

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ИВАНОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МАТЕРИНСТВА И ДЕТСТВА ИМ. В.Н.ГОРОДКОВА
МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

РЕЧИСТОВА ИРИНА ВЛАДИМИРОВНА

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ ЭКО У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ ТРУБНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ
АКТИВНОСТИ РЕАКЦИЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

14.01.01 – акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ,

Посисеева Л.В.

Доктор медицинских наук, профессор

Сотникова Н.Ю.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Современные представления о факторах, определяющих качество эмбрионов, при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе.....	11
1.2. Роль хемокинов в регуляции оогенеза и обеспечении успеха различных этапов ЭКО	22
1.3. Участие фагоцитов в обеспечении процесса оогенеза в норме и при бесплодии.....	28
Глава 2. Материалы и методы исследования	
2.1. Организация работы и характеристика объекта исследования.....	32
2.2. Программа экстракорпорального оплодотворения.....	34
2.3 Методы исследования.....	35
Глава 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН	
3.1. Особенности пациенток с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе.....	41
3.2. Сравнительная клиническая характеристика женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов в программе ЭКО.....	52
Глава 4. ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ХЕМОКИНОВ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ ТРУБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ С КАЧЕСТВОМ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭКО	
4.1. Особенности системной продукции хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в	67

зависимости от качества полученных эмбрионов.....	
4.2. Особенности локальной продукции хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов.....	74
Глава 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАГОЦИТОВ КРОВИ И Фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе с качеством эмбрионов, полученных при проведении программы ЭКО	
5.1. Особенности функционального состояния моноцитов на системном уровне у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов...	80
5.2. Характеристика функционального состояния макрофагов фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов	87
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы:

Проблема бесплодия в супружеских парах остается одной из наиболее актуальных и социально значимых. Доля бесплодных браков на территории России колеблется от 8 до 17,5% и в настоящее время не имеет тенденции к снижению [61]. До 60-70% женского бесплодия составляет трубно-перитонеальный фактор, частота бесплодия в сочетании с эндометриозом колеблется от 20 до 48% [17].

Одним из эффективных и в ряде случаев единственным методом лечения бесплодия является ЭКО. Однако, несмотря на достигнутый прогресс в разработке протоколов стимуляции суперовуляции яичников и методах культивирования эмбрионов, частота наступления беременности после ЭКО, по данным разных центров, остается невысокой и колеблется в пределах 20-40% [61]. Важным критерием удачного исхода программы ЭКО является качество переносимых эмбрионов [64]. Предполагается, что качество эмбриона, полученного в ходе оплодотворения *in vitro*, во многом зависит от исходного состава фолликулярной жидкости. Известно, что в фолликулярной жидкости, кроме гормонов, содержатся различные белки и цитокины, в том числе ингибины А и В, TGF β [151; 128], VEGF [114, 69], IGF-1 [127], а также цитокины IL-12 [95, 129, 131], IL-6 [161], IL-8 и др. Высокое содержание IL-12 в фолликулярной жидкости рассматривают как маркер качества эмбрионов и успешной имплантации [129], а уровень AMГ в фолликулярной жидкости – как показатель оплодотворения и исхода ЭКО [72].

Менее изучено содержание хемокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости у женщин, участвующих в программе ЭКО. Ранее было доказано, что хемокины играют особую роль в процессах репродукции, включая овуляцию, в пролиферации эндометрия, реакции децидуализации и др. [142, 195, 138]. Между тем, отсутствуют данные о связи хемокинов с качеством ооцита и эмбриона. Известно, что основными продуцентами и

клетками-мишенями цитокинов являются эффекторные клетки врожденного иммунитета – моноциты и макрофаги, однако особенности функционирования этих клеточных популяций у женщин с бесплодием различной этиологии, изучены недостаточно. Установлено, что макрофаги являются наиболее многочисленной популяцией клеток иммунной системы, присутствующей в яичниках и участвующей в регуляции ангиогенеза и фолликулогенеза [99]. Их роль в регуляции овариальных процессов и обеспечении качества зачатия до конца не установлена.

Таким образом, определение особенностей функционального состояния фагоцитов и содержания хемокинов в фолликулярной жидкости и периферической крови является актуальной задачей современной науки и имеет большое значение для практики.

Цель исследования:

Разработать новые критерии прогноза качества эмбрионов при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе на основании комплексного изучения содержания хемокинов и оценки функционального состояния моноцитов/макрофагов периферической крови и фолликулярной жидкости.

Задачи исследования:

1. Установить наиболее значимые клинические факторы, определяющие развитие бесплодия и качество эмбрионов при проведении ЭКО, у женщин с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с эндометриозом.
2. Оценить содержание хемокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом в зависимости от качества эмбрионов, полученных при проведении ЭКО.
3. Определить особенности экспрессии функциональных молекул моноцитами крови и макрофагами фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом

в зависимости от качества эмбрионов, полученных при проведении ЭКО.

4. Разработать новый способ прогноза качества эмбрионов при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом.

Научная новизна исследования:

Установлено, что развитие бесплодия, как трубного происхождения, так и при эндометриозе, сопровождается снижением сывороточного содержания хемокина RANTES и нарушением функционального состояния моноцитов с угнетением экспрессии CD16 молекул и повышением экспрессии CD86 молекул.

Выявлено, что нарушение фертильности у пациенток с эндометриозом ассоциировано с более выраженными иммунологическими нарушениями, чем у женщин с бесплодием трубного происхождения, проявляющимися более высоким уровнем внутриклеточной продукции моноцитами IL-8, угнетением экспрессии CD49e молекул и снижением сывороточного содержания MCP-1.

Выявлены особенности содержания хемокинов в фолликулярной жидкости относительно уровня хемокинов в крови у пациенток с бесплодием трубного происхождения и с эндометриозом, связанные со значительным повышением в фолликулярной жидкости содержания IL-8, умеренным повышением уровня MCP-1 и снижением содержания RANTES.

Установлено, что в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом в отличие от пациенток с бесплодием трубного происхождения повышено содержание CD16+, CD11b+ и CD86+ макрофагов и снижен уровень CD49e+ макрофагов.

Показано, что получение эмбрионов низкого качества у пациенток с бесплодием трубного происхождения ассоциировано с низким содержанием RANTES и CD86+ фолликулярных макрофагов при высокой

внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами и повышенном уровне CD16+ моноцитов.

Выявлено, что у женщин с бесплодием и эндометриозом получение эмбрионов низкого качества сочетается с высоким содержанием в крови IL-8+ моноцитов, низким уровнем CD49e+, HLA-DR+ и CD11b+ моноцитов и HLA-DR+ фолликулярных макрофагов.

Впервые показано, что получение эмбрионов высокого качества у женщин как трубного происхождения, так и связанного с эндометриозом, ассоциировано с высоким относительным содержанием в крови HLA-DR+ моноцитов.

Практическая значимость исследования

В клиническую практику предложен «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием», основанный на определении в периферической крови количества HLA-DR+ моноцитов (патент №2441243 от 27.01.2012).

Выявлено, что к факторам, определяющим качество эмбрионов, полученных при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения, относятся количество полученных при оплодотворении эмбрионов, толщина эндометрия, уровень ФСГ и АМГ в крови, а у женщин с бесплодием и эндометриозом - гиперплазия эндометрия в анамнезе, количество полученных эмбрионов и ооцитов, оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе.

Методология и методы исследования: Для достижения поставленной цели проведено обследование кагортным методом пациенток с бесплодием трубного происхождения и с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии, обратившихся в отделение вспомогательных репродуктивных технологий для проведения ЭКО. При обследовании пациенток использовался комплекс современных клинических, иммунологических методов исследования. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета

современных компьютерных программ прикладного статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

Механизмы нарушения фертильности у пациенток как с бесплодием трубного происхождения, так и с эндометриозом связаны с нарушением регуляции реакций врожденного иммунитета, которые проявляются угнетением системной продукции хемокина RANTES и изменением экспрессии CD16 и CD86 молекул моноцитами периферической крови и фолликулярными макрофагами.

Получение эмбрионов низкого качества при бесплодии трубного происхождения связано с низким сывороточным содержанием RANTES, высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами, сниженной экспрессией CD11b молекул моноцитами и CD86 молекул фолликулярными макрофагами. У женщин с бесплодием и эндометриозом получение эмбрионов низкого качества ассоциировалось со сниженным содержанием HLA-DR+, CD11b+, CD49e+ моноцитов в крови и HLA-DR+ макрофагов в фолликулярной жидкости.

При значениях относительного содержания HLA-DR+ моноцитов крови 68% и более прогнозируется получение эмбрионов высокого качества у пациенток с бесплодием как трубного происхождения, так и связанного с эндометриозом.

Апробация работы

Основные результаты исследований по теме диссертации докладывались и обсуждались на: XIII Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009), XXII Международном Конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний (Москва, 2009), научно-практической конференции ЦФО РФ с международным участием «Инновации и информационные технологии в диагностической, лечебно-профилактической

и учебной работе клиник» (Тверь, 2009), Республиканской научно-практической конференции «Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности» (Белоруссия, Минск, 2009), XXIII Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний (Москва, 2010), Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая практика - новые горизонты» (Москва, 2010), VIII Конференции иммунологов Урала (Сыктывкар, 2010), IV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2010), конференции молодых ученых, посвященной 30-летию со дня основания Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова (Иваново, 2010), 90-ой юбилейной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию ИвГМА (Иваново, 2010).

Внедрение результатов в практику

Разработанный «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием» прошел предрегистрационное испытание в отделении вспомогательных репродуктивных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личное участие автора

Самостоятельно проводились отбор пациенток в группы, согласно критериям включения и исключения, клиническое обследование пациенток. Принимала участие в проведении иммунологических исследований. Проводила систематизацию, статистическую обработку, анализ и описание полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 – в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы и практические рекомендации. Библиографический указатель включает 230 источников, в том числе 63 отечественных и 167 иностранных. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 7 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о факторах, определяющих качество эмбрионов, при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе

Частота бесплодных браков в России превышает 15%, а в некоторых регионах данный показатель составляет 20% [26]. Число заболеваний, прямо или косвенно оказывающих влияние на репродуктивные органы, непрерывно растет. [29, 44, 46]. Бесплодие в семье - это тяжелое состояние, которое нарушает социальную и психологическую адаптацию человека и требует оказания высокоспециализированной медицинской помощи [24, 25,150]. Низкая эффективность традиционных методов лечения бесплодия привели к развитию методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в том числе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и переноса эмбрионов в полость матки (ПЭ). Эффективность данного метода в России составляет 25-45% [26]. Большое количество неудачных исходов заставляет исследователей все глубже изучать данную проблему и искать новые пути ее решения.

Наиболее частыми формами бесплодия, с которыми супружеские пары обращаются для проведения программы ЭКО, являются трубно-перитонеальный фактор и эндометриоз [17]. Мета-анализ по оценке эффективности программ ВРТ показал, что у пациенток с эндометриозом частота наступления беременности почти в 2 раза ниже, чем у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием [78]. По данным ряда авторов, у женщин с бесплодием и эндометриозом III-IV стадии после проведения хирургического и гормонального лечения частота наступления беременности при проведении ЭКО составляет лишь 10%–12% [53, 117, 174]. При этом у женщин с бесплодием трубного происхождения результаты эффективности лечения методом ЭКО значительно выше, чем у женщин с другими факторами бесплодия, такими как эндометриоз, синдром поликистозных

яичников [97]. Так, частота наступления беременности после ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения на цикл стимуляции по разным источникам составляет от 28,6 до 37,4% [60]. Однако даже эти результаты, превышающие аналогичные данные при лечении пациенток с другими формами бесплодия, остаются относительно невысокими.

В литературе эффективность программ ЭКО в большинстве случаев оценивается по наступлению беременности или ее отсутствию. При выявлении факторов, влияющих на исход ЭКО, было показано, что частота наступления беременности почти в 4 раза выше у пациенток, которые на протяжении 3-6 месяцев перед вступлением в программу ЭКО получали агонисты гонадотропин-рилизинг-гормонов (аГнРГ) [13]. Однако при длительной подготовке с использованием аГнРГ происходит выраженное подавление функции яичников, что проявляется увеличением потребности в гонадотропинах во время стимуляции суперовуляции, медленным ростом фолликулов и эндометрия, поэтому некоторые исследователи предлагают сократить время подготовки до 3 месяцев [224].

Многие исследователи уделяют большое внимание состоянию эндометрия и его рецептивности как предиктора дальнейшей имплантации и наступления беременности в результате ЭКО [36, 41, 52, 110].

Менее изучены факторы, влияющие на качество эмбрионов, получаемых в ходе программы ЭКО, от которых во многом зависит ее исход [58]. Прогнозирование качества эмбрионов до вступления женщины в программу ВРТ могло бы существенно повысить эффективность процедуры путем коррекции тактики ведения пациентки.

К настоящему времени выявлены некоторые генетические факторы, влияющие на качество эмбрионов. Так, при исследовании генотипа женщин с бесплодием трубного происхождения, которые готовятся к программе ЭКО, было установлено, что выявление у этих пациенток аллельного полиморфизма генов HLAII класса (аллелей DQB1*06 и/или DRB1*13) ассоциировалось с получением эмбрионов высокого качества [40].

Установлено, что анализ экспрессии ряда генов клетками кумулюса позволяет опосредованно судить о качестве яйцеклетки и прогнозировать качество эмбрионов, которые впоследствии будут получены при проведении оплодотворения *in vitro*. К числу наиболее информативных относятся гены, связанные с регуляцией апоптоза, транскрипционными факторами и хемокиновыми рецепторами [100]. Изучение взаимосвязи между полиморфизмом генов фолатного обмена MTHFR и исходом ЭКО у бразильских женщин, показало, что С677 аллельный вариант был связан с получением пропорции зрелых и незрелых ооцитов, а А1298С вариант был ассоциирован с общим количеством забранных ооцитов. Но ассоциации полиморфизма этих генов с качеством эмбрионов выявлено не было [169].

Широко обсуждался вопрос о гормональном обследовании женщин, планирующих ЭКО, так как это приводило к их более рациональному ведению, повышению качества получаемых эмбрионов и увеличению частоты положительных исходов [3, 125]. В литературе есть данные о важной роли щитовидной железы в процессах, которые способствуют повышению эффективности лечения бесплодия методом ЭКО [1, 34]. Выявлена высокая частота носительства антител к щитовидной железе у женщин с неудачными попытками ЭКО. По данным исследований, уровень тиреотропного гормона значительно выше у пациенток с низким качеством ооцитов и эмбрионов и неудачным исходом ЭКО [181]. Таким образом, исследование функции щитовидной железы может сыграть важную роль для прогноза эффективности ЭКО.

Есть исследования, которые посвящены изучению влияния сывороточного уровня пролактина на исход ЭКО. При проведении ретроспективного исследования о роли гиперпролактинемии в программе ЭКО в 90 лечебных циклах было показано, что она не оказывает отрицательного влияния на наступление беременности у пациенток в программе ЭКО [223]. Однако существует и противоположное мнение о том, что нескорректированная до вступления в протокол стимуляции

суперовуляции гиперпролактинемия приводит к получению ооцитов низкого качества и в итоге к неудачному исходу программы ЭКО [225].

Существенное влияние на качество эмбрионов оказывают нарушения процессов фолликулогенеза и оогенеза. Многие авторы указывают на то, что у женщин с эндометриозом отмечается дисфункция яичников и нарушение фолликулогенеза, что приводит к снижению качества ооцитов и полученных эмбрионов, далее – к нарушению имплантации у этих пациенток [86,144, 163, 178, 217, 227]. При этом угнетение процессов оогенеза может быть вызвано перитонеальным воспалением, которое отмечается при эндометриозе [137]. В ряде работ указывается на то, что у женщин с бесплодием и эндометриозом нарушения роста фолликула и созревания яйцеклеток могут быть вызваны изменениями клеточного цикла клеток гранулезы, которые характеризуются снижением количества клеток в G2/M фазе и увеличением количество клеток, находящихся в S фазе и вступивших в апоптоз [118]. Изменение апоптоза клеток гранулезы подтверждено другим исследователями, которые показали, что при эндометриозе апоптоз клеток гранулезы повышен пропорционально степени тяжести эндометриоза, что приводит к снижению качества ооцитов и получаемых эмбрионов [178].

