, характеризующий процесс растворения (лизиса) сгустка.

2.3.3. Методы оценки состояния фетоплацентарного комплекса

Биофизический профиль плода и состояние кровообращения в системе мать-плацента-плод оценивались при помощи ультразвукового исследования (УЗИ) с доплерометрией на аппарате Medison V-20 компании Samsung.

Оценка состояния сердечной деятельности плода (кардиотокография) проводилась на аппарате Sonicaid Team Care/Trend. Оценивались: частота базального ритма, шевеление плода, коротковолновая вариабельность сердечного ритма (STV), наличие акцелераций, децелераций, соблюдение критериев Доуза-Редмана (вариабельность более 10 перцентилия, отсутствие децелераций более 20 уд/мин, STV более 5 м/сек, количество шевелений плода более 20 в час).

2.3.4. Оценка морфофункционального состояния плацент

Морфологическое исследование плацент проведено по стандартной методике с использованием микроскопа Axio Scope A1 с фотокамерой Axio Cam ERc 5s, оснащенный программным обеспечением Axio Vision Rel.4.8.2 (производство Карл Цейсс, Германия).

1) макроскопическое описание с определением органомерических показателей: форма, размер, масса (г), описание материнской поверхности, плодных оболочек, места прикрепления пуповины, количества и состояния сосудов пуповины, вычисление плацентарно-плодового коэффициента;

2) гистологическое исследование срезов;

Для обзорной гистологии участки плаценты после фиксации в 10%-ном нейтральном формалине иссекались через все слои, включая децидуальную пластинку, плодные оболочки, пуповину. Морфологическое описание плацент проводили в соответствии с «Медико-технологическим стандартом

морфологического исследования последа в родовспомогательном учреждении 3Б уровня – федеральном перинатальном центре».

При морфологическом анализе гистопрепаратов определяли следующие показатели:

- соответствие дифференцировки плацентарной ткани сроку беременности;
- распространенность дегенеративно-дистрофических изменений в структурах плаценты;
- степень выраженности нарушений материнско-плацентарного кровообращения;
- уровень развития компенсаторно-приспособительных реакций;
- распространенность и характер воспалительной альтерации структур последа в целом (пуповина, плодные оболочки, плацента);
- наличие гестационной перестройки спиральных артерий.

Исследование плацент осуществляли по стандартной методике с определением удельного объема 5 структурных компонентов плаценты (%) для характеристики материнско-плодового кровообращения: межворсинчатое пространство, материнский фибриноид, строма ворсин, сосуды ворсин, инфаркты-петрификаты. Для интерпретации нарушений в плаценте использовали две группы признаков:

1) признаки недостаточного притока крови в межворсинчатое пространство: инфаркты, афункциональные зоны, снижение межворсинчатого пространства;

2) признаки нарушений оттока крови: ретроплацентарные гематомы, тромбоз межворсинчатого пространства, периворсинчатый фибриноид. Внимание уделяли компенсаторно-приспособительным реакциям материнского и плодового русла.

Для оценки результатов использовали морфологическую классификацию патологической незрелости плацент, критерии нарушений развития ворсинчатого дерева и проводили сопоставление гистологических данных с результатами эхо- и доплерографии.

2.3.5. Иммуногистохимическое исследование плацент (VEGFr1, Аннексин V)

Для иммуногистохимического исследования использовали двухэтапный стрептавидин-биотин-пероксидазный метод с демаскировкой антигена и применением стандартных наборов моноклональных и поликлональных антител фирмы «Bond RTU Primary» США с использованием иммуногистостейнера закрытого типа Bond- maX (Leica, Германия). Проявление реакции осуществлялось системой визуализации «Dako Cytomation» (Дания). Для визуализации первичных антител использовали безбиотиновую систему детекции Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Biogenex США).

В образцах определяли уровень экспрессии рецепторов к Аннексину V (моноклональные кроличьи антитела, клон EPR3979), и к VEGFr1 (поликлональные кроличьи антитела, клон GTX22350, GeneTex США).

Для ИГХ - исследования использовали серийные парафиновые срезы. Результаты реакции рецепторов идентифицировались по цитоплазматическому окрашиванию клеток в коричневый цвет. Экспрессия рецепторов в строме ворсин, ворсинчатом трофобласте и эндотелии сосудов ворсин оценена путем подсчета количества окрашенных ядер и клеток в поле зрения при увеличении 400, при этом изучали не менее 10 полей зрения. Оценка экспрессии антител и распределение по клеточным элементам выполнены при использовании полуколичественной системы по интенсивности окрашивания от одного креста (слабое окрашивание) до трех (самое интенсивное окрашивание). Исследование проводилось в стандартных условиях на иммуногистостейнере закрытого типа Bond maX (производитель Leica, Германия).

2.3.6. Оценка состояния новорожденного

Характеристика состояния новорожденного включала оценку по шкале Апгар (1 - 5 мин) на момент рождения, определение весо-ростовых параметров, комплексное клинико-лабораторное обследование с проведением нейросонографии на 3-5 сутки на УЗ-аппарате Philips HD-15, датчики L 5-10 и C 3-6.

2.3.7. Методы статистической обработки данных

Первичный анализ с расчетом средних значений, стандартных отклонений, стандартных ошибок для количественных переменных и частотного распределения для бинарных данных был выполнен с использованием «Microsoft Office, Excel 2016».

Сравнение непрерывных количественных данных проведено с использованием t-критерия Стьюдента. Для сравнения бинарных данных применялся либо точный критерий Фишера (F-критерий), либо критерий Пирсона (χ^2) с поправкой Йетса (если абсолютные частоты были меньше 10).

На этапе множественных сравнений (больше двух групп) полученные значения уровня значимости корректировались поправкой Бонферрони.

Критерий Фишера и Пирсона рассчитывался с использованием прикладных программ «STATISTICA 13» и «MedCalc 15.8».

Нулевая гипотеза отклонялась при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического метода по Спирмену в рамках программы «STATISTICA 13».

Отбор переменных для вторичного анализа данных выполнен с использованием результатов сравнения групп по вышеперечисленным критериям, а также процесса аналитического исследования имеющегося массива информации с целью выявления определенных закономерностей и систематических взаимосвязей между переменными в рамках раздела добычи данных (Date mining) в «STATISTICA 13».

Определение значимых различий комбинаций генов в изучаемых группах выполнено с использованием прикладной программы «Multifactor Dimensionality

Reduction» (mdr 3.0.2). Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга в обеих выборках проводили с помощью критерия χ^2 с использованием программы Hardy-Weinberge equilibrium.

Расчет решающего правила прогноза производился методом логистической регрессии в «STATISTICA 13».

Определение чувствительности (Se) и специфичности (Sp) всех переменных, входящих в математическую модель, результирующего значения математической модели и выбор порога отсечения вычислены в ROC анализе программы MedCalc.

Проверка математической модели проведена на экзаменационной выборке в модели нейронной сети программы «STATISTICA 13».

Данные об общем количестве выполненных исследований приведены в таблице (таблица 6).

Таблица 6 - Общее количество выполненных исследований

Вид исследования	Количество исследований
Исследование плазменного звена гемостаза (клоттинговые тесты)	401
Тромбоэластографическое исследование	401
Генетические полиморфизмы, ассоциированные с риском развития тромбофилии и эндотелиальной дисфункции	1350
УЗИ с доплерометрией	401
Кардиотокография	135
НСГ новорожденных	133
Морфологическое исследование плацент	133
Иммуногистохимическое исследование плацент	266
Всего исследований	4691

ГЛАВА 3. ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА ПОСЛЕ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОПЕРЕНОСА В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Настоящая глава посвящена изучению особенностей формирования фетоплацентарного комплекса после ПЭ в стимулированном цикле и криопереноса в программах ЭКО и поиску этиопатогенетических аспектов формирования патологии перинатального периода у данного контингента пациенток.

3.1. Особенности течения беременности у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса

При анализе течения беременности у пациенток исследуемых групп угроза прерывания беременности в I триместре встречалась достоверно чаще в основной группе, и составила 55% по сравнению с контрольной группой, где данное осложнение беременности не было зарегистрировано ($p < 0,05$). В 4% ($n=2$) случаев в подгруппе 1 (ПЭ в стимулированном цикле) зафиксирован самопроизвольный выкидыш в сроке беременности 9-10 недель. Во II триместре беременности частота встречаемости угрозы прерывания беременности в подгруппе 1 составила 33,3% ($n=16$), а в подгруппе 2 (перенос РЭ) – 20% ($n=10$), что также достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). В контрольной группе случаев угрозы прерывания беременности не зафиксировано (таблица 7).

Дебют формирования фетоплацентарной недостаточности со II триместра с исходом в нарушение маточно-плацентарного кровообращения в 2 раза чаще встречался в подгруппе 1 (после ПЭ в стимулированном цикле) – 33,3% ($n=16$), по сравнению с подгруппой 2 (криоперенос) – 16% ($n=8$) ($p < 0,05$).

Таблица 7 – Течение беременности у пациенток исследуемых групп

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=100)		Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=50)		Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Самопроизвольный выкидыш	2	2	2	4	0	0	0	0
Угроза прерывания беременности в I триместре	55	55	32	64	23	46	0	0*
Угроза прерывания беременности во II триместре	26	26,5	16	33,3	10	20	0	0*
ФПН во II триместре	24	24,5	16	33,3 [^]	8	16	0	0*
ФПН в III триместре	29	29,6	18	37,5	11	22	0	0*
ФПН в III триместре с исходом в ЗРП	5	17,2	2	11,1	3	27,3	0	0*
ФПН в III триместре с исходом в НМПК	22	75,9	14	77,8	8	72,7	0	0*
ФПН в III триместре с исходом в НМПК и ЗРП	2	6,9	2	11,1	0	0	0	0*
ВТЭО	2	2	2	4	0	0	0	0
ПОНРП	1	1	1	2	0	0	0	0
Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, $p < 0,05$ [^] различия статистически значимы при сравнении по подгруппам основной группы, $p < 0,05$								

В III триместре ФПН была выявлена в 37,5% (n=18) случаев в подгруппе 1, из них ЗРП как с НМПК, так и без формировалась с одинаковой частотой в 11,1% (n=2) случаев. НМПК без ЗРП выявлено в 77,8% (n=14).

В подгруппе 2 ФПН в III триместре зафиксирована в 22% (n=11) случаев, из которых ЗРП встречалась в 27,3% (n=3) случаев, НМПК – в 72,7% (n=8). Сочетание ЗРП и НМПК у пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов выявлено не было. У пациенток контрольной группы осложненного течения беременности в виде формирования ФПН зарегистрировано не было.

В 4% (n=2) случаев выявлены венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО) у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле, что напрямую связано с гормональной стимуляцией суперовуляции, являющейся дополнительным мощным активирующим фактором запуска процессов тромбообразования на фоне

уже имеющих гиперкоагуляционных сдвигов. В 2% (n=1) случаев в подгруппе 1 зарегистрирована преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты (ПОНРП) (таблица 7).

3.2. Особенности системы гемостаза в I триместре беременности у пациенток после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения

С целью выявления характерных коагулопатических изменений после переноса эмбрионов в программах ЭКО, всем пациенткам проводилось углубленное исследование плазменного звена системы гемостаза при помощи клоттинговых тестов по триместрам беременности.

В I триместре беременности выявлено достоверное усиление активации гемостаза по внутреннему и внешнему путям, а также увеличение маркеров внутрисосудистого свертывания крови у пациенток основной группы: АЧТВ $29,6 \pm 0,5$ сек., ТВ $13,9 \pm 0,1$ сек., РФМК $10,5 \pm 0,8$ мг%, против АЧТВ $38,1 \pm 0,3$ сек., ТВ $16,8 \pm 0,1$ сек., РФМК $5,8 \pm 0,2$ мг%, в группе контроля ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам внутри основной группы получено не было (таблица 8).

Таблица 8 - Изменение показателей плазменного гемостаза в группах пациенток в I триместре беременности ($M \pm m$)

Срок беременности	Показатель, ед. измерения	Основная группа (ЭКО) (n=100)	Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=50)	Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)	Контрольная группа (n=35)
I триместр	PLT, 10^9 /л	$255,4 \pm 7,5$	$260,0 \pm 8,6$	$250,7 \pm 6,4$	$239,1 \pm 7,7$
	Фг, г/л	$4,4 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,1$
	АЧТВ, сек	$29,6 \pm 0,5^*$	$29,2 \pm 0,6$	$30,0 \pm 0,4$	$38,1 \pm 0,3$
	ТВ, сек	$13,9 \pm 0,1^*$	$13,8 \pm 0,1$	$13,9 \pm 0,1$	$16,8 \pm 0,1$
	ПТ по Квику, %	$101,8 \pm 1,2$	$101,2 \pm 1,3$	$102,4 \pm 1,0$	$99,9 \pm 1,3$
	МНО	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,0$
	РФМК, мг%	$10,5 \pm 0,8^*$	$10,7 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,2$
	АТ III, %	$103,1 \pm 1,2$	$102,8 \pm 1,2$	$103,3 \pm 1,2$	$104,5 \pm 0,8$
Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в основной и контрольной группах					

Известно, что отражая изменения в отдельных звеньях системы гемостаза, предлагаемые тесты, не характеризуют общий свертывающий

потенциал крови и не могут являться предикторами тромбозов, играющих важную роль в развитии тяжелых акушерских осложнений.

Наиболее совершенным методом комплексной оценки состояния системы гемостаза является тромбоэластография (ТЭГ), которая до настоящего времени остается единственным методом, позволяющим качественно и количественно охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза.

В связи с этим, параллельно с изучением плазменного звена гемостаза клоттинговыми тестами, мы провели оценку системы гемокоагуляции у обследуемых пациенток методом ТЭГ.

На основании проведенных исследований было отмечено достоверное укорочение времени образования сгустка **K** $2,0 \pm 0,1$ мин. в основной группе против $2,7 \pm 0,1$ мин. в контрольной группе ($p < 0,05$).

Выявлена также достоверная активация хронометрических и структурных характеристик образования сгустка у беременных основной группы в виде увеличения скорости роста фибриновой сети **ANGLE** $63,2 \pm 0,9$ град., против **ANGLE** $47,5 \pm 0,5$ град., в группе контроля, максимальной амплитуды: **МА** $56,4 \pm 1,1$ мм. в основной группе, против **МА** $48,5 \pm 0,6$ мм. в группе контроля ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам внутри основной группы получено не было (таблица 9).

Таблица 9 - Сравнительная характеристика показателей ТЭГ у беременных в I триместре по группам исследования ($M \pm m$)

Срок беременности	Показатель, ед. измерения	Основная группа (ЭКО) (n=100)	Подгруппа 1 (n=50)	Подгруппа 2 (n=50)	Контрольная группа (n=35)
I триместр	R, мин.	$9,5 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,4$	$9,4 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,2$
	K, мин.	$2,0 \pm 0,1^*$	$1,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
	ANGLE, град.	$63,0 \pm 0,8^*$	$63,1 \pm 0,8$	$62,9 \pm 0,7$	$47,5 \pm 0,5$
	МА, мм	$56,4 \pm 1,1^*$	$56,8 \pm 1,1$	$55,9 \pm 1,1$	$48,5 \pm 0,6$
	CI	$1,4 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,2$
	LY30, %	$1,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в основной и контрольной группах					

Таким образом, у пациенток основной группы в I триместре была выявлена гиперкоагуляция: определялись маркеры повышенного внутрисосудистого свертывания крови, активация внутреннего и внешнего путей и повышение общего свертывающего потенциала крови. Гиперкоагуляционные нарушения в первом триместре у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле встречались в 60% случаев, после криопереноса - в 52% ($p>0,05$).

3.3. Коррекция дезадаптации системы гемостаза после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения

Всем пациенткам при выявлении гиперкоагуляционных нарушений было начато лечение низкомолекулярными гепаринами (НМГ). В I триместре НМГ получали 56% основной группы, из них 53,6% пациенток после ПЭ в стимулированном цикле и 46,4% - после переноса РЭ, во II и III триместрах – 75,5% и 77,6% соответственно (48,6% подгруппы 1 и 51,4% подгруппы 2), $p>0,05$ (таблица 10).

Таблица 10 – Терапия низкомолекулярными гепаринами по триместрам беременности

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=100)		Подгруппа 1 (n=50)		Подгруппа 2 (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
НМГ в I триместре	56	56*	30	53,6	26	52	0	0
НМГ во II триместре	74	75,5*	36	46,8	38	51,4	0	0
НМГ в III триместре	76	77,6*	37	56,8	39	51,4	0	0

Примечание: * различия статистически значимы, $p<0,05$ в основной и контрольной группах

Несмотря на проводимую терапию, в течение всей беременности у пациенток основной группы отмечена достоверная тенденция к усилению активации гемостаза плазменного звена гемостаза по сравнению с группой контроля как во II триместре (АЧТВ $30,7\pm 0,4$ сек., против АЧТВ $38,4\pm 0,5$ сек.; ТВ $14,8\pm 0,1$ сек., против ТВ $18,1\pm 0,1$ сек.; РФМК $14,1\pm 0,8$ мг%, против РФМК $7,9\pm 0,4$

мг% соответственно), так и в III триместре (АЧТВ 30,4±0,4 сек., против АЧТВ 39,2±0,4 сек.; ТВ 14,9±0,1 сек., против ТВ 17,7±0,2 сек.; РФМК 15,2±0,8 мг%, против РФМК 8,9±0,3 мг% соответственно, $p<0,05$) (таблица 11).

Таблица 11 - Изменение показателей плазменного гемостаза в группах пациенток во II и III триместрах беременности (M±m)

Срок беременности	Показатель, ед. измерения	Основная группа (ЭКО) (n=98)	Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=48)	Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)	Контрольная группа (n=35)
II триместр	PLT, 10 ⁹ /л	258,9±7,6	262,5±8,7	255,3±6,4	244,9±8,4
	Фг, г/л	4,6±0,1	4,7±0,1	4,5±0,1	4,6±0,1
	АЧТВ, сек	30,7±0,4*	30,3±0,4	31,0±0,4	38,4±0,5
	ТВ, сек	14,8±0,1*	14,7±0,1	14,8±0,1	18,1±0,1
	ПТ по Квику, %	102,1±1,2	101,3±1,0	102,4±1,4	100,3±1,0
	МНО	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	РФМК, мг%	14,1±0,8*	14,4±0,8	13,8±0,8	7,9±0,4
	АТ III, %	104,0±1,0	103,1±1,1	104,8±0,8	102,1±0,7
III триместр	PLT, 10 ⁹ /л	260,7±7,8	272,3±9,5	249,0±6,6	241,6±9,8
	Фг, г/л	4,7±0,1	4,6±0,1	4,7±0,1	4,6±0,1
	АЧТВ, сек	30,4±0,4*	30,3±0,3	30,4±0,4	39,2±0,4
	ТВ, сек	14,9±0,1*	14,9±0,1	14,8±0,1	17,7±0,2
	ПТ по Квику, %	101,8 ±1,3	100,6 ±1,2	103,0±1,3	103,4±1,1
	МНО	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	РФМК, мг%	15,2±0,8*	14,8±0,8	15,5±0,8	8,9±0,3
	АТ III, %	103,6±0,8	104,0±0,9	103,2±0,7	103,8±1,1
Примечание: * различия статистически значимы, $p<0,05$ в основной и контрольной группах					

По данным ТЭГ у пациенток в программах ЭКО по сравнению с группой контроля сохранялось повышение общего свертывающего потенциала крови, что характеризовалось достоверным укорочением интервала **R**, свидетельствующего об активации I фазы свертывания (II триместр R 9,0±0,3 мин., против 10,0±0,3 мин.; III триместр R 8,3±0,3 мин., против 9,5±0,3 мин. соответственно, $p<0,05$).

Выявлено также статистически значимое увеличение скорости формирования сгустка (2 фаза свертывания) **K** (II триместр: $1,9 \pm 0,1$ мин., против $2,6 \pm 0,1$ мин. у пациенток контрольной группы; III триместр: $1,9 \pm 0,1$ мин., против $2,7 \pm 0,1$ мин., $p < 0,05$) и роста фибриновой сети **ANGLE** (II триместр: $63,2 \pm 0,9$ град., против $47,1 \pm 0,3$ град. в группе контроля; III триместр: $64,1 \pm 0,8$ град., против $46,8 \pm 0,4$ град., $p < 0,05$). Достоверная разница в основной группе отмечена и по параметру **МА**, характеризующего плотность сгустка (II триместр: $56,3 \pm 1,4$ мм., против $48,9 \pm 0,4$ мм. в контрольной группе; III триместр: $56,8 \pm 1,0$ мм, против $47,8 \pm 0,6$ мм. $p < 0,05$). Отличий в показателях системы гемостаза по подгруппам в основной группе получено не было (таблица 12).

Таблица 12 - Сравнительная характеристика показателей ТЭГ у беременных во II и III триместрах по группам исследования ($M \pm m$)

Срок беременности	Показатель	Основная группа (ЭКО) (n=98)	Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=48)	Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)	Контрольная группа (n=35)
II триместр	R, мин.	$9,0 \pm 0,3^*$	$9,3 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,3$
	K, мин.	$1,9 \pm 0,1^*$	$1,9 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
	ANGLE, град.	$63,2 \pm 0,9^*$	$63,4 \pm 1,0$	$62,9 \pm 0,8$	$47,1 \pm 0,3$
	МА, мм	$56,3 \pm 1,4^*$	$55,7 \pm 1,5$	$56,9 \pm 1,2$	$48,9 \pm 0,4$
	CI	$0,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$
III триместр	LY30, %	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$
	R, мин.	$8,3 \pm 0,3^*$	$8,2 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,3$
	K, мин.	$1,9 \pm 0,1^*$	$1,8 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
	ANGLE, град.	$64,1 \pm 0,8^*$	$64,7 \pm 0,8$	$63,4 \pm 0,8$	$46,8 \pm 0,4$
	МА, мм	$56,8 \pm 1,0^*$	$57,8 \pm 1,0$	$55,9 \pm 1,0$	$47,8 \pm 0,6$
	CI	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$
	LY30, %	$1,9 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в основной и контрольной группах

При сохраняющихся гиперкоагуляционных нарушениях на фоне терапии НМГ ФПН во II триместре у пациенток основной группы развилась в 38,1% случаев, из них в 66,7% случаев в подгруппе 1 и в 33,3% случаев в подгруппе 2. В

III триместре ФПН сформировалась у 40,8% основной группы, из них в 62,1% и 39,9% случаев в подгруппе 1 и 2 соответственно (таблица 13).

Таблица 13 – Развитие фетоплацентарной недостаточности на фоне гиперкоагуляции у пациенток исследуемых групп

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=100)		Подгруппа 1 (n=50)		Подгруппа 2 (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Гиперкоагуляция в I триместре	56	56*	30	53,6	26	46,4	0	0
Гиперкоагуляция во II триместре	63	64,3*	34	54	29	46	0	0
Гиперкоагуляция в III триместре	71	72,4*	39	55	32	45	0	0
ФПН во II триместре	24	38,1*	16	66,7	8	33,3	0	0
ФПН в III триместре	29	40,8*	18	62,1	11	39,9	0	0

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в основной и контрольной группах

Таким образом, можно сделать вывод о том, что дезадаптация системы гемостаза у беременных после переноса эмбрионов в программах ЭКО сохраняется на протяжении всей беременности. Однако развитие осложненного течения беременности в виде формирования ФПН в подгруппе после ПЭ в стимулированном цикле формируется почти в 2 раза чаще по сравнению с подгруппой после переноса витрифицированных эмбрионов. Для выявления генеза гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в программах ЭКО нами изучены маркеры генетической предрасположенности патологии системы гемостаза и ангиогенеза.

3.4. Генетические аспекты гемостазиологических расстройств при беременности в результате экстракорпорального оплодотворения

Для оценки вклада генетической предрасположенности в формирование осложнений беременности, наступившей в результате ЭКО, всем пациенткам основной и контрольной групп было проведено молекулярно-генетическое типирование однонуклеотидных замен в генах, кодирующих факторы свертывания крови (*F5: 1691 G>A; F2:20210 G>A; F7: 10976 G>A; FGB: 455*

$G>A$; *FXIII*: 103 $G>T$), систему фибринолиза (*PAI-I*:5 $G>4G$), тромбоцитарные рецепторы (*ITGA2*: 807 $C>T$; *ITGB3*: 1565 $T>C$) и ген сосудисто-эндотелиального фактора роста (*VEGF-A*: -2578 $C>A$ и +936 $C>T$).

Вклад полиморфизма изучаемых генов в риск формирования патологии оценивался по общей, мультипликативной и доминантной моделям.

На первом этапе исследования нами была проанализирована частота распределения аллелей и генотипов по полиморфным вариантам исследуемых генов в группе женщин с беременностью, наступившей в результате ЭКО после ПЭ в стимулированном цикле и витрифицированных эмбрионов в сравнении с контрольной группой женщин.

Полученные результаты не выявили значимых отличий в распространении полиморфизма генов кодирующих факторы свертывания крови (*F5*: 1691 $G>A$; *F2*:20210 $G>A$; *F7*: 10976 $G>A$; *FGB*: 455 $G>A$; *FXIII*: 103 $G>T$), систему фибринолиза (*PAI-I*:5 $G>4G$), тромбоцитарные рецепторы (*ITGA2*: 807 $C>T$; *ITGB3*: 1565 $T>C$) и ген сосудисто-эндотелиального фактора роста (*VEGF-A*: +936 $C>T$) среди всех обследованных групп женщин. Частота распространения однонуклеотидных замен близка к популяционной, и характер распределения их в группах соответствует закону Харди-Вайнберга.