Существует мнение, что среди факторов, которые оказывают влияние на качество эмбрионов и эффективность ЭКО является возраст женщины [121, 124, 185]. Показано, что до 35 лет основные параметры фолликуло- и эмбриогенеза практически не изменяются [6, 203], высока частота успешных исходов в программе ЭКО [21, 113, 182]. После того как женщина достигает 39 лет, снижается ответ яичников на стимуляцию овуляции, ухудшаются качество и характер оплодотворения полученных ооцитов, вплоть до того что они вообще могут отсутствовать, изменяется скорость и характер дробления эмбрионов, что в итоге оказывает влияние на снижение эффективности ЭКО у женщин старше 40-44 лет [9]. Кроме того, показано, что с возрастом растет число получаемых в результате программы ЭКО ооцитов в стадии дегенерации и количество полиплоидных зигот [7], повышается частота

анеуплодии ооцитов [11]. Низкое качество ооцитов и эмбрионов у женщин старшей возрастной группы связывают с накоплением хромосомных дефектов в ооцитах, которые возникают в результате нарушений первого и второго делений мейоза [124]. Такие генетические аномалии необязательно приведут к развитию фрагментации или вакуолизации эмбриона, замедлению или остановке его развития или индукции апоптоза, но абсолютно точно могут стать причиной отсутствия имплантации или ранней гибели уже имплантировавшегося эмбриона [92, 135]. Известно, что с возрастом накапливаются повреждения ядерной и митохондриальной ДНК, регуляторных белков и липидов, которые вызваны свободными радикалами в результате окислительного стресса [124,156], что, вероятно, может приводить к усилению процессов апоптоза клеток гранулезы со всеми вытекающими последствиями [212].

Многие исследователи констатируют, что у пациенток старше 46 лет после ЭКО беременность не наступает. Существует мнение, что для данной возрастной группы женщин с бесплодием наиболее перспективно участие в программе донации ооцитов [162].

Таким образом, почти все исследователи указывают на отрицательное влияние увеличения возраста на эффективность программ ЭКО. Это связано с физиологическим процессом угасания функции яичников, в результате происходит уменьшение их резервных возможностей для формирования когорты фолликулов при стимуляции яичников и снижение качества полученных ооцитов и эмбрионов [104, 173].

Существует ряд работ, посвященных изучению влияния продолжительности бесплодия на качество получаемых эмбрионов, их способность к имплантации и наступлению беременности [23, 24, 187, 211]. В работе Светлакова А.В. с соавт. [57] проанализировано влияние на предимплантационный эмбриогенез разной продолжительности бесплодия (менее 5 лет, от 6 до 10 лет и более 10 лет) у женщин в возрасте от 30 до 34 лет. Критерием качества полученных эмбрионов использовали способность к

формированию бластоцисты в культуре, учитывая скорость дробления и степень фрагментации эмбрионов и/или частоту наступления имплантации (ЧНИ). Было обнаружено, что количество образовавшихся бластоцист снижалось в зависимости от длительности бесплодия, а ЧНИ изменялась в группе женщин с бесплодием трубного происхождения, но не с эндокринным фактором бесплодия. Частота наступления беременности снижалась с увеличением длительности бесплодного периода и составляла при бесплодии менее 5 лет - 41,7%, от 6 до 10 лет – 27,3% и при бесплодии более 10 лет – 18,2% соответственно [57]. Таким образом, исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что длительность бесплодия, а значит и выраженность патологического процесса в репродуктивной системе женщины является фактором, влияющим на характер, скорость дробления и степень фрагментации эмбрионов.

По некоторым литературным данным, на эффективность ЭКО влияет диагностированное первичное или вторичное бесплодие. Известно, что женщины, у которых были беременности в анамнезе имеют больше шансов наступления беременности после ЭКО, а у пациенток, у которых есть дети, вероятность успешного исхода ЭКО значительно выше [209]. Считают, что первичное бесплодие является менее благоприятным фактором для исхода программы ЭКО, так как при нем происходят более глубокие нарушения в репродуктивной системе, в том числе связанные с нарушением рецептивности эндометрия, большое значение также оказывают и иммунные механизмы, а также генетические факторы, непосредственно участвующие в патогенезе первичного бесплодия, что не может не отразиться и на качестве получаемых эмбрионов в программе ЭКО [10, 91, 219]

В связи с этим, особую диагностическую ценность в плане прогнозирования качества эмбриона приобретают методы оценки овариального резерва пациенток, планирующих участвовать в программе ЭКО. Известно, что к основным критериям оценки овариального резерва на сегодняшний день относят определение базальных уровней

гонадотропинов, эстрадиола, ингибина В, АМГ, количества антральных фолликулов и объема яичников.

Многие исследования посвящены изучению овариального резерва и прогнозированию эффективности стимуляции суперовуляции на основании оценки базальных уровней гонадотропинов и эстрадиола [23]. Так, показано, что бедный ответ яичников при стимуляции овуляции ожидается при уровне ФСГ > 10 мЕД/л [26].

Во многих работах прослеживается также влияние сниженного овариального резерва на качество ооцитов и получаемых в ходе программы ЭКО эмбрионов у женщин с бесплодием и эндометриозом [164]. Показано, что независимо от возраста, распространенные формы эндометриоза ассоциированы с прогрессивным снижением овариального резерва, который оценивали по сывороточному уровню антимюллерового гормона [188]. Однако остается до конца не ясным, является ли снижение овариального резерва прямым следствием распространенного эндометриоза, или это снижение было первичным и связано с онтогенетическими особенностями развития пациенток с эндометриозом [164].

Ингибин В является показателем, который характеризует овариальный резерв. Ранее указывалось, что уровень ингибина В имеет большое значение при планировании проведения ЭКО [204].

Доказано, что возрастное снижение овариального резерва, проявляющееся в уменьшении числа фолликулов в яичниках женщин, приводит к падению уровня ингибина В в крови [133].

Выявлено, что по уровню ингибина В можно прогнозировать успешное получение ооцитов и наступление беременности в результате ЭКО [147], а уровни ингибина В, ингибина А и активина А коррелируют с размерами фолликулов [128]. В некоторых работах приводятся данные сравнительного анализа содержания ингибина В в периферической крови и в фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием различного генеза и их связь с успехом различных этапов ЭКО. Так, предполагают, что у женщин с бесплодием,

обусловленным как трубным фактором, так и эндометриозом низкие уровни ингибина В и АМГ в сыворотке крови в дальнейшем приводят к слабому ответу яичников на стимуляцию овуляции, меньшему количеству полноценных ооцитов и в итоге к негативному исходу программы ЭКО [96,109]. Высокий уровень ингибина В в фолликулярной жидкости свидетельствует о прогнозе хорошего ответа яичников на стимуляцию, связанного с числом полученных яйцеклеток [102]. Анализ содержания ингибина В в сыворотке крови у женщин с эндометриозом и бесплодием трубного происхождения в циклах ЭКО показал, что у пациенток с эндометриозом уровень ингибина В и число полученных ооцитов были значительно снижены, что по мнению авторов, указывает на нарушение функций клеток гранулезы при эндометриозе [202].

Большую клиническую значимость перед проведением ЭКО приобрело определение сывороточного уровня антимюллера гормона (АМГ). АМГ - представитель семейства трансформирующих факторов роста β , вырабатывается в преантральных и антральных фолликулах [32]. АМГ не зависит от уровня ФСГ, не изменяется в течение менструального цикла [32] и способен лучше отражать процессы старения в яичнике чем базальные уровни ФСГ и ингибина В [72,74, 205]. При уровне АМГ ниже 0,6 нг/мл прогнозируется «бедный ответ» яичников на стимуляцию суперовуляции, получение ооцитов и эмбрионов низкого качества и в целом - низкая эффективность программы ЭКО. Выявлено, что частота наступления беременности в результате проведения ЭКО при низких значениях АМГ составляла лишь 14%, тогда как при АМГ более 0,6 нг/мл беременность наступала в 28% наблюдений [193].

Для оценки овариального резерва и прогноза исхода программы ЭКО специалисты применяют ультразвуковую оценку объема яичников и определение числа антральных фолликулов. Установлено, что «бедный ответ» на овариальную стимуляцию наблюдается при объеме яичников $< 3 \text{ см}^3$ и количестве антральных фолликулов меньше двух на 3-й день

менструального цикла [32,112]. Полагают, что уменьшение объема яичников и числа антральных фолликулов отражает снижение овариального резерва [186, 191]. Таким образом, анализируя перечисленные гормональные инструментальные методы оценки овариального резерва, многие авторы [32, 122, 185] считают, что ни один из них нельзя использовать как достаточно надежный для прогноза ответа яичников на стимуляцию суперовуляции.

Есть мнение о том, что размер матки и толщина эндометрия коррелируют с результатами стимуляции суперовуляции в циклах ЭКО, то есть чем тоньше эндометрий, тем беднее ответ яичников на стимуляцию [18, 20, 197, 198]. Полагают, что эффективность ЭКО зависит от количества полученных при трансвагинальной пункции ооцитов, и чем больше их количество, тем шанс получения эмбрионов хорошего качества выше, а значит и прогноз ЭКО более благоприятный [175, 208].

Роль системного и локального воспаления как фактора, участвующего в механизмах нарушения оогенеза, обсуждался в литературе [56, 64]. Наличие хронического эндометрита можно рассматривать в качестве одного из факторов, непосредственно влияющего на качество полученных в программе ЭКО эмбрионов [10, 54]. Известно, что при бесплодии трубного происхождения непосредственной причиной окклюзии маточных труб являются перенесенные ранее воспалительные процессы, чаще всего вызванные генитальными инфекциями [22, 76, 121, 159]. Учитывая эти данные, можно предположить, что наличие ИППП в анамнезе у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием опосредованно может оказывать негативное влияние на процесс созревания яйцеклеток, а в дальнейшем - на процесс оплодотворения и качество эмбрионов у этих пациенток.

Ряд авторов в своих работах указывают, что многократные операции на придатках матки приводят к резкому снижению овариального резерва яичников, их кровоснабжения, а значит и нарушению процессов оогенеза [23, 26,30], что негативно отражается на качестве получаемых эмбрионов в программе ЭКО.

По данным литературы, при определении качества эмбриона можно использовать опосредованные параметры оценки качества, к которым относят, например, число эмбрионов на 2 день после проведения оплодотворения, общее количество бластоцист, число замороженных бластоцист, а также имплантационный индекс [126]. Единственный показатель, позволяющий непосредственно оценить качество эмбриона – это шкала баллов, основанная на морфологических характеристиках развивающегося эмбриона [37, 126]. Однако использование этого показателя на практике несколько затруднено, поскольку нет единого стандартизованного подхода к оценке баллов в различных лабораториях. Кроме того, часто практикуется перенос более чем одного эмбриона, а когда эмбрионы различного качества, то в этом случае невозможно рассчитать «средний показатель качества» [228]. Для преодоления этих трудностей ряд авторов предлагали использовать кумулятивный показатель качества, которой представляет собой общую сумму баллов перенесенных эмбрионов [213]. Однако наиболее часто характеристики лучшего эмбриона (так называемый «лидирующий эмбрион») применяются для оценки качества эмбрионов у индивидуальной пациентки [228].

Определение качества переносимых в полость матки эмбрионов имеет большое практическое значение, особенно при переносе нескольких эмбрионов. Ретроспективный анализ 1467 циклов программы ЭКО у пациенток с разным количеством перенесенных в полость матки эмбрионов показал, что при переносе одного эмбриона эффективность составила 20%, двух эмбрионов – 18,7%, трех эмбрионов – наступление беременности произошло в 40,9% циклах [216]. Поэтому во избежание риска наступления многоплодной беременности авторы советуют производить перенос одного эмбриона высокого качества женщинам в возрасте до 30 лет, двух эмбрионов высокого качества пациенткам 31-35 лет. Женщинам 35 лет и старше рекомендуют переносить в полость матки трех эмбрионов высокого качества [216]. Во всех этих случаях для повышения эффективности ЭКО необходимо

правильно оценить качество переносимых эмбрионов. Данные систематического обзора и метаанализа [157] 1654 пациенток показали, что существует более высокая вероятность наступления беременности и ее вынашивания до родов при переносе эмбрионов на стадии бластоцисты, чем на стадии дробления.

Таким образом, качество эмбрионов во многом определяют эффективность программы ЭКО. Исследования, проведенные к настоящему времени, позволили установить, что качество эмбрионов зависит от целого ряда факторов, таких как генетические, гормональные факторы, а также от возраста, типа и продолжительности бесплодия, состояния овариального резерва, толщины эндометрия. Следует отметить, что до настоящего времени остается практически не изученной взаимосвязь состояния иммунной системы женщин, участвующих в программе ЭКО, с качеством полученных у них эмбрионов. Учитывая важную роль иммунных механизмов в регуляции практически всех этапов репродуктивных процессов, можно предположить, что клетки иммунной системы и вырабатываемые ими цитокины могут оказывать непосредственное влияние на оогенез, и, соответственно, на качество яйцеклеток и получаемых из них эмбрионов.

1.2 Роль хемокинов в регуляции оогенеза и обеспечении успеха различных этапов ЭКО

К настоящему времени получены многочисленные доказательства, что цитокины, содержащиеся в фолликулярной жидкости, непосредственно участвуют в процессах созревания ооцита и обеспечении имплантационного потенциала эмбриона [107]. Так, выявлено корреляционные связи между содержанием в фолликулярной жидкости ряда факторов роста и степенью зрелости ооцита. Показано, что концентрация VEGF в фолликулярной жидкости негативно коррелирует с созреванием ооцитов [114], тогда как содержание IGF-1 в фолликулярной жидкости позитивно коррелирует с качеством эмбриона, что, по мнению авторов, позволяет расценивать IGF-1

как биохимический маркер качества эмбриона [127]. Кроме того, установлено, что высокое содержание в фолликулярной жидкости фактора ST2, являющегося рецептором IL-33, отмечается в случаях получения эмбрионов высокого качества [107]. Однако не было установлено связи между фолликулярным уровнем IL-18 и связывающего его протеина с качеством эмбриона [141]. Очевидно, что не все цитокины фолликулярной жидкости, напрямую, участвуют в регуляции оогенеза и имеют одинаковую значимость в регуляции функции яичников. Наибольший интерес в этом плане представляет такое семейство цитокинов, как хемокины.

Основной характеристикой молекул из семейства хемокинов является их хемоаттрактантная активность [47]. Эта группа молекул имеет ряд особенностей строения, характерных только для них. Молекулы хемокинов состоят из 70-80 аминокислотных остатков, и отличительным признаком их строения является наличие дисульфидных связей между остатками цистеина, положение которых и определяет принадлежность молекулы к той или иной группе [99]. К настоящему времени выделяют 4 семейства хемокинов:

- семейство СХС-хемокинов (или α – хемокины) включает в себя молекулы, имеющие два цистеиновых остатка, разделенные каким-либо аминокислотным остатком (-С-Х-С-). К этому семейству относят IL-8, рост-регулирующие онкогены (GRO α , GRO β и GRO γ), интерферон-продуцируемый протеин 10 (IP-10) и другие молекулы [48]. Действие хемокинов этого семейства в большей степени проявляется в регуляции острого воспаления. Они являются сильными хемоаттрактантами для нейтрофилов, базофилов, Т-лимфоцитов, естественных киллеров [190].

Семейство СС- или β – хемокинов, является наиболее многочисленным, оно представлено молекулами, имеющими два рядом расположенных (-СС-) цистеиновых остатка. В это семейство входят такие хемокины, как RANTES (регулируемый активацией фактор, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками), макрофагальный воспалительный протеин (MIP-1 α , MIP-1 β), моноцитарный-

хемотаксический протеин - 1, 2, 3, 4 (MCP-1, 2, 3, 4), эотаксин и ряд других молекул. Хемокины этого семейства принимают участие в развитии хронического воспаления [168], являются мощными хемоаттрактантами для Т-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов и активированных НК-клеток [64,171,190].