У обследованных женщин в программах ЭКО после переноса эмбрионов в стимулированном цикле (подгруппа 1) выявлены достоверно значимые отличия в частоте встречаемости полиморфных вариантов гена *VEGF-A*: -2578 $C>A$. Генотипы *VEGF-A*: -2578 *AA* и *CA* чаще выявлялись у основной группы ($\chi^2=6,12$; $p=0,03$; $OR= 3,51$; 95% $CI=1,34-9,18$), тогда как генотип *VEGF-A*: -2578 *CC* имели преимущественно пациентки контрольной группы ($\chi^2=6,12$; $p=0,03$; $OR= 0,26$; 95% $CI=0,11-0,75$) (таблица 14).

Таблица 14 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Доминантная модель) у женщин после ПЭ в стимулированном цикле и пациенток контрольной группой

Генотипы	Контроль	Подгруппа 1	χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i>	
	n = 35/%	n = 50/%			знач.	95% CI
<i>FGB GG</i>	0,59	0,55	0,01	0,90	0.961	0.401-2.301
<i>FGB GA+AA</i>	0,44	0,43			1.040	0.435-2.492
<i>F2 GG</i>	1,00	0,98	0,03	0,85	33,0	4.347-250.5
<i>F2 GA+AA</i>	0,03	0,00			0.00	0.00
<i>F5 GG</i>	1,00	0,94	0,10	0,75	0.742	0.065-8.524
<i>F5 GA+AA</i>	0,03	0,04			1.347	0.117-15.47
<i>F7 GG</i>	0,65	0,78	2,25	0,13	2.251	0.861-5.886
<i>F7 GA+AA</i>	0,38	0,20			0.444	0.170-1.161
<i>F13 GG</i>	0,59	0,47	0,37	0,54	0.702	0.293-1.679
<i>F13 GT+TT</i>	0,44	0,51			1.425	0.596-3.409
<i>ITGA2 CC</i>	0,38	0,31	0,06	0,79	0.838	0.334-2.101
<i>ITGA2 CT+TT</i>	0,65	0,67			1.193	0.476-2.991
<i>ITGB3 CC</i>	0,79	0,55	3,15	0,08	0.406	0.154-1.067
<i>ITGB3 CT+TT</i>	0,24	0,43			2.466	0.937-6.484
<i>PAI-1 5G5G</i>	0,32	0,29	0,00	0,92	1.097	0.426-2.824
<i>PAI-1 5G+4G</i>	0,71	0,69			0.911	0.354-2.346
<i>VEGF-2578 CC</i>	0,79	0,47	6,12	0,01*	0.285	0.109-0.745
<i>VEGF-2578 CA+AA</i>	0,24	0,51			3.510	1.342-9.178
<i>VEGF 936 CC</i>	0,97	0,88	0,09	0,75	0.575	0.105-3.150
<i>VEGF 936 CT+TT</i>	0,06	0,10			1.739	0.317-9.527

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в подгруппе 1 и контрольной группе (с поправкой Бонферрони $p = 0,03$)

Анализ общей, мультипликативной и доминантной моделей у пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов (подгруппа 2) не выявил отличия в распределении генотипов по полиморфному локусу *VEGF-A*: -2578C>A в исследуемых группах, а также отсутствовали различия в частоте встречаемости и других исследованных нами генов (таблица 15).

Таблица 15 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Доминантная модель) у женщин после переноса витрифицированных эмбрионов и пациенток контрольной группы

Генотипы	Контроль	Подгруппа 2	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 50/%			знач.	95% CI
<i>FGB GG</i>	0,57	0,60	0,002	0,96	0,95	0,46 - 1,9
<i>FGB GA+AA</i>	0,43	0,40			1,07	0,48 - 2,37
<i>F2 GG</i>	0,97	1,00	0,03	0,86	2,10	1,13 - 3,88
<i>F2 GA+AA</i>	0,03	0,00			4,26	0,16 - 107,81
<i>F5 GG</i>	0,97	1,00	1,46	0,23	2,10	1,13 - 3,88
<i>F5 GA+AA</i>	0,03	0,00			4,26	0,16 - 107,81
<i>F7 GG</i>	0,63	0,66	0,004	0,95	0,95	0,47 - 1,9
<i>F7 GA+AA</i>	0,37	0,34			1,09	0,47 - 2,53
<i>F13 GG</i>	0,57	0,50	0,18	0,66	1,14	0,55 - 2,37
<i>F13 GT+TT</i>	0,43	0,50			0,85	0,39 - 1,85
<i>ITGA2 CC</i>	0,37	0,18	3,00	0,08	2,06	0,79 - 5,35
<i>ITGA2 CT+TT</i>	0,63	0,82			0,76	0,39 - 1,5
<i>ITGB3 CC</i>	0,77	0,66	0,75	0,39	1,16	0,59 - 2,27
<i>ITGB3 CT+TT</i>	0,23	0,34			0,67	0,26 - 1,72
<i>PAI-1 5G5G</i>	0,31	0,22	0,53	0,47	1,42	0,55 - 3,66
<i>PAI-1 5G+4G</i>	0,69	0,78			0,87	0,45 - 1,71
<i>VEGF-2578 CC</i>	0,77	0,64	1,11	0,29	1,2	0,61 - 2,35
<i>VEGF-2578 CA+AA</i>	0,23	0,36			0,63	0,24 - 1,62
<i>VEGF 936 CC</i>	0,94	0,88	0,36	0,55	1,07	0,57 - 2,00
<i>VEGF 936 CT+TT</i>	0,06	0,12			0,47	0,09 - 2,49

На втором этапе исследования нами была проанализирована частота встречаемости аллелей и генотипов у женщин с беременностью, наступившей в результате ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО, имеющих клинические проявления гиперкоагуляции, и контрольной группой беременных.

Анализ распределения аллелей по полиморфным маркерам генов *F5:1691G>A*, *F2:20210G>A*, *F7: 10976 G>A*, *FGB:455 G>A*, *FXIII: 103 G>T*, *PAI-1 5G>4G*, *ITGA2: 807 C>T*, *ITGB3: 1565T>C* и *VEGF-A: -2578C>A* и *+936C>T* показал отличия в частоте встречаемости полиморфизма *ITGB3 C1565T* между сравниваемыми группами, аллель *ITGB3 1565T* чаще регистрировался в подгруппе 1 ($\chi^2=3,84$; $p=0,04$; OR= 2,37; 95% CI=1,01-5,65), а мажорный аллель *ITGB3 1565C* был более распространен у женщин контрольной группы.

Получены и отличия в распространении аллелей по полиморфизму - *2578C>A* гена *VEGF-A*: у женщин с гиперкоагуляцией из группы ЭКО после ПЭ в

стимулированном цикле чаще регистрировался аллель *VEGF-2578 A* ($\chi^2=6,59$; $p=0,01$; $OR=4,25$; $95\% CI=1,51-11,98$), а в контрольной – альтернативный аллель *VEGF-2578 C* ($\chi^2=6,59$; $p=0,01$; $OR=0,4$; $95\% CI=0,08-0,66$) (таблица 16).

Таблица 16 – Распределение частот аллелей *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A: -2578 u +936* (Мультипликативная модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после ПЭ в стимулированном цикле и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	ПЭ в стимулированном цикле	χ^2	p	OR	
	n = 35/%	n = 30/%			знач.	95% CI
<i>FGB G</i>	1,00	0,83	0,02	0,89	0,8	0,33-1,92
<i>FGB A</i>	0,44	0,43			1,36	0,5-3,67
<i>F2 G</i>	1,03	0,86	0,01	0,93	0,86	0,02-44,61
<i>F2 A</i>	0,03	0,00			0,39	0,02-9,93
<i>F5 G</i>	1,03	0,86	0,38	0,54	0,86	0,05-14,3
<i>F5 A</i>	0,03	0,03			1,17	0,07-19,46
<i>F7 G</i>	0,82	0,77	0,36	0,55	1,57	0,56-4,38
<i>F7 A</i>	0,38	0,23			0,64	0,23-1,78
<i>F13 G</i>	0,94	0,80	0,01	0,93	0,94	0,39-2,28
<i>F13 T</i>	0,44	0,40			1,07	0,42-2,59
<i>ITGA2 C</i>	0,85	0,60	0,63	0,43	0,66	0,3-1,49
<i>ITGA2 T</i>	0,65	0,69			1,51	0,67-3,37
<i>ITGB3 C</i>	0,85	0,77	3,84	0,04*	0,42	0,1-0,18
<i>ITGB3 T</i>	0,14	0,28			2,37	1,01-5,65
<i>PAI-1 5G</i>	0,68	0,57	0,01	0,93	0,95	0,41-2,18
<i>PAI-1 4G</i>	0,71	0,63			1,05	0,46-2,42
<i>VEGF-2578 C</i>	1,00	0,46	6,59	0,01*	0,4	0,08-0,66
<i>VEGF-2578 A</i>	0,24	0,46			4,25	1,51-11,98
<i>VEGF 936 C</i>	1,03	0,86	0,02	0,89	0,57	0,09-3,65
<i>VEGF 936 T</i>	0,06	0,09			1,75	0,27-11,18

Примечание: * различия статистически значимы, $p<0,05$ в подгруппе 1 и контрольной группе

Анализ общей модели позволил выявить отличия и в распределении генотипов по полиморфному локусу *VEGF-A: -2578C>A* в исследуемых группах. Генотипы *VEGF-A: -2578 AA* и *CA* чаще выявлялись в подгруппе 1 (*AA* - $\chi^2=6,89$; $p=0,03$; $OR=5,23$; $95\% CI=0,55-49,63$; *CA* - $\chi^2=6,89$; $p=0,03$; $OR=2,67$; $95\% CI=0,9-8,05$), тогда как генотип *VEGF-A: -2578 CC* имели преимущественно пациентки контрольной группы ($\chi^2=6,89$; $p=0,03$; $OR=0,26$; $95\% CI=0,09-0,75$) $p>0,05$ (таблица 17).

Таблица 17 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Общая модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после ПЭ в стимулированном цикле и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	ПЭ в стимулированном цикле	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 30/%			знач.	95% CI
<i>FGB GG</i>	0,57	0,50	0,33	0,85	1,5	0,56-4,02
<i>FGB GA</i>	0,40	0,47			1,31	0,49-3,51
<i>FGB AA</i>	0,03	0,03			1,17	0,07-19,59
<i>F2 GG</i>	0,97	1,00	0,00	0,94	9,72	0,52-183,18
<i>F2 GA</i>	0,03	0,00			0,38	0,01-9,6
<i>F2 AA</i>	0,00	0,00			1,17	0,02-60,43
<i>F5 GG</i>	0,97	0,97	0,37	0,54	0,85	0,05-14,25
<i>F5 GA</i>	0,03	0,03			1,17	0,07-19,59
<i>F5 AA</i>	0,00	0,00			1,16	0,02-60,43
<i>F7 GG</i>	0,63	0,73	1,31	0,52	1,63	0,56-4,69
<i>F7 GA</i>	0,17	0,17			0,97	0,26-3,56
<i>F7 AA</i>	0,20	0,10			0,44	0,1-1,9
<i>F13 GG</i>	0,57	0,53	0,26	0,88	0,86	0,32-2,29
<i>F13 GT</i>	0,34	0,40			1,28	0,47-3,51
<i>F13 TT</i>	0,09	0,07			0,76	0,12-4,9
<i>ITGA2 CC</i>	0,37	0,20	2,84	0,24	0,42	0,14-1,31
<i>ITGA2 CT</i>	0,46	0,50			1,19	0,45-3,15
<i>ITGA2 TT</i>	0,17	0,30			2,07	0,64-6,71
<i>ITGB3 CC</i>	0,77	0,53	4,12	0,13	0,34	0,12-0,98
<i>ITGB3 CT</i>	0,17	0,37			2,8	0,89-8,84
<i>ITGB3 TT</i>	0,06	0,10			1,83	0,29-11,78
<i>PAI-1 5G5G</i>	0,31	0,27	0,27	0,87	0,79	0,27-2,33
<i>PAI-1 5G4G</i>	0,34	0,40			1,28	0,47-3,51
<i>PAI-1 4G4G</i>	0,34	0,33			0,96	0,34-2,69
<i>VEGF-2578 CC</i>	0,77	0,47	6,89	0,03*	0,26	0,09-0,75
<i>VEGF-2578 CA</i>	0,20	0,40			2,67	0,9-8,05
<i>VEGF-2578 AA</i>	0,03	0,13			5,23	0,55-49,63
<i>VEGF 936 CC</i>	0,94	0,90	0,03	0,86	0,55	0,08-3,5
<i>VEGF 936 CT</i>	0,06	0,10			1,83	0,29-11,78
<i>VEGF 936 TT</i>	0,00	0,00			1,16	0,02-60,43

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в подгруппе 1 и контрольной группе

Возможное влияние генотипа на изменение коагуляционных свойств крови оценивалось по доминантной модели (таблица 18).

Таблица 18 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Доминантная модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после ПЭ в стимулированном цикле и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	ПЭ в стимулированном цикле	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 30/%			знач.	95% CI
FGB GG	0,57	0,50	0,11	0,74	0,75	0,28-1,99
FGB GA+AA	0,43	0,50			1,17	0,49-2,77
F2GG	0,97	1,00	0,01	0,94	2,65	0,10-67,55
F2 GA+AA	0,03	0,00			0,39	0,02-9,88
F5 GG	0,97	0,97	0,40	0,53	0,85	0,05-14,25
F5 GA+AA	0,03	0,03			1,17	0,07-19-59
F7 GG	0,63	0,73	0,40	0,53	1,63	0,56-4,93
F7 GA+AA	0,37	0,27			0,67	0,23-1,95
F13 GG	0,57	0,53	0,00	0,95	0,86	0,32-2,29
F13 GT+TT	0,43	0,47			1,17	0,44-3,11
ITGA2 CC	0,37	0,20	1,54	0,21	0,42	0,14-1,30
ITGA2 CT+TT	0,63	0,80			2,36	0,77-7,30
ITGB3 CC	0,77	0,53	4,09	0,04	0,34	0,99-0,12
ITGB3 CT+TT	0,23	0,47			2,95	1,02-8,61
PAI-1 5G5G	0,31	0,27	0,02	0,88	0,79	0,27-2,33
PAI-1 5G+4G	0,69	0,73			1,26	0,43-3,71
VEGF-2578 CC	0,77	0,47	5,2	0,02*	0,26	0,09-0,75
VEGF-2578 CA+AA	0,23	0,53			3,86	1,33-11,20
VEGF 936 CC	0,94	0,90	0,03	0,86	0,55	0,08-3,50
VEGF 936 CT+TT	0,06	0,10			1,83	0,29-11,78

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в подгруппе 1 и контрольной группе

Проведенные исследования позволили установить ассоциацию полиморфных локусов $1565T > C$ гена *ITGB3* и $-2578C > A$ гена *VEGF-A* с изменением коагуляционных свойств крови у беременных после ПЭ в стимулированном цикле.

Так, носительство в генотипе вариантного аллеля $1565T$ гена *ITGB3* увеличивает шанс формирования гиперкоагуляционных расстройств у женщин

подгруппы 1, а генотип *ITGB3:1565CC* наоборот, обладает протективным эффектом в отношении данной патологии.

В формировании гиперкоагуляции имеет значение и полиморфизм -2578C>A гена *VEGF-A*: при генотипе *VEGF-2578 CC* шанс формирования признака меньше единицы, а наличие гомо (*VEGF-2578 AA*) или гетерозиготного (*VEGF-2578 CA*) генотипа увеличивает риск развития гиперкоагуляции у беременных после ЭКО.

Таким образом, проведенные исследования показали значимость полиморфизмов *ITGB3:1565T>C* и *VEGF-A: -2578 C/A* на формирование гемостазиологических нарушений у женщин после ЭКО с ПЭ в стимулированном цикле. Установлена ассоциация аллеля *VEGF:-2578 A* и *1565T* гена *ITGB3* с гиперкоагуляцией у женщин подгруппы 1.

Так как пациентки в подгруппе после криопереноса также имели клинические проявления гиперкоагуляции, нами была проанализирована частота встречаемости аллелей и генотипов у данной категории женщин и контрольной группой беременных.

Анализ распределения аллелей по полиморфным маркерам генов *F5:1691G>A*, *F2:20210G>A*, *F7: 10976 G>A*, *FGB:455 G>A*, *FXIII: 103 G>T*, *PAI-1 5G>4G*, *ITGA2: 807 C>T*, *ITGB3: 1565T>C* и *VEGF-A: -2578C>A* и *+936C>T* показал отличия в частоте встречаемости полиморфизма *ITGA2 T807C* между сравниваемыми группами, аллель *ITGA2 807T* чаще регистрировался в подгруппе 1 ($\chi^2=4,04$; $p=0,04$; $OR= 0,65$; $95\% CI=0,32-1,29$), а аллель *ITGA2 807C* был более распространен у женщин контрольной группы. Других отличий в распространении аллелей исследованных генов получено не было (таблица 19).

Таблица 19 – Распределение частот аллелей *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Мультипликативная модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после криопереноса и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	Криоперенос	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 26/%			знач.	95% CI
<i>FGB G</i>	0,67	0,67	0,04	0,84	0,99	0,57-1,76
<i>FGB A</i>	0,13	0,13			0,96	0,33-2,73
<i>F2 G</i>	0,98	1,00	0,02	0,88	0,98	0,59-1,64
<i>F2 A</i>	0,01	0,00			2,23	0,09-55,94
<i>F5 G</i>	0,98	1,00	0,02	0,88	0,98	0,59-1,64
<i>F5 A</i>	0,01	0,00			2,23	0,09-55,94
<i>F7 G</i>	0,67	0,70	1,15	0,28	0,94	0,54-1,65
<i>F7 A</i>	0,24	0,13			1,8	0,69-4,67
<i>F13 G</i>	0,66	0,58	0,07	0,79	1,14	0,66-2,04
<i>F13 T</i>	0,17	0,19			0,89	0,36-2,22
<i>ITGA2 C</i>	0,49	0,29	4,04	0,04*	1,68	0,83-3,40
<i>ITGA2 T</i>	0,29	0,44			0,65	0,32-1,29
<i>ITGB3 C</i>	0,81	0,79	0,09	0,77	1,03	0,60-1,76
<i>ITGB3 T</i>	0,10	0,10			1,04	0,31-3,46
<i>PAI-1 5G</i>	0,40	0,38	0,00	0,97	1,04	0,53-2,05
<i>PAI-1 4G</i>	0,43	0,38			1,11	0,57-2,18
<i>VEGF-2578 C</i>	0,82	0,66	1,83	0,18	1,23	0,71-2,14
<i>VEGF-2578 A</i>	0,08	0,16			0,49	0,17-1,48
<i>VEGF 936 C</i>	0,96	0,84	3,99	0,05	1,13	0,67-1,91
<i>VEGF 936 T</i>	0,01	0,11			0,12	0,01-1,06

Примечание: * различия статистически значимы, $p < 0,05$ в подгруппе 2 и контрольной группе

Анализ общей и доминантной моделей у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией в I триместре беременности после криопереноса и женщин в контрольной группе не выявил отличия в распределении генотипов по полиморфному локусу *ITGA2*: 807 C>T в исследуемых группах, а также отсутствовали различия в частоте встречаемости и других исследованных нами генов (таблица 20 и 21).

Таблица 20 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Общая модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после криопереноса и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	Криоперенос	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 26/%			знач.	95% CI
<i>FGB GG</i>	0,57	0,58	0,05	0,97	0,99	0,43-2,29
<i>FGB GA</i>	0,40	0,38			1,04	0,39-2,71
<i>FGB AA</i>	0,03	0,04			0,74	0,04-12,44
<i>F2 GG</i>	0,97	1,00	0,02	0,88	0,97	0,41-1,99
<i>F2 GA</i>	0,03	0,00			2,24	0,09-57,18
<i>F2 AA</i>	0,00	0,00			0,75	0,01-38,85
<i>F5 GG</i>	0,97	1,00	0,02	0,88	0,97	0,41-1,99
<i>F5 GA</i>	0,03	0,00			2,24	0,09-57,18
<i>F5 AA</i>	0,00	0,00			0,75	0,01-38,85
<i>F7 GG</i>	0,63	0,62	4,83	0,09	1,02	0,45-2,31
<i>F7 GA</i>	0,17	0,35			0,49	0,16-1,57
<i>F7 AA</i>	0,20	0,04			5,2	0,6-44,9
<i>F13 GG</i>	0,57	0,46	0,89	0,64	1,24	0,51-2,97
<i>F13 GT</i>	0,34	0,46			0,74	0,29-1,92
<i>F13 TT</i>	0,09	0,08			1,11	0,17-7,16
<i>ITGA2 CC</i>	0,37	0,15	3,94	0,14	2,41	0,71-8,26
<i>ITGA2 CT</i>	0,46	0,54			0,85	0,35-2,04
<i>ITGA2 TT</i>	0,17	0,31			0,56	0,17-1,80
<i>ITGB3 CC</i>	0,77	0,73	0,41	0,82	1,06	0,49-2,29
<i>ITGB3 CT</i>	0,17	0,23			0,74	0,21-2,57
<i>ITGB3 TT</i>	0,06	0,04			1,49	0,13-17,28
<i>PAI-1 5G5G</i>	0,31	0,27	0,89	0,64	1,17	0,39-3,42
<i>PAI-1 5G4G</i>	0,34	0,46			0,74	0,29-1,92
<i>PAI-1 4G4G</i>	0,34	0,27			1,27	0,44-3,68
<i>VEGF-2578 CC</i>	0,77	0,58	2,74	0,25	1,34	0,59-3,00
<i>VEGF-2578 CA</i>	0,20	0,35			0,58	0,19-1,75
<i>VEGF-2578 AA</i>	0,03	0,08			0,37	0,03-4,31
<i>VEGF 936 CC</i>	0,94	0,81	3,62	0,16	1,17	0,55-2,46
<i>VEGF 936 CT</i>	0,06	0,12			0,49	0,08-3,18
<i>VEGF 936 TT</i>	0,00	0,08			0,15	0,00-3,24

Таблица 21 - Распределение частот генотипов *F5*, *F2*, *F7*, *FGB*, *FXIII*, *PAI-I*, *ITGA2*, *ITGB3*, *VEGF-A*: -2578 и +936 (Доминантная модель) у пациенток с выявленной гиперкоагуляцией после криопереноса и женщин контрольной группы

Генотипы	Контроль	Криоперенос	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 35/%	n = 26/%			знач.	95% CI
<i>FGB GG</i>	0,57	0,58	0,05	0,83	0,99	0,43-2,29
<i>FGB GA+AA</i>	0,43	0,42			1,01	0,40-2,56
<i>F2GG</i>	0,97	1,00	0,02	0,88	0,97	0,47-1,99
<i>F2 GA+AA</i>	0,03	0,00			2,24	0,09-57,18
<i>F5 GG</i>	0,97	1,00	0,02	0,88	0,97	0,47-1,99
<i>F5 GA+AA</i>	0,03	0,00			2,24	0,09-57,18
<i>F7 GG</i>	0,63	0,62	0,03	0,87	1,02	0,45-2,32
<i>F7 GA+AA</i>	0,37	0,38			0,98	0,37-2,54
<i>F13 GG</i>	0,57	0,46	0,35	0,55	1,24	0,51-2,98
<i>F13 GT+TT</i>	0,43	0,54			0,79	0,33-1,93
<i>ITGA2 CC</i>	0,37	0,15	2,51	0,11	2,41	0,70-8,26
<i>ITGA2 CT+TT</i>	0,63	0,85			0,74	0,34-1,62
<i>ITGB3 CC</i>	0,77	0,73	0,00	0,95	1,06	0,49-2,29
<i>ITGB3 CT+TT</i>	0,23	0,27			0,85	0,27-2,64
<i>PAI-1 5G5G</i>	0,31	0,27	0,01	0,92	1,17	0,39-3,42
<i>PAI-1 5G+4G</i>	0,69	0,73			0,93	0,43-2,06
<i>VEGF-2578 CC</i>	0,77	0,58	1,8	0,18	1,34	0,59-3,00
<i>VEGF-2578 CA+AA</i>	0,23	0,42			0,54	0,19-1,53
<i>VEGF 936 CC</i>	0,94	0,81	1,52	0,16	1,17	0,55-2,46
<i>VEGF 936 CT+TT</i>	0,06	0,19			0,29	0,05-1,65

Проведенные исследования по распределению аллелей и генотипов исследуемых генов не выявили достоверных отличий в группах у пациенток после криопереноса и контрольной группой женщин, за исключением локуса *ITGA2*: 807 C>T, по которому получено различие только в распределении аллелей. Так как отличий в распределении генотипов в общей и доминантной моделях получено не было, мы сочли преждевременным делать вывод о значимости этого полиморфизма в формировании гиперкоагуляции при переносе витрифицированных эмбрионов.

Большинство работ по анализу влияния аллельного полиморфизма на развитие мультифакторной патологии свидетельствуют о слабом эффекте

отдельных однонуклеотидных замен на развитие заболевания без их связи с остальной частью генома и без учета влияния внешней среды [9]. В связи с чем, для выявления ассоциации полиморфных вариантов генов - кандидатов с риском формирования патологии необходимо рассматривать совокупность множества генов, вовлеченных в сложные механизмы патогенеза, и факторы внешней среды.

Для определения роли межгенных взаимодействий в риске развития гиперкоагуляционных осложнений у женщин с беременностью в результате ЭКО после ПЭ в стимулированном цикле и после криопереноса и, обусловленных ими, осложнений гестации мы использовали метод сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR).

3.5. Роль межгенных взаимодействий в формировании наследственной предрасположенности к гиперкоагуляционным осложнениям гестации у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения

Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программы MDRv. 3/0/2. В проведенном исследовании были проанализированы все возможные комбинации полиморфных вариантов ключевых генов тромбофилии (*F51691G>A*, *F220210G>A*, *F7: 10976 G>A*, *FGB455 G>A*, *FXIII: 103 G>T*, *PAI-1 5G>4G*, *ITGA2: 807 C>T*, *ITGB3 1565T>C*) и ангиогенеза (*VEGF-A: -2578C>A* и *+936C>T*) у пациентов после ПЭ в стимулированном цикле и после криопереноса в программах ЭКО с проявлениями гиперкоагуляции в первом триместре беременности и в группе сравнения (контрольная группа). В процессе моделирования использовались высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, позволяющие однозначно дифференцировать наличие или отсутствие статистических эффектов.

С помощью программы MDR нами построены оптимальные модели межгенных взаимодействий генов тромбофилии и ангиогенеза. Было установлено, что для развития гиперкоагуляции во время беременности наибольшей точностью предсказания обладают трех и четырехлокусные модели (таблица 22).

Таблица 22 – Модели межгенных взаимодействий при гиперкоагуляции у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле

Модель	Точность предсказания, %	Воспроизводимость тестируемой модели, %
<i>ITGA2 (rs192974), VEGF-A (rs699947), FXIII (rs134570)</i>	73	90
<i>FXIII (rs134570), ITGA2 (rs192974), VEGF-A (rs699947), VEGF-A (rs3025039)</i>	70	70

Было установлено, что среди моделей наибольшей воспроизводимостью и точностью для развития гиперкоагуляции во время беременности обладает трехлокусная модель *ITGA2 (rs192974), VEGF-A (rs699947), FXIII (rs134570)*. Данная модель характеризовалась 90%-ной воспроизводимостью (Cross Validation consistency) и 73%-ной точностью предсказания (Testing balanced accuracy). На основе полученной модели выявлены 16 генотипов повышенного риска развития гиперкоагуляции (темно-серые ячейки) и 4 генотипа пониженного риска (светло-серые ячейки), белые квадраты означают отсутствие взаимодействия (рисунок 2).

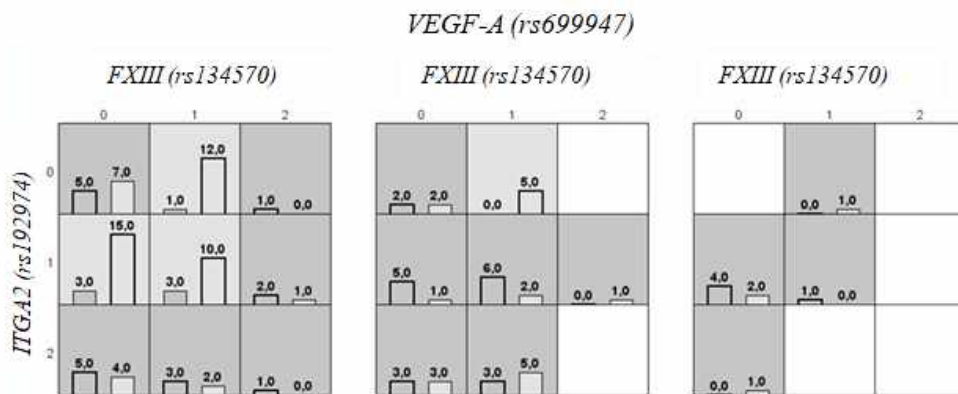


Рисунок 2- Комбинации риска гиперкоагуляции
(столбики слева гиперкоагуляция есть, гиперкоагуляции нет)

Вклад каждого полиморфизма при риске развития гиперкоагуляции во время гестации на примере трехлокусной модели представлен в виде дендрограммы (рисунок 3).

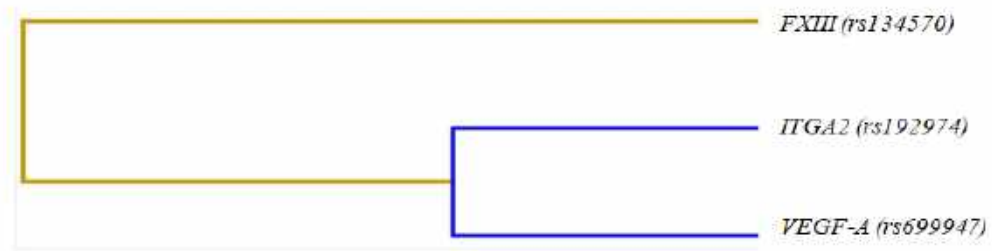


Рисунок 3 – График энтропии, отражающий межгенные взаимодействия в полученной трехлокусной модели (оранжевые и синие линии – синергизм действия)

Длинные линии в дендрограмме описывают слабую взаимосвязь между генами. Чем короче линии, соединяющие два предиктора, тем сильнее взаимодействие.

На следующем этапе оценили информационную ценность отдельного маркера, взаимодействие пары генов оценили с помощью схемы Фрюхтерман-Рейнгольда (рисунок 4).

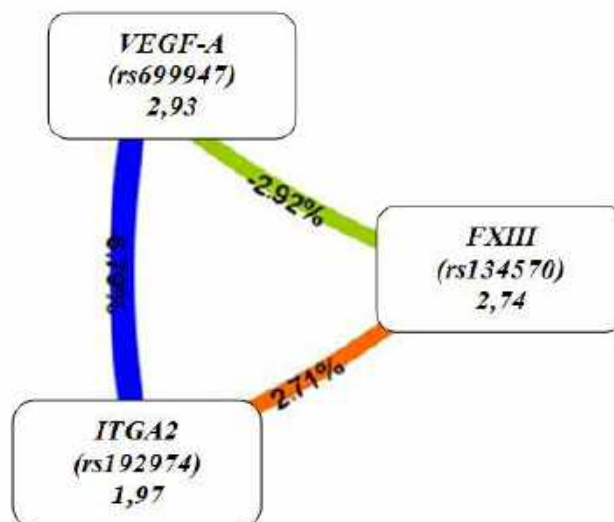


Рисунок 4 – Схема Фрюхтерман-Рейнгольда для межгенных взаимодействий (красные линии означают выраженный синергический эффект, оранжевые – умеренный, зеленые и синие - обладают синонимическим эффектом, коричневые – аддитивным)

Согласно схеме Фрюхтерман-Рейнгольда из всех полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом (долей энтропии) обладает полиморфизм *VEGF-A* (*rs699947*) – 2,93%. В то же время оптимальным межгенным взаимодействием является двулокусная модель *ITGA2* (*rs192974*), *VEGF-A* (*rs699947*), на долю комбинации которых приходится 6,79% фенотипической энтропии, что демонстрирует умеренный синонимический эффект полиморфизмов при формировании предрасположенности к гиперкоагуляции. Также умеренным синонимическим эффектом обладает комбинация *VEGF-A* (*rs699947*) и *FXIII* (*rs134570*). А умеренным синергическим эффектом - *ITGA2* (*rs192974*) и *FXIII* (*rs134570*) и составляет 2,71% фенотипической энтропии.

Таким образом, наибольшей информативностью в нашем исследовании обладает трехлокусная модель межгенных взаимодействий *ITGA2* (*rs192974*), *VEGF-A* (*rs699947*), *FXIII* (*rs134570*), которая характеризовалась 90%-ной воспроизводимостью и 73%-ной точностью предсказания. Чувствительность и специфичность модели снижается при добавлении предикторов.

Также мы проанализировали все возможные комбинации полиморфных вариантов ключевых генов тромбофилии (*F51691G>A*, *F220210G>A*, *F7: 10976 G>A*, *FGB455 G>A*, *FXIII: 103 G>T*, *PAI-1 5G>4G*, *ITGA2: 807 C>T*, *ITGB3 1565T>C*) и ангиогенеза (*VEGF-A: -2578C>A* и *+936C>T*) у пациентов после криопереноса в программах ЭКО с проявлениями гиперкоагуляции в первом триместре беременности и в группе контроля. С помощью программы MDR нами построены модели межгенных взаимодействий генов тромбофилии и ангиогенеза. Однако полученные модели не информативны, поскольку обладали недостаточной точностью предсказания и воспроизводимостью тестируемой модели (таблица 23).

Таблица 23 – Модели межгенных взаимодействий при гиперкоагуляции у пациенток после криопереноса

Модель	Точность предсказания, %	Воспроизводимость тестируемой модели, %
<i>FGB (rs134570), F5 (rs2227400)</i>	54	50

Проведенные исследования роли межгенных взаимодействий в изменении коагуляционных свойств крови при беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО позволили выявить значимые ДНК – локусы, участвующие в риске формирования данной патологии, направленность и силу взаимодействия между генами, которые в совокупности оказывают влияние на проявление гиперкоагуляции.

Материалы главы 3 опубликованы в следующих работах

1. Шумовская, В.В. Генетические аспекты состояния системы гемостаза при беременности в результате экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова // Материалы научно-практической конференции «Современные тренды развития репродуктивной и перинатальной медицины». – 2018. – Екатеринбург (тезисы).
2. Шумовская, В.В. Состояние системы гемостаза и его генетические аспекты при беременности, наступившей в результате экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова, Л.А. Пестряева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2019. - №1. – С. 60-65.
3. Шумовская, В.В. Особенности течения беременности и родов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова // Материалы VI конгресса акушеров-гинекологов УФО «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине». – 2019. – С. 95-97. – Екатеринбург (тезисы).

4. Зайкова, В.В. Особенности формирования фетоплацентарного комплекса после переноса эмбрионов в программах ВРТ / В.В. Зайкова, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова // Материалы VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Малышевские чтения. Демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» образовательный семинар «Репродуктивное здоровье в условиях новой коронавирусной инфекции». – 2020. – С. 26-27– Екатеринбург, 2020 (тезисы).

ГЛАВА 4. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ГЕСТАЦИИ У ПАЦИЕНТОК В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Целью настоящей главы явилось выведение математических моделей прогнозирования осложненного течения беременности у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле и криопереноса в программах ЭКО.

4.1. Правило прогноза гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах экстракорпорального оплодотворения

На основе статистического анализа результатов лабораторных и молекулярно-генетических исследований с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 13.3, MedCalc 19.0.7, Multifactor Dimensionality Reduction (mdr_3.0.2), Microsoft Excel были отобраны данные из группы после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО, отличающиеся от таковых в контрольной группе относительно наличия гиперкоагуляции (по экспертной оценке) с учетом корреляционных связей по Спирмену. В качестве критериев достоверности различий данных (при уровне значимости $p \leq 0,05$) применялись t-тест (критерий Стьюдента), точный критерий Фишера (F-критерий), критерий χ^2 Пирсона (рисунок 5).

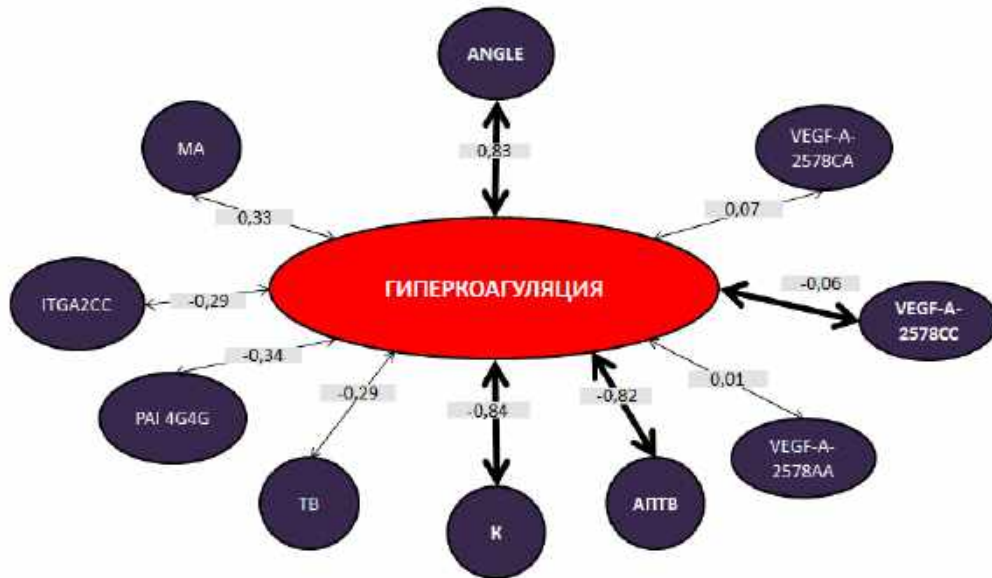


Рисунок 5 – Схема корреляционных связей

Проведенный логистический регрессионный анализ позволил построить статистическую модель для прогнозирования гиперкоагуляционных осложнений гестации (STATISTICA 13.3) в I триместре беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО (таблица 24).

Таблица 24 – Статистическая модель прогноза

n=135	Model: Logistic regression (logit) N of 0's: 79 1's: 56 Dep. var: ГИПЕРКОАГУЛЯЦИЯ Loss: Max likelihood (MS-err. scaled to 1) Final loss: 1,493975917 Chi(4)=180,22 p=0,0000 Modeled probability that АПТВ1(N 30 - 42) = 0,				
	Const.B0	VEGF-A-2578 CC	АЧТВ	К	ANGLE
Estimate	4,6488	-0,532535	-1,03445	-18,2286	1,002148

На основании статистической модели выведено правило прогноза, включающее наиболее информативные параметры клоттинговых тестов, ТЭГ и молекулярно-генетического исследования:

$$H = VEGF-A2578CC * K1 + АЧТВ * K2 + К * K3 + ANGLE * K4 + const$$

Где:

H – Прогностический индекс гиперкоагуляционных осложнений гестации,

VEGF-A 2578CC - если есть - 1, если нет – 0,

АЧТВ – уровень активированного частичного (парциального) тромбопластинового времени в сек. в крови женщины,

K - время образования сгустка в мин. по данным ТЭГ,

ANGLE - скорость роста фибриновой сети в град. по данным ТЭГ,

K1, K2, K3, K4, K5 – коэффициенты,

при $K1 = -0,53, K2 = -1,03, K3 = -18,23, K4 = 1,00$

$4,65 - const,$

При расчете прогностического индекса в контрольной группе и группе после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО получены следующие значения Н (таблица 25):

Таблица 25 – Значения Н при расчете прогностического индекса

Случай	Гиперкоагуляции нет	Гиперкоагуляция есть	Случай	Гиперкоагуляции нет	Гиперкоагуляция есть
1	-40,5	11,2	29	-27,4	5,6
2	-52,0	11,6	30	-30,3	22,0
3	-44,9	9,7	31	-38,6	
4	-53,8	33,9	32	-36,2	
5	-24,5	20,7	33	-37,9	
6	-23,2	0,9	34	-30,3	
7	-50,0	28,8	35	-22,5	
8	-53,8	8,7	36	-34,2	
9	-53,3	18,6	37	-28,9	
10	-32,7	13,3	38	-42,8	
11	-26,9	6,1	39	-45,5	
12	-54,3	2,2	40	-13,9	
13	-29,6	3,5	41	-20,8	
14	-28,4	7,4	42	-17,3	
15	-34,3	37,4	43	-8,7	
16	-61,0	31,1	44	-5,1	
17	-35,7	7,3	45	-13,7	
18	-38,2	14,5	46	-14,7	
19	-21,3	12,5	47	-12,7	
20	-35,4	12,1	48	-2,5	
21	-31,3	18,8	49	-12,3	
22	-34,2	8,7	50	-20,8	
23	-27,7	22,0	51	-10,9	
24	-52,5	22,9	52	-7,6	
25	-33,2	18,2	53	-2,0	
26	-33,0	9,9	54	-1,8	
27	-19,9	8,7	55	-8,7	
28	-44,1	23,7			

В случае наличия гиперкоагуляции среднее значение N составило 15,1 при стандартном отклонении 9,5; минимальное значение 0,9 и максимальное значение 37,4. При отсутствии гиперкоагуляции значения N соответственно были: -29,4; 15,3; -61,0; -1,8 (рисунок 6).

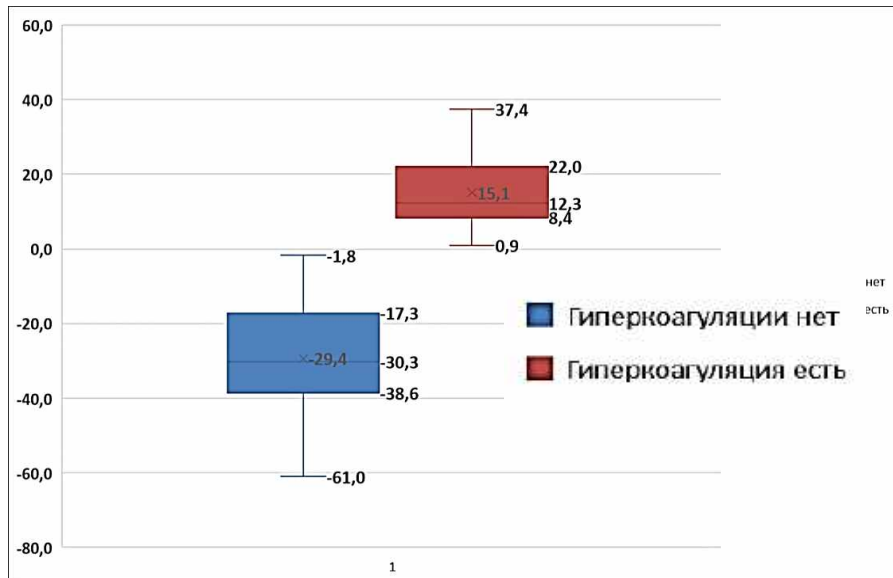


Рисунок 6 – Значение расчетного показателя N в зависимости от состояния гемостаза

Для определения чувствительности и специфичности всех переменных, входящих в правило, был проведен ROC-анализ в рамках программы MedCalc 19.0.7 и STATISTICA 13.3 (рисунок 7).

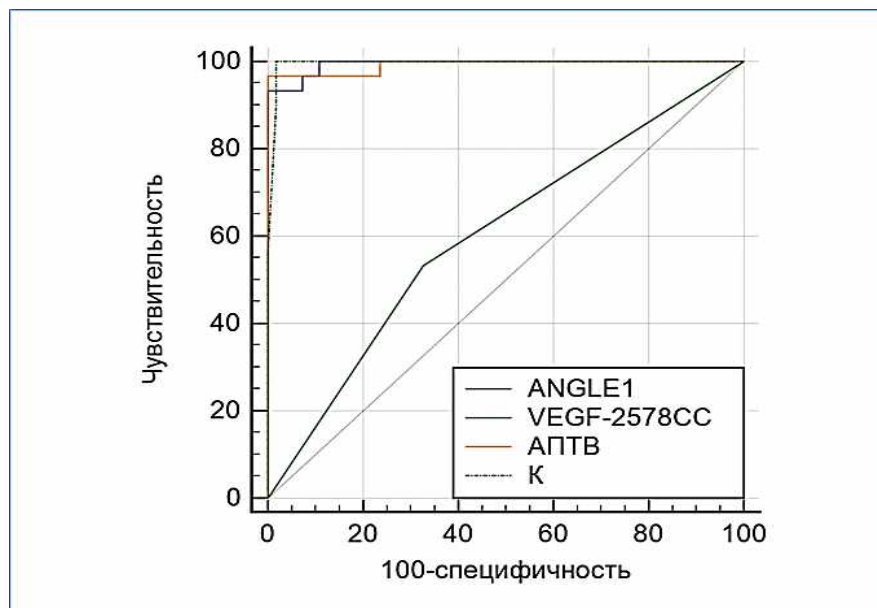


Рисунок 7 - ROC-кривые, полученные при анализе переменных, входящих в правило на чувствительность и специфичность

Выбор порога отсечения и определение чувствительности (Se) и специфичности (Sp) результирующего значения N вычислены в ROC анализе программы MedCalc. Порог отсечения отбирался исходя из оптимального соотношения Se и Sp (таблица 26, рисунок 8).

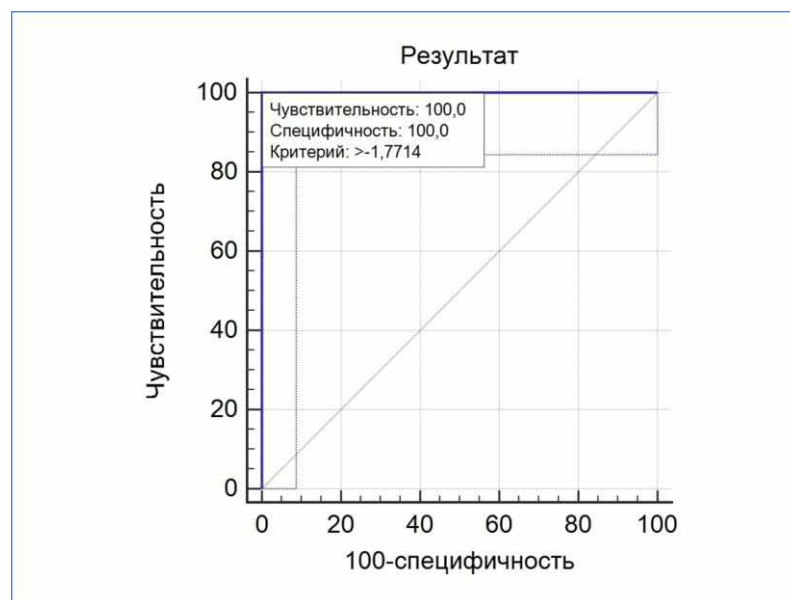


Рисунок 8 - ROC-кривая интегрального показателя N

Таблица 26 - Результат теста на точку отсечения

Критерий	Чувствительность	95% CI	Специфичность	95% CI	95% CI	95% CI
...>-12,739771	100	88,4 - 100,0	83,64	71,2 - 92,2	3,4 - 11,1	
>-12,3094564	100	88,4 - 100,0	85,45	73,3 - 93,5	3,6 - 13,0	
>-10,8751408	100	88,4 - 100,0	87,27	75,5 - 94,7	3,9 - 15,7	
>-8,6695743	100	88,4 - 100,0	90,91	80,0 - 97,0	4,8 - 25,4	
>-7,6266582	100	88,4 - 100,0	92,73	82,4 - 98,0	5,4 - 35,3	
>-5,0542998	100	88,4 - 100,0	94,55	84,9 - 98,9	6,1 - 55,1	
>-2,4628743	100	88,4 - 100,0	96,36	87,5 - 99,6	7,1 - 107,2	
>-1,9557235	100	88,4 - 100,0	98,18	90,3 - 100,0	7,9 - 383,5	
>-1,7714449	100	88,4 - 100,0	100	93,5 - 100,0		
>0,8915949	96,67	82,8 - 99,9	100	93,5 - 100,0		0,005 - 0,2
>2,1590815	93,33	77,9 - 99,2	100	93,5 - 100,0		0,02 - 0,3
>3,4715645	90	73,5 - 97,9	100	93,5 - 100,0		0,03 - 0,3
>5,5627709	86,67	69,3 - 96,2	100	93,5 - 100,0		0,05 - 0,3
>6,095306	83,33	65,3 - 94,4	100	93,5 - 100,0		0,07 - 0,4
>7,3168812	80	61,4 - 92,3	100	93,5 - 100,0		0,10 - 0,4
>7,4441621	76,67	57,7 - 90,1	100	93,5 - 100,0		0,1 - 0,4
>8,66528	70	50,6 - 85,3	100	93,5 - 100,0		0,2 - 0,5
>8,704426	66,67	47,2 - 82,7	100	93,5 - 100,0		0,2 - 0,6
>9,7026552	63,33	43,9 - 80,1	100	93,5 - 100,0		0,2 - 0,6
>9,890469	60	40,6 - 77,3	100	93,5 - 100,0		0,3 - 0,6
>11,2360949	56,67	37,4 - 74,5	100	93,5 - 100,0		0,3 - 0,7
>11,6498749	53,33	34,3 - 71,7	100	93,5 - 100,0		0,3 - 0,7
>12,0689694...	50	31,3 - 68,7	100	93,5 - 100,0		0,3 - 0,7

По результатам теста, точка отсечения равна 0,89. Учитывая целесообразность гипердиагностики в сторону гиперкоагуляции, порог отсечения принят равным 1 (рисунок 9). Чувствительность правила при значении $N > 1$ составила 96,67%, а специфичность – 100%.