Семейство γ -хемокинов изучено в меньшей степени и представлено молекулами, имеющими один цистеиновый остаток (-C-). К ним относятся: лимфотактин (LT), специфически действующий на Т-хелперы, цитотоксические лимфоциты и естественные киллеры, но не активирующий хемотаксис нейтрофилов и макрофагов [48, 94].

Семейство δ -хемокинов, или CX3C семейство включает в себя хемокины, у которых два цистеиновых остатка разделены тремя аминокислотами (-C-XXX-C-). Это семейство представлено мембранно-связанным гликопротеином фракталкином [140]. Он обладает хемоаттрактантной активностью для Т-клеток, моноцитов и НК-клеток, но не для нейтрофилов [65].

Основная биологическая роль хемокинов - привлечение в очаг воспаления лейкоцитов с последующей их активацией [47]. Помимо регуляции воспалительных процессов, хемокины непосредственно участвуют в обеспечении физиологического течения многих репродуктивных процессов, включая овуляцию, пролиферацию, и рост эндометрия, реакцию децидуализации и многие другие [16]. Особую роль, по мнению ряда авторов, хемокины играют в обеспечении процесса оогенеза [148]. Это связано с тем, что рекрутирование активированных лейкоцитов непосредственно в яичники является необходимым условием нормального течения процессов фолликулярной атрезии, овуляции образования желтого тела [222]. Продемонстрировано присутствие в яичниках различных популяций моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов, эозинофилов, причем их содержание в различные фазы цикла меняется. Это свидетельствует о том, что лейкоциты и их секреторные продукты действуют как локальные

медиаторы фолликулярной атрезии, овуляции и лютеолизиса. Аккумуляция лейкоцитов только в определенных структурах яичников может быть обусловлена направленной миграцией клеток из сосудистого русла в ответ на специфический хемоаттрактантный сигнал, который обеспечивают хемокины [42, 222]. Факторы, обладающие хемоаттрактантным действием в отношении лейкоцитов, изначально были выявлены в фолликулярной жидкости овуляторных фолликулов [208]. Murdoch W.J. и McCormick R.J. [170] первые сообщили о том, что перивуляторные фолликулы секретируют низкомолекулярные факторы, способные стимулировать миграцию лейкоцитов *in vitro*. Причем, по их данным, миграция различных популяций лейкоцитов была неодинаковой в различные фазы овуляции. Так, нейтрофилы и эозинофилы мигрировали под действием кондиционированной среды из фолликулярной ткани, полученной через 24 и 36 часов после повышения ЛГ, тогда как моноциты мигрировали только в ответ на ткань, полученную через 36 часов, что приблизительно соответствовало 12 часам после овуляции [170]. Базофилы и лимфоциты при этом не оказывали хемотаксической активности. Впоследствии та же динамика миграции нейтрофилов и эозинофилов при овуляции с последующим хемотаксисом моноцитов/макрофагов в течение лютеинизации была подтверждена в других работах [101, 222]. Учитывая эти данные, особое внимание исследователей привлекли 3 хемокина- IL-8, MCP-1 и RANTES, поскольку именно эти факторы играют существенную роль в обеспечении хемотаксиса нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов. Было установлено, что IL-8 и RANTES экспрессируются в максимальной степени в овуляторных фолликулах, а MCP-1, хемокин, специфический для моноцитов, экспрессируется в течение овуляции и при образовании желтого тела [229].

IL-8 (другое его название CXCL8) активно вырабатывается фибробластами, моноцитами/макрофагами, эндотелиальными и эпителиальными клетками в местах воспаления и обладает сильной хемоаттрактантной активностью в отношении нейтрофилов [130]. Под его

влиянием происходит изменение формы нейтрофилов, увеличивается уровень внутриклеточного Ca^{2+} , происходит экзоцитоз гранул, а также образуются реактивные метаболиты кислорода [5]. Было показано, что действие в яичниках IL-8 не ограничивается только хемоаттрактантной функцией в отношении нейтрофилов. Выявлено, что IL-8 активно продуцируется клетками гранулезы, активируя при этом Ca^{2+} -зависимый рецептор IL-8 и p38 митоген-активированный протеин-киназный сигнальный путь в моноцитах и индуцируя направленную миграцию этих клеток. Моноциты, в свою очередь, также начинают вырабатывать IL-8, что свидетельствует об их важной роли в обеспечении массивной лейкоцитарной инфильтрации при образовании желтого тела [148]. Возможно, что прямым следствием лейкоцитарной инфильтрации под действием IL-8 является регуляция ангиогенеза в яичниках. Было показано, что клетки гранулезы, вырабатывающие IL-8, индуцируют миграцию и образование капиллярных трубок эндотелиальными клетками *in vitro*. В то же время, сами лейкоциты оказывают регулирующее влияние на клетки гранулезы в отношении выработки ими про-ангиогенных факторов [148].

MCP-1 относится к семейству CC-хемокинов, он обладает хемотаксической активностью в отношении моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов и базофилов [167]. Активация макрофагов под действием MCP-1 приводит к их дегрануляции и респираторному взрыву, сопровождающемуся выработкой реактивных форм кислорода [5]. Установлено, что MCP-1 вовлекается в циклические изменения в яичниках. Так, экспрессия мРНК MCP-1 в ткани перифолликулярной стромы усиливалась от перiovуляторной к поздней овуляторной фазе с последующим падением в постовуляторную фазу. При этом плотность макрофагов в ткани была выше в пре- и раннюю овуляторную фазу по сравнению с постовуляторной фазой [166]. По другим данным, MCP-1 регулирует инфлюкс макрофагов в corpus luteum в течение лютеолизиса [222]. Эти данные позволяют предположить, что MCP-1

участвует в развитии воспалительно-подобной реакции в яичниках в течение овуляторного процесса.

RANTES, также называемый CCL5, выполняет в организме функцию привлечения Т-лимфоцитов, дендритных клеток, эозинофилов, ЕК, тучных клеток в места воспаления и инфекции [154]. Установлено, что этот хемокин активно участвует в регуляции эозинофильной инфильтрации corpus luteum. Так, по данным литературы, эозинофилы преимущественно аккумулируются в микрососудах текального слоя, трансформирующегося в септу corpus luteum. При этом клетки гранулезного слоя, текального слоя и геморрагические участки при лютеинизации содержат низкое, умеренное и высокое количество эозинофилов, соответственно. И это селективное присутствие эозинофилов в перивуляторных структурах было обусловлено усиленной активностью RANTES [119].

Таким образом, можно считать доказанной важную роль хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в обеспечении процессов оогенеза. В связи с этим, можно предположить, что продукция этих хемокинов как на системном уровне, так и на уровне яичников может отражать качество ооцитов и позволит прогнозировать качество полученных из этих ооцитов эмбрионов при проведении оплодотворения *in vitro*. Однако в настоящее время остаются мало изученными особенности содержания хемокинов в фолликулярной жидкости и связь их концентрации с качеством эмбриона и успехом имплантации.

В отдельных работах, посвященных этому вопросу, указывается, что в фолликулярной жидкости определяются такие хемокины, как IL-8 [142], RANTES и MCP-1 [195], а присутствие в эндометрии этих хемокинов играет важную роль в успешной имплантации бластоцисты [138]. Однако данные о том, как связано содержание этих хемокинов с качеством ооцита и эмбриона, в какой мере содержание хемокинов в фолликулярной жидкости коррелирует с их сывороточным уровнем в литературе практически отсутствуют.

Есть данные о том, что содержание IL-8 в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом выше по сравнению с данным показателем у фертильных женщин, что, вероятно, вызывает снижение овариального резерва, способствуя тем самым развитию бесплодия [111]. Некоторые авторы отмечают положительную корреляционную связь между концентрацией IL-8 в фолликулярной жидкости и наступлением беременности в результате программы ЭКО, а также указывают на то, что повышение уровня IL-8 наблюдается вместе с ростом и созреванием фолликулов в яичнике, высоким уровнем прогестерона после проведения стимуляции овуляции. Эти данные позволяют предположить непосредственное участие данного хемокина в процессах фолликулогенеза и овуляции [129].

Показано, что повышенный сывороточный уровень MCP-1 выявлен у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, у которых в результате лечения методом ЭКО наступила беременность, а экспрессия данного хемокина положительно коррелировала с содержанием CD3+, CD56+, CD16+ NK- клеток, что явилось предиктором положительного исхода программы ЭКО [136]. В имеющихся отдельных работах, посвященных изучению содержания хемокинов в фолликулярной жидкости пациенток с эндометриозом, приводятся противоречивые данные. Так, сообщалось о том, что содержание RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом было выше, а уровень MCP-1 – ниже аналогичных показателей женщин с трубно-перитонеальным фактором [196]. В то же время, другие исследователи не нашли каких-либо изменений в содержании RANTES в фолликулярной жидкости при эндометриозе [180].

Таким образом, до сих пор нет единого мнения о содержании хемокинов IL-8, MCP-1, RANTES в сыворотке крови и фолликулярной жидкости и их связи с качеством получаемых эмбрионов в результате программы ЭКО.

1.3. Участие фагоцитов в обеспечении процесса оогенеза в норме и при бесплодии

Фагоциты являются ключевыми клетками-эффекторами, определяющими развитие как адаптивного, так и врожденного иммунитета [63]. Принято считать, что основная функция этих клеток – защита организма от патогенов инфекционной природы. Однако, благодаря способности к продукции большого числа цитокинов и ростовых факторов, а также способности к тканевому ремоделированию макрофаги выполняют важную функцию по поддержанию тканевого гомеостаза во многих органах и системах [132]. Макрофаги присутствуют в больших количествах во всех органах женской репродуктивной системы, включая яичники, матку, фаллопиевы трубы, молочные железы, что позволяет говорить об их непосредственном участии в регуляции различных этапов репродуктивного процесса [221].

Макрофаги образуются из клеток-предшественников костномозгового происхождения, которые при созревании поступают в кровоток как моноциты [161]. Из циркулирующего пула моноцитов после их миграции в ткань образуются макрофаги. Поступив в ткань, моноциты/макрофаги участвуют в поддержании тканевого гомеостаза за счет осуществления: фагоцитоза и деградации чужеродных антигенов, тканевого ремоделирования за счет диссоциации элементов внеклеточного матрикса, продукции и секреции многочисленных цитокинов, хемокинов и факторов роста [132]. Эти эффекторные функции позволяют фагоцитам регулировать локальный иммунный ответ и провоспалительные реакции, определяя выполнение тканью своих функций [161]. Тканевые фагоциты характеризуются экспрессией специфического набора поверхностных протеинов, которые преимущественно выполняют рецепторную функцию [161]. К числу наиболее важных рецепторов фагоцитов относятся EMR-1, определяющий адгезию фагоцитов по типу клетка-клетка, MHC молекулы II класса или HLA-DR молекулы, которые вовлекаются в процессы антигенной презентации макрофагами, рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов, в

том числе CD16 молекулы, рецепторы к комплементу, включая CD11b молекулы, а также маннозные рецепторы, сиалоадгезин, и так называемые «рецепторы-мусорщики» [161]. Важно, что эти маркеры, используемые для идентификации макрофагов, также несут важную информацию об изменениях функциональных характеристик фагоцитов. Фагоциты являются основными секреторными клетками, способными к продукции цитокинов и факторов роста, которые функционируют при нормальных, воспалительных и других патологических процессах в большинстве тканей организма [161]. Макрофаги также являются активными продуцентами хемокинов [161], таких как MCP-1 и -3, RANTES, IL-8, нейтрофильный аттрактант эпителиального происхождения-78 (ENA-78), GRO α и др. [47, 161].

Присутствие макрофагов в яичниках установлено давно. Первые работы, посвященные этому вопросу, выполнены в 1964г. на крысах, в яичниках которых были идентифицированы макрофаги на основании выявления экспрессии таких ферментов, как щелочная фосфатаза, эстераза и β -глюкуронидаза [161]. Специфическое распределение макрофагов в яичниках и изменения их содержания в различные фазы менструального цикла, а также способность макрофагов к регуляции клеточной пролиферации, воспаления и стероидогенеза позволяет рассматривать эти клетки как важные регуляторы функции яичников [99].

Роль макрофагов в регуляции процессов роста фолликулов остается мало изученной. Есть мнение, что макрофаги, локализованные в клетках теки растущего фолликула, продуцируют факторы роста и цитокины, влияющие на клеточную пролиферацию и рост фолликула, одновременно супрессируя его апоптоз [161]. Более подробно изучены макрофаги, содержащиеся в фолликулярной жидкости. Показано, что макрофаги составляют от 5 до 15% всех клеток в образцах аспириатов фолликулярной жидкости, полученных при проведении ЭКО. При этом около 8% клеток имеют овариальное происхождение, тогда как остальные макрофаги происходят из пула моноцитов периферической крови [161]. Поскольку макрофаги являются

важнейшим источником цитокинов, формирующих интрафолликулярное микроокружение, много работ было посвящено оценке уровня цитокинов макрофагального происхождения в фолликулярной жидкости. Было установлено, что в фолликулярной жидкости содержится большое количество IL-1 β , IL-6, IL-10, GM-CSF, MCP, MIP- α , которые могут участвовать в регуляции роста фолликула и овуляции [166]. Однако фенотип и функциональное состояние макрофагов фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием различной этиологии, а также взаимосвязь уровня активации макрофагов с качеством эмбрионов, полученных у этих женщин при проведении ЭКО, к настоящему времени остается мало изученным.

В отдельных работах указывается на нарушение функции овариальных макрофагов у пациенток с СПКЯ. Установлено, что у них значительно повышено общее количество макрофагов в фолликулярной жидкости, что ведет к развитию локального воспалительного процесса [158].

При изучении особенностей функционального состояния овариальных макрофагов при эндометриозе установлено, что в фолликулярной жидкости при эндометриозе значительно повышено содержание CD14 $^{+}$ макрофагов по сравнению с показателями пациенток с трубным фактором [161]. На основании этих данных высказывается предположение о том, что фолликулярные макрофаги могут оказывать негативное влияние на фолликулогенез и созревание ооцитов при эндометриозе. Однако подробного изучения фенотипа макрофагов фолликулярной жидкости при эндометриозе и трубном факторе до настоящего времени не проводилось.

Таким образом, моноциты/макрофаги играют важную роль в регуляции репродуктивных процессов. Учитывая их широкое присутствие и непосредственное участие в функционировании яичников, можно предположить, что существует непосредственная связь между уровнем функциональной активности моноцитов крови/макрофагов фолликулярной жидкости с качеством созревающих яйцеклеток и, соответственно, с качеством эмбрионов, которые впоследствии будут получены из этих

яйцеклеток при оплодотворении *in vitro* при проведении ЭКО. Определение этой взаимосвязи имеет не только научный интерес, но и большую практическую значимость, поскольку поможет созданию новых прогностических критериев качества эмбриона. Использование этих критериев в практике центров ЭКО позволит своевременно скорректировать тактику ведения пациенток, участвующих в программе ЭКО, что будет способствовать повышению эффективности ВРТ.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация работы и характеристика объекта исследования

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – д.м.н. А.И. Малышкина). Отбор и обследование супружеских пар осуществлялись на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий (зав. – д.м.н., профессор И.К. Богатова), в лаборатории клинической иммунологии (зав. – д.м.н., профессор Н.Ю. Сотникова) с 2008 по 2010г.

Всего обследовано 162 женщины из супружеских пар, участвующих в программе ЭКО, которые были разделены на следующие группы:

- 1 группа - 99 женщин с бесплодием трубного происхождения (N 97.1);
- 2 группа – 63 женщины, у которых бесплодие было обусловлено эндометриозом маточных труб (N 80.2) и тазовой брюшины (N80.3) I-II стадии.

В результате проведения экстракорпорального оплодотворения в зависимости от качества полученных эмбрионов были выделены 4 подгруппы:

- 1а подгруппа – 53 женщины с эмбрионами высокого качества при бесплодии трубного происхождения;
- 1б подгруппа - 46 женщин с эмбрионами низкого качества при бесплодии трубного происхождения;
- 2а подгруппа – 23 женщин с эмбрионами высокого качества при бесплодии и эндометриозе;
- 2б подгруппа - 40 женщин с эмбрионами низкого качества при бесплодии и эндометриозе.

Критерии включения в программу исследования:

- бесплодие трубного происхождения;
- бесплодие, связанное с эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II

стадии.