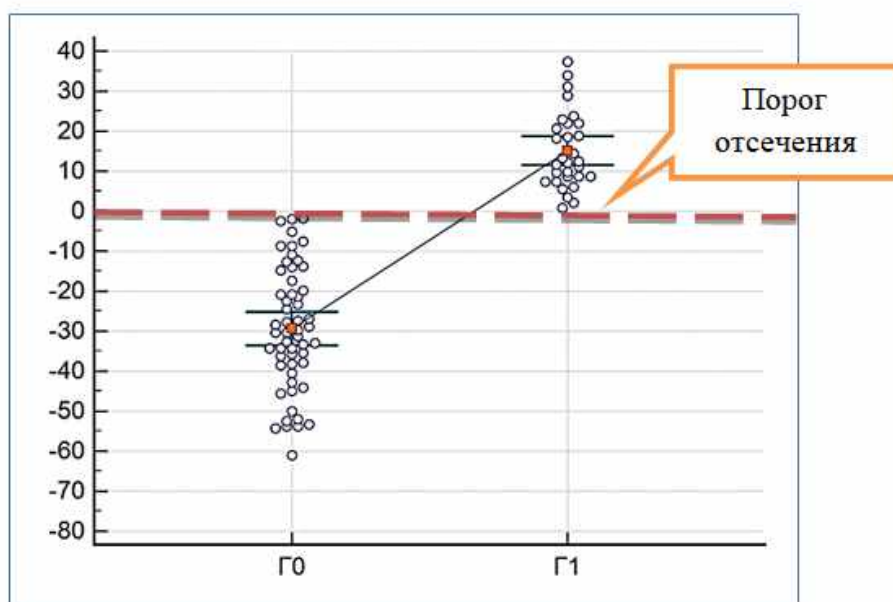


Рисунок 9 – Порог отсечения по интегральному показателю N (где G0-нет гиперкоагуляции, G1 – есть гиперкоагуляция)

При значении $N \geq 1$, прогнозируют высокий риск гиперкоагуляционных осложнений гестации во время беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО.

Если значение $N < 1$, прогнозируют низкий риск гиперкоагуляционных осложнений гестации во время беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО.

Проверка правила проведена на экзаменационной выборке в модели нейронной сети (STATISTICA 13.3) (таблица 27).

Таблица 27 – Проверка правила на экзаменационной выборке в модели нейронной сети

1	2	3	4	5	VEGF-A 2578 CC	k1	AЧТВ	k2	K	k3	ANGLE	k4	Const.B0	Результат (формула)	Нейр.сеть	Правило
0	0	0	0	0	1	-0,53	32	-1,03	1,9	-18,23	48	1,00	4,65	-15,5	0	0
0	0	0	0	0	0	-0,53	32	-1,03	1,9	-18,23	48	1,00	4,65	-15,0	0	0
1	1	1	1	1	1	-0,53	26	-1,03	1,7	-18,23	72	1,00	4,65	18,2	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	26	-1,03	1,7	-18,23	72	1,00	4,65	18,7	1	1
0	0	0	0	0	1	-0,53	34	-1,03	2,1	-18,23	52	1,00	4,65	-17,5	0	0
0	0	0	1	0	1	-0,53	29	-1,03	1,9	-18,23	59	1,00	4,65	-1,6	0	0
1	1	0	1	1	0	-0,53	29	-1,03	1,9	-18,23	59	1,00	4,65	-1,1	1	1
1	1	0	1	1	0	-0,53	30	-1,03	2,0	-18,23	62	1,00	4,65	-0,7	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	25	-1,03	1,9	-18,23	65	1,00	4,65	9,7	1	1
0	1	1	1	1	1	-0,53	25	-1,03	2,0	-18,23	60	1,00	4,65	2,3	1	1
1	1	0	1	1	0	-0,53	30	-1,03	1,8	-18,23	58	1,00	4,65	-1,0	1	1
0	0	0	0	0	1	-0,53	36	-1,03	2,0	-18,23	59	1,00	4,65	-10,0	0	0
1	1	0	1	1	0	-0,53	32	-1,03	1,9	-18,23	60	1,00	4,65	-3,3	1	1
0	1	1	1	1	1	-0,53	32	-1,03	1,7	-18,23	65	1,00	4,65	4,9	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	28	-1,03	1,8	-18,23	63	1,00	4,65	6,0	1	1
1	1	1	1	1	1	-0,53	28	-1,03	1,7	-18,23	64	1,00	4,65	8,3	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	29	-1,03	1,8	-18,23	63	1,00	4,65	5,0	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	29	-1,03	1,5	-18,23	65	1,00	4,65	12,4	1	1
1	1	1	1	1	1	-0,53	26	-1,03	1,6	-18,23	68	1,00	4,65	16,2	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	28	-1,03	1,6	-18,23	66	1,00	4,65	13,1	1	1
1	1	0	1	1	0	-0,53	30	-1,03	1,9	-18,23	65	1,00	4,65	4,1	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	28	-1,03	1,8	-18,23	68	1,00	4,65	11,0	1	1
1	1	0	1	1	0	-0,53	30	-1,03	1,9	-18,23	58	1,00	4,65	2,9	1	0
0	0	0	1	0	1	-0,53	30	-1,03	2,0	-18,23	60	1,00	4,65	-3,2	0	0
1	1	1	1	1	0	-0,53	28	-1,03	1,5	-18,23	64	1,00	4,65	12,5	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	26	-1,03	1,4	-18,23	72	1,00	4,65	24,4	1	1
0	1	1	1	1	1	-0,53	28	-1,03	1,8	-18,23	62	1,00	4,65	4,5	1	1
1	1	1	1	1	1	-0,53	25	-1,03	1,9	-18,23	70	1,00	4,65	13,8	1	1
1	1	1	1	1	0	-0,53	26	-1,03	1,9	-18,23	64	1,00	4,65	7,3	1	1
1	1	1	1	1	1	-0,53	26	-1,03	1,5	-18,23	65	1,00	4,65	15,0	1	1

Несовпадение результатов оценки риска гиперкоагуляции в нейронной сети и расчета по формуле составило 3,3% с ошибкой чувствительности.

Таким образом, предложенная модель позволяет с чувствительностью 96,67% и специфичностью 100% прогнозировать гиперкоагуляционные осложнения гестации после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО, что будет способствовать своевременной коррекции выявленных гемостазиологических нарушений и профилактике неблагоприятных перинатальных исходов, характерных для данной патологии.

4.2. Правило прогноза вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения

На основе статистического анализа результатов лабораторных исследований были отобраны данные из подгруппы после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО, отличающиеся от таковых в контрольной группе, относительно наличия осложненного течения беременности (по экспертной оценке) с учетом корреляционных связей по Спирмену (рисунок 10).



Рисунок 10 – Схема корреляционных связей

Проведенный логистический регрессионный анализ позволил построить статистическую модель для прогнозирования осложненного течения

беременности (STATISTICA 13.3) после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО (таблица 28).

Таблица 28 – Статистическая модель прогноза

n=85	Model: Logistic regression (logit) N of 0's: 56 1's: 29 (ОтборКрио) Dep. var: Осложнения Loss: Max likelihood Final loss: 39,544996147 Chi?(4)=30,018 p=,00000 Modeled probability that TB1 = 0,				
	Const.B0	АЧТВ	ТВ	К	ANGLE
Estimate	5,6	-0,2	-0,6	1,6	0,1

На основании статистической модели выведено правило прогноза, включающее наиболее информативные параметры клоттинговых тестов и ТЭГ.

$$I = АЧТВ * K1 + ТВ * K2 + К * K3 + ANGLE * K4 + const$$

Где:

I – Прогностический индекс вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО,

АЧТВ – активированное частичное (парциальное) тромбoplastиновое время, клоттинговый тест, характеризующий эффективность внутреннего пути активации коагуляции (сек.),

ТВ – тромбиновое время, клоттинговый тест, характеризующий превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина (сек.),

К – параметр тромбоэластограммы, характеризующий время образования фиксированного сгустка (мин.),

ANGLE - параметр тромбоэластограммы, характеризующий скорость роста фибриновой сети (град.),

$K1, K2, K3, K4, K5$ – коэффициенты,

при $K1 = -0,22, K2 = -0,57, K3 = 1,62, K4 = 0,1$

$5,58 - const.$

При расчете прогностического индекса в контрольной группе и группе после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО получены следующие значения I (таблица 29):

Таблица 29 – Значения при расчете прогностического индекса

Случаи	Осложнений нет	Осложнения есть	Случаи	Осложнений нет	Осложнения есть
1	-2,88	0,30	26	-3,49	-0,28
2	-1,94	-0,74	27	-2,06	0,33
3	-3,25	-1,04	28	-3,17	1,35
4	-2,31	0,41	29	-3,50	0,09
5	-3,80	-0,82	30	-3,04	0,08
6	-3,41	0,83	31	-1,88	0,49
7	-0,60	0,59	32	-1,65	0,27
8	-2,31	1,24	33	-2,02	1,06
9	-2,48	-0,01	34	-3,75	-0,28
10	-4,03	1,24	35	-1,93	0,99
11	-5,52	0,20	36		0,62
12	-1,39	-0,38	37		0,76
13	-3,24	-1,20	38		0,33
14	-3,05	-0,50	39		1,35
15	-4,32	-0,50	40		0,05
16	-2,78	-0,05	41		-0,15
17	-3,97	0,07	42		-1,45
18	-5,16	0,54	43		0,43
19	-3,93	1,03	44		0,13
20	-3,39	-0,26	45		-0,10
21	-4,35	-0,07	46		0,76
22	-4,22	0,33	47		0,32
23	-4,40	0,50	48		-1,40
24	-1,94	1,48	49		-0,08
25	-3,53	0,68	50		-0,28

В случае наличия осложненного течения беременности значение I составило 0,14 при стандартном отклонении 0,5; минимальное значение (-1,45) и максимальное значение 1,48. При отсутствии осложнений беременности значения I соответственно были: -3,23; 0,8; -5,52; -1,65 (рисунок 11).

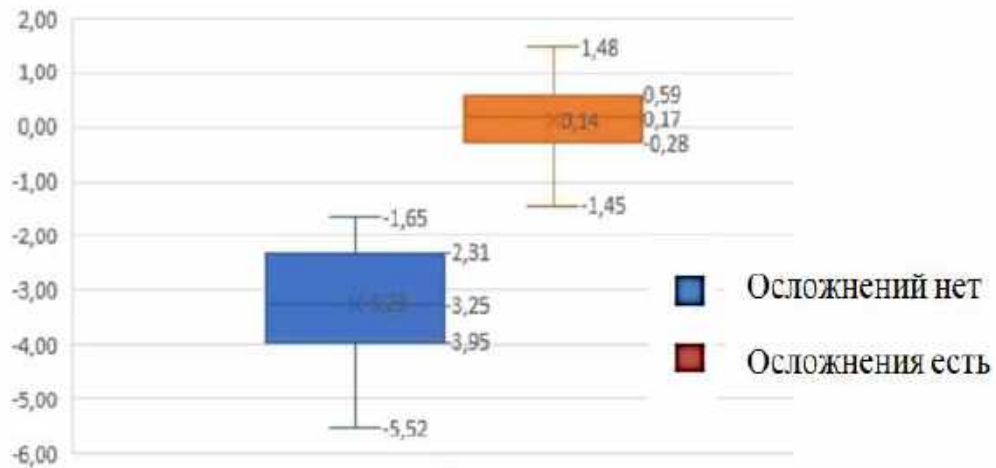
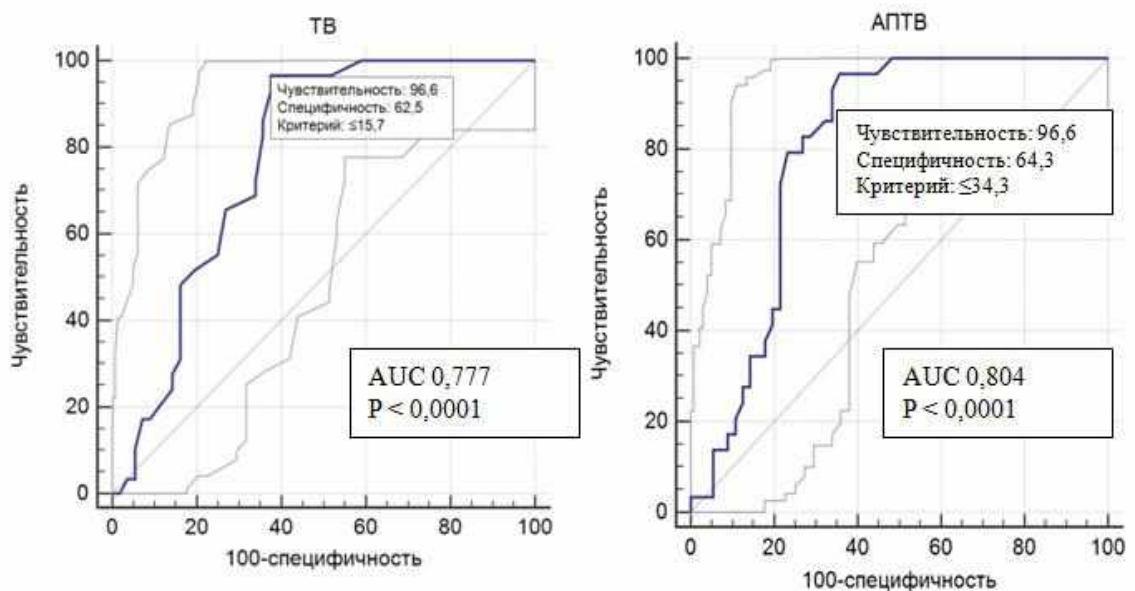


Рисунок 11 – Значение расчетного показателя I в зависимости от осложненного течения беременности

Для определения чувствительности и специфичности всех переменных входящих в правило был проведен ROC-анализ в рамках программы MedCalc 19.0.7 и STATISTICA 13.3 (рисунок 12).



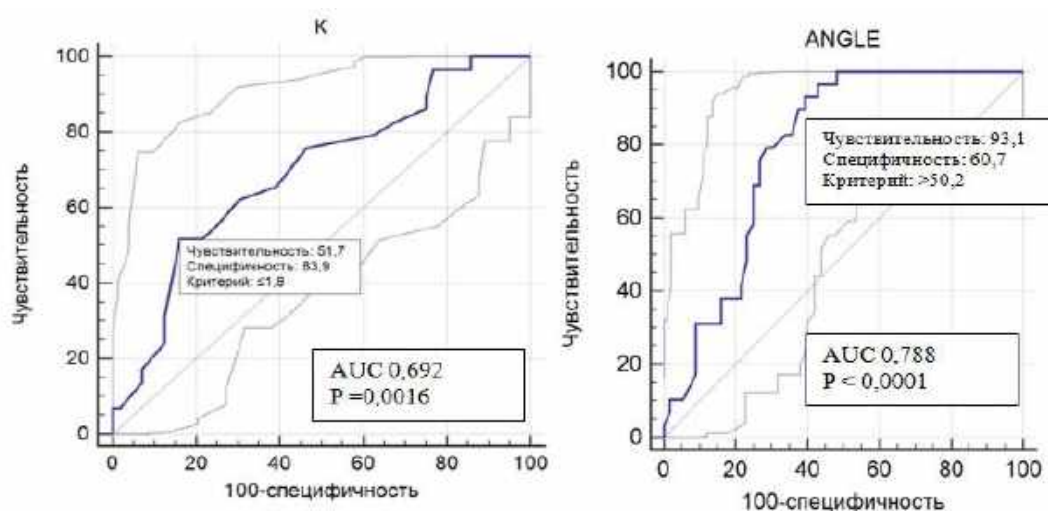


Рисунок 12 - ROC-кривые, полученные при анализе переменных, входящих в правило на чувствительность и специфичность

Выбор порога отсечения и определение чувствительности (Se) и специфичности (Sp) результирующего значения I вычислены в ROC анализе программы MedCalc. Порог отсечения отбирался исходя из оптимального соотношения Se и Sp (таблица 30, рисунок 13).

Таблица 30 - Результат теста на точку отсечения

Критерий	Чувствительность	95% CI	Специфичность	95% CI	+LR	95% CI	95% CI
>1,94	100,00	88,1 - 100,0	55,56	41,4 - 69,1	2,25	1,7 - 3,0	
>1,93	100,00	88,1 - 100,0	57,41	43,2 - 70,8	2,35	1,7 - 3,2	
>1,88	100,00	88,1 - 100,0	59,26	45,0 - 72,4	2,45	1,8 - 3,4	
>1,65	100,00	88,1 - 100,0	61,11	46,9 - 74,1	2,57	1,8 - 3,6	
>1,45	100,00	88,1 - 100,0	62,96	48,7 - 75,7	2,70	1,9 - 3,8	
>1,4	100,00	88,1 - 100,0	64,81	50,6 - 77,3	2,84	2,0 - 4,1	
>1,2	100,00	88,1 - 100,0	66,67	52,5 - 78,9	3,00	2,1 - 4,4	
>1,04	96,55	82,2 - 99,9	66,67	52,5 - 78,9	2,90	2,0 - 4,3	0,007 - 0,4
>0,82	93,10	77,2 - 99,2	66,67	52,5 - 78,9	2,79	1,9 - 4,1	0,03 - 0,4
>0,76	89,66	72,6 - 97,8	66,67	52,5 - 78,9	2,69	1,8 - 4,0	0,05 - 0,5
>0,74	86,21	68,3 - 96,1	66,67	52,5 - 78,9	2,59	1,7 - 3,9	0,08 - 0,5
>0,5	82,76	64,2 - 94,2	68,52	54,4 - 80,5	2,63	1,7 - 4,0	0,1 - 0,6
>0,38	79,31	60,3 - 92,0	68,52	54,4 - 80,5	2,52	1,6 - 3,9	0,1 - 0,6
>0,28	75,86	56,5 - 89,7	72,22	58,4 - 83,5	2,73	1,7 - 4,4	0,2 - 0,7
>0,26	72,41	52,8 - 87,3	72,22	58,4 - 83,5	2,61	1,6 - 4,2	0,2 - 0,7
>0,15	72,41	52,8 - 87,3	74,07	60,3 - 85,0	2,79	1,7 - 4,6	0,2 - 0,7
>0,1....	72,41	52,8 - 87,3	75,93	62,4 - 86,5	3,01	1,8 - 5,1	0,2 - 0,7

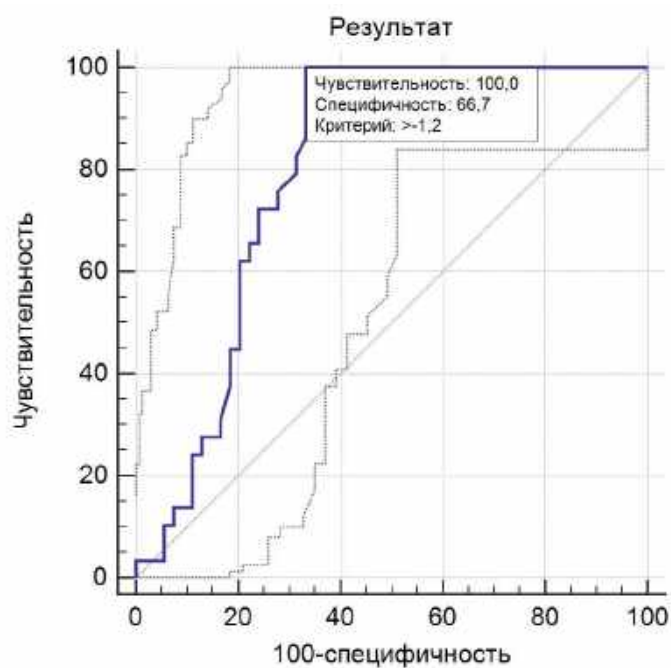


Рисунок 13 - ROC-кривая интегрального показателя I

По результатам теста, точка отсечения равна -1,2 (рисунок 14). Чувствительность правила при значении $I > -1,2$ составила 100%, а специфичность – 66,7%.

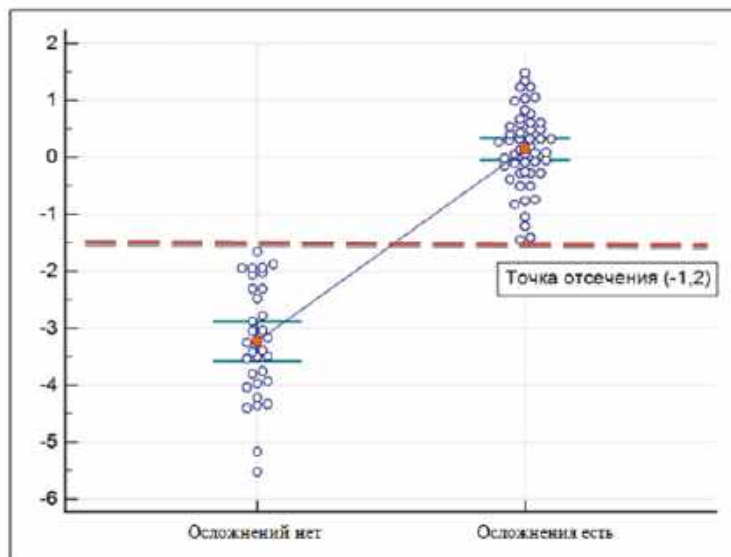


Рисунок 14 – Порог отсечения по интегральному показателю I

При значении $I \geq -1,2$, прогнозируют высокий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО.

Если значение $I < -1,2$, прогнозируют низкий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО. Проверка правила проведена на экзаменационной выборке в модели нейронной сети (STATISTICA 13.3) (таблица 31).

Таблица 31 – Проверка правила на экзаменационной выборке в модели нейронной сети

1	2	3	4	5	АЧТВ	k1	ТВ	k2	К	k3	ANGLE	k4	Const.B0	Результат (формула)	Риск осложнений (1 – да, 0 – нет)	Совпадение прогноза и теста (1 – да, 0 – нет)
1	1	1	1	1	29,6	-0,22	13,5	-0,57	1,9	1,62	61,0	0,1	5,58	0,55	1	1
0	0	0	0	0	34,5	-0,22	15,4	-0,57	2,7	1,62	48,3	0,1	5,58	-1,58	0	1
0	0	0	0	0	33,7	-0,22	16,4	-0,57	2,5	1,62	47,3	0,1	5,58	-2,40	0	1
1	1	0	1	1	28,4	-0,22	13,6	-0,57	1,6	1,62	65,9	0,1	5,58	0,76	1	1
0	0	0	0	0	32,3	-0,22	14,2	-0,57	2,0	1,62	55,0	0,1	5,58	-0,88	1	0
1	1	0	1	0	26,6	-0,22	12,8	-0,57	1,7	1,62	65,9	0,1	5,58	1,78	1	1
0	0	0	0	0	37,8	-0,22	17,3	-0,57	2,9	1,62	48,8	0,1	5,58	-3,02	0	1
0	0	0	0	1	33,1	-0,22	14,4	-0,57	2,1	1,62	58,0	0,1	5,58	-0,71	1	0
1	1	1	1	1	25,4	-0,22	12,0	-0,57	1,4	1,62	66,0	0,1	5,58	2,02	1	1
0	0	0	0	0	35,6	-0,22	16,4	-0,57	2,3	1,62	48,0	0,1	5,58	-3,07	0	1
1	1	1	1	1	29,9	-0,22	14,0	-0,57	1,9	1,62	60,0	0,1	5,58	0,10	1	1
1	1	0	1	0	28,8	-0,22	13,8	-0,57	1,9	1,62	69,4	0,1	5,58	1,40	1	1
0	0	0	0	0	39,3	-0,22	17,0	-0,57	3,2	1,62	42,0	0,1	5,58	-3,37	0	1
0	0	0	0	0	33,1	-0,22	15,2	-0,57	2,2	1,62	47,6	0,1	5,58	-2,04	0	1
1	1	0	1	0	27,6	-0,22	13,8	-0,57	1,8	1,62	70,3	0,1	5,58	1,59	1	1
0	0	0	0	0	36,0	-0,22	16,0	-0,57	2,4	1,62	44,0	0,1	5,58	-3,17	0	1
0	0	0	0	0	34,2	-0,22	15,6	-0,57	2,1	1,62	52,0	0,1	5,58	-2,23	0	1
1	1	1	1	1	32,1	-0,22	14,0	-0,57	2,2	1,62	58,0	0,1	5,58	-0,10	1	1
1	1	1	1	1	26,7	-0,22	12,1	-0,57	1,6	1,62	63,4	0,1	5,58	1,74	1	1
1	1	0	1	0	28,8	-0,22	12,5	-0,57	1,9	1,62	68,0	0,1	5,58	2,00	1	1
0	0	0	0	1	32,0	-0,22	15,6	-0,57	2,0	1,62	54,3	0,1	5,58	-1,68	0	1
1	1	0	1	0	24,6	-0,22	12,5	-0,57	1,8	1,62	68,3	0,1	5,58	2,79	1	1
1	1	1	1	0	28,9	-0,22	12,2	-0,57	1,9	1,62	64,2	0,1	5,58	1,77	1	1
0	0	0	0	0	33,2	-0,22	15,6	-0,57	2,0	1,62	55,0	0,1	5,58	-1,88	0	1
1	1	0	1	1	26,7	-0,22	13,1	-0,57	1,9	1,62	65,0	0,1	5,58	1,82	1	1
1	1	0	1	0	24,8	-0,22	12,1	-0,57	1,8	1,62	73,1	0,1	5,58	3,45	1	1
1	1	1	1	0	29,8	-0,22	12,6	-0,57	1,9	1,62	63,2	0,1	5,58	1,24	1	1
0	0	0	0	0	34,5	-0,22	15,2	-0,57	2,2	1,62	55,4	0,1	5,58	-1,57	0	1
0	0	0	0	0	33,5	-0,22	15,6	-0,57	2,3	1,62	52,3	0,1	5,58	-1,73	0	1
1	1	1	1	1	29,5	-0,22	13,2	-0,57	1,7	1,62	66,4	0,1	5,58	0,96	1	1

Точность прогноза составляет 93,3%, несовпадение результатов оценки риска осложненного течения беременности в нейронной сети и расчета по формуле составило 6,7% с ошибкой чувствительности.

Способ позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать осложненное течение беременности у пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО, что будет способствовать своевременной коррекции выявленных нарушений и профилактике неблагоприятных перинатальных исходов, характерных для данной патологии.

Таким образом, полученные правила прогнозирования осложненного течения беременности у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле и криопереноса, позволят оптимизировать тактику ведения данной категории пациенток и улучшить перинатальные исходы.

Материалы главы 4 опубликованы в следующих работах

- 1. Патент на изобретение РФ № 2720241. Способ прогнозирования гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса «свежих» эмбрионов в программах ЭКО. / Шумовская В.В., Путилова Н.В., Путилов С.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России. - № 2720241; заявл. 17.11.2019г.; опубл. 28.04.2020, Бюл. № 13.**
- 2. Патент на изобретение РФ № 2729441. Способ прогнозирования вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО. / Шумовская В.В., Путилова Н.В., Путилов С.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России. - № 2729441; заявл. 30.03.2020г.; опубл. 06.08.2020, Бюл. № 22.**

3. Зайкова, В.В. Прогнозирование гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Зайкова, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова, Л.А. Пестряева // Учебное пособие. – Екатеринбург: «Типография ситипринт», 2020. – 38 с. ISBN 978-5-89918-043-9.

ГЛАВА 5. ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ ИСХОДЫ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ У ПАЦИЕНТОК ПОСЛЕ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОПЕРЕНОСА В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Настоящая глава посвящена анализу способов родоразрешения, перинатальных исходов и поиску морфологических и иммуногистохимических особенностей плацентарной ткани у пациенток после переноса эмбрионов в программах ЭКО.

5.1. Анализ способов родоразрешения и перинатальных исходов у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса

При изучении особенностей течения родов было выявлено, что частота преждевременных родов у пациенток основной группы была выше (6,1%), чем у беременных контрольной группы и встречалась только после ПЭ в стимулированном цикле ($p < 0,05$). Случаев преждевременных родов у пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов и пациенток контрольной группы зарегистрировано не было (таблица 32).

Ведущим методом родоразрешения в основной группе являлось кесарево сечение - в 55,1% ($n=54$) случаев, в то время как в контрольной группе частота кесарева сечения составила 28,6% ($n=10$) ($p < 0,05$). Примерно с одинаковой частотой удельный вес кесарева сечения встречался в подгруппах 1 и 2 в основной группе – 58,3% ($n=28$) и 52% ($n=26$) соответственно. Основным показанием к абдоминальному родоразрешению у пациенток основной группы был анамнез – 50% ($n=27$) (в подгруппе 1 – 46,4% ($n=13$), в подгруппе 2 - 53,9% ($n=14$)). Также с одинаковой частотой операция кесарево сечение была проведена

вследствие наличия рубца на матке и формирования слабости родовой деятельности - 14,8% (n=8).

Таблица 32 – Перинатальные исходы и показания к абдоминальному родоразрешению у пациенток исследуемых групп

Изучаемый параметр	Основная группа (ЭКО) (n=98)		Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=48)		Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Рождение доношенных детей	92	93,9	42	87,5	50	100	35	100
Рождение недоношенных детей	6	6,1*	6	12,5	0	0	0	0
Самостоятельные роды	44	44,9	20	41,7	24	48	25	71,4
Абдоминальное родоразрешение	54	55,1*	28	58,3	26	52	10	28,6
Кесарево сечение вследствие наличия рубца на матке	8	14,8	7	25	1	3,8	2	20
Кесарево сечение вследствие неправильного членорасположения плода	1	1,8	1	3,6	0	0	2	20
Кесарево сечение вследствие слабости родовой деятельности	8	14,8	3	10,7	5	19,2	4	40
Кесарево сечение вследствие предлежания плаценты	3	5,6	0	0	3	11,5	0	0
Кесарево сечение вследствие ПОНРП	1	1,8	1	3,6	0	0	0	0
Кесарево сечение вследствие клинически узкого таза	3	5,6	2	7,1	1	3,8	0	0
Кесарево сечение вследствие острой гипоксии плода	3	5,6	1	3,6	2	7,8	1	10
Сочетанные показания	27	50	13	46,4	14	53,9	1	10
Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, $p < 0,05$								

Гестационный возраст на момент родоразрешения в контрольной группе был достоверно выше, чем у пациенток, беременность которых наступила после ПЭ в стимулированном цикле, и составил $39,4 \pm 0,2$ недель против $38,4 \pm 0,3$ недель ($p < 0,05$). Средний вес новорожденных в контрольной группе составлял $3442,5 \pm 53,7$ г, в то время как в основной группе - $3183,1 \pm 75,3$ г. ($p < 0,05$) (таблица 33). Достоверных отличий в гестационном возрасте и в среднем весе новорожденных по подгруппам внутри основной группы получено не было ($p > 0,05$).

Таблица 33 - Перинатальные исходы у пациенток исследуемых групп, (M±m)

Исследуемый параметр	Основная группа (ЭКО) (n=98)	Подгруппа 1 (ПЭ в стимулированном цикле) (n=48)	Подгруппа 2 (криоперенос) (n=50)	Контрольная группа (n=35)
Гестационный возраст, нед.	$38,6 \pm 0,3$	$38,4 \pm 0,3^*$	$39,1 \pm 0,2$	$39,4 \pm 0,2$
Вес новорожденных, г.	$3183,1 \pm 75,3^{**}$	$3153,8 \pm 83,3$	$3212,3 \pm 66,5$	$3442,5 \pm 53,7$
Рост новорожденных, см.	$50,7 \pm 0,5$	$50,7 \pm 0,5$	$50,7 \pm 0,4$	$51,4 \pm 0,3$
Оценка по шкале Апгар на 1 минуте	$6,8 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1^*$	$6,8 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$
Оценка по шкале Апгар на 5 минуте	$7,8 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1^*$	$7,8 \pm 0,1$	8 ± 0
Примечание: * различия статистически значимы при сравнении подгруппы 1 и контрольной группы, $p < 0,05$				
** различия статистически значимы при сравнении основной и контрольной групп, $p < 0,05$				

При оценке состояния новорожденных по шкале Апгар из рисунка 15 видно, что удовлетворительное состояние детей (7/8 баллов по Апгар) чаще фиксировалось в контрольной группе – 97,1% (n=34), в то время как в основной группе частота составила 76,5% (n=75). Следует отметить, что разница в частоте была не столь значительной и не соответствовала критериям достоверности ($p > 0,05$). Умеренная гипоксия (6/7 баллов по Апгар) достоверно чаще встречалась в основной группе новорожденных – 21,4% (n=21) ($p < 0,05$), в то время как в контрольной группе умеренная гипоксия была у 2,9% (n=1) детей.

Гипоксия средней степени тяжести (5/6 баллов по Апгар) в основной группе встречалась в 2% (n=2) случаев и только в подгруппе 1, в контрольной группе и в подгруппе 2 подобная гипоксия не встречалась ($p < 0,05$). Случаев тяжелой гипоксии (3/4 баллов по Апгар) и перинатальных потерь в исследуемых группах не было (таблица 34).

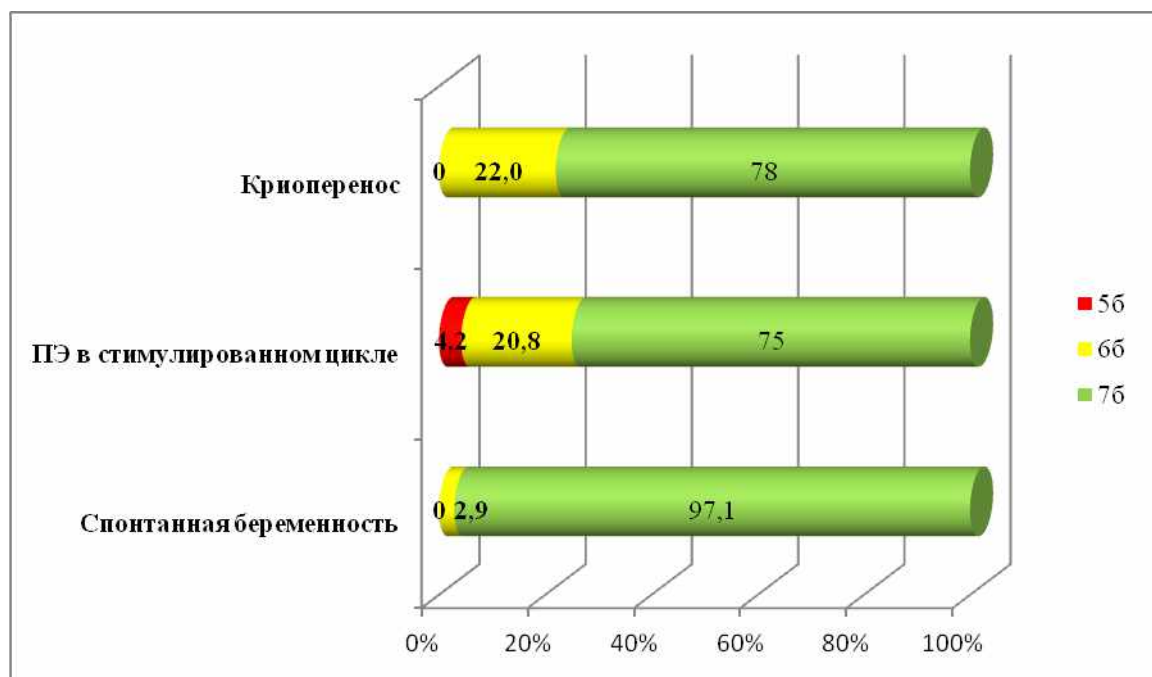


Рисунок 15 – Оценка новорожденных исследуемых групп на 1 минуте по шкале Апгар

Таблица 34 - Оценка степени тяжести асфиксии новорожденных при рождении на 1 и 5 минуте шкалы Апгар в исследуемых группах

Исследуемый параметр	Основная группа (ЭКО) (n=98),%	Подгруппа 1 (n=48),%	Подгруппа 2 (n=50),%	Контрольная группа (n=35),%
Удовлетворительное состояние (7/8 баллов по Апгар)	76,5	75	78	97,1
Умеренная гипоксия (6/7 баллов по Апгар)	21,4*	20,8	22	2,9
Гипоксия средней степени тяжести (5/6 баллов по Апгар)	2*	4,2	0	0
Тяжелая гипоксия (3/4 баллов по Апгар)	0	0	0	0

Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, $p < 0,05$

Таким образом, превалирующим методом родоразрешения у пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО, является операция кесарево сечение, так как данная категория пациентов отнесена к группе высокого риска и требует индивидуального подхода к ведению беременности и родоразрешению. Гестационный возраст и вес новорожденных в основной группе был близок к средним цифрам в контрольной группе. Однако стоит отметить, что в подгруппе после ПЭ в стимулированном цикле получены достоверные отличия в средних показателях срока родоразрешения и веса новорожденных по сравнению с группой контроля. Таким образом, нами получены данные о наиболее благоприятных перинатальных исходах у пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов, не отличающихся от перинатальных исходов пациенток со спонтанно наступившей беременностью.

5.2. Анализ морфоструктуры плацент у пациенток в программах экстракорпорального оплодотворения

Морфологические исследования проведены в объеме 133 последов, из них 98 последов от пациенток основной группы: подгруппа 1 – ПЭ в стимулированном цикле (n=48), подгруппа 2 – перенос витрифицированных эмбрионов (n=50) и 35 – от пациенток контрольной группы.

Гистологическое исследование последа включало в себя изучение:

- плаценты (хориальная и базальные пластины, состояние краевой зоны, ворсинчатого хориона, межворсинчатого пространства);
- плодных оболочек (амниотический слой, спонгиозное пространство, трофобластический и децидуальные слои);
- пуповины (состояние стромы и сосудистый компонент).

По результатам патоморфологического исследования показатели масс плацент в исследуемых группах не имели достоверных отличий. При ПЭ в стимулированном цикле средняя масса плацент составила $543,2 \pm 19,6$ г, при переносе витрифицированных эмбрионов – $572,4 \pm 16,5$ г, при естественном наступлении беременности – $511,4 \pm 18,3$ г ($p > 0,05$) (рисунок 16).

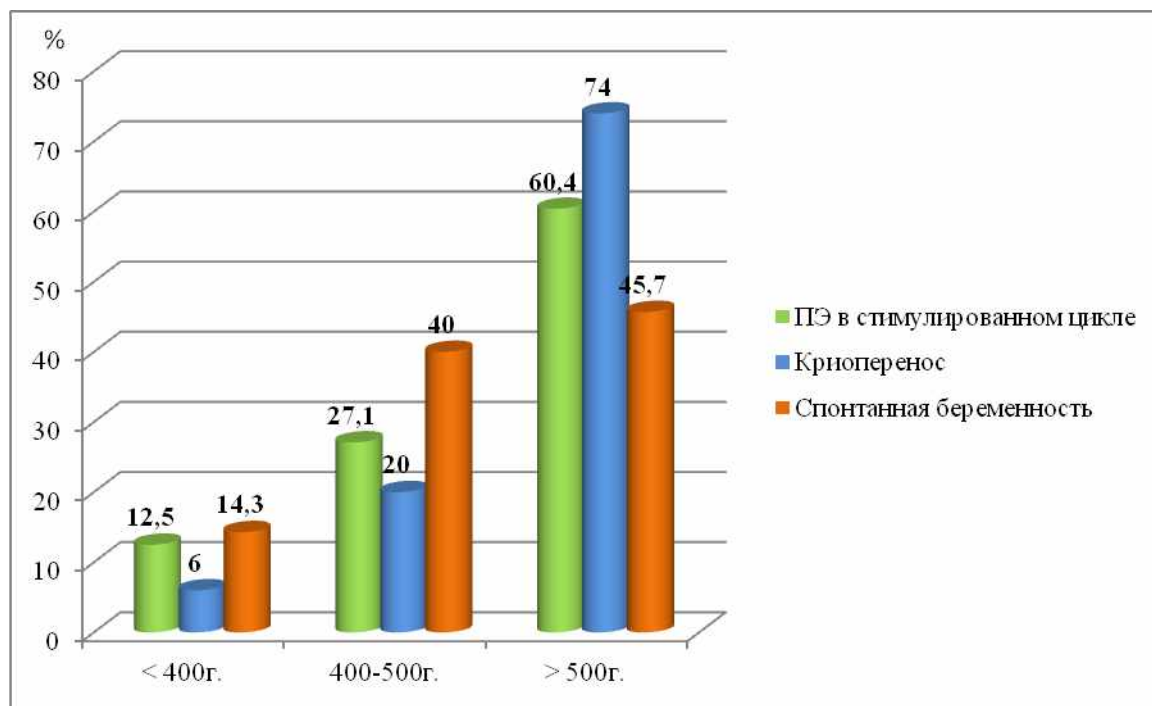


Рисунок 16 - Распределение по массе плацент в исследуемых группах

Макроскопические признаки повышения давления в сосудах плаценты, такие как варикозное расширение сосудов, формирование ложных узлов в пуповине, также были во всех группах, при отсутствии достоверных различий между группами.

При морфологическом исследовании плацент от пациенток основной группы по сравнению с контрольной, достоверно чаще встречались аномалии прикрепления пуповины в виде краевого и парацентрального прикрепления, чаще отмечалось формирование краевого валика, а также изменения в структуре ворсинчатого дерева в виде слабого развития котиледонов и борозд ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам основной группы выявлено не было (таблица 35).

Таблица 35 – Анализ изменений плодовой и материнской поверхностей плацент исследуемых групп (M±m)

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=98)		Подгруппа 1 (n=48)		Подгруппа 2 (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Краевое прикрепление пуповины	42	42,9*	25	52,1	17	34	5	14,3
Парацентральное прикрепление пуповины	53	54,1*	21	43,8	32	64	18	51,4
Центральное прикрепление пуповины	1	1*	0	0	1	2	12	34,3
Оболочечное прикрепление пуповины	2	2	2	4,1	0	0	0	0
Ложные узлы	12	12,2*	6	12,5	6	12	1	2,9
Краевой валик	43	43,9*	23	48	20	40	3	8,6
Хорошо выраженные котиледоны	48	49	22	45,8	26	52	31	88,6
Слабо выраженные котиледоны	50	51*	26	54,2	24	48	4	11,4

Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, p<0,05

Одним из важных критериев полноценности плаценты является состояние её виллезного дерева, в частности терминальных ворсин хориона, которые являются определяющим компонентом при оценке соответствия срока беременности и гистологической структуры плаценты. При нормально протекающей беременности в зрелой плаценте на долю терминальных ворсин хориона приходится 40-50% от общего объема ворсин, зрелые промежуточные ворсины хориона составляют около 30%, стволовые формы ворсин до 20%, промежуточные незрелые формы ворсин могут встречаться до 5%. Изменения в соотношении видов ворсин хориона и появление генераций ворсин, характерных для более ранних сроков (промежуточных зрелых и незрелых форм), нередко обуславливает развитие плацентарной недостаточности.

При исследовании плацент основной группы основную часть хориальной оболочки составляют терминальные ворсины. Строма этих ворсин образована рыхлой тканью, поверхность которых покрыта однослойным трофобластическим эпителием с дистрофическими изменениями (рисунок 17).

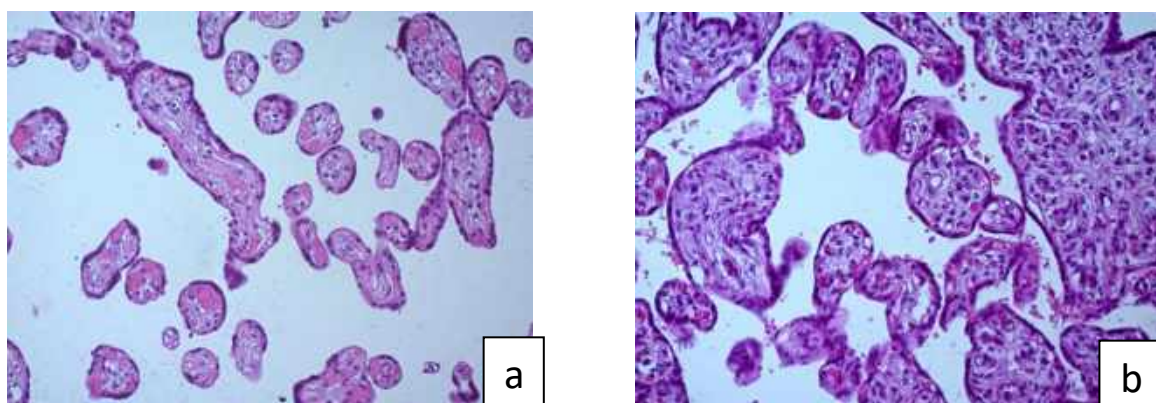


Рисунок 17 - Строение ворсинчатого хориона а (терминальные) б (зрелые и незрелые промежуточные). Окраска Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$

Полноценное маточно-плацентарное кровообращение, необходимое для непрерывного поступления в интервиллезное пространство достаточного количества материнской крови, обеспечивает нормальное структурно-функциональное состояние плаценты. Определяющим фактором морфогенеза ворсинчатого хориона является взаимоотношение маточно-плацентарной и фетоплацентарной систем кровообращения, при нарушениях которых возникает ФПН - одно из наиболее распространенных клинических проявлений патологии последа [38, 44].

В основной группе частота встречаемости ФПН была достоверно выше, и составила 57,2%, против 5,7% в группе контроля ($p < 0,05$). Наибольшее число случаев формирования ФПН встречалось в подгруппе 1 – 62,6%, а в подгруппе 2 составило - 52% (таблица 36).

Таблица 36 – Частота встречаемости плацентарной недостаточности исследуемых групп

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=98)		Подгруппа 1 (n=48)		Подгруппа 2 (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Острая плацентарная недостаточность	4	4,1	3	6,3	1	2	0	0
ФПН компенсированная	13	13,3	6	12,5	7	14	0	0
ФПН субкомпенсированная	39*	39,8*	21	43,8	18	36	2	5,7
ФПН декомпенсированная	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, $p < 0,05$

Среди форм ФПН наиболее часто встречающейся была субкомпенсированная форма: 43,8% в подгруппе 1, 36% - в подгруппе 2, а в группе контроля – 5,7%.

Под трофобластическим эпителием терминальных ворсин локализованы сосуды синусоидального типа с нарушениями кровенаполнения (мало-полнокровие, ангиоматоз), регистрировались нарушения кровотока в стволовых ворсинах и межворсинчатом пространстве в виде истинных и ложных инфарктов и гематом (рисунок 18, 19, 20).

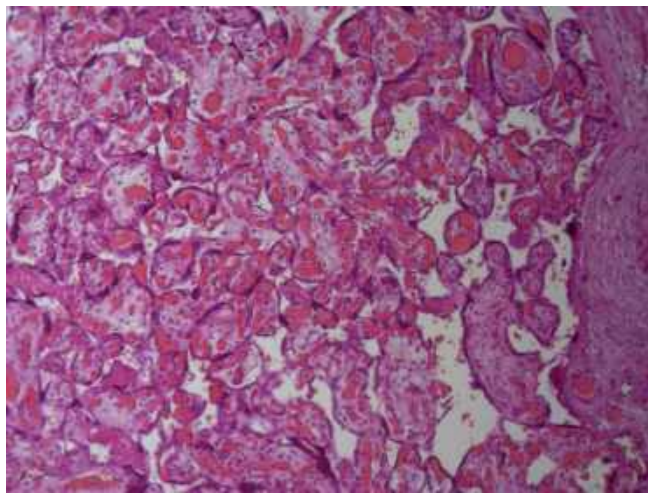


Рисунок 18 - Ангиоматоз и полнокровие
(окраска Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$)

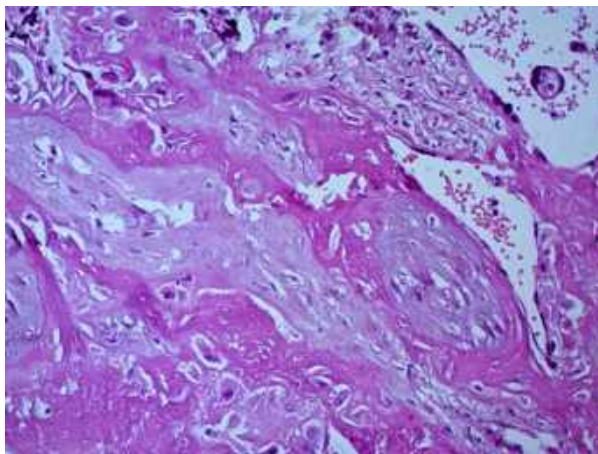


Рисунок 19 - Псевдоинфаркт
(окраска Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$)

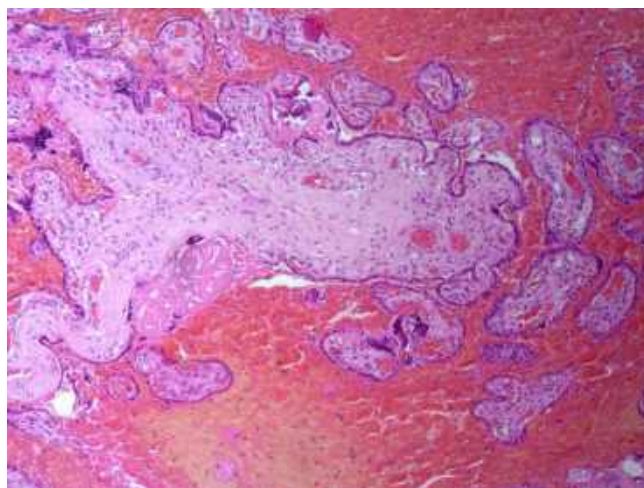


Рисунок 20 – Гематома (окраска Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$)

При морфологическом исследовании плацент у женщин с беременностью после ЭКО более выражено проявлялись компенсаторно-приспособительные процессы в виде увеличения количества синцитиальных почек, неравномерного развития и формирования синцитиокапиллярных мембран (таблица 37).

Таблица 37 – Гистологическая характеристика плацент исследуемых групп

Патология	Основная группа (ЭКО) (n=98)		Подгруппа 1 (n=48)		Подгруппа 2 (n=50)		Контрольная группа (n=35)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нарушение кровообращения в виде инфарктов, свертков, стаза и псевдоинфарктов	24	24,5*	13	27,1	11	22	1	2,9
Нарушение кровенаполнения ворсин (мало- полнокровие, ангиоматоз).	66	67,3*	32	66,7	34	68	1	2,9
Выраженность компенсаторно-приспособительных реакций (КПР)	30	30,6*	18	37,5	12	24	1	2,9
Патология развития терминальных ворсин	24	24,5*	13	27,1	11	22	1	2,9
Дистрофические изменения клеток	30	30,6*	18	37,5	12	24	1	2,9
Патологическая незрелость ворсин	22	22,4*	12	25	10	20	2	5,7
Гематомы	25	25,5*	14	29,2	11	22	1	2,9
Примечание: * различия статистически значимы между основной и контрольной группами, $p < 0,05$								

Очаговые нарушения ветвления ворсин и очаговая пролиферация также достоверно чаще регистрировались в основной группе. В базальной децидуальной оболочке в большинстве плацент обеих групп обнаружены фибриноидные изменения. В дистрофически измененных участках плаценты выявлено отложение солей кальция. Воспалительные изменения плацентарного диска и пуповины реже регистрировались в контрольной группе (рисунок 21).