Диагноз бесплодия трубного происхождения и бесплодия, связанного с эндометриозом, поставлен на основании данных анамнеза, УЗИ, гистеросальпингографии, диагностической лапароскопии.

Критерии исключения из исследования:

- бесплодие, связанное с отсутствием овуляции (N 97.0);
- бесплодие маточного происхождения (N 97.2);
- бесплодие цервикального происхождения (N 97.3);
- бесплодие, связанное с мужскими факторами (N 97.4);
- другие формы женского бесплодия (N 97.8);
- бесплодие неуточненное (N 97.9),

Женщины обеих групп перед программой ЭКО обследовались в соответствии с приказом № 107 («О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению») Минздрава РФ от 30 августа 2012г. Кроме того, пациенткам перед началом проведения ЭКО определяли уровень ингибина В. Оценку иммунологических параметров крови и фолликулярной жидкости проводили в день трансвагинальной пункции яичников.

После оплодотворения *in vitro* оценивалось качество полученных эмбрионов.

Все исследования проводились с информированного согласия пар.

На каждую женщину заполнялась «Индивидуальная карта обследования», в которую вносились данные анамнеза, результаты клинико-лабораторных исследований, сведения о тактике ведения и исходах программы ЭКО.

Материалом для исследования служили периферическая венозная кровь из кубитальной вены и фолликулярная жидкость.

При оценке иммунологических показателей и параметров овариального резерва (ФСГ, ингибин В, АМГ) использовали имеющиеся в лаборатории клинической иммунологии нормативные показатели периферической крови

здоровых небеременных женщин фертильного возраста (контрольная группа, n=23).

2.2. Программа экстракорпорального оплодотворения

Стимуляцию суперовуляции яичников начинали при отсутствии ретенционных образований в яичниках и при толщине эндометрия не более 5мм. Ультразвуковой мониторинг стимуляции суперовуляции осуществляли каждые 2-3 дня до момента введения овуляторной дозы чХГ. Применяли фармакологические протоколы комбинированного использования человеческих менопаузальных гонадотропинов (ЧМГ) (препарат менопур, Ferring, Германия) и рФСГ (препарат гонал-Ф, Merck Serono, Швейцария) на фоне антГнРГ (препарат цетротид, Serono Ares, Швейцария) или аГнРГ (препарат диферелин, Beafour Ipsen, Франция). «Овуляторную» дозу чХГ (препарат хорагон, Ferring, Германия) назначали при наличии максимального диаметра лидирующих фолликулов, по данным УЗИ, не менее 17-18мм, толщины эндометрия не менее 7мм. Доза препаратов чХГ составила 5-10 000 МЕ и зависела от количества растущих фолликулов и степени риска развития синдрома гиперстимуляции яичников.

Через 36 часов после введения овуляторной дозы чХГ под контролем УЗИ проводилась трансвагинальная пункция фолликулов и аспирация их содержимого.

Оплодотворение *in vitro* осуществлялось стандартным методом с последующим инкубированием [33].

Перенос эмбрионов в полость матки осуществляли на 3 или 5 сутки после начала культивирования *in vitro* и оценки их качества с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Karl Zeiss, Германия).

Всем пациенткам проводилась поддержка посттрансферного периода с применением гестагенов (микронизированный прогестерон в капсулах или дидрогестерон), которые назначались через 24 часа после проведения трансвагинальной пункции фолликулов.

На 14 день после переноса эмбрионов с целью диагностики возможной

беременности оценивали уровень β – субъединицы ХГЧ, а на 21 день после переноса эмбрионов проводили УЗИ для определения плодного яйца в полости матки.

2.3. Методы исследования

Клинические методы исследования включали сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, стандартные лабораторные обследования, необходимые для женщин, планирующих проведение ЭКО.

Консультации специалистов (маммолога, терапевта, эндокринолога) проводились по показаниям.

Методы оценки овариального резерва: в сыворотке крови, забранной перед началом протокола стимуляции суперовуляции методом иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере Multiscan EX (Labsystems, Finland) определяли концентрацию ингибина В с помощью коммерческой тест-системы производства Diagnostic System Laboratoris (Texas, USA) и концентрацию антимюллерова гормона (АМГ) с помощью коммерческого набора AMH GenII ELISA производства Beckman Coulter Inc. (USA). Анализ и интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-разработчика.

УЗИ органов малого таза, при котором проводилось измерение объема яичников, числа антральных фолликулов перед вступлением в программу ЭКО выполняли на аппарате «АЛОКА Prosound SSD-3500 SX» (Япония) с использованием интравагинального и абдоминального датчиков (UST – 984 5 МГц, UST – 979 3,5 МГц) и электронного линейного датчика (UST – 5512U 7,5 МГц) [38].

Эмбриологические методы оценки качества эмбриона проводились после оплодотворения *in vitro* визуальной микроскопией с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Karl Zeiss, Германия). На основании морфологических признаков: скорость дробления, форма и размер бластомеров, степень фрагментации и вакуолизации цитоплазмы все эмбрионы делили на эмбрионы высокого и низкого качества [59]. В подгруппы женщин с

эмбрионами высокого качества были отнесены пациентки, у которых преимущественно преобладали эмбрионы класса А или В, а в подгруппы женщин с эмбрионами низкого качества – пациентки с преобладанием эмбрионов класса С и Д.

2.3.1. Иммунологические методы исследования

Процедура выделения мононуклеарных клеток из периферической крови и фолликулярной жидкости

Выделение обогащенной популяции мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови осуществляли стандартным методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($d=1,078$). Для получения обогащенной популяции мононуклеарных клеток фолликулярной жидкости предварительно проводили центрифугирование полученной при трансвагинальной пункции яичников фолликулярной жидкости аспирируемых фолликулов в течение 10 мин. После окончания центрифугирования удаляли надосадочную фракцию, осадок ресуспендировали в 6 мл физ.раствора и центрифугировали в градиенте плотности фиколл-урографина ($d=1,060$, $d=1,078$). Отбирали кольцо клеток в интерфазе фиколл-урографин $d=1,078$ – физ.раствор, отмывали средой RPMI 1640, доводили концентрацию клеток до 1×10^6 кл/мл и использовали для дальнейших исследований.

Проведение цитометрического исследования периферических моноцитов и фолликулярных макрофагов

Поверхностный фенотип иммунокомпетентных клеток и внутриклеточную продукцию ими IL-8 определяли с помощью моноклональных антител (мАТ) методом проточной цитофлюориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, USA). В качестве флюорохромной метки использовали флюоресцеинизотиоцианат (FITC) и фикоэритрин (PE). Фирма-производитель и клон мАТ, которые использовались в исследовании, указаны в таблице 2.3.1.

Процедуру окрашивания и фиксации клеток проводили стандартным способом в соответствии с указаниями фирмы-разработчика. При проведении проточной цитометрии клетки использовали в конечной концентрации 1×10^6 . При оценке мембранной экспрессии CD-маркеров периферическими моноцитами и фолликулярными макрофагами к 50 μ л суспензии клеток в

Таблица 2.3.1.

Панель моноклональных антител, использованных в исследовании

№ п/п	мАТ	Клон	Фирма-производитель	Флюорохромная метка
1.	Анти-Human HLA-DR	-	ООО «Сорбент», Москва	PE
2.	Анти-Human CD16	-	ООО «Сорбент», Москва	FITC
3.	Анти-Human CD11b	-	ООО «Сорбент», Москва	FITC
4.	Анти-Human CD49e	IIA1	BD Boiscences, USA	PE
5.	Анти-Human CD86	HA5.2B7	Beckman Coulte, Francer	PE
6.	Анти-Human CD14	TuK4	Caltag Laboratories, USA	PE
7.	Анти-Human IL-8	-	Invitrogen, USA	PE

FITC – флюоресцеинизотиоцианат

PE – фикоэритрин

концентрации 1×10^6 клеток/мл добавляли 5 μ л мАТ, меченных FITC или 5 μ л мАТ, меченных PE, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут, затем клетки отмывали в 1 мл фосфатного буфера (PBS), содержащего 0,1% азид натрия, и фиксировали в соответствии со стандартной процедурой. При оценке внутриклеточной продукции IL-8 в популяции моноцитов крови и макрофагов фолликулярной жидкости предварительно проводили процедуру фиксации и пермеабелизации клеточной мембраны с использованием коммерческого набора Fixative Solution IO Test®310x Concentrate (Beckman Coulter, USA).

Не менее 10000 клеток анализировалось в каждом образце. Анализ результатов проводили в программе «CELL Quest Pro» (Becton Dickinson, USA). Анализировали клетки в моноцитарном гейте, который устанавливали на основании окрашивания клеток анти-CD14 антителами.

Иммуноферментный анализ

Для оценки содержания в периферической крови и фолликулярной жидкости хемокинов RANTES, MCP-1 и IL-8 использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрацию цитокинов определяли с использованием коммерческих тест-систем на микропланшетном ридере Multiscan EX (Labsystems, Finland). Анализ проводился в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Фирма-производитель и предел чувствительности тест-систем, использовавшихся в исследовании, указаны в таблице 2.2.2.

Таблица 2.3.2.

Характеристика тест-систем для определения цитокинов и факторов роста, использованных при проведении исследования.

№ п/п	Цитокин	Фирма-производитель	Предел чувствительности тест-системы
1.	RANTES	Invitrogen, USA	3пкг/мл
2.	MCP-1	Bender MedSystems, Austria	2,3 пг/мл
3.	IL-8	Bender MedSystems, Austria	2,0 пг/мл

2.3.2. Статистические методы исследования

Статистическая обработка результатов исследования проводилась по общепринятым методам вариационной статистики после проверки рядов данных на нормальность распределения. В зависимости от типа распределения данных достоверность различий между показателями независимых выборок оценивались по непараметрическому критерию U (Манна-Уитни) или по t-критерию. Результаты представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического ($M \pm m$). Для оценки относительного риска получения эмбрионов низкого качества при проведении программы ЭКО рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95%

доверительным интервалом (ДИ – 95%). Статистический анализ осуществлялся в пакете прикладных лицензионных программ «Statistica 6.0», «MicrosoftOffice 2007», «GenStat», «MedCalk» и «OpenEpi».

Объем проведенных исследований представлен в таблице 2.3.2

Таблица 2.3.2

Общее число выполненных исследований

Методы исследования	Абсолютное число
Клинические	162
Ультразвуковые	162
Эмбриологические методы определения качества эмбриона	162
Иммунологические:	
Проточная цитофлуориметрия:	
HLA-DR+ моноциты	35
CD16+ моноциты	43
CD11b+ моноциты	30
CD49+ моноциты	25
CD86+ моноциты	28
IL-8+ моноциты	36
HLA-DR+ фолликулярные макрофаги	43
CD16+ фолликулярные макрофаги	49
CD11b+ фолликулярные макрофаги	39
CD49+ фолликулярные макрофаги	34
CD86+ фолликулярные макрофаги	31
IL-8+ фолликулярные макрофаги	44
Иммуноферментный анализ:	
АМГ	57
Ингибин В	80

IL-8 в сыворотке крови	72
MCP в сыворотке крови	72
RANTES в сыворотке крови	72
IL-8 в фолликулярной жидкости	51
MCP в фолликулярной жидкости	51
RANTES в фолликулярной жидкости	47
Всего	1425

Глава 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН

3.1. Особенности пациенток с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе

Возраст женщин 1 группы колебался от 24 до 44 лет, а женщин 2 группы - от 23 до 45 лет (таблица 3.1.1.). Средний возраст женщин 1 группы составил $32,7 \pm 0,4$ года, 2 группы - $32,9 \pm 0,5$ года, что практически не различалось.

Таблица 3.1.1

Возрастной состав обследованных женщин (абс.ч., %)

Возраст (в годах)	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
≤ 25	3 (3,03%)	1 (1,6%)	0,494
26-30	24 (24,2%)	15 (23,8%)	0,553
31-38	62 (62,6%)	41 (65,1%)	0,442
> 38	10 (10,1%)	6 (9,5%)	0,566
$M \pm m$	$32,7 \pm 0,4$	$32,9 \pm 0,5$	0,716

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

В обеих группах было больше женщин в возрасте от 31 до 38 лет. Они составили 62,6% в 1 группе и 65,1% - во 2 группе. Таким образом, женщины обеих групп достоверно не отличались между собой по возрастным характеристикам.

Средний возраст менархе в 1 группе составил $13,1 \pm 0,1$ года, во 2 группе - $13,1 \pm 0,2$ года (таблица 3.1.2). Своевременное менархе отмечалось у 86(86,9%) женщин с бесплодием трубного происхождения и у 54(85,7%) женщин с бесплодием и эндометриозом. Позднее менархе в 1 группе выявлено у 7(7,1%) женщин и у 4(6,3%) женщин во 2 группе. Раннее менархе наблюдалось у 6(6,1%) пациенток 1 группы и у 5(7,9%) пациенток 2 группы. Таким образом, достоверных отличий в среднем возрасте менархе в обследованных группах не обнаружено.

У большинства женщин в обеих группах имел место регулярный менструальный цикл: 92,9% и 88,9% соответственно группам.

Как представлено в таблице 3.1.2, дисменорея диагностирована практически с одинаковой частотой у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом (23,2% и 27,0%). Следует отметить, что у пациенток 2 группы достоверно чаще, чем у женщин 1 группы отмечалась НЛФ (27% и 9,5%, $p=0,003$).

Таблица 3.1.2

Менструальная функция обследованных женщин (абс.ч.,%)			
Менструальная функция	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
Своевременное менархе	86 (86,9%)	54 (85,7%)	0,505
Позднее менархе	7 (7,1%)	4 (6,3%)	0,564
Раннее менархе	6 (6,1%)	5 (7,9%)	0,436
Средний возраст менархе, лет	13,1±0,1	13,1±0,2	0,405
Меноррагия	14 (14,1%)	11 (17,5%)	0,361
Гипоменорея	7 (7,1%)	7 (11,1%)	0,269
Дисменорея	23 (23,2%)	17 (27%)	0,360
Опсоменорея	0 (0%)	1 (1,6%)	0,389
НЛФ	9 (9,5%)	17 (27%)	0,003

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Характеристика репродуктивной функции обследованных женщин представлена в таблице 3.1.3. Средний возраст начала половой жизни в 1 группе составил 18,2±0,3 года, во 2 группе – 18,9±0,3 лет, что достоверно не различалось.

Первичное бесплодие чаще наблюдалось в группе с бесплодием и эндометриозом - у 36(57,1%) женщин ($p=0,000$), вторичное бесплодие – в группе женщин с бесплодием трубного происхождения - у 75(75,8%) пациенток ($p=0,000$).

Длительность бесплодия до 3 лет достоверно чаще отмечалась у

пациенток с бесплодием трубного происхождения по сравнению с группой женщин с бесплодием и эндометриозом (17,2% и 6,3%, соответственно, $p=0,036$).

Своевременные роды в анамнезе отмечали 10(10,1%) женщин 1 группы, причем у 3(3%) из них было двое родов. Во 2 группе своевременные роды были у 4(6,4%) женщин, в т.ч. у одной (1,6%) - двое родов. Медицинские абортыв имели 21(21,2%) женщина 1 группы и 11(17,5%) пациенток 2 группы. Частота самопроизвольных выкидышей в группе с бесплодием трубного происхождения составила 14,1%, а в группе с бесплодием и эндометриозом - 7,9%, однако это отличие не было статистически значимым. Эктопическую беременность в анамнезе имели 48,5% женщин с бесплодием трубного происхождения, во 2 группе подобных случаев было меньше – 12,7% ($p=0,000$). При изучении методов контрацепции, которые применяли пациентки обследованных групп, достоверных различий не установлено (таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.3

Характеристика репродуктивной функции и контрацепция у обследованных женщин (абс.ч.,%)

Параметр	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
Средний возраст начала половой жизни	18,2±0,3	18,9±0,3	0,053
Первичное бесплодие	24 (24,2%)	36 (57,1%)	0,000
Вторичное бесплодие	75 (75,8%)	27 (42,9%)	0,000
Длительность бесплодия до 3 лет	17 (17,2%)	4 (6,3%)	0,036
Длительность бесплодия от 3 до 10 лет	50 (50,5%)	36 (57,1%)	0,254
Длительность бесплодия более 10 лет	32 (32,3%)	23 (36,5%)	0,352
1 роды	10 (10,1%)	4 (6,4%)	0,299
≥2 родов	3 (3%)	1 (1,6%)	0,494
Медицинские аборты	21 (21,2%)	11 (17,5%)	0,354

Самопроизвольные выкидыши	14 (14,1%)	5 (7,9%)	0,173
Эктопическая беременность	48 (48,5%)	8 (12,7%)	0,000
Внутриматочная контрацепция	9 (9,4%)	2 (3,2%)	0,126
Барьерная контрацепция	5 (5,3%)	3 (4,8%)	0,622
Оральные контрацептивы	11 (11,6%)	6 (9,5%)	0,483

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Таблица 3.1.4

Гинекологическая патология у обследованных женщин (абс.ч.,%)

Заболевания и оперативные вмешательства	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
Воспаление придатков матки	99 (100%)	9 (14,3%)	0,000
Эндометрит	13 (13%)	22 (37,9%)	0,000
Аденомиоз	0 (0%)	6 (9,5%)	0,003
Заболевания шейки матки	18 (18,8%)	12 (19,1%)	0,524
ИППП	56 (56,6%)	30 (47,6%)	0,171
Бактериальный вагиноз	7 (7,4%)	0 (0%)	0,029
Доброкачественные опухоли яичников	13 (13,7%)	13 (20,6%)	0,147
Гиперандрогения	11 (11,6%)	6 (9,5%)	0,483
Гиперпролактинемия	7 (7,4%)	2 (3,2%)	0,246
Гиперплазия эндометрия	10 (10,1%)	12 (19,1%)	0,084
Гипоплазия эндометрия	0 (0%)	3 (4,8%)	0,057
Миома матки	13 (13,7%)	10 (15,9%)	0,395
Окклюзия или отсутствие маточных труб	99 (100%)	0 (0%)	0,000
Эндометриоз маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии	0 (0%)	63 (100%)	0,000
Операции на яичниках	25 (25,3%)	30 (47,6%)	0,003
Оперативные вмешательства, связанные с	5 (5,2%)	6 (9,5%)	0,215

экстрагенитальной патологией			
Стимуляция овуляции (КБ)	20 (20,6%)	23 (36,5%)	0,018
ИОСМ	7 (7,2)	21 (33,3)	0,000
ЭКО не проводилось	64 (64,6%)	43 (68,3%)	0,383
1 попытка ЭКО	23 (23,2%)	15 (23,8%)	0,539
≥2 попытки ЭКО	12 (12,1%)	5 (7,9%)	0,284

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Как представлено в таблице 3.1.4, у всех женщин с бесплодием трубного происхождения в анамнезе диагностировано воспаление придатков матки, что достоверно чаще, чем в группе с бесплодием и эндометриозом (14,3%, $p=0,000$). Эндометрит чаще имел место у пациенток 2 группы по сравнению с 1 группой (37,9% и 13,0% соответственно, $p=0,000$).

Аденомиоз в анамнезе был отмечен у 6(9,5%) женщин 2 группы, тогда как в 1 группе его не было ($p=0,003$). Неопухолевые заболевания шейки матки в анамнезе отмечены у 18(18,8%) женщин 1 группы, и у 12(19,1%) женщин 2 группы. Инфекции, передающиеся половым путём, перенесли 56(56,6%) женщин с бесплодием трубного происхождения и 30(47,6%) пациенток с бесплодием и эндометриозом. Бактериальный вагиноз был в анамнезе только у женщин 1 группы (7,4%, $p=0,029$). Кисты и доброкачественные опухоли яичников были диагностированы у 13(13,7%) женщин 1 группы и у 13(20,6%) женщин 2 группы. Гиперпластический процесс эндометрия в анамнезе встречался у 10(10,1%) женщин 1 группы и у 12(19,1%) больных во 2 группе. Гипоплазия эндометрия выявлена только в группе с бесплодием и эндометриозом у 3(4,8%) женщин. Гиперандрогению практически одинаково часто отмечали женщины с бесплодием трубного происхождения (11,6%) и женщины с бесплодием и эндометриозом (9,5%). Гиперпролактинемия в отмечалась у 7,4% женщин 1 группы и у 3,2% пациенток 2 группы, но эти различия не были статистически значимыми. В анамнезе миому матки малых размеров (до 1,5см в диаметре) в 1 группе имели 13(13,7%) женщин, во 2

группе - 10(15,9%).

Всем пациенткам проводилась оценка состояния маточных труб на основании МСГ, которая уточнялась при лапароскопии. Оклюзия или отсутствие маточных труб были диагностированы у всех женщин 1 группы. Во 2 группе данная патология отсутствовала ($p=0,000$). У всех женщин 2 группы диагностирован эндометриоз маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии, тогда как в 1 группе данное заболевание отсутствовало, что достоверно отличало эту группу от пациенток 2 группы ($p=0,000$).

Операции на яичниках (аднексэктомии, резекции яичника) достоверно чаще встречались у женщин с бесплодием и эндометриозом (47,6%), по сравнению с пациентками с бесплодием трубного происхождения (25,3%, $p=0,003$). Оперативные вмешательства, связанные с экстрагенитальной патологией (аппендэктомия, грыжесечение), с одинаковой частотой отмечались у женщин обеих групп наблюдения (5,2% и 9,5%, соответственно).

Стимуляцию овуляции в естественном цикле КБ проводили у 20(20,6%) пациенток 1 группы, что достоверно реже, чем во 2 группе (36,5%, $p=0,018$). ИОСМ проводилось у женщин с бесплодием и эндометриозом чаще, чем в группе с бесплодием трубного происхождения – в 33,3% и 7,2% случаев соответственно ($p=0,000$). В 1 группе у 64(64,6%) супружеских пар ЭКО в анамнезе не проводилось, 23(23,2%) пары однократно участвовали в программе ЭКО, а у 12(12,1%) - проведено 2 и более попыток ЭКО. Во 2 группе у 43(68,3%) пар не было ни одной попытки ЭКО, 15(23,8%) пар однократно участвовали в программе ЭКО, а у 5(7,9%) пар было 2 и более попыток, что достоверно не различалось.

В таблице 3.1.5 показано, что соматические заболевания отсутствовали у 12(12,1%) женщин 1 группы и у 6(9,5%) пациенток 2 группы. Достоверных отличий между группами по частоте перенесённых соматических заболеваний разных нозологических форм выявлено не было.

На момент начала программы экстракорпорального оплодотворения

острой или обострения хронической экстрагенитальной патологии у женщин обеих групп не было. Хронические экстрагенитальные заболевания на момент начала программы ЭКО и ПЭ были в стадии ремиссии у всех женщин в обеих исследуемых группах.

Таблица 3.1.5

Экстрагенитальная патология в анамнезе (абс.ч.,%)

Экстрагенитальная патология	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
Отсутствовала	12 (12,1%)	6 (9,5%)	0,404
Частые простудные заболевания	95 (96%)	60 (95,2%)	0,558
Детские инфекционные заболевания	22 (22,2%)	16 (25,4%)	0,389
Болезни органов пищеварения	14 (14,1%)	11 (17,5%)	0,361
Заболевания органов дыхания	13(13,1%)	9 (14,3%)	0,505
Заболевания мочевыделительной системы	5 (5,4%)	5 (7,9%)	0,335
Заболевания сердечно-сосудистой системы	12 (12,1%)	5 (7,9%)	0,284
Ожирение	22 (22,2%)	10 (15,9%)	0,217
Варикозная болезнь нижних конечностей	0 (0%)	2 (3,2%)	0,150
Аллергические реакции	22 (22,2%)	11 (17,5%)	0,299

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Перед вступлением в программу ЭКО у всех женщин оценивали овариальный резерв.

Данные УЗИ показали, что до 10 фолликулов и более в яичниках наблюдалось у 66(66,7%) женщин 1 группы, и у 40(63,5%) пациенток 2 группы. При измерении объема яичников у 40(40,4%) женщин 1 группы объем яичников был меньше 8 см³. Во 2 группе количество таких пациенток составило 58,7%, что было достоверно больше по сравнению с 1 группой (p=0,020).

Показатели сывороточного содержания гормонов у женщин обеих групп мы сравнивали с аналогичными показателями овариального резерва здоровых женщин с доказанной фертильностью, которые обратились в Центр

здоровья семьи ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России с целью введения ВМС (таблица 3.1.6). Как видно из полученных результатов, средний уровень ФСГ был повышен в обеих обследованных группах по сравнению со здоровыми женщинами ($p=0,000$ и $p=0,007$ соответственно группам), а средний уровень ингибина В - снижен ($p=0,041$ и $p=0,043$, соответственно). Нами не выявлено статистически значимых различий в средних показателях сывороточного содержания АМГ у женщин 1 и 2 групп по сравнению со здоровыми фертильными женщинами. Проведение сравнительно анализа параметров овариального резерва у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом не выявило значимых различий в средних показателях сывороточного содержания ФСГ, ингибина В и АМГ.

Таблица 3.1.6

Сравнительная характеристика показателей овариального резерва обследованных пациенток и здоровых фертильных женщин ($M \pm m$)

Параметр	Здоровые фертильные женщины (n=20)	1 группа (n=24)	2 группа (n=32)	p
ФСГ, мЕд/л	4,21±0,4	6,69±0,22	6,20±0,30	$p_1=0,000$ $p_2=0,007$ $p_3=0,235$
Ингибин В, пг/мл	67,16±8,7	44,61±4,92	43,08±0,28	$p_1=0,041$ $p_2=0,043$ $p_3=0,540$
АМГ, нг/мл	2,16±0,2	2,56±0,26	2,20±0,41	$p_1=0,412$ $p_2=0,925$ $p_3=0,324$

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1 группы;

p_2 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2 группы;

p_3 - достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп.

Для уточнения состояния овариального резерва у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины мы провели индивидуальный анализ показателей сывороточного содержания ингибина В и АМГ и оценили частоту низких и нормальных значений ингибина В (менее 47 пг/мл и более 47 пг/мл), а также низких, нормальных и высоких значений АМГ (менее 1 нг/мл, 1-2,5 нг/мл и более 2,5 нг/мл). При выборе этих числовых интервалов мы ориентировались на данные литературы [102, 128, 183, 189] и указатели фирмы-разработчика тест-систем. Полученные результаты приведены на рис. 3.1.1.

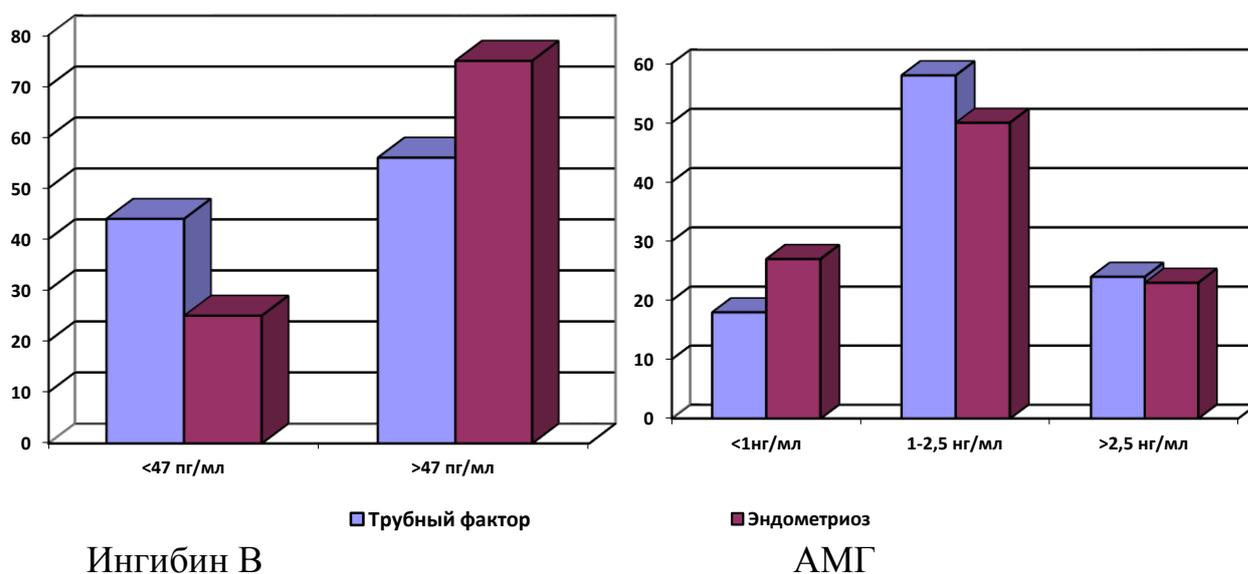


Рис.3.1.1 Характеристика индивидуальных значений сывороточного содержания ингибина В и АМГ у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом

По нашим данным, нормальное содержание ингибина В было у 21(43,8%) женщины с бесплодием трубного происхождения и у 7(25%) женщин с бесплодием и эндометриозом, что достоверно не различалось. Сниженный сывороточный уровень ингибина В был отмечен у 21(43,8) женщины 1 группы и у 17(60,7%) женщин 2 группы, что значимо не различалось. Нормальные значения сывороточного содержания АМГ

наблюдались практически с одинаковой частотой и у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом (57,6% и 50% соответственно). Сниженный уровень АМГ в крови был у 6(18,2%) женщин 1 группы и у 6(27,3%) женщин 2 группы. Повышенный уровень АМГ в крови отмечался у 8(24,2%) женщин 1 группы и у 5(22,7%) женщин 2 группы. Достоверных различий между обследованными группами нами выявлено не было.

При TVP яичников было получено от 1 до 24 ооцитов в 1 группе и от 1 до 30 ооцитов во 2 группе. Среднее количество полученных ооцитов в 1 группе составило $8,6 \pm 0,6$, во 2 группе – $9,0 \pm 1,0$ ооцитов, что достоверно не различалось. При оплодотворении *in vitro* в группе супружеских пар с бесплодием трубного происхождения среднее количество полученных эмбрионов составило $4,8 \pm 0,4$, в группе супружеских пар с бесплодием и эндометриозом - $3,5 \pm 0,5$ ($p \geq 0,05$).

В таблице 3.1.7 показано, что в результате оплодотворения *in vitro* эмбрионы высокого качества получены у 53(53,5%) женщин 1 группы и у 23(36,5%) женщин 2 группы и эти различия были достоверны ($p=0,025$).

Таблица 3.1.7

Результаты программы ЭКО (абс.ч.,%)

Параметр	1 группа (n=99)	2 группа (n=63)	p
Высокое качество эмбрионов	53 (53,5%)	23 (36,5%)	0,025
Низкое качество эмбрионов	46 (46,5%)	40 (63,5%)	0,025
Беременность	39 (39,4%)	16 (25,4%)	0,044
Роды	27 (27,3)	15 (23,8%)	0,382
Погибшая беременность	7 (7,1%)	1 (1,6%)	0,112
Самопроизвольный выкидыш	1 (1,0%)	0 (0%)	0,611
Трубная беременность	2 (2,0%)	0 (0%)	0,372
Анэмбриония	2 (2,0%)	0 (0%)	0,372

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Эмбрионы низкого качества получены у 46(46,5%) женщин с бесплодием трубного происхождения, у 40(63,5%) женщин с бесплодием и эндометриозом и эти различия были достоверны ($p=0,025$).

В результате проведения программы ЭКО беременность чаще наступила у женщин с бесплодием трубного происхождения по сравнению с женщинами с бесплодием и эндометриозом ($p=0,044$). Родами закончились беременности у 27(27,3%) женщин 1 группы и у 15(23,8%) женщин 2 группы, что достоверно не отличалось. Погибшие беременности были у 7(7,1%) пациенток с бесплодием трубного происхождения и у 1(1,6%) - с бесплодием и эндометриозом. Один самопроизвольный выкидыш, две трубные беременности и две анэмбрионии были выявлены только в 1 группе.

Синдром гиперстимуляции в процессе проведения программы ЭКО наблюдался у 9(9,1%) женщин 1 группы и у 9(14,3%) женщин 2 группы, что достоверно не отличалось.