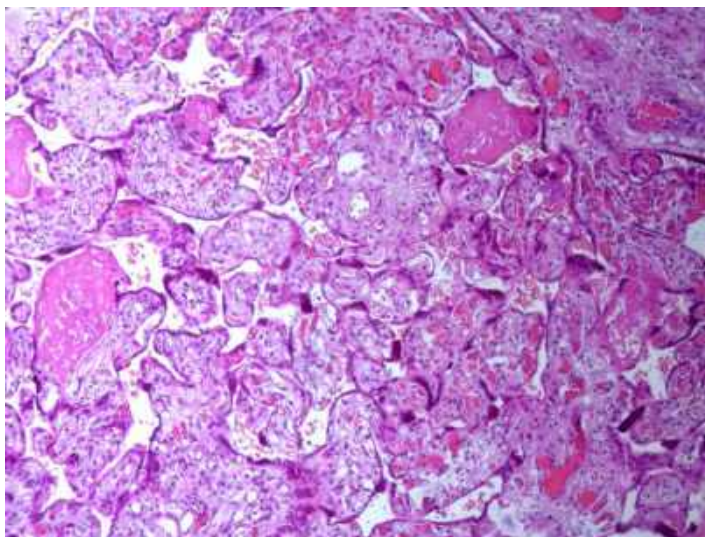


Рисунок 21 - Нарушение ветвления и пролиферация ворсин
(окраска Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$)

5.3. Иммуногистохимическое исследование экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFr1) и Аннексина V в плаценте после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения

Развитие и внедрение в повседневную практику методов иммуногистохимии позволило углубленно понять морфофункциональные особенности плаценты с позиции экспрессии в ней многочисленных сигнальных молекул, регулирующих ее различные функции. Как известно, центральную роль в процессах ангиогенеза в плаценте играет VEGF, влияющий на развитие новых кровеносных сосудов, путем взаимодействия с соответствующими тирозинкиназными рецепторами.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов плаценты установлено, что выраженная экспрессия VEGFr1 клетками ворсинчатого

трофобласта была достоверно выше в контрольной группе по сравнению с группой после переноса эмбрионов в программах ЭКО и составила $33,8\pm 4,4\%$ и $13,9\pm 3\%$ соответственно ($p < 0,05$). Напротив, слабая экспрессия VEGFr1 в клетках ворсинчатого трофобласта достоверно чаще встречалась в основной группе: $18,1\pm 2,4\%$, против $7,3\pm 2,1\%$ в группе контроля (таблица 38). Достоверных отличий по подгруппам основной группы получено не было (рисунок 22, 23).

Таблица 38 - Экспрессия VEGFr1 в плаценте исследуемых групп ($M\pm m$)

Экспрессия VEGF-R1		Основная группа (ЭКО) (n=98), %	Подгруппа 1 (n=48), %	Подгруппа 2 (n=50), %	Контрольная группа (n=35), %
Ворсинчатый трофобласт	Выраженная	$13,9\pm 3^*$	$13\pm 3,2$	$14,7\pm 2,9$	$33,8\pm 4,4$
	Умеренная	$33,9\pm 3,9$	$29,4\pm 3,6$	$38,4\pm 4,2$	$44\pm 4,6$
	Слабая	$18,1\pm 2,4^*$	$20\pm 2,4$	$16,3\pm 2,5$	$7,3\pm 2,1$
Строма ворсин	Выраженная	$3,4\pm 0,9$	$1,8\pm 0,6$	$4,9\pm 1,2$	$6,9\pm 1,4$
	Умеренная	$24,7\pm 3,4$	$19,4\pm 2,7$	$29,9\pm 4$	$37,2\pm 3,5$
	Слабая	$10,5\pm 1,2$	$10,1\pm 1$	$10,8\pm 1,3$	$8,9\pm 1,7$
Клетки эндотелия	Выраженная	$2,6\pm 0,6$	$2,4\pm 0,3$	$2,7\pm 0,8$	$2,1\pm 1$
	Умеренная	$24,1\pm 3,9$	$22,3\pm 3,3$	$25,8\pm 4,4$	$29,5\pm 4,1$
	Слабая	$10,2\pm 1,4$	$9,6\pm 1,4$	$10,7\pm 1,4$	$7,5\pm 2,3$

Примечание: * различия достоверны между основной и контрольной группами, $p < 0,05$

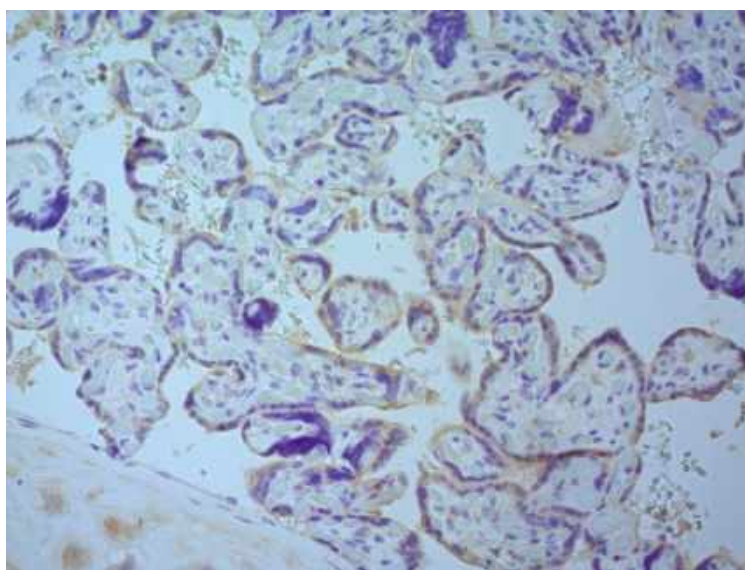


Рисунок 22 - Слабая экспрессия VEGFr1 в плаценте у пациенток основной группы (окраска стандартными антителами, увеличение $\times 200$)

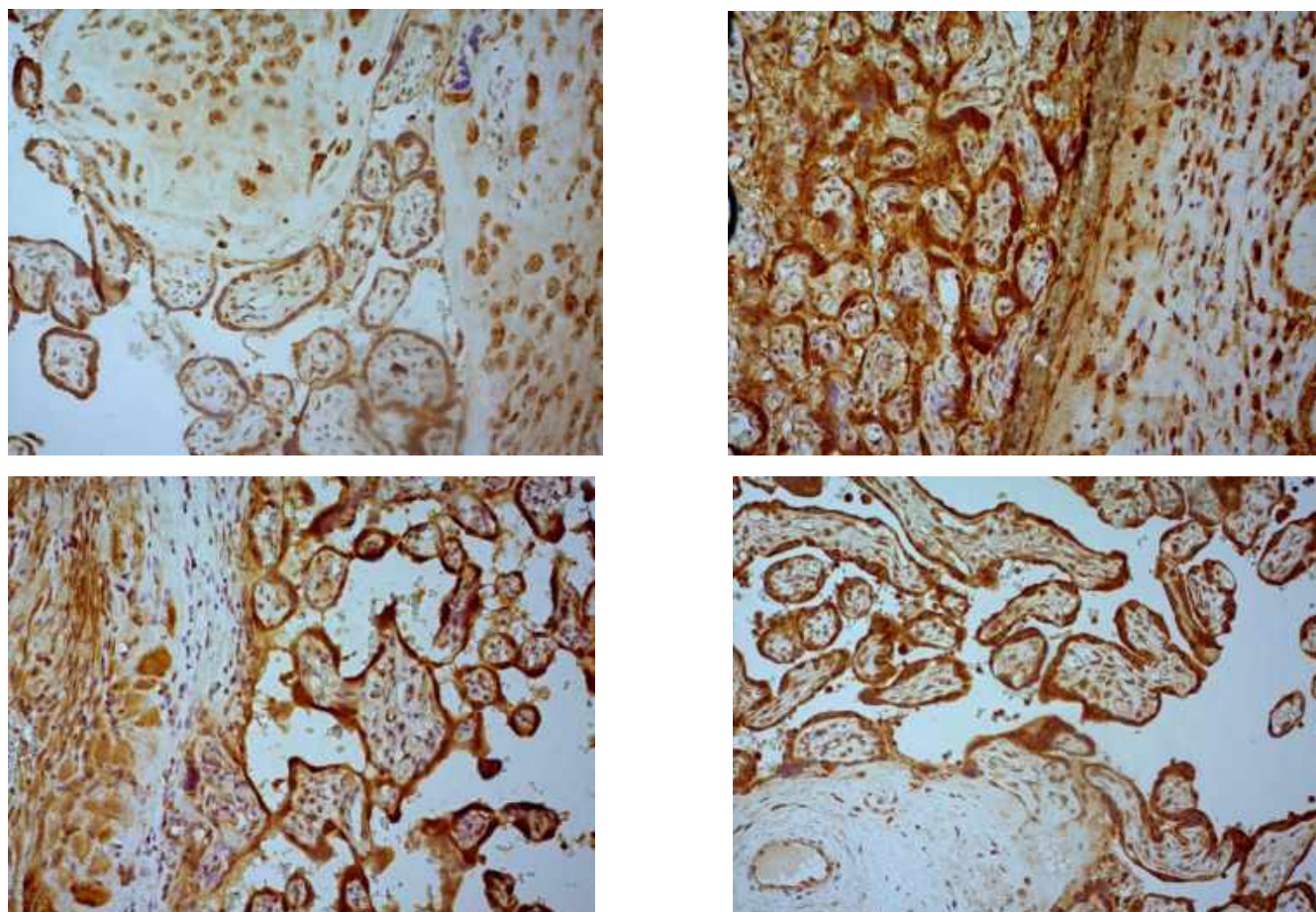


Рисунок 23 - Выраженная экспрессия VEGFr1 в плаценте у пациенток контрольной группы (окраска стандартными антителами, увеличение $\times 200$)

При анализе экспрессии Аннексина V в микропрепаратах установлено, что выраженная и умеренная экспрессия достоверно чаще встречалась в группе со спонтанно наступившей беременностью по сравнению с группой после ЭКО, как в клетках ворсинчатого трофобласта ($89 \pm 2,6\%$ против $41,3 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$), так и в строме ворсин ($53,7 \pm 4,2\%$ против $37,5 \pm 2,8\%$ $p < 0,05$). Напротив, слабая экспрессия Аннексина V в клетках ворсинчатого трофобласта достоверно чаще встречалась в основной группе: $16,2 \pm 2,1\%$, против $0,5 \pm 0,1\%$ в группе контроля ($p < 0,05$) (таблица 39). Также выявлены достоверные отличия в уровне экспрессии Аннексина V в клетках эндотелия. Более выраженный уровень экспрессии отмечался в контрольной группе и составил $10,2 \pm 1,6\%$, против $1,8 \pm 0,4\%$ в основной группе ($p < 0,05$) (рисунок 24, 25). Достоверных отличий по подгруппам основной группы получено не было.

Таблица 39 - Экспрессия Аннексина V в плаценте исследуемых групп (M±m)

Экспрессия Аннексина V		Основная группа (ЭКО) (n=98), %	Подгруппа 1 (n=48), %	Подгруппа 2 (n=50), %	Контрольная группа (n=35), %
Ворсинчатый трофобласт	Выраженная	41,3±4,5*	37,4±4,5	45,1±4,5	89±2,6
	Умеренная	34,4±3,1*	32,6±3	36,2±3,2	9,7±2,5
	Слабая	16,2±2,1*	17,7±2,1	14,7±2,1	0,5±0,1
Строма ворсин	Выраженная	12±1,6	7,4±1,1	16,6±2	11,8±2,5
	Умеренная	37,5±2,8*	39,3±2,8	35,6±2,7	53,7±4,2
	Слабая	24,7±1,9*	24,6±1,8	24,8±1,9	14,6±2,3
Клетки эндотелия	Выраженная	1,8±0,4*	1,2±0,3	2,4±0,5	10,2±1,6
	Умеренная	34,4±2,3	31,8±2,1	37±2,4	41,5±4,1
	Слабая	25,4±1,9	23,8±2	27±1,8	18,3±2,9

Примечание: * различия достоверны между основной и контрольной группами, p<0,05

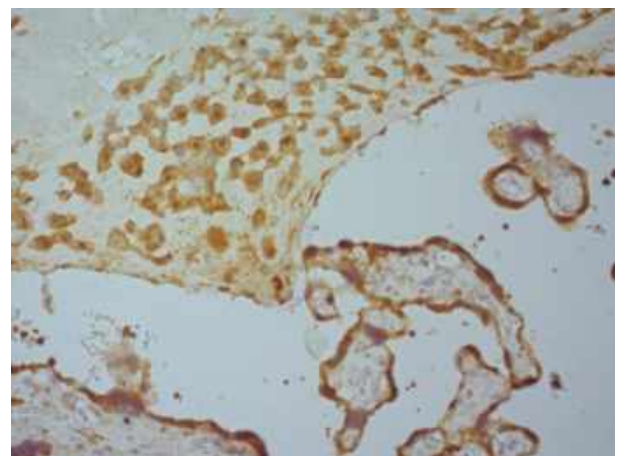
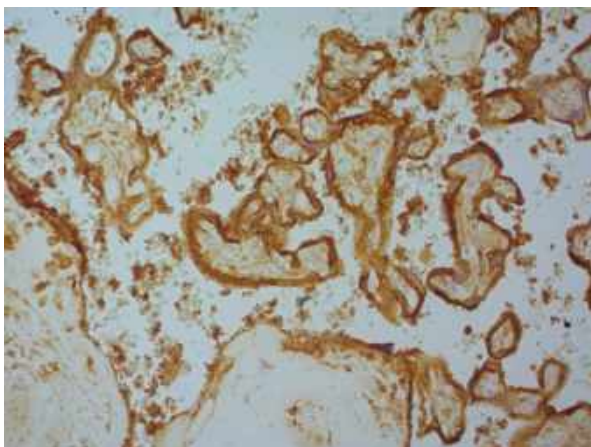
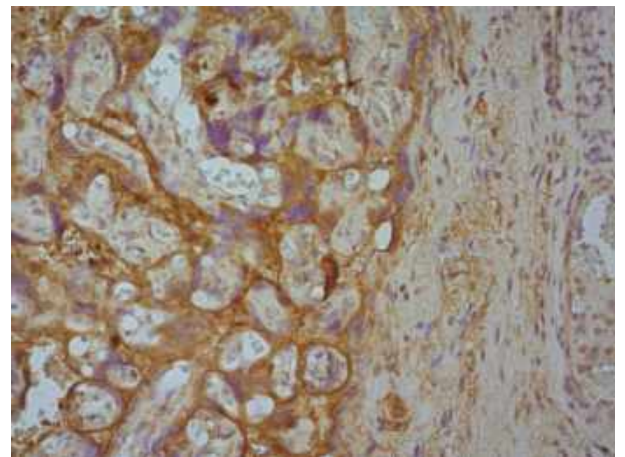
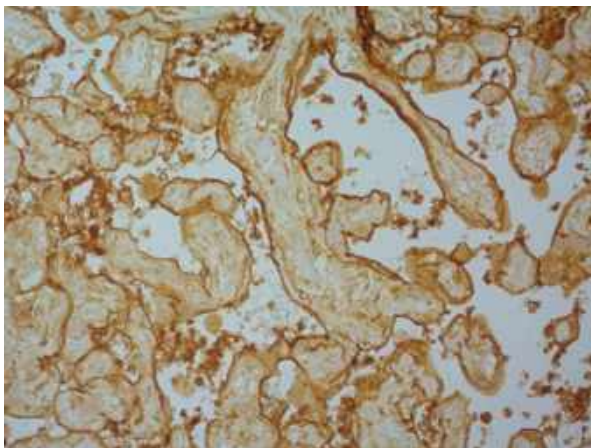


Рисунок 24 - Выраженная экспрессия Аннексина V в плаценте у пациенток контрольной группы (окраска стандартными антителами, увеличение ×200)

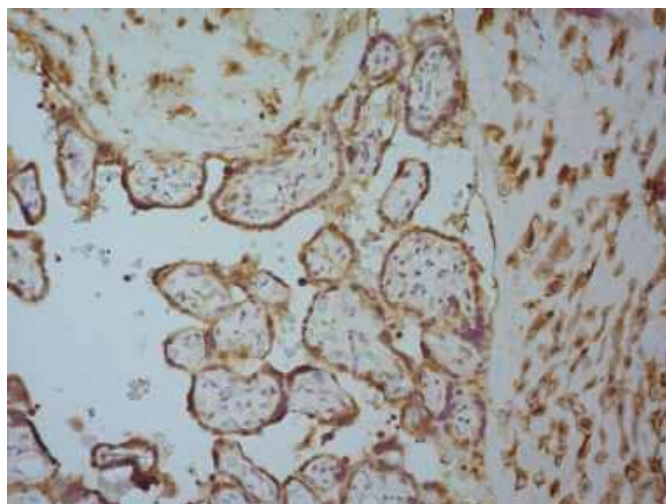


Рисунок 25 - Слабая экспрессия Аннексина V в плаценте у пациенток основной группы (окраска стандартными антителами, увеличение $\times 200$)

Таким образом, проведенное морфологическое и иммуногистохимическое исследование плацентарной ткани у пациенток исследуемых групп позволило выявить достоверные изменения в степени созревания ворсин (преобладание промежуточных ворсин) у пациенток основной группы. Чаще регистрировались компенсаторно-приспособительные процессы, формирование ФПН, очаговые нарушения ветвления ворсин, дистрофические и воспалительные изменения. Результаты исследования показали статистическую значимость и в уровне экспрессии VEGFr1 и Аннексина V. Слабая экспрессия данных маркеров выявлена в клетках ворсинчатого трофобласта и строме ворсин в основной группе, что подтверждает данные морфологического исследования о неполноценности строения ворсинчатого дерева и формирование ФПН в группе после ПЭ в программах ЭКО.

Материалы главы 5 опубликованы в следующих работах

1. Шумовская, В.В. Беременность и роды после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская. Н.В. Путилова // Лечение и профилактика. – 2019. № - 2. С. 16-21.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесплодие является распространенной проблемой среди пар репродуктивного возраста. У каждой шестой пары наблюдается бесплодие, по крайней мере, один раз в течение их репродуктивной жизни, и примерно 10% пар во всем мире являются бесплодными [51, 89, 58, 149]. От 1 до 5% детей в промышленно развитых странах рождаются после применения методов ВРТ [128].

Таким образом, несмотря на большие успехи, достигнутые в области развития методов ВРТ, до сегодняшнего дня не существует единой общепринятой теории патогенеза формирования патологии фетоплацентарного комплекса у пациенток после переноса эмбрионов в программах ЭКО. В связи с этим разработка новейших методов прогноза развития осложнений гестации у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и после криопереноса представляет собой наиболее перспективное направление современного акушерства.

Согласно литературным данным, беременности, наступившие в результате ВРТ, относят к группе высокого риска по формированию осложненного течения беременности [3, 40, 83, 114, 163]. Наше исследование подтверждает эти данные: у пациенток после ПЭ в программах ЭКО угроза прерывания беременности в ранних сроках достоверно чаще встречалась по сравнению со спонтанно наступившей, и составляла 55%.

Вторым по частоте осложнением беременности была ФПН, на долю которой во II триместре пришлось 24,5% всех случаев ПЭ, а в III триместре 29,6%. Стоит отметить, что ФПН в 2 раза чаще регистрировалась у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле ЭКО по сравнению с криопереносом.

Более раннее начало развития ФПН регистрировалось также у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле и характеризовалось как задержкой роста плода, так и/или НМПК. По данным литературы, частота формирования ФПН варьирует от 25-45% всех осложнений беременности, а у пациенток в программах ЭКО данное осложнение достигает 50-70% [10, 19].

В исследовании, проведенном Johnson et al. частота развития осложненного течения беременности в виде формирования ФПН, ПОНРП и антенатальной гибели плода в группе после переноса эмбрионов в стимулированном цикле была статистически выше по сравнению с группой после переноса РЭ. Также авторами предположена связь стимуляции овуляции и патологии гестационного периода, основываясь на исследовании пика эстрадиола у данной категории пациенток [168]. Другие исследования рассматривали каждое осложнение беременности отдельно, независимо от программы ЭКО [113, 136].

Известно, что гиперкоагуляционные нарушения в системе мать-плацента-плод играют ведущую роль в формировании фетоплацентарного комплекса [45]. Основные изменения в системе свертывания крови, происходящие в результате стимуляции овуляции, приводят к увеличению прокоагулянтной и снижению антикоагулянтной активности [54, 103, 104, 184].

В нашем исследовании также гиперкоагуляция достоверно чаще встречалась и сохранялась на протяжении всей беременности у пациенток после ПЭ в программах ЭКО: определялись маркеры повышенного внутрисосудистого свертывания крови, активация внутреннего и внешнего путей и повышение общего свертывающего потенциала крови. Однако развитие гиперкоагуляционных нарушений в подгруппе после ПЭ в стимулированном цикле формировалось в 2 раза чаще по сравнению с подгруппой после переноса витрифицированных эмбрионов.

Исследование, проведенное Balandina A.N. et al., также сообщает о наличии корреляции между состоянием системы свертывания крови у женщин и исходами ЭКО, в особенности на фоне проводимой стимуляции овуляции [54].

В проведенном нами исследовании, всем пациенткам при выявлении гиперкоагуляционных нарушений было начато лечение НМГ. По данным многих авторов, женщинам, вступающим в программу ЭКО, назначаются профилактические дозы НМГ [54, 59, 63, 67, 126, 177]. Эта практика противоречит международным рекомендациям, но все же реализуется в ряде стран, в том числе и в России.

Нами, также как и в современной литературе, отмечен вклад терапии НМГ в улучшение перинатальных исходов. Проведенное ранее рандомизированное исследование Ata B. et al. среди 150 женщин с предыдущими неудачами ЭКО, получавшими профилактические дозы НМГ, показало высокий удельный вес показателей живорождения у данной категории пациенток, по сравнению с группой, где подобная терапия не проводилась [63].

В другом исследовании участвовали пациентки с тромбофилией и установлено, что показатели эффективности ВРТ при назначении НМГ у этой категории больных значительно выше [176].

В исследовании, проведенном Момот А.П. и др. доказана эффективность гепаринотерапии у пациенток, вступающих в программу ЭКО, способствующей снижению числа случаев неблагоприятных исходов у данной категории женщин на 33%, а при комбинировании с вазокомпрессией в случае сочетанных нарушений гемостаза – более 50% [21].

Проведенный в нашем исследовании анализ генетической предрасположенности патологии системы гемостаза позволил установить ассоциацию сочетанного полиморфизма гена рецептора тромбоцитов (*ITGA2: 807 C>T*) и XIII фактора свертывания крови (*FXIII: 103 G>T*), а также фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF-A: 2578 C>A*) у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле, обладающих аддитивным действием, что отражено в трехлокусной модели, характеризующейся 90%-ной воспроизводимостью и 73%-ной точностью предсказания.

Полученные данные соотносятся с исследованием, проведенным Agacis N. et al., в котором определен вклад множественных полиморфизмов генов

тромбофилии на исход программ ВРТ [176]. Однако Di Nisio et al. сообщают об отсутствии статистически значимых межгенных взаимодействий с исходами ЭКО [86].

Результаты настоящего исследования сопоставимы с данными М. Vidyadhari et al. Авторами изучена генетическая роль полиморфизмов гена *VEGF-A*: 2578 C>A, показано, что трансверсия аллеля А вместо аллеля С в промоторной области -2578 снижет экспрессию *VEGF-A* в первом триместре беременности и способствует невынашиванию и угрозе прерывания беременности [61].

Отсутствие достоверных отличий в нашем исследовании при анализе роли межгенных взаимодействий в формировании патологии системы гемостаза у пациенток в группе после криопереноса подтверждают и другие авторы, которые сообщают об отсутствии существенного влияния множественных тромбофилических однонуклеотидных полиморфизмов на исходы программ ВРТ. Однако в данных исследованиях отсутствует градация групп исходя из протокола ЭКО [86, 135].

При изучении особенностей родоразрешения в нашем исследовании было выявлено, что частота преждевременных родов у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле была достоверно выше и составила 6,1%, в отличие от пациенток после переноса витрифицированных эмбрионов и со спонтанно наступившей беременностью, где отсутствовало данное осложнение.

Проведенный метаанализ Pandey S. et al., включающий 22 исследования, обнаружил высокий риск преждевременных родов у пациенток после ЭКО [140]. Аналогичное эстонское проспективное когортное исследование, в котором сравнивались акушерские и перинатальные исходы у 1260 женщин, забеременевших в результате ЭКО, показало высокий удельный вес преждевременных родов у данной категории пациенток 2.19 (95% CI 1.59 – 3.02) [50].

В австралийском исследовании описан высокий риск преждевременных родов у пациенток после ПЭ в стимулированном цикле по сравнению с

криопереносом [156]. Ряд авторов считает, что перенос РЭ может снизить частоту преждевременных родов и значительно улучшить перинатальные исходы [69, 76, 77, 129].

В проведенном нами исследовании основным методом родоразрешения пациенток в программах ЭКО была операция кесарево сечение, как и у других авторов, так как данная категория пациентов отнесена к группе высокого риска и требует индивидуального подхода к ведению беременности и родоразрешению [113].

В приведенном нами морфологическом и иммуногистохимическом анализе плацентарной ткани у пациенток после ПЭ в программах ЭКО отмечена слабая экспрессия уровня проангиогенных факторов (VEGFr1 и Аннексин V), обусловленная неполноценностью строения ворсинчатого дерева и формированием ФПН. Считаем, что отсутствие достоверных различий среди пациенток после ПЭ в стимулированном цикле и криопереноса обусловлено ранним назначением НМГ, так как в литературе описана роль данной терапии в улучшении рецептивности эндометрия, а, следовательно, и эффективности программ ВРТ [177].