Таким образом, женщины с бесплодием трубного происхождения и женщины с бесплодием и эндометриозом имели практически одинаковый средний календарный возраст, средний возраст менархе, частоту регулярных менструальных циклов. У женщин обеих исследуемых групп одинаково часто имел место сниженный овариальный резерв (повышенный уровень ФСГ, сниженный уровень ингибина В). В программе ЭКО у женщин обеих групп получено практически одинаковое среднее количество ооцитов при TVP и среднее количество эмбрионов при оплодотворении *in vitro*.

У женщин с бесплодием трубного происхождения чаще, чем у пациенток с бесплодием и эндометриозом диагностированы воспалительные процессы придатков матки, бактериальный вагиноз, эктопические беременности в анамнезе. Женщины этой группы чаще страдали вторичным бесплодием. У всех пациенток отсутствовали или были непроходимы маточные трубы. Доля эмбрионов высокого качества и частота наступления беременности были больше у женщин с бесплодием трубного происхождения по сравнению с пациентками с бесплодием и эндометриозом.

Женщины с бесплодием и эндометриозом в анамнезе чаще имели нарушения менструальной функции по типу НЛФ, операции на яичниках, хронический эндометрит, аденомиоз, первичное бесплодие. У них чаще проводилась стимуляция овуляции в естественном цикле и ИОСМ. У всех пациенток установлено наличие эндометриоза маточных труб и тазовой брюшины.

3.2. Сравнительная клиническая характеристика женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов в программе ЭКО

Средний возраст женщин всех подгрупп достоверно не отличался и составил $32,3 \pm 0,5$ года у женщин с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами высокого качества, $32,8 \pm 0,6$ года у женщин с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами низкого качества, $32,4 \pm 0,7$ года у пациенток с бесплодием и эндометриозом и эмбрионами высокого качества, $33,1 \pm 0,7$ года у пациенток с бесплодием и эндометриозом и эмбрионами низкого качества, что достоверно не отличалось (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1

Возрастной состав обследованных женщин (абс.ч.,%)

Группа Возраст (в годах)	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p ₁	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p ₂
M±m	32,3±0,5	32,8±0,6	0,505	32,4±0,7	33,1±0,7	0,512
≤25	2 (3,8%)	1 (2,2%)	0,554	0 (0%)	1 (2,5%)	0,635
26-30	11(20,8%)	14(30,4%)	0,191	6 (26,1%)	8 (20%)	0,398
31-37	38(71,7%)	23 (50%)	0,030	17(73,9%)	25(62,5%)	0,021
ОШ (95% ДИ) 0,42 (0,19-0,96)						
>38	2 (3,8%)	8 (17,4%)	0,027	0 (0%)	6 (15%)	0,055
ОШ (95% ДИ) 5,4 (1,08-26,73)						

p₁ – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп;
p₂ – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Однако женщин в возрасте от 31 до 37 лет было достоверно больше в подгруппе 1а, чем в подгруппе 1б (71,7% и 50%, соответственно, скорректированное ОШ 0,42, ДИ 95% 0,19-0,96; $p=0,030$). Та же закономерность отмечена и в отношении пациенток с бесплодием и эндометриозом: женщин в возрасте 31-37 лет было 73,9% в подгруппе 2а, в подгруппе 2б их было 62,5%, что достоверно различалось ($p=0,021$). Следует отметить, что женщин в возрасте 38 лет и старше было больше в подгруппах 1б и 2б – в 17,4% и 15% (скорректированное ОШ 5,4, ДИ 95% 1,08-26,73; $p=0,027$), тогда как частота таких пациенток в подгруппах 1а и 2а составила 3,8% и 0%, соответственно ($p=0,055$).

Особенности менструального цикла и его нарушений у пациенток представлены в таблице 3.2.2.

Таблица 3.2.2

Менструальная функция обследованных женщин (абс.ч.,%)

Группа Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p_1	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p_2
Средний возраст менархе	13,0±0,2	13,4±0,2	0,125	13,1±0,2	13,3±0,2	0,534
Своевре- менное менархе	48(90,6%)	38 (83,6%)	0,192	18 (78,3%)	28 (70%)	0,343
Ранее менархе	4 (7,5%)	3 (6,5%)	0,462	2 (8,7%)	4 (10%)	0,620
Позднее менархе	1 (1,9%)	5 (10,9%)	0,073	3 (13%)	8 (20%)	0,369
Дисме- норея	11(20,8%)	12 (26,1%)	0,348	4 (17,4%)	13(32,5%)	0,158
Гипоме- норея	1 (1,9%)	6 (13%)	0,037	0 (0%)	7 (17,5%)	0,034
НЛФ	3 (5,7%)	6 (13%)	0,178	3 (13%)	14 (35%)	0,052

p_1 – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп;
 p_2 – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Средний возраст менархе в подгруппах достоверно не отличался. Во всех подгруппах у большинства женщин преобладало своевременное менархе и регулярный менструальный цикл. Частота дисменореи и НЛФ также достоверно не различались в обследованных подгруппах. Гипоменорею достоверно чаще отмечали женщины в обеих подгруппах с эмбрионами низкого качества.

Характеристика репродуктивной функции женщин основных клинических групп наблюдения представлена в таблице 3.2.3.

Таблица 3.2.3

**Характеристика репродуктивной функции обследованных женщин
(абс.ч.,%)**

Группа Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p ₁	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p ₂
Средний возраст начала половой жизни	18,3±0,4	18,1±0,3	0,730	19,4±0,5	18,7±0,3	0,341
Первичное бесплодие	12 (22,6%)	12 (26,1%)	0,434	12 (52,2%)	24 (60%)	0,366
Вторичное бесплодие	41 (77,4%)	3 (73,9%)	0,434	11 (47,8%)	16 (40%)	0,366
Длительность бесплодия: ≤3лет	8 (15,1%)	9 (19,6%)	0,373	3 (13%)	1 (2,5%)	0,134
4 - 10 лет	29 (54,7%)	21 (45,7%)	0,243	15 (65,2%)	21 (52,5%)	0,573
> 10 лет	16 (30,2%)	16 (34,8%)	0,392	5 (21,7%)	18 (45%)	0,054
1 роды	6 (11,3%)	4 (8,7%)	0,464	1 (4,3%)	3 (7,5%)	0,535
Медицинские аборты	12 (22,6%)	9 (19,6%)	0,451	5 (21,7%)	6 (15%)	0,363
Самопроизвольные выкидыши	6 (11,3%)	8 (17,4%)	0,282	1 (4,3%)	4 (10%)	0,393

p₁ – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп;
p₂ – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Средний возраст начала половой жизни в подгруппах достоверно не отличался и составил в подгруппе 1а - $18,3 \pm 0,4$ лет, в подгруппе 1б – $18,1 \pm 0,3$ года, в подгруппе 2а - $19,4 \pm 0,5$ года и в подгруппе 2б - $18,7 \pm 0,3$ года (таблица 3.2.3). Первичное и вторичное бесплодие практически с одинаковой частотой встречалось в подгруппах пациенток с бесплодием и с эмбрионами как высокого, так и низкого качества. У пациенток с бесплодием трубного происхождения качество полученных эмбрионов не зависело от длительности бесплодия. У женщин с бесплодием длительностью более 10 лет и эндометриозом чаще отмечалось получение эмбрионов низкого качества – у 45% женщин, тогда как эмбрионы высокого качества при длительности бесплодия более 10 лет были лишь у 21,7% пациенток ($p=0,054$). Качество полученных в программе ЭКО эмбрионов у женщин всех четырех обследованных подгрупп не имело достоверной зависимости от частоты своевременных родов, медицинских абортотв и самопроизвольных выкидышей в анамнезе.

Хронический эндометрит, ИППП, оперативные вмешательства, связанные с экстрагенитальной патологией (аппендэктомия, грыжесечение) в анамнезе достоверно чаще отмечали женщины с бесплодием трубного происхождения и с эмбрионами низкого качества, по сравнению с женщинами с бесплодием трубного происхождения и с эмбрионами высокого качества (таблица 3.2.4). Гиперпластические процессы эндометрия, операции на яичниках (аднексэктомии, резекции яичников), ИОСМ в анамнезе чаще отмечали женщины с бесплодием и эндометриозом и эмбрионами низкого качества, по сравнению с женщинами с бесплодием и эндометриозом и эмбрионами высокого качества.

Участие в программе ЭКО 1 раз было отмечено у 39,1% пациенток подгруппы 2а, что достоверно чаще, чем в подгруппе 2б – 15% (скорректированное ОШ 0,3; 95% ДИ 0,08 – 0,92; $p=0,033$).

Особенности анамнеза обследованных женщин (абс.ч.,%)

Группа Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p ₁	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p ₂
Воспаление придатков	53 (100%)	46 (100%)	-	16 (69,6%)	33 (82,5%)	0,190
Эндометриит	2 (3,8%)	10 (21,7%)	0,007	6 (26,1%)	16 (40%)	0,201
	ОШ (95% ДИ) 7,1 (1,46-34,28)					
Аденомиоз	0 (0%)	0 (0%)		2 (8,7%)	4 (10%)	0,620
Заболевания шейки матки	7 (13,2%)	11 (23,9%)	0,132	2 (8,7%)	10 (25%)	0,102
ИППП	22 (41,5%)	34 (73,9%)	0,001	10 (43,5%)	20 (50%)	0,407
	ОШ (95% ДИ) 4,0 (1,70 - 9,39)					
Бактериальный вагиноз	3 (5,7%)	4 (8,7%)	0,421	0 (0%)	0 (0%)	
Гиперплазия эндометрия	3 (5,7%)	7 (15,2%)	0,108	1 (4,3%)	11 (27,5%)	0,022
				ОШ (95% ДИ) 8,3 (1,00 - 69,57)		
Гиперандрогения	4 (7,5%)	7 (15,2%)	0,187	1 (4,3%)	5 (12,5%)	0,381
Гиперпролактинемия	4 (7,5%)	3 (6,5%)	0,651	0 (0%)	2 (5%)	0,151
Операции на яичниках	14 (26,4%)	11 (23,9%)	0,480	7 (30,4%)	23 (57,5%)	0,034
				ОШ (95% ДИ) 3,1 (1,04 - 9,17)		

Оперативные вмешательства по поводу экстрагенитальной патологии	0 (0%)	5 (10,9%)	0,019	3 (13%)	3 (7,5%)	0,381
Стимуляция овуляции (КБ)	9 (17%)	11 (23,9%)	0,272	6 (26,1%)	17 (42,5%)	0,151
ИОСМ	5 (9,4%)	2 (4,3%)	0,281	4 (17,4%)	17 (42,5%)	0,037
			ОШ (95% ДИ) 3,5 (1,01 – 12,22)			
ЭКО не проводилось	34 (64,2%)	30 (65,2%)	0,540	14 (60,9%)	28 (70%)	0,320
1 попытка ЭКО	13 (24,5%)	10 (21,7%)	0,466	9 (39,1%)	6 (15%)	0,033
			ОШ (95% ДИ) 0,3 (0,08 – 0,92)			
≥2 попыток ЭКО	6 (11,3%)	6 (13%)	0,516	0 (0%)	6 (15%)	0,056

p_1 – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп;
 p_2 – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Мы проанализировали зависимость показателей овариального резерва от качества полученных эмбрионов у обследованных пациенток. По данным УЗИ органов малого таза, которое проводилось до вступления в программу ЭКО, достоверных различий в количестве антральных фолликулов в подгруппах женщин с эмбрионами различного качества выявлено не было (таблица 3.2.5). При измерении объема яичников установлено, что в подгруппе 1а яичники в объеме меньше 8 см^3 были у 15(28,3%) женщин, а в подгруппе 1б – у 25(54,3%) пациенток, что достоверно различало эти подгруппы (скорректированное ОШ 3,0; 95% ДИ 1,31- 6,94; $p=0,007$). И, наоборот, объем яичников более 8 см^3 достоверно чаще отмечался в подгруппе 1а (у 71,7%

женщин), чем подгруппе 1б (у 45,7% пациенток, скорректированное ОШ 0,3; 95% ДИ 0,14- 0,76; $p=0,007$). Качество эмбрионов у женщин с бесплодием и эндометриозом достоверно не зависело от объема яичников.

Таблица 3.2.5

Оценка УЗ параметров яичников (абс.ч.,%)

Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p_1	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p_2
< 10 фол- ликулов	32 (60,4%)	34 (73,9%)	0,113	12 (52,2%)	28 (70%)	0,127
≥ 10 фол- ликулов	21 (39,6%)	12 (26,1%)	0,113	11 (47,8%)	12 (30%)	0,127
Объем яичников: ≤ 8 см ³	15 (28,3%)	25 (54,3%)	0,007	13 (56,5%)	24 (60%)	0,497
ОШ (95% ДИ) 3,0 (1,31 – 6,94)						
> 8 см ³	38 (71,7%)	21 (45,7%)	0,007	10 (43,5%)	16 (40%)	0,497
ОШ (95% ДИ) 0,3 (0,14 – 0,76)						

p_1 – достоверность различий между показателями 1а и 1б подгрупп;

p_2 – достоверность различий между показателями 2а и 2б подгрупп

В таблице 3.2.6 приведены данные сравнительной характеристики среднего содержания ФСГ, ингибина В и АМГ у пациенток с эмбрионами различного качества и у здоровых фертильных женщин. Как видно из приведенных данных, средний уровень ФСГ в обеих подгруппах с эмбрионами высокого качества и в подгруппах с эмбрионами низкого качества достоверно повышен по сравнению с группой здоровых фертильных женщин. Различий по среднему уровню ФСГ между подгруппами пациенток с эндометриозом и бесплодием выявлено не было.

Среднее содержание ингибина В у пациенток с эмбрионами высокого качества при трубном бесплодии было ниже контрольных значений ($p=0,041$).

Средний уровень АМГ у женщин с эмбрионами высокого качества и бесплодием трубного происхождения достоверно повышен по сравнению с группой здоровых фертильных женщин ($p=0,031$). У пациенток с бесплодием и эндометриозом, у которых были получены эмбрионы низкого качества, среднее содержание АМГ достоверно снижено по сравнению с группой здоровых фертильных женщин ($p=0,044$).

Таблица 3.2.6

Сравнительная характеристика показателей овариального резерва в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель	Здоровые фертильные женщины (n=20)	1 группа		p	2 группа		p
		1а подгруппа (n=10)	1б подгруппа (n=14)		2а подгруппа (n=12)	2б подгруппа (n=20)	
ФСГ, мЕд/л	4,21±0,4	5,86±0,24	7,63±0,32	$p_1=0,006$ $p_2=0,000$ $p_3=0,000$	6,56±0,50	5,96±0,36	$p_4=0,014$ $p_5=0,012$ $p_6=0,546$
Ингибин В, пг/мл	67,16±8,7	42,01±6,26	47,22±6,71	$p_1=0,041$ $p_2=0,073$ $p_3=0,832$	56,14±14,81	44,3±11,29	$p_4=0,631$ $p_5=0,054$ $p_6=0,336$
АМГ, нг/мл	2,16±0,2	3,13±0,49	2,37±0,30	$p_1=0,031$ $p_2=0,861$ $p_3=0,245$	3,47±1,23	1,78±0,34	$p_4=0,351$ $p_5=0,044$ $p_6=0,374$

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток подгруппы 1а;

p_2 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток подгруппы 1б;

p_3 - достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп;

p_4 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток подгруппы 2а;

p_5 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток подгруппы 2б;

p_6 - достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Индивидуальный анализ показателей ФСГ, ингибина В и АМГ в подгруппах женщин с высоким и низким качеством эмбрионов представлен на рис. 3.2.1- 3.2.3. Установлено, что при бесплодии трубного происхождения получение эмбрионов высокого качества достоверно чаще было у женщин с показателями содержания ФСГ менее 10 мЕд/л (98,1% и 84,8% соответственно, скорректированное ОШ 0,1; 95% ДИ 0,01- 0,91; $p=0,018$). При этом получение эмбрионов низкого качества чаще отмечено у пациенток с повышенными (более 10 мЕд/л) показателями ФСГ (15,2% и 1,9% соответственно, скорректированное ОШ 9,3; 95% ДИ 1,10- 79,00; $p=0,018$). У пациенток с бесплодием и эндометриозом взаимосвязи между уровнем ФСГ и качеством эмбрионов не выявлено.

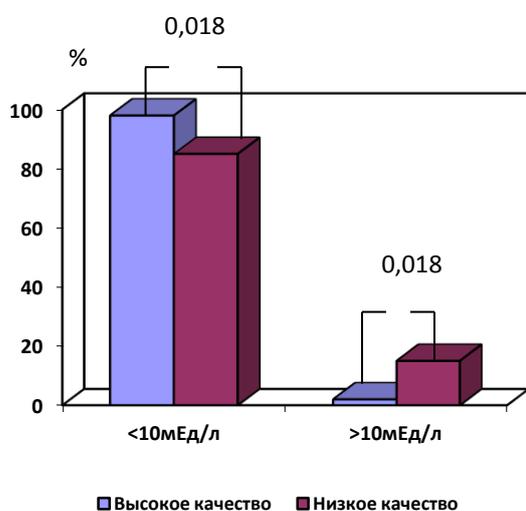


Рис.3.2.1 Частота индивидуальных значений сывороточного содержания ФСГ у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов

Достоверных различий по уровню ингибина В в подгруппах пациенток обеих групп не установлено.

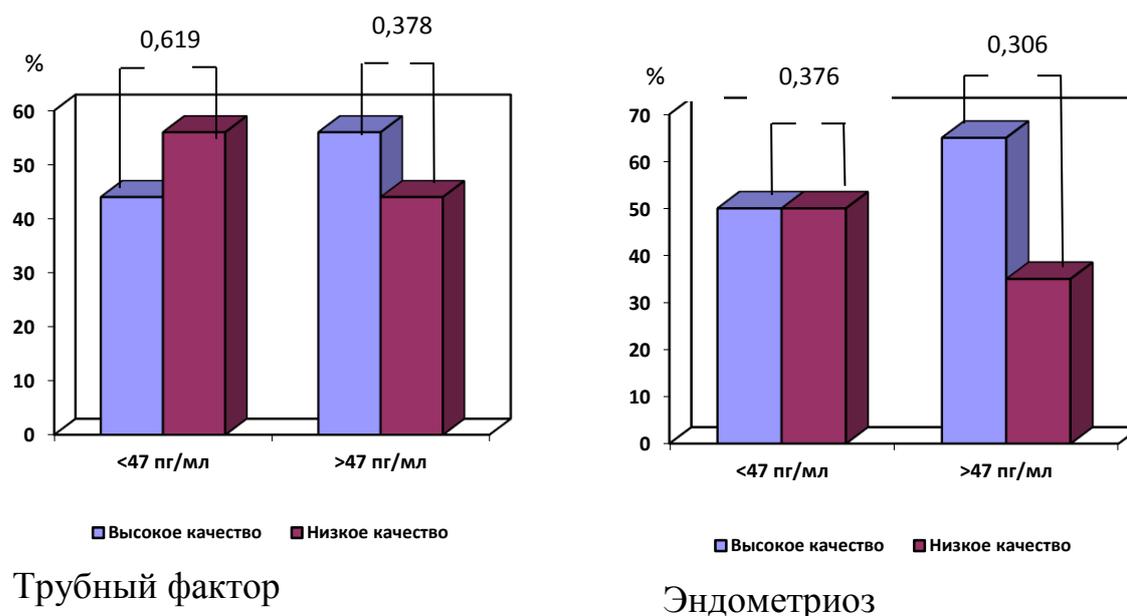


Рис.3.2.2 Частота индивидуальных значений сывороточного содержания ингибина В у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов

Как видно из приведенных результатов, при бесплодии трубного происхождения эмбрионы низкого качества чаще были у пациенток с низкими (менее 1 нг/мл) показателями АМГ (44,4% и 8,3% соответственно, скорректированное ОШ 8,8; 95% ДИ 1,25 – 62,19; $p=0,034$). Достоверной зависимости качества эмбрионов от нормальных и высоких значений АМГ при бесплодии трубного происхождения не отмечено.

Среди пациенток с бесплодием и эндометриозом эмбрионы высокого качества чаще были получены при значениях АМГ более 2,5 нг/мл (42,9%, $p=0,023$). Достоверной зависимости качества эмбрионов от нормальных и низких значений АМГ при бесплодии и эндометриозе не отмечено.

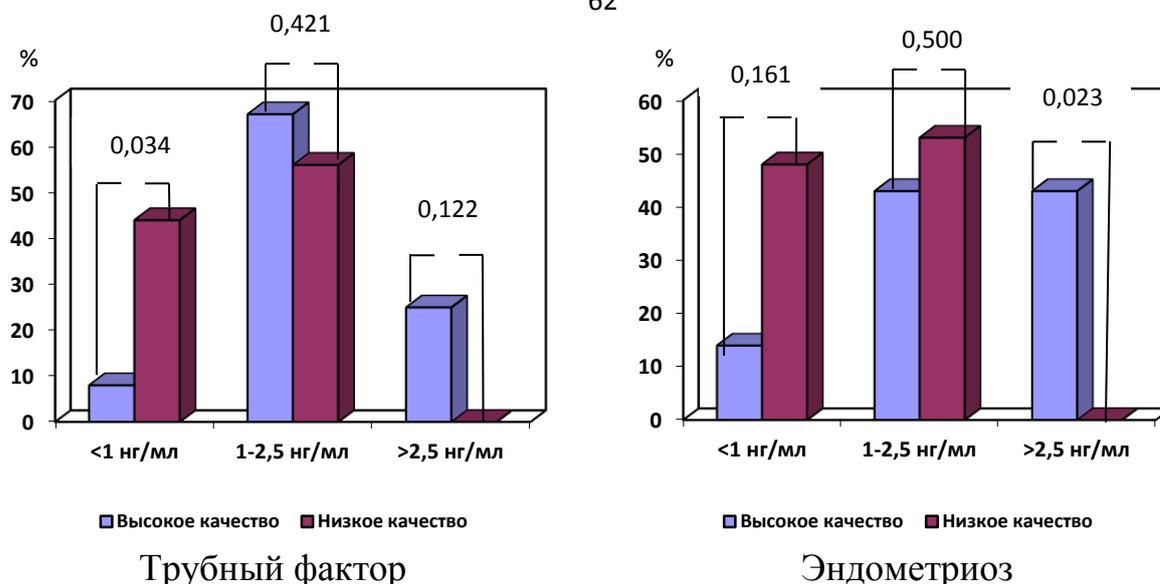


Рис.3.2.1. Частота индивидуальных значений сывороточного содержания АМГ у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов

В таблице 3.2.7 представлены данные, характеризующие взаимосвязь параметров программы ЭКО с качеством эмбрионов. Установлено, что у женщин с бесплодием трубного происхождения толщина эндометрия на день проведения TVP менее 7мм достоверно чаще отмечалась при низком качестве эмбрионов (28,3%), по сравнению с подгруппой женщин с высоким качеством эмбрионов (3,8%, скорректированное ОШ 10,1; 95% ДИ 2,13 – 47,41; $p=0,001$). Как при бесплодии трубного происхождения, так и при бесплодии и эндометриозе получение более 10 ооцитов после TVP чаще отмечалось при получении эмбрионов высокого качества (подгруппа 1а – 52,8%, 1б – 28,3%, скорректированное ОШ 0,4; 95% ДИ 0,15 – 0,81; $p=0,011$; подгруппа 2а – 60,9%, 2б – 27,5%, скорректированное ОШ 0,2; 95% ДИ 0,08 – 0,72; $p=0,010$).

В тех случаях, когда у женщин получено менее 5 ооцитов как в группе с бесплодием трубного происхождения, так и в группе с бесплодием и эндометриозом, отмечалось достоверное повышение частоты эмбрионов низкого качества (1а подгруппа – 18,9%, 1б подгруппа – 52,2%, скорректированное ОШ 4,7; 95% ДИ 1,91– 11,53; $p=0,000$; 2а подгруппа –

26,1%, 2б подгруппа – 60%, скорректированное ОШ 4,3; 95% ДИ 1,38 – 13,09; $p=0,009$).

Получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* было ассоциировано с низким качеством эмбрионов у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом. При наличии этого признака у женщин с бесплодием трубного происхождения высокое качество эмбрионов отмечалось в 13,2% случаев, низкое качество - в 84,8% случаев (скорректированное ОШ 36,7; 95% ДИ 11,81 – 113,5; $p=0,000$).

Таблица 3.2.7

Параметры программы ЭКО (абс.ч.,%)

Группа Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p_1	2а подгруппа (n=23)	2б подгруппа (n=40)	p_2
Толщина эндометрия перед TVP менее 7мм	2(3,8%)	13(28,3%)	0,001	5 (21,7%)	8 (20%)	0,556
	ОШ (95% ДИ) 10,1 (2,13 – 47,41)					
Количество ооцитов: >10	28(52,8%)	13(28,3%)	0,011	14(60,9%)	11(27,5%)	0,010
	ОШ (95% ДИ) 0,4 (0,15-0,81)			ОШ (95% ДИ) 0,2 (0,08-0,72)		
< 5	10(18,9%)	24(52,2%)	0,000	6 (26,1%)	24(60%)	0,009
	ОШ (95% ДИ) 4,7 (1,91-11,53)			ОШ (95% ДИ) 4,3(1,38 – 13,09)		
Количество полученных эмбрионов: <3	7(13,2%)	39(84,8%)	0,000	7 (30,4%)	31 (77,5%)	0,000
	ОШ (95% ДИ) 36,7 (11,81-113,5)			ОШ (95% ДИ) 7,9 (2,48 – 25,05)		
>10	11(20,8%)	0 (0%)	0,000	3 (13%)	2 (5%)	0,252

p_1 – достоверность различий между показателями 1а и 1б подгрупп;

p_2 – достоверность различий между показателями 2а и 2б подгрупп

У женщин с бесплодием и эндометриозом менее 3 эмбрионов получено в 30,4% случаев в подгруппе с высоким качеством эмбрионов и в 77,5% случаев в подгруппе с низким качеством эмбрионов (скорректированное ОШ 7,9; 95% ДИ 2,48 – 25,05; $p=0,000$). В группе женщин с бесплодием трубного происхождения только в подгруппе 1а были выявлены случаи получения более 10 эмбрионов – 20,8%, тогда как в подгруппе 1б таких случаев не отмечалось ($p=0,000$).

В таблице 3.2.8, представлены результаты проведения программы ЭКО.

Таблица 3.2.8

Результаты программы ЭКО (абс.ч.,%)

Группа Показатель	1 группа			2 группа		
	1а подгруппа (n=53)	1б подгруппа (n=46)	p_1	2а подгруппа (n=23)	2а подгруппа (n=40)	p_2
Беременность	36 (67,9%)	3 (6,5%)	0,000	16(69,6%)	0 (0%)	0,000
	ОШ (95% ДИ) 0,03 (0,01-0,12)					
Роды	26 (49,1%)	1 (2,2%)	0,000	15(65,2%)	0 (0%)	0,000
Погибшая беременность	6 (11,3%)	1 (2,2%)	0,081	1 (4,3%)	0 (0%)	0,365
Самопроизвольный выкидыш	1 (1,9%)	0 (0%)	0,535	0 (0%)	0 (0%)	
Трубная беременность	1 (1,9%)	1 (2,2%)	0,716	0 (0%)	0 (0%)	
Анэмбриония	2 (3,8%)	0 (0%)	0,290	0 (0%)	0 (0%)	

p_1 – достоверность различий между показателями 1а и 1б подгрупп;

p_2 – достоверность различий между показателями 2а и 2б подгрупп

Как видно из таблицы 3.2.8. беременность наступила у 36(67,9%) женщин с бесплодием трубного происхождения в подгруппе с эмбрионами высокого качества и у 3(6,5%) женщин в подгруппе с эмбрионами низкого качества и эти отличия были достоверны (скорректированное ОШ 0,03; 95% ДИ 0,01-0,12; $p=0,000$). При бесплодии и эндометриозе беременность наступила у 16(69,6%) женщин только в подгруппе с эмбрионами высокого качества ($p=0,000$).

Родами закончились беременности у 26(49,1%) женщин подгруппы 1а, у 1(2,2%) женщины подгруппы 1б и у 15(65,2%) женщин подгруппы 2а и эти отличия были достоверны ($p=0,000$).

Таким образом, нами выявлена взаимосвязь между рядом показателей и получением эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО, причем эта связь имела свои особенности при бесплодии трубного происхождения и при бесплодии и эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины. У женщин с бесплодием трубного происхождения повышают шанс получения эмбрионов низкого качества следующие факторы: возраст старше 38 лет (в 5,4 раза), хронический эндометрит (в 7,1 раза), наличие ИППП в анамнезе (в 4 раза), повышенный уровень ФСГ - более 10 мЕд/л (в 9,3 раза), уровень АМГ менее 1 нг/мл (в 8,8 раза), объем яичников менее 8 см³ (в 3 раза), толщина эндометрия менее 7мм (в 10,1 раз), забор менее 5 ооцитов при TVP (в 4,7 раза), получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (в 36,7 раз).

Снижен шанс получения эмбрионов низкого качества у пациенток с бесплодием трубного происхождения, находящихся в возрасте от 31 до 37 лет, с нормальным уровнем (менее 10 мЕд/л) ФСГ, а также в тех случаях, когда при TVP было получено более 10 ооцитов.

У женщин с бесплодием и эндометриозом повышают шанс получения эмбрионов низкого качества: гиперплазия эндометрия в анамнезе (в 8,3 раз), оперативные вмешательства на яичниках (в 3, 1 раза), получение менее 5 ооцитов при TVP (в 4,3 раза) и менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (в 7,9 раз).

Наличие в анамнезе хотя бы одной попытки ЭКО и получение более 10 ооцитов при TVP, напротив, снижают шанс получения эмбрионов низкого качества в результате проведения программы ЭКО у женщин с бесплодием и эндометриозом.

Как при бесплодии трубного происхождения, так и при бесплодии и эндометриозе, получение эмбрионов высокого качества ассоциировано с наступлением беременности, а получение эмбрионов низкого качества - с отсутствием беременности в результате проведения программы ЭКО.

Глава 4. ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ХЕМОКИНОВ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ ТРУБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ С КАЧЕСТВОМ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭКО

4.1. Особенности системной продукции хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов

Для уточнения иммунных механизмов, участвующих в нарушении репродуктивной функции у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом, нами был проведен сравнительный анализ содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием и здоровых женщин с доказанной фертильностью (контрольная группа).

Как видно из данных, приведенных в таблице 4.1.1, в периферической крови женщин с бесплодием трубного происхождения уровень MCP-1 был значительно повышен по сравнению с аналогичным показателем группы контроля ($p=0,038$), в то время как содержание RANTES было снижено в этой группе по сравнению с группой здоровых женщин ($p=0,033$). Сывороточные уровни IL-8 у женщин с бесплодием трубного происхождения и у фертильных женщин достоверно не различались между собой.

Оценка системной продукции хемокинов у женщин с бесплодием и эндометриозом (таблица 4.1.1) показала, что эта группа характеризовалась статистически значимым снижением сывороточного содержания RANTES по сравнению с контрольной группой ($p=0,014$). Достоверных различий в сывороточном уровне MCP-1 и IL-8 в группе женщин с бесплодием и эндометриозом и в контрольной группе нами выявлено не было, однако хотелось бы отметить выраженную тенденцию к повышению содержания IL-8 у женщин с бесплодием и эндометриозом.

Таблица 4.1.1

Характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе и здоровых фертильных женщин (M±m)

Показатель, пг/мл	Контроль (n=10)	1 группа (n=34)	p ₁	2 группа (n=39)	p ₂	p ₃
IL-8	12,25±12,24	10,81±2,12	0,093	21,83±9,67	0,091	0,899
MCP-1	219,19± 22,35	286,33± 16,75	0,038	237,73±17,72	0,839	0,019
RANTES	41002,60± 3468,76	34628,38± 2482,53	0,033	31223,06± 2278,60	0,014	0,863

p₁ - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1 группы;

p₂ – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2 группы;

p₃– достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Мы провели сравнительный анализ сывороточного содержания хемокинов в двух основных группах наблюдения (рис. 4.1.1.) и выявили, что продукция MCP-1 у женщин с бесплодием и эндометриозом была достоверно снижена по сравнению с таковой у пациенток с бесплодием трубного происхождения (p=0,019). Сывороточные уровни IL-8 и RANTES у пациенток двух групп наблюдения достоверно не различались между собой.