Подобные данные о нарушении функциональной активности сосудистого русла в плаценте после ВРТ были получены в работе Сосниной А.К. [38].

Проведенное исследование и полученные результаты позволили разработать алгоритм ведения беременности у пациенток в программах ЭКО на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса путем проведения молекулярно-генетического исследования гена фактора роста эндотелия сосудов и исследования системы гемостаза (рисунок 26).

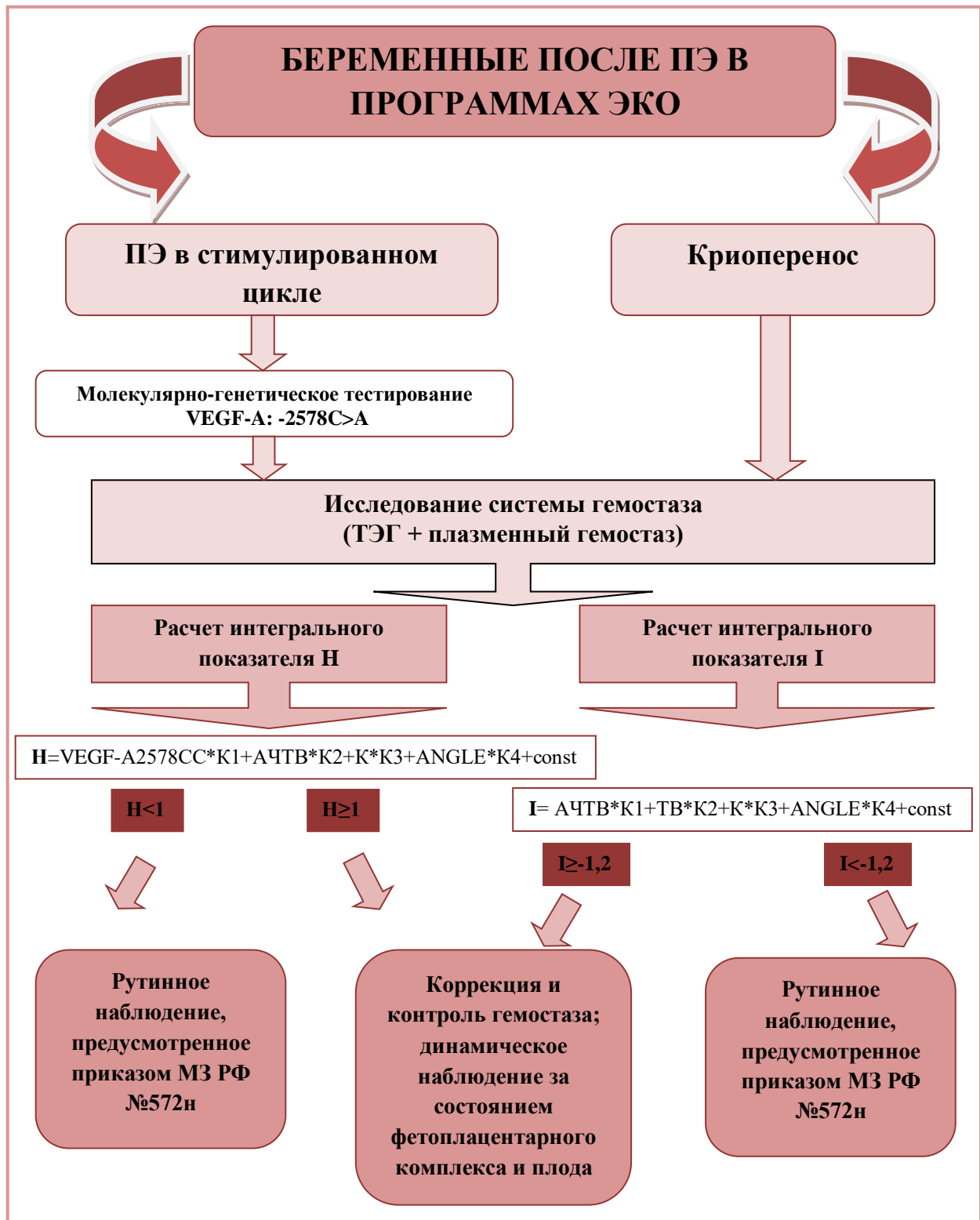


Рисунок 26 – Алгоритм ведения беременности у пациенток в программах ЭКО на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса

Согласно предложенному алгоритму при значении $H \geq 1$ и $I \geq -1,2$ прогнозируют высокий риск гиперкоагуляционных осложнений гестации во время беременности после ПЭ в программах ЭКО, что требует коррекцию и контроль гемостаза, динамическое наблюдение за состоянием фетоплацентарного комплекса и плода.

Если значение $H < 1$ и $I < -1,2$, прогнозируют низкий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса эмбрионов в программах ЭКО, требуется обычное динамическое наблюдение за течением беременности, предусмотренное приказом Министерства здравоохранения РФ №572н.

Разработанный на основе проведенного исследования алгоритм ведения беременности у пациенток в программах ЭКО является инновационным диагностическим методом, позволяющим на основе выявления патологических полиморфизмов гена сосудистого эндотелиального фактора в сопряжении с нарушениями системы гемостаза спрогнозировать патологию фетоплацентарного комплекса как на ранних сроках беременности, так и на прегравидарном этапе.

Перспективами дальнейшей разработки темы является продолжение поиска генетических предикторов развития патологии фетоплацентарного комплекса у пациенток после переноса эмбрионов в программах ЭКО. Дифференцированный подход к выбору протокола ЭКО и прогнозирование патологии фетоплацентарного комплекса позволит снизить перинатальную заболеваемость и улучшить показатели эффективности ВРТ.

ВЫВОДЫ

1. Перенос эмбрионов в стимулированном цикле чаще проводится у пациенток с бесплодием трубного происхождения, тогда как криоперенос осуществляется у пациенток с бесплодием, связанным с отсутствием овуляции. Течение беременности с одинаковой частотой осложняется угрозой прерывания с ранних сроков при различных вариантах переноса эмбриона, тогда как формирование фетоплацентарной недостаточности после переноса эмбрионов в стимулированном цикле встречается в 2 раза чаще по сравнению с криопереносом и дебютирует раньше, начиная со II триместра, что реализуется в более высокий удельный вес рождения недоношенных детей.
2. У пациенток после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения отмечена достоверная активация гемокоагуляции как по внутреннему, так и по внешнему путям, и повышение общего свертывающего потенциала крови после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения. Слабая экспрессия проангиогенных факторов (VEGFr1 и Аннексин V) в плацентарной ткани у этой категории больных обуславливает неполноценность строения ворсинчатого дерева и формирование фетоплацентарной недостаточности.
3. Гиперкоагуляционные осложнения у женщин после переноса эмбрионов в стимулированном цикле ассоциированы с сочетанным полиморфизмом гена рецептора тромбоцитов (*ITGA2: 807 C>T*) и XIII фактора свертывания крови (*FXIII: 103 G>T*), а также фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF-A: 2578 C>A*), обладающих аддитивным действием, что отражено в трехлокусной модели, характеризующейся 90%-ной воспроизводимостью и 73%-ной точностью предсказания.

4. Анализ распределения аллелей и генотипов по изученным генам в группе пациенток после криопереноса показал отличие только по полиморфизму *ITGA2: 807 C>T*, влияние которого на патологию выражено незначительно, так как значимых ассоциаций генотипов по этому локусу с формированием гиперкоагуляции выявлено не было.
5. Проведенное исследование позволило выявить наиболее значимые критерии формирования патологии фетоплацентарного комплекса и разработать 2 правила прогноза осложнений гестации у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса, имеющие высокую степень информативности. На основании прогностических правил разработан алгоритм ведения беременности у данной категории пациенток, направленный на улучшение перинатальных исходов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем пациенткам на этапе подготовки к экстракорпоральному оплодотворению необходимо проводить молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов генов тромбофилии и фактора роста эндотелия сосуда, а также исследование плазменного звена гемостаза при помощи клоттинговых тестов (активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время) и методом тромбоэластографии с изучением основных параметров (время образования сгустка – К и скорость роста фибриновой сети - ANGLE).
2. После молекулярно-генетического типирования женщин и исследования системы гемостаза необходимо определить степень риска формирования осложненного течения беременности с использованием решающих правил прогноза и прогностических индексов «Н» и «I».
3. Всем беременным, высокого риска формирования патологии фетоплацентарного комплекса после переноса эмбрионов в стимулированном цикле ($N \geq 1$) и после криопереноса ($I \geq -1,2$), необходимо провести коррекцию и контроль гемостаза, динамическое наблюдение за состоянием фетоплацентарного комплекса и плода.
4. Если значение $N < 1$ и $I < -1,2$, прогнозируют низкий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения, требуется динамическое наблюдение за течением беременности, предусмотренное приказом Министерства здравоохранения РФ №572н.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
- ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
- ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
- ЗРП – задержка роста плода
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- МНО - международное нормализованное отношение
- НМГ – низкомолекулярные гепарины
- ОМС – обязательное медицинское страхование
- ПОНРП – преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты
- ПЭ – перенос эмбрионов
- РАРЧ - Российская Ассоциация Репродукции Человека
- РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы
- РЭ – размороженные эмбрионы
- СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников
- ССС – сердечно-сосудистая система
- ТВ - тромбиновое время
- ФГ - уровень фибриногена
- ФПН – фетоплацентарная недостаточность
- ХФПН – хроническая фетоплацентарная недостаточность
- ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение
- ANGLE - скорость роста фибриновой
- К - время образования сгустка
- КИ - коагуляционный индекс
- LY30 – лизис сгустка
- МА - максимальная амплитуда
- Р - время реакции
- VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ангиогенные ростовые факторы и патогенез преэклампсии / Н.В. Башмакова, П.Б. Цывьян, Г.Н. Чистякова и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2017. - №5. – С.7-12.
2. Антитела к аннексину V у женщин с привычным невынашиванием беременности / С.В. Чепанов, Т.Н. Шляхтенко, М.С. Зайнулина и др. // Акушерство и гинекология. – 2014. - № 7. - С. 29-32.
3. Бакиров, Б.А. Особенности системы гемостаза у беременных с осложненным акушерским анамнезом / Б.А. Бакиров, И.В. Сахаутдинова, А.Д. Марон // Креативная хирургия и онкология. - 2018. - №2. – С. 125-129.
4. Беременность высокого риска. Под ред. АД. Макацарии, Ф.А. Червенака, В.О. Бицадзе. М. 2015. 920с.
5. Бузян, Л.О. Беременность и роды у женщины с преэклампсией в анамнезе и гипергомоцистеинемией на фоне применения бемипарина в сочетании с низкими дозами аспирина / Л.О. Бузян, Г.Г. Кетова, В.Ф. Долгушина // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2015. - №3. - С. 35-39.
6. Виноградова, Д. Правовое регулирование вспомогательных репродуктивных технологий в Российской Федерации /Д. Виноградова // Вести научных достижений. – 2019. №4. – С. 29-31.
7. Газиева, И.А. Предикторная значимость показателей функционального состояния эндотелия и регуляции ангиогенеза в первом триместре беременности в развитии плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь // И.А. Газиева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. - №2. – с. 14.

8. Генетические причины тромбофилии / Л.А. Озолиня, С.Б. Керчелаева, И.А. Лапина и др. // Венозные тромбоэмболические осложнения в акушерстве и гинекологии. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - С. 256-320.
9. Генодиагностика тромбофилических состояний у женщин репродуктивного возраста / Д.М. Мункоева, Л.И. Колесникова, Л.В. Сутурина и др. // Российский медицинский журнал. - 2015. - № 1. – С. 45-50.
10. Гриневич, Т.Н. Прогнозирование вероятности гиперкоагуляционного состояния во время беременности путем анализа генетического статуса женщин с привычным невынашиванием беременности / Т.Н. Гриневич, С.А. Ляликов, Т.Л. Степура // Журнал ГрГМУ. - 2016. - №4 – С. 50-54.
11. Иакашвили, С.Н. Особенности течения и исход одноплодной беременности, наступившей после экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона, в зависимости от фактора бесплодия [Электронный ресурс] / С.Н. Иакашвили, П.М. Самчук // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 3.
12. Иванец, Т.Ю. Референсные интервалы для гемостазиологических лабораторных тестов в динамике физиологической беременности / Т.Ю. Иванец, М.А. Виноградов, Н.В. Долгушина // Акушерство и гинекология. – 2016. - № 9. - С. 50-59.
13. Исследование генов системы гемостаза у беременных в европейской популяции / Д.П. Шостак, А.И. Попова, В.Е. Патрушева и др. //Сибирское медицинское обозрение. - 2018. - № 2.- С. 5-12.
14. Капралова, А.Е. Проблемы законодательного регулирования вспомогательных репродуктивных технологий [Текст] // Актуальные проблемы права: материалы VI Междунар. науч. конф. (г. Москва, декабрь 2017 г.). — М.: Буки-Веди, 2017. — С. 62-65.
15. Кешишян, Е.С. Состояние здоровья и развития детей, рожденных после экстракорпорального оплодотворения / Е.С. Кешишян, А.Д. Царегородцев, М.И. Зиборова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. - №5. – С. 15-25.

16. Клинико-генетические параллели формирования истмико-цервикальной недостаточности при одноплодной беременности, наступившей в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий / Г.Б. Мальгина, А.Ф. Фассахова, Т.Б. Третьякова и др. // Проблемы репродукции. – 2018. - №3. – С. 74-80.
17. Клинический протокол «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://www.consultant.ru>, свободный (дата обращения : 15.03.2020).
18. Коган, И.Ю. Протоколы стимуляции яичников в циклах ЭКО / И.Ю. Коган, Е.А. Лесик, А.М. Гзгзян - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – С. 160.
19. Кузнецов, В.М. Клиническое значение анамнестических факторов и полиморфизма гена VEGF в прогнозировании преэклампсии: канд. ... мед. наук. – Москва, 2018. – 111с.
20. Липницкая, А.В. Особенности течения беременности, родов и перинатальные исходы у женщин после экстракорпорального оплодотворения [Текст] / А.В. Липницкая, В.А. Прохоцкая // Новые задачи современной медицины: материалы IV Междунар. науч. конф. (г. Санкт-Петербург, декабрь 2016г.). – СПб.: Свое издательство, 2016. – С. 37-40.
21. Межгенные взаимодействия в формировании гемостазиологических расстройств при беременности / Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова, Л.А. Пестряева и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2015. - № 3.- С. 46-51.
22. Момот, А.П. Изменения системы гемостаза в цикле ЭКО и их влияние на эффективность процедуры / А.П. Момот, И.В. Молчанова, Л.П. Цывкина // Бюллетень медицинской науки. – 2017. - №4. – С. 77-81.
23. Мурашко, А.В. Антикоагулянты в акушерстве / А.В. Мурашко // Медицинский Совет. - 2018. -№7. – С. 140-145.
24. Мурашко, А.В. Гемостазиологические показатели у беременных с артериальной гипертензией и синдромом задержки развития плода / А.В. Мурашко, М.С. Симонова, А.Г. Горюнова // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2018. -№1. – С. 9-11.

25. Нефедова, Н.А. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе / Н.А. Нефедова, С.Ю. Давыдова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - №3. – 14с.
26. Петров, Ю.А. Клинические особенности течения беременности, родов и послеродового периода у первородящих повторнобеременных женщин / Ю.А. Петров. Т.Ю. Байкулова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. - №8. – С. 719–723.
27. Плацентарная и кардиоплацентарная недостаточность: современные методы функциональной диагностики патологии плода / Л.Д. Белоцерковцева, Л.В. Коваленко, А.Э. Каспарова и др.// Вестник СурГУ. Медицина. - 2016. - № 2. - С. 17-23.
28. Полиморфизм генов системы гемостаза у женщин с угрожающими преждевременными родами / А.И. Малышкина, И.Н. Фетисова, Ю.Н. и др.// Акушерство, гинекология и репродукция. – 2018. - №1. – С. 23-33.
29. Причины акушерских осложнений у пациенток после вспомогательных репродуктивных технологий / О.Н. Аржанова, Ю.М. Пайкачева, А.В. Рулева и др. // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017.- № 3. – С. 25-33.
30. Прогностическая значимость антител к аннексину-5 в развитии осложнений беременности и родов / А.А. Тамразян, О.В. Макаров, С.Б. Керчелаева и др. // Вестник РУДН. Серия: Медицина.- 2011. - № 6. – С. 366 – 372.
31. Прокопенко, В.М. Применение протеомного анализа в акушерстве (первые результаты исследований) / В.М. Прокопенко // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2016. - №16. – С. 28-32.
32. Радзинский, В.Е. Патология пуповины / В.Е. Радзинский, Ч.Г. Гагаев. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 95с.
33. Регистр ВРТ. Отчет за 2018г. Российская Ассоциация Репродукции Человека: [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://www.rahr.ru>, свободный (дата обращения : 15.03.2020).

34. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2015г / В.С. Корсак, А.А. Смирнова, О.В. Шурыгина // Проблемы репродукции. – 2017. - № 5. – С. 8-22.
35. Репродуктивные и перинатальные исходы применения криотехнологий в программах экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, И.В. Данькова и др.// Проблемы репродукции. – 2019. №3. С. 82-90.
36. Роль тромбоцитов в реализации репродуктивной функции у женщин // А.Г. Ящук, А.В. Масленников, Л.А. Даутова и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. - 2017. - № 4.- С. 20-24.
37. Рудакова, Е.Б. Можно ли помочь пациенткам старшей возрастной группы с реализацией репродуктивной функции в программах ЭКО и ПЭ / Е.Б. Рудакова, Е.А. Федорова, И.В. Сергеева // Медицинский совет. – 2018. - №7. – С. 116-124.
38. Связь между полиморфизмом гена фактора роста эндотелия сосудов и привычным невынашиванием беременности: систематический обзор и метанализ / Я. Сун, М. Чен, Б. Мао и др. // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. - 2018. - № 2. - С. 32-41.
39. Соснина, А.К. Морфофункциональные особенности плацент при беременности, наступившей после применения вспомогательных репродуктивных технологий: дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2017. – 129с.
40. Состояние системы гемостаза во время беременности, наступившей с использованием вспомогательных репродуктивных технологий / В.В. Соболева, Н.С. Трифонова, Л.С. Александров и др. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2017. - № 4. – С. 64-70.
41. Стулева, Н.С. Беременность и роды после экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона у женщины с многократными неудачами ЭКО в анамнезе и с сочетанной формой тромбофилии (циркуляцией антифосфолипидных антител и генетической тромбофилией) /

- Н.С. Стулева // Акушерство, гинекология, репродукция. – 2015. - №4. – С. 31-35.
42. Тапильская, Н.И. Ведение беременности ранних сроков, наступившей в результате протоколов ВРТ / Н.И. Тапильская, И.Ю. Коган, А.М. Гзгзян - Санкт-Петербург: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – С. 144.
43. Тюмина, О.В. Здоровье женщин позднего репродуктивного возраста с бесплодием: монография / О.В. Тюмина, В.А. Мельников. – М.: Издательство «Академия естествознания», 2016. – 210 с.
44. Факторы риска развития плацентарных нарушений и исходы беременности у пациенток с клиническими признаками недостаточности плаценты. Патоморфологические особенности плаценты / Л.Д. Белоцерковцева, А.Э. Каспарова, Л.В. Коваленко и др. // Вестник СурГУ. Медицина. - 2015. - № 1. - С. 12-18.
45. Федорова, М.В. Иммуногистохимические различия плацент при пролонгированной и истинно перенесенной беременности / М.В. Федорова, Т.Л. Смирнова // Вестник Чувашского университета. - 2013. - №3. – С.560-563.
46. Физиология и патология гемостаза: учебное пособие / под ред. Н.И. Стуклова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016. -112с.- (Б-ка врача-специалиста).
47. Хроническая плацентарная недостаточность: факторы риска декомпенсации. Достижения сегодня – залог будущего развития: научный сборник / Ю.В. Тезиков, Т.С. Белоконева, С.А. Рябова и др. – Самара: 2016. - С. 304-309.
48. A fresh look at the freeze-all protocol: a SWOT analysis / C. Blockeel, P Drakopoulos, S Santos-Ribeiro et al. // Hum Reprod. – 2016. - Vol. 31. – P. 491–497.
49. A new perspective on the risk of hypercoagulopathy in ovarian hyperstimulation syndrome using thromboelastography / E. Zohav, B. Almog, A. Cohen et al. // Reprod. Sci.- 2017. - Vol.24, № 12. - P. 1600-1606.

50. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment / F.M. Ubaldi, D. Cimadomo, A. Vaiarelli et al. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2019. – Vol. 10. – P. 94.
51. Adverse Obstetric Outcomes Associated With In Vitro Fertilization in Singleton Pregnancies / J. Qin, X. Sheng, D. Wu et al. // *Reprod Sci*. – 2017. – Vol. 24, № 4. – P. 598-608.
52. Aghajanova, L. Obstetrics and gynecology residency and fertility / L.Aghajanova, J.Hoffman, E.Mok-Lin // *Needs. Reprod. Sci*. - 2017. - Vol.24, №3. - P. 428-434.
53. Alansari, L. How to maximize the pregnancy rate with no increase in multiple pregnancy rates following blastocyst embryo transfer? Is blastocyst transfer time the missing ingredient? / L. Alansari, V. Akande // *Middle East. Fertil. Soc. J*. - 2015. - Vol. 20. - P. 241-245.
54. Alterations in genome-wide DNA methylation profiling in first trimester chorionic villi from pregnancies conceived with in vitro fertilization / N.B.G. Xu, J. Cui, E.T. Wang et al. // *Epigenetics*. - 2016. – Vol. 24. – P. 18.
55. An enhanced clot growth rate before in vitro fertilization decreases the probability of pregnancy / A.N. Balandina, E.M. Koltsova, T.A. Teterina et al. // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, № 5. – P. 19.
56. Angiogenic markers in pregnancies conceived through in vitro fertilization / M.S. Lee, D. Cantonwine, S.E. Little et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol*. - 2015.- Vol. 213, № 2. - P. 43-54.
57. Assisted reproductive technology and risk of adverse obstetric outcomes in dichorionic twin pregnancies: a systematic review and meta-analysis / J.B. Qin, H. Wang, X. Sheng et al. // *Fertil Steril*. – 2016. – Vol. 105. P. 1180–1192.
58. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE / O. Gliozheni, H. Strohmer, E. Petrovskaya et al. // *Hum Reprod*.- 2017.- Vol. 32, № 10. - P. 1957–1973.
59. Assisted Reproductive Technology Surveillance – United States, 2015 / S. Sunderam, D.M. Kissin, W.D. Barfield et al. // *MMWR Surveill Summ*. – 2018. – Vol. 67, № 3. – P. 1–28.

60. Association of common thrombophilias and antiphospholipid antibodies with success rate of in vitro fertilization / A. Steinvil, R. Raz, S. Berliner et al. // *Thromb Haemost.* – 2012. – Vol. 108, № 6. – P. 1192–7.
61. Association of genetic polymorphism of vascular endothelial growth factor in the etiology of recurrent pregnancy loss: a triad study / M. Vidyadhari, M. Sujatha, P. Krupa et al. // *J Assist Reprod Genet.* - 2019. – Vol. 36. - № 5. – P. 979-988.
62. Association of genetic polymorphism of vascular endothelial growth factor in the etiology of recurrent pregnancy loss: a triad study / M. Vidyadhari, M. Sujatha, P. Krupa et al. // *J Assist Reprod Genet.* – 2019. – Vol. 36. N. 5. – P. 979-988.
63. Association of number of retrieved oocytes with live birth rate and birth weight: an analysis of 231,815 cycles of in vitro fertilization / V.L. Baker, M.B. Brown, B. Luke et al. // *Fertil Steril.* - 2015. – Vol. 103. – P. 931–938.
64. Ata, B, Urman B. Thrombophilia and assisted reproduction technology-any detrimental impact or unnecessary overuse / B. Ata, B. Urman // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – Vol. 33, № 10. – P. 1305–1310.
65. Ata, B. A universal freeze all strategy: why it is not warranted / B. Ata, E. Seli // *Curr Opin Obstet Gynecol.* - 2017. – Vol. 29, № 3. – P. 136–145.
66. Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization / S. Sandin, K.G. Nygren, A. Iliadou et al. // *Journal of the American Medical Association.* – 2013. – Vol. 310, № 1. – P. 75—84.
67. Banker, M. The impact of vitrification in artificial reproductive technology programmes / M. Banker, A. Kotdawala, R. Gupta // *Eur Med J.* – 2017. - № 2. – P. 82-89.
68. Bates, S.M. Anticoagulation and in vitro fertilization and ovarian stimulation / S.M. Bates // *Hematol Educ Program.* – 2014. – Vol. – P. 379–386.
69. Berntsen, S. Large for gestational age and macrosomia in singletons born after frozen/thawed embryo transfer (FET) in assisted reproductive technology (ART) / S. Berntsen, A. Pinborg // *Birth Defects Res.* – 2018. – Vol. 110, № 8. - P. 630-643.

70. Bhattacharya, S. Maternal and perinatal outcomes after fresh versus frozen embryo transfer-what is the risk-benefit ratio? / S. Bhattacharya // *Fertil. Steril.* - 2016. - Vol.106, №2. - P. 241–243.
71. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis / J. Wen, J. Jiang, C. Ding et al. // *Fertil Steril.* – 2012. - Vol. 97, № 6. – P. 1331—1337.
72. Bosch, E. The future of cryopreservatoin in assisted reproductive technologies / E. Bosch, M. De Vos, P. Humaidan // *Frontiers in Endocrinology.* – 2020. – Vol. 11, № 67. – P. 1-11.
73. Choux, C. The placenta: phenotypic and epigenetic modifications induced by Assisted Reproductive Technologies throughout pregnancy / C. Choux, V. Carmignac, C. Bruno et al. // *Clinical Epigenetics.* – 2015. – Vol.7, №1. - P.87-107.
74. Clinical and molecular analyses of Beckwith-Wiedemann syndrome: Comparison between spontaneous conception and assisted reproduction techniques / J. Tenorio, V. Romanelli, A. Martin-Trujillo et al. // *American Journal of Medical Genetics Part A.* – 2016. – Vol.170, №10. – P. 2740-2749.
75. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study / Z . Li, Y.A. Wang, W. Ledger et al. // *Hum Reprod.* – 2014. № 29. P. 2794-2801.
76. Clinical outcomes of single versus double blastocyst transfer in fresh and vitrified-warmed cycles / J.H. Eum, J. K. Park, S. Y. Kim SY et al. // *Clin. Exp. Reprod. Med.* - 2016. - Vol. 43, № 3. - P. 164-168.
77. Cobo, A. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. 2011. In: *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]* // A. Cobo, C. Diaz. – 2011. Vol. 96, № 2. P. 277-285.
78. Contribution of cryopreservation to the cumulative live birth rate: a large multicentric cycle-based data analysis from the Italian National / G. Scaravelli,

- P.E. Levi-Setti et al. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. Vol. 36. - № 11. – P. 2287-2295.
79. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos / P. Drakopoulos, C. Blockeel, D. Stoop et al. // *Hum Reprod*. – 2016. – Vol. 31. – P. 370–376.
80. Cryopreservation and its clinical applications / T.H. Jang, S.C. Park, J.H. Yang et al. // *Integrative Medicine Research*. – 2017. № 6. - P. 12-18.
81. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects / A.A. Mandawala, S.C. Harvey, T.K. Roy et al. // *Theriogenology*. – 2016. - № 86. – P. 1637–1644.
82. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges // K.W. Yong, W. K. Wan Safwani, F. Xu et al. // *Biopreserv Biobank*. – 2015. - № 13. - P. 231–239.
83. DNA methylation differences between in vitro- and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clinical epigenetics* / S. Song S, J. Ghosh, M. Mainigi et al. // *Human Molecular Genetics*. – 2015. - № 7. - P. 41.
84. Effect of male body mass index on assisted reproduction treatment outcome: an updated systematic review and metaanalysis / R. Mushtaq, J. Pundir, C. Achilli // *Reprod Biomed Online*. – 2018. Vol. 36, № 4. – P. 459–71.
85. Effect of maternal age on maternal and neonatal outcomes after assisted reproductive technology / A.L. Wennberg, S. Opdahl, C. Bergh et al. // *Fertil Steril*. – 2016. - Vol. 106. – P. 1142–1149.
86. Effects of in vitro fertilization and maternal characteristics on perinatal outcomes: a population-based study using siblings / J. Seggers, M. Pontesilli, A.C. Ravelli et al. // *Fertil Steril*. – 2016. – Vol. 105, № 3. – P. 590–598.
87. Effects of multiple inherited and acquired thrombophilia on outcomes of in-vitro fertilization / M. Di Nisio, A. Ponzano, G.M. Tiboni et al. // *Thromb Res*. - 2018. - Vol.167. – P. 26–31.

88. Elective cryopreservation of all embryos with subsequent cryothaw embryo transfer in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome reduces the risk of adverse obstetric outcomes: a preliminary study / A.N. Imudia, A.O. Awonuga, A.J. et al. // *Fertil Steril.* – 2013. - Vol. 99. - P. 168–73.
89. European IVF-Monitoring Consortium (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) / M.S. Kupka, T. D'Hooghe, A.P. Ferraretti et al // *Hum Reprod.* - 2016. Vol. – 31. N 2. P. 233-248.
90. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). ART Fact Sheet; 2010 [Internet]: www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines
91. Farhang, G.M. The p53 family and VEGF regulation: 'it's complicated'/ M.G. Farhang, S. Goossens, J.J. Haigh // *Cell Cycle.* - 2013. - Vol.12. - P.1331-1332.
92. Freeze-all cycle in reproductive medicine: current perspectives / M. Roque, M. Valle, A. Kostolias et al. // *JBRA Assist Reprod.* – 2017. - Vol. 21. – P. 49–53.
93. Fresh and Frozen-Thawed Embryo Transfer Compared to Natural Conception: Differences in Perinatal Outcome? / S. Spijkers, J. Willem, L. Roel et al. // *Gynecol Obstet Invest.* – 2017. Vol. 82, № 3. – P. 296-303.
94. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis / M. Roque, K. Lattes, S. Serra et al. // *Fertil Steril.* – 2013. – Vol. 99. - P. 156–62.
95. Fresh embryos versus freeze-all embryos—transfer strategies: nuances of a meta-analysis / F.C. Dieamant, C.G. Petersen, A.L. Mauri et al. // *JBRA Assist Reprod.* – 2017, - № 21. – P. 260–272.
96. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes / M. Roque, T. Haahr, S. Geber et al. // *Hum Reprod Update.* – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 2-14.
97. Fresh versus frozen embryo transfer after gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles among high responder women: A randomized, multi-center study / A. Aflatoonian, M. Mansoori-Torshizi, M. Farid Mojtahedi et al. // *Int J Reprod Biomed (Yazd).* – 2018. – Vol. 16, № 1. - P. 9–18.

98. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction / K.M. Wong, M. van Wely, F. Mol et al. // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2017. – Vol. 28, № 3. – P. 64.
99. Fritz, R. Cell signaling in trophoblast-uterine communication / R. Fritz, C. Jain, D.R. Armant // *Int. J. Dev. Biol.*- 2014.- Vol. 58. - P. 261-271.
100. Genetic and hemostasiological predictors of IVF pregnancy / I.V. Dankova, O.A. Melkozerova, T.B. Tretyakova et al. // *Gynecological Endocrinology.* – 2017. – Vol. 33, №1. – P. 32-35.
101. GnRH agonist trigger and LH activity luteal phase support versus hCG trigger and conventional luteal phase support in fresh embryo transfer IVF/ICSI cycles—a systematic PRISMA review and meta-analysis / T. Haahr, M. Roque, S.C. Esteves et al. // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2017. - № 8. – P. 116-124.
102. Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles / V.L. Baker, M.B. Brown, B. Luke et al. // *J. Fertil Steril.* – 2015. – Vol. 104. – P. 1145–1152.
103. Heertum, K. V. Neonatal outcomes following fresh as compared to frozen/thawed embryo transfer in in vitro fertilization / K.V. Heertum, R. Weinerman // *Birth Defects Res.* – 2018. – Vol. 110, № 8. - P. 625-629.
104. Impact of blood hypercoagulability on in vitro fertilization outcomes: a prospective longitudinal observational study / G.T. Gerotziafas. P. Van Dreden, E. Mathieu d'Argent et al. // *Thromb J.* – 2017. - Vol. 15. –P. 9.
105. Impact of elevated peak serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation on the birth weight of term singletons from fresh IVF-ET cycles / N. Pereira, D.E. Reichman, D.E. Goldschlag et al // *Assist Reprod Genet.* – 2015. - Vol. 32, № 4. P. 527–532.
106. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan / O. Ishihara, R. Araki, A. Kuwahara et al. // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 101. – P. 128–133.

107. Impact of single embryo transfer policy on perinatal outcomes in fresh and frozen cycles-analysis of the Japanese Assisted Reproduction Technology registry between 2007 and 2012 / K. Takeshima, S.C. Jwa, H. Saito et al. // *Fertil Steril.* – 2016. - Vol. 105. – P. 337–346.
108. In Vitro fertilization and adverse obstetric and perinatal outcomes / C.S. Sullivan-Pyke, S. Senapati, M.A. Mainig et al. // *Semin Perinatol.* – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 345–353.
109. Increased body mass index associated with increased preterm delivery in frozen embryo transfers / K. Ozgur, H. Bulut, M Berkkanoglu et al. // *J Obstet Gynaecol.* - 2019. – Vol. 39, № 3. – P. 377-383.
110. Increased coagulation index as measured by Thromboelastography during ovarian stimulation for in vitro fertilization: Influence of the final oocyte maturation triggering agent / R. Beck-Fruchter, I. Gavish, S. Baram et al. // *Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* - 2018. - Vol. 227. - P. 26-29.
111. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The Danish National Cohort Study 1995–2006 / A. Pinborg, A. Loft, A.K. Henningsen et al. // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 94, № 4. — P. 1320–1327.
112. Inflammation and thrombophilia in pregnancy complications: implications for risk assessment and clinical management /F. la Farina, V. Raparelli, L. Napoleone et al. // *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets.*- 2016.- Vol.15, № 3.- P. 187-203.
113. Inherited and acquired thrombophilias / M.P. Rambaldi, F. Mecacci, S. Guaschino et al. // *J. Reprod Sci.* – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 167–82.
114. In-vitro fertilization and spontaneous pregnancies: matching outcomes in Douala, Cameroon / T.O. Egbe, G. Sandjon, C. Ourtchingh et al. // *Fertil Res Pract.* – 2016. - №2. – P. 10.
115. Jie, Z. Association of assisted reproductive technology with adverse pregnancy outcomes / Z. Jie, D. Yiling, Y. Ling // *Iran J Reprod Med.* – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 169–180.

116. Johnson, M. Human in vitro fertilisation and developmental biology: a mutually influential / M. Johnson // *Development*. – 2019. – Vol. 146. №17. P. 1-11.
117. Joshi, N. Trends and correlates of good perinatal outcomes in assisted reproductive technology / N. Joshi // *Obstet Gynecol*. – 2012. Vol. 120, № 4. P. 843–851.
118. Karami, M. The association of placenta previa and assisted reproductive techniques: a meta-analysis / M. Karami, E. Jenabi, B. Fereidooni // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2017. - № 18. – C. 5-13.
119. Kissin, D.M. Monitoring health outcomes of assisted reproductive technology / D.M. Kissin, D.J. Jamieson, W.D. Barfield // *N. Engl. J. Med.*- 2014. - Vol. 371, № 1. - P. 91–93.
120. Knofler, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion / M. Knofler // *International Journal of Developmental Biology*. – 2010. – № 54. C. 269–280.
121. Kroener, L. Predisposing Factors to Abnormal First Trimester Placentation and the Impact on Fetal Outcomes / L. Kroener, E.T. Wang, M.D. Pisarska // *Seminars in reproductive medicine*. – 2016. - Vol. 34, № 1. - P. 27–35.
122. Larger First-Trimester Placental Volumetric Parameters Are Associated With Lower Pressure and More Flow-Mediated Vasodilation of the Fetoplacental Vasculature After Delivery // E. Hitzerd, I.F. Reijnders, A.G.M.G.J. Mulders et al // *Front Physiol*. – 2020. - Vol. 11. - P.6.
123. Li, C. Expression of factors involved in the regulation of angiogenesis in the full-term human placenta: Effects of in vitro fertilization / C. Li, Y. Zhang, L. Tang et al. // *Reproductive Biology*. – 2016. – Vol. 16, №2. – P.104-112.
124. Live birth rates and perinatal outcomes when all embryos are frozen compared with conventional fresh and frozen embryo transfer: a cohort study of 337,148 in vitro fertilisation cycles / A.D.A.C. Smith, K. Tilling, D.A. Lawlor et al. // *BMC Med*. – 2019. - Vol. -17, № 1. – P. 202.

125. Live birth rates in the first complete IVF cycle among 20 687 women using a freeze-all strategy / Q. Zhu, Q. Chen, L. Wang et al. // *Hum Reprod.* – 2018. – Vol. 33, №5. – P. 924–929.
126. Long-term outcomes of freeze-all strategy: A retrospective analysis from a single ART center in Japan / Y. Asada, M. Tokoro, M. Sonohara et al. // *Reproductive Medicine and Biology.* – 2019. Vol. 18. – №2. – P. 173-179.
127. Low molecular weight heparins use in pregnancy: a practice survey from Greece and a review of the literature / E. Papadakis, A. Pouliakis, A. Aktypi et al. // *Thromb J.* – 2019. – Vol. 17. – P. 23.
128. Low-Molecular-Weight Heparin for Placenta-Mediated Pregnancy Complications Study Group Meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications / M.A. Rodger, M. Carrier, G. le Gal et al. // *Blood.* – 2014. - Vol. 123. - P. 822–828.
129. Macaluso, M. A public health focus on infertility prevention, detection, and management / M.Macaluso, T.J.Wright-Schnapp, A.Chandra // *Fertility and Sterility.* – 2010. - Vol.93, № 1. - P.16.
130. Maheshwari, A. Obstetric and perinatal outcomes after either fresh or thawed frozen embryo transfer: an analysis of 112,432 singleton pregnancies recorded in the Human Fertilisation and Embryology Authority anonymized dataset / A. Maheshwari, E.A. Raja, S. Bhattacharya // *Fertility and Sterility.* – 2016. - Vol. 106, № 7. – P.1703–1708.
131. Maternal and Live-birth Outcomes of Pregnancies following Assisted Reproductive Technology: A Retrospective Cohort Study / L. Zhu, Y. Zhang, Y. Liu et al. // *Sci Rep.* – 2016. - № 6. – P. 351-341.
132. Matrai, C.E. Absence of distinct immunohistochemical distribution of Annexin A5, C3b, C4d, and C5b-9 in placentas from patients with antiphospholipid antibodies, preeclampsia, and systemic lupus erythematosus / C.E. Matrai, J.H. Rand, R.N. Baergen // *Pediatr Dev Pathol.* – 2019. № - 22. – P. 431-439.

133. Mode of conception does not appear to affect placental volume in the first trimester / S.J. Churchill, E.T. Wang, M. Akhlaghpour M et al. // *Fertil Steril.* – 2017. - Vol. 107, № 6. – P. 1341–1347.
134. Mor, Y.S. Ovarian hyperstimulation syndrome and thrombotic events / Y. S. Mor, J. G. Schenker // *Am J Reprod Immunol.* – 2014. – Vol. 72, № 6. - P. 541–548.
135. Morimoto, Y. Extraordinary clinical success of a single- embryo transfer policy. Wahat comes next / Y. Morimoto // *Fertil Steril.* – 2016. - Vol. 105. – P. 302–303.
136. Multiple thrombophilic single nucleotide polymorphisms lack a significant effect on outcomes in fresh IVF cycles: an analysis of 1717 patients / G. Patounakis, E. Bergh, E. J. Forman et al. // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – Vol. 33. – N 1. – P. 67-73.
137. Natural cycle IVF reduces the risk of low birthweight infants compared with conventional stimulated IVF / W. Mak, L.A. Kondapalli, G. Celia et al. // *Hum Reprod.* – 2016. – Vol. 31, № 4. – P. 789–794.
138. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer / O. Kato, N. Kawasaki, D. Bodri et al // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2012. – Vol. 161. – P. 46–50.
139. Neurodevelopmental Outcomes After Assisted Reproductive Technologies / J. Balayla, O. Sheehy, W.D. Fraser et al. // *Obstet Gynecol.* – 2017. – Vol. 129, № 2. – P. 265–272.
140. NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss / D.I. Sokolov, V.A. Mikhailova, A.O. Agnayeva et al. // *Gynecological endocrinology.* - 2019. N1. P. 5-10.
141. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis / S. Pandey, A. Shetti, M. Hamilton et al. // *Hum Reprod Update.* - 2012. Vol. 18, № 5. P. 485-503.

142. Obstetric outcome and incidence of congenital anomalies in 2351 IVF/ICSI babies / P.E. Levi Setti, M. Moioli, A. Smeraldi et al. // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – Vol. 33, № 6. – P. 711–717.
143. Obstetric outcomes after fresh versus frozen-thawed embryo transfers: A systematic review and meta-analysis / M. Roque M, M. Valle, M. Sampaio et al. // *JBRA Assist Reprod.* – 2018. – Vol. 22, № 3. – P. 253–260.
144. Ombelet, W. Pregnant after assisted reproduction: a risk pregnancy is born! 18-years perinatal outcome results from a population-based registry in Flanders, Belgium / W. Ombelet, G. Martens, L. Bruckers // *Views Vis Obgyn.* - 2016. – Vol. 8, № 4. – P. 193–204.
145. Oocyte cryopreservation for donor egg banking / A. Cobo, J. Remohí, C.C. Chang et al. // *Reproductive Medicine Online.* – 2011. - № 23. – P. 271-273.
146. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance / L. Rienzi, C. Gracia, R. Maggiulli et al. // *Hum Reprod. Update.* - 2017. - Vol. 23, № 2. - P. 139–155.
147. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh vs frozen, following PGS with NGS. A randomized controlled trial / A. Coates, A. Kung, E. Mounts et al. // *Fertil Steril.* – 2017. – Vol. 107. – P. 723–730.
148. Optimum oocyte retrieved and transfer strategy in young women with normal ovarian reserve undergoing a long treatment protocol: a retrospective cohort study / Y.H. Chen, X.H. Xu, Q. Wang et al. // *Reprod Genet.* – 2015. – Vol. 32. – P. 1459–1467.
149. Orvieto, R. Is Embryo Cryopreservation Causing Macrosomia-and What Else / R. Orvieto, M. Kirshenbaum, N. Gleicher // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 19.
150. Ozgur, K. Segmented ART—the new era in ART / K. Ozgur, P. Humaidan, K. Coetzee // *Reprod Biol.* – 2016. - Vol. 16. P. 91–103.
151. Pereira, N. A fresh (er) perspective on frozen embryo transfers / N. Pereira, Z. Rosenwaks // *Fertil. Steril.* -2016. - Vol. 106, № 2. - P. 257–258.

152. Perinatal complications and live-birth outcomes following assisted reproductive technology: a retrospective cohort study / L.L. Lei, Y.L. Lan, S.Y. Wang et al // Chin Med J (Engl). – 2019 - Vol. – 132, № 20. - P. 2408–2416.
153. Perinatal outcome in singletons after modified natural cycle IVF and standard IVF with ovarian stimulation / M. J. Pelinck, M. H. Keizer, A. Hoek et al. // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2010. - Vol. 148. –P. 56–61.
154. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995–2006 / S. Pelkonen, R. Koivunen, M. Gissler et al. // Hum Reprod. – 2010. – Vol. 25. – P. 914–923.
155. Perinatal outcomes among singletons after assisted reproductive technology with single-embryo or double-embryo transfer versus no assisted reproductive technology / A.S. Martin, J. Chang, Y. et al. // Fertil steril. – 2017. - Vol. 107. – P. 954–960.
156. Perinatal outcomes associated with assisted reproductive technology: the Massachusetts Outcomes Study of Assisted Reproductive Technologies (MOSART) / E. Declercq, B. Luke, C. Belanoff et al. // Fertil Steril. – 2015. – Vol. 103. – P. 888–895.
157. Perinatal outcomes by mode of assisted conception and sub-fertility in an Australian data linkage cohort / J.L. Marino JL, V.M. Moore, K.J. Willson et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 1. - P. 10.
158. Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. agematched healthy pregnancies / A. Hoeller, L. Ehrlich, M. Golic et al. // Hypertens Pregnancy. - 2017. - Vol. 36, № 2. - P.151-160.
159. Platelet aggregation in healthy women during normal pregnancy - a longitudinal study / L.R.F. Blomqvist, A.M. Strandell, F. Baghaei et al. // Platelets. - 2018. - Vol. 16. - P. 1-7.
160. Prediction of live birth and cumulative live birth rates in freeze-all-IVF treatment of a general population / K. Ozgur, H. Bulut, M. Berkkanoglu et al. // J Assist Reprod Genet. – 2019. – Vol. 36, № 4. – P. 685–696.

161. Pregnancy outcomes and maternal and perinatal complications of pregnancies following *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection using own oocytes, donor oocytes, and vitrified embryos: A prospective follow-up study / M. Banker, V. Mehta, D. Sorathiya et al. // J Hum Reprod Sci. – 2016. – Vol. 9, № 4. – P. 241–249.
162. Pregnancy outcomes in very advanced maternal age pregnancies: the impact of assisted reproductive technology / S. Jackson, C. Hong, E.T et al. // Fertility and sterility. – 2015. – Vol. 103, № 1. – P. 76–80.
163. Pregnancy, thrombophilia, and the risk of a first venous thrombosis: systematic review and bayesian meta-analysis / F. Croles, N. Kazem, D. Johannes et al. //BMJ. – 2017. - Vol. 359.
164. Recurrent pregnancy loss: evidence-based evaluation, diagnosis and treatment / A. Bashiri et al. // Springer. – 2016. – P. 208.
165. Reproductive technologies and the risk of birth defects. / M. J. Davies, V.M. Moore, K. J. Willson et al. // N Engl J Med. – 2012. - Vol. 366, № 19. - P. 1803—1813.
166. Rifouna, M.S. First trimester trophoblast and placental bed vascular volume measurements in IVF or IVF/ICSI pregnancies / M.S. Rifouna, A.D. Reus, A.H. Koning //Human Reproduction. - 2014. – Vol. 29, № 12. – P. 2644-2649.
167. Risk factors and predicting health disorders in infants born from monocytes after *in vitro*/ L.A. Pykhtina, O.M. Filkina, N.D. Gadzhimuradova et al.// Health risk Analysis. – 2017. - №1. – C. 53-61.
168. Risk of adverse pregnancy and perinatal outcomes after high technology infertility treatment: a comprehensive systematic review / S. Palomba, R. Homburg, S. Santagni et al. Reprod Biol Endocrinol. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P.76.
169. Risk of ischemic placental disease in fresh and frozen embryo transfer cycles / K.M. Johnson, M.R. Hacker, N. Resetkova et al. // Fertil Steril. – 2019. - Vol. 111. –N 4. P. 714-721.

170. Risk of poor neonatal outcome at term after medically assisted reproduction: a propensity score-matched study / S. Ensing, A. Abu-Hanna, T.J. Roseboom et al. // *Fertil Steril.* – 2015. – Vol. 104. – P. 384–390.
171. Semen quality of young adult ICSI offspring: the first results / F. Belva, M. Bonduelle, M. Roelants et al. // *Hum Reprod.* – 2016. – Vol. 31. – P. 2811–2820.
172. Stanford, J.B. Fertility treatments and adverse perinatal outcomes in a population-based sampling of births in Florida, Maryland, and Utah: a cross-sectional study / J.B. Stanford, S.E. Simonse, L. Baksh // *BJOG: an international journal of obstetrics and gynecology.* – 2016. – Vol. 123, № 5. – P. 718–729.
173. Study on the Expressions of PHD and HIF in Placentas from Normal Pregnant Women and Patients with Preeclampsia / W. Liu, S.J. Wang, Q. D. Lin // *International Journal of Biological Sciences.* – 2014. – Vol. 10, №3. – P. 278–284.
174. Study protocol: E-freeze - freezing of embryos in assisted conception: a randomised controlled trial evaluating the clinical and cost effectiveness of a policy of freezing embryos followed by thawed frozen embryo transfer compared with a policy of fresh embryo transfer, in women undergoing in vitro fertilisation / A. Maheshwari, S. Bhattacharya, U Bowler et al. // *Reprod Health.* – 2019, - Vol. 16, № 1. P. 81.
175. The effect of fertility treatment on adverse perinatal outcomes in women aged at least 40 years / A. Harlev, A. Walfisch, E. Oran et al // *Int J Gynaecol Obstet.* – 2018. Vol. 140. – P. 98–104.
176. The effect of in vitro fertilization on coagulation parameters as measured by thromboelastogram / S. Orbach-Zinger, L.A. Eidelman, A. Lutsker et al. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* - 2016. - Vol. 201. - P. 118–120.
177. The impact of inherited thrombophilia types and low molecular weight heparin treatment on pregnancy complications in women with previous adverse outcome / N. Aracic, D. Roje, I.A. Jakus et al. // *Yonsei Med J.* – 2016. – Vol. 57, № 5. – P. 1230–1235.

178. The physiologic and therapeutic role of heparin in implantation and placentation / M. Quaranta, O. Erez, S.A. Mastrolia et al. // PeerJ. – 2015. № 3. – P. 691.
179. The W.T. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure / W.T. Teh, J. McBain, P. Rogers // J Assist Reprod Genet. – 2016. – Vol. 33. – P. 1419–1430.
180. Trends in perinatal health after assisted reproduction: a Nordic study from the CoNARTaS group / A. A. Henningsen, M. Gissler, R. Skjaerven R et al. // Hum Reprod. – 2015. – Vol. 30. – P. 710–716.
181. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer / S. Guo, L. S. Colbert, M. Fuller et al. // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1806, №1. – P. 108-21.
182. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos / M. Rezazadeh Valojerdi, P. Eftekhari-Yazdi, L. Karimian et al. // J Assist Reprod Genet. - 2009. – № 26. – P. 347-354.
183. Weinerman, R. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: the translational rationale / R. Weinerman, M. Mainigi // Fertil Steril. – 2014. – Vol. 102, № 1. – P. 10–18.
184. Which one has a better obstetric and perinatal outcome in singleton pregnancy, IVF/ICSI or FET: a systematic review and meta-analysis / J. Zhao, B. Xu, Q. Zhang et al. // Reprod Biol Endocrinol. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 51.
185. Wong, K.M. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates / K.M. Wong, S. Mastenbroek, S. Repping // Fertil Steril. – 2014. - Vol. 102, № 1. P. 19–26.