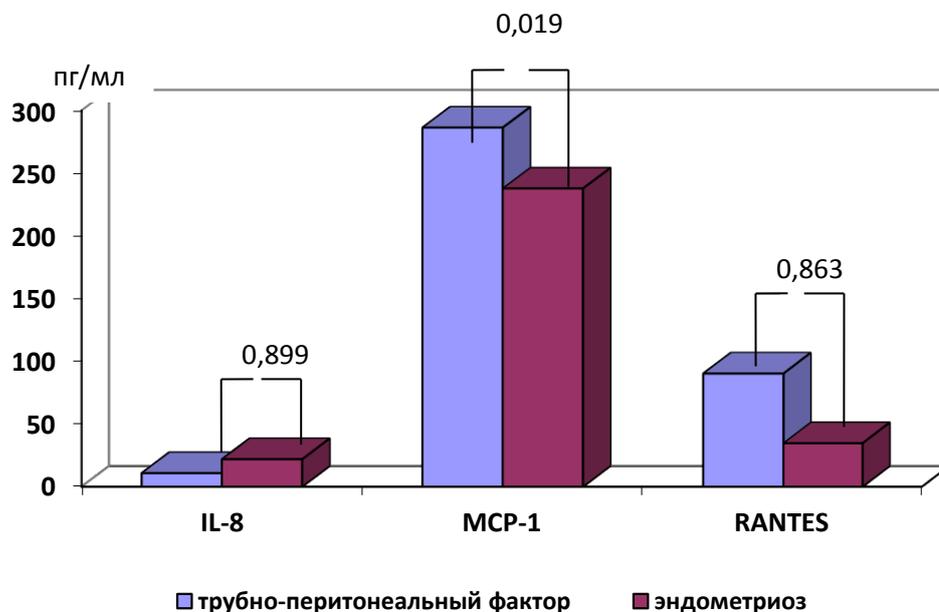


Рис.4.1.1 Сравнительная характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом

Известно, что хемокины вырабатываются различными типами клеток, но наиболее активно их продуцируют фагоциты [94]. Для уточнения характера системной продукции хемокинов при бесплодии различной этиологии мы изучили особенности внутриклеточной продукции одного из хемокинов – IL-8 моноцитами пациенток с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом (таблица 4.1.2). Анализ полученных результатов показал, что в периферической крови пациенток с бесплодием трубного происхождения содержание IL-8-позитивных моноцитов достоверно не отличалось от такового в группе здоровых женщин ($p=0,124$). У женщин с бесплодием и эндометриозом отмечалось достоверное повышение количества моноцитов, продуцирующих внутриклеточно IL-8 как по сравнению с группой контроля ($p=0,018$), а также по сравнению с группой женщин с бесплодием трубного происхождения ($p=0,016$) (рис. 4.1.2.).

Таблица 4.1.2

Характеристика внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе и здоровых фертильных женщин ($M \pm m$)

Показатель, %	Контроль (n=10)	1 группа (n=23)	p_1	2 группа (n=13)	p_2	p_3
IL-8+	46,18±5,16	55,88±1,72	0,124	63,56±2,42	0,018	0,016

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1 группы;

p_2 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2 группы;

p_3 – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

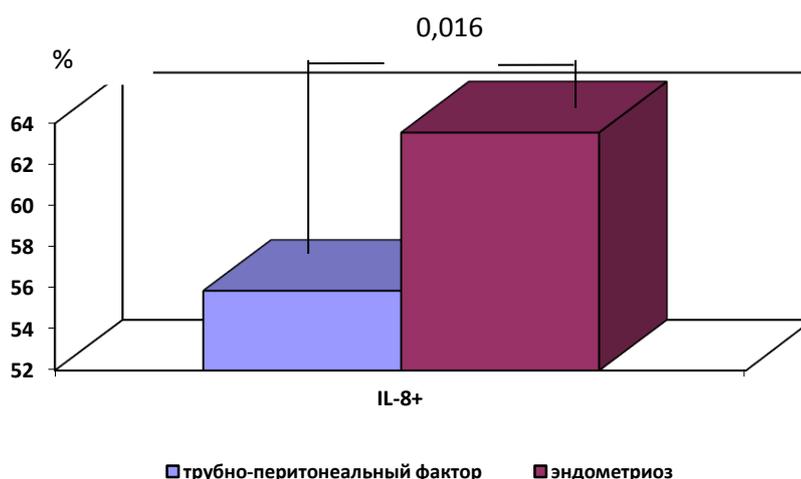


Рис. 4.1.2. Сравнительная характеристика внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом

На следующем этапе нашего исследования мы оценили наличие взаимосвязи между характером системной продукции хемокинов у пациенток обеих групп наблюдения и качеством полученных при проведении программы ЭКО эмбрионов. В таблице 4.1.3 представлены данные, характеризующие сывороточное содержание хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества эмбрионов.

Уровень MCP-1 в сыворотке крови женщин с бесплодием трубного происхождения, у которых были получены эмбрионы высокого качества, был достоверно повышен по сравнению с группой здоровых женщин ($p=0,018$), тогда как показатели сывороточного содержания IL-8 и RANTES в этой подгруппе пациенток не отличались от показателей контрольной группы. Содержание RANTES у пациенток с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами низкого качества было достоверно снижено по сравнению с группой здоровых женщин ($p=0,019$). Содержание IL-8 и MCP-1 в этой подгруппе достоверно не отличалось от группы контроля. Проведение сравнительного анализа показателей сывороточного содержания хемокинов у пациенток 1а и 1б подгрупп не выявило каких-либо достоверных различий.

Таблица 4.1.3

Сравнительная характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель, пг/мл	Контроль (n=10)	1а подгруппа (n=16)	p_1	1б подгруппа (n=18)	p_2	p_3
IL-8	12,25± 12,24	13,33± 4,08	0,083	8,56± 1,67	0,157	0,654
MCP-1	219,19± 22,35	308,21± 27,13	0,018	265,75± 19,62	0,175	0,195
RANTES	41002,6± 3468,76	39416,54± 3643,51	0,121	31379,44± 2449,13	0,019	0,215

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1а подгруппы;

p_2 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1б подгруппы;

p_3 – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

Как видно из таблицы 4.1.4, внутриклеточная продукция IL-8 моноцитами женщин с бесплодием трубного происхождения при получении эмбрионов низкого качества достоверно повышена по сравнению с группой здоровых женщин ($p=0,050$). Различий в содержании IL-8+ моноцитов в подгруппе

пациенток с эмбрионами высокого качества и в контрольной группе нами не выявлено.

Таблица 4.1.4

Сравнительная характеристика внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, %	Контроль (n=6)	1а подгруппа (n=8)	p ₁	1б подгруппа (n=15)	p ₂	p ₃
IL-8+	46,18±5,16	51,54±2,86	0,391	58,77±1,78	0,050	0,052

p₁ - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1а подгруппы;

p₂ – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1б подгруппы;

p₃– достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

При оценке содержания хемокинов в сыворотке крови женщин с бесплодием и эндометриозом (таблица 4.1.5), у которых были получены эмбрионы высокого качества, установлено, что отличительной чертой данной подгруппы является сниженное содержание RANTES (p=0,023).

Таблица 4.1.5

Сравнительная характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, пг/мл	Контроль (n=10)	2а подгруппа (n=16)	p ₁	2б подгруппа (n=23)	p ₂	p ₃
IL-8	12,25±12,24	15,93±4,91	0,061	25,85±16,02	0,170	0,421
MCP-1	219,19± 22,35	214,32± 13,34	0,562	418,70± 204,77	0,903	0,535
RANTES	41002,6± 68,76	31384,47± 3912,51	0,023	31117,61± 2841,21	0,028	0,858

p₁ - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2а подгруппы;

p₂ – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2б подгруппы;

p₃– достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

При этом уровень IL-8 и MCP-1 в данной подгруппе значительно не отличался. У женщин с эмбрионами низкого качества при бесплодии и эндометриозе содержание RANTES достоверно снижено ($p=0,028$). Между собой пациентки подгрупп 2а и 2б по анализируемым показателям значимо не различались.

При оценке внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества эмбрионов (таблица 4.1.6) выявлено, что в подгруппе пациенток с эмбрионами низкого качества относительное содержание IL-8+ моноцитов достоверно повышено ($p=0,016$). В подгруппе женщин с эмбрионами высокого качества значительных изменений внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами по сравнению с подгруппой пациенток, у которых были получены эмбрионы низкого качества, выявлено не было.

Таблица 4.1.6

Сравнительная характеристика внутриклеточной продукции IL-8 моноцитами женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель, %	Контроль (n=6)	2а подгруппа (n=3)	p_1	2б подгруппа (n=11)	p_2	p_3
IL-8+	46,18±5,16	54,87±7,29	0,384	64,04±2,70	0,016	0,335

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2а подгруппы;

p_2 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2б подгруппы;

p_3 – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Таким образом, женщины с бесплодием трубного происхождения отличались от группы фертильных женщин более высоким сывороточным содержанием MCP-1 и низким – RANTES. При этом получение в результате программы ЭКО эмбрионов высокого качества у женщин этой группы было ассоциировано с высоким содержанием MCP-1, а получение эмбрионов

низкого качества – с низким уровнем RANTES и высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами. Пациентки с бесплодием и эндометриозом отличались от женщин контрольной группы сниженным сывороточным содержанием RANTES и высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами, при этом повышение содержания в крови IL-8+ моноцитов было характерно для пациенток с эмбрионами низкого качества.

4.2. Особенности локальной продукции хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов

Известно, что процесс созревания ооцитов во многом зависит от микроокружения, в котором находится яйцеклетка [135]. По данным литературы ведущую роль в регуляции различных этапов созревания ооцитов играют различные цитокины и факторы роста [31]. Исходя из этих данных, можно предположить, что особенности содержания хемокинов в фолликулярной жидкости могут быть непосредственно связаны с качеством эмбрионов, полученных впоследствии при проведении ЭКО, поскольку доказано непосредственно участие хемокинов в регуляции оогенеза.

Для подтверждения этого предположения нами был проведен анализ содержания хемокинов в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием различной этиологии в зависимости от качества полученных эмбрионов. При сравнении содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин обеих групп наблюдения мы не выявили каких-либо достоверных различий между пациентками с бесплодием трубного происхождения и пациентками с бесплодием и эндометриозом (таблица 4.2.1). Однако в группе женщин с бесплодием и эндометриозом отмечалась выраженная тенденция к снижению уровня RANTES в фолликулярной жидкости по сравнению с группой пациенток с бесплодием трубного происхождения. Хотелось бы также отметить, что оценка спектра продукции

изучаемых цитокинов в группах показала, что у женщин с бесплодием трубного происхождения в фолликулярной жидкости доминировала продукция RANTES, а у пациенток с бесплодием и эндометриозом в максимальной степени определялся MCP-1, тогда как уровень RANTES был минимальным среди изученных цитокинов.

Таблица 4.2.1

Характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе (M±m)

Показатель, пг/мл	1 группа (n=30)	2 группа (n=23)	p
IL-8	166,55±21,48	135,60±23,88	0,212
MCP-1	398,90±28,50	365,42±28,63	0,394
RANTES	568,89±203,09	95,36±83,14	0,197

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Внутриклеточная продукция IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения не отличалась от аналогичного показателя в группе женщин с бесплодием и эндометриозом (таблица 4.2.2).

Таблица 4.2.2

Характеристика внутриклеточной продукции IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе (M±m)

Показатель, %	1 группа (n=30)	2 группа (n=23)	p
IL-8+	54,12±2,91	55,92±2,65	0,651

p – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Для уточнения характера иммунорегуляции на системном и локальном уровнях при бесплодии различной этиологии мы провели сравнительный анализ содержания хемокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости

женщин 1 и 2 групп наблюдения (таблица 4.2.3). Было установлено, что в обеих группах женщин с бесплодием в фолликулярной жидкости был резко, более чем в 10 раз, повышен уровень IL-8 по сравнению с сывороточным его содержанием ($p=0,000$ в обоих случаях). Содержание MCP-1 в фолликулярной жидкости также было выше такового в крови как у женщин с бесплодием трубного происхождения, так и у пациенток с бесплодием и эндометриозом ($p=0,001$ и $p=0,000$, соответственно). Однако локальный уровень MCP-1 превосходил системный не более чем в 1,5-2 раза и это повышение было менее выражено, чем для IL-8.

Таблица 4.2.3

Сравнительная характеристика содержания и продукции хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе ($M\pm m$)

Показатель, пг/мл	1 группа (n=30)		p_1	2 группа (n=23)		p_2
	Кровь	Фолликулярная жидкость		Кровь	Фолликулярная жидкость	
IL-8, пг/мл	10,81±2,12	166,55±21,48	0,000	21,83±9,67	135,60±23,88	0,000
MCP-1, пг/мл	286,33±16,75	398,90±28,50	0,001	237,73±17,72	365,42±28,63	0,000
RANTES, пг/мл	34628,38±2482,53	568,89±203,09	0,000	31967,34±2340,88	95,36±83,14	0,000
IL-8+, %	55,88±1,72	54,12±2,91	0,607	63,56±2,42	55,92±2,65	0,042

p_1 - достоверность различий между показателями крови и фолликулярной жидкости женщин 1 группы;

p_2 - достоверность различий между показателями крови и фолликулярной жидкости женщин 2 группы

Содержание RANTES в фолликулярной жидкости было снижено по сравнению с его сывороточным уровнем у пациенток обеих групп наблюдения ($p=0,000$ в обоих случаях). Внутриклеточная продукция IL-8

моноцитами крови и макрофагами фолликулярной жидкости не различалась при бесплодии трубного происхождения, тогда как при бесплодии и эндометриозе внутриклеточная продукция IL-8 моноцитами достоверно превышала выработку этого хемокина макрофагами фолликулярной жидкости ($p=0,042$).

Данные, характеризующие локальную продукцию хемокинов у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов, представлены в таблице 4.2.4.

Таблица 4.2.4

Характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель, пг/мл	1а подгруппа (n=16)	1б подгруппа (n=14)	p
IL-8	143,60±25,10	192,79±35,71	0,299
MCP-1	409,91±34,49	386,32±47,87	0,228
RANTES	771,05±216,80	326,67±216,80	0,129

p – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

Анализ результатов показал, что содержание IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами низкого качества достоверно не отличалось от аналогичных параметров у пациенток с эмбрионами высокого качества. Следует отметить лишь выраженную тенденцию к снижению уровня RANTES в подгруппе пациенток с эмбрионами низкого качества.

Данные, характеризующие внутриклеточную продукцию IL-8 фолликулярными макрофагами у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов, представлены в таблице 4.2.5.

Таблица 4.2.5

Характеристика внутриклеточной продукции IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, %	1а подгруппа (n=12)	1б подгруппа (n=15)	p
IL-8+	53,50±4,45	54,62±3,98	0,853

p – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

Как видно из таблицы 4.2.5 внутриклеточная продукция IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости в группе женщин с бесплодием трубного происхождения не зависела от качества полученных эмбрионов.

При изучении зависимости содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом от качества полученных эмбрионов статистически значимых различий во всех случаях выявлено не было (таблица 4.2.6).

Таблица 4.2.6

Характеристика содержания хемокинов IL-8, MCP-1 и RANTES в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, пг/мл	2а подгруппа (n=8)	2б подгруппа (n=15)	p
IL-8	118,56±23,11	144,68±34,84	0,949
MCP-1	415,47±51,38	338,73±33,53	0,245
RANTES	21,92±21,92	197,27±131,08	0,726

p – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Оценка внутриклеточной продукции хемокина IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием и эндометриозом не выявила достоверных различий по этому показателю у женщин с эмбрионами высокого и низкого качества, хотя следует отметить выраженную тенденцию к увеличению содержания IL-8+ макрофагов в фолликулярной жидкости пациенток, у которых были получены эмбрионы низкого качества (таблица 4.2.7).

Таблица 4.2.7

Характеристика внутриклеточной продукции IL-8 макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, %	2а подгруппа (n=4)	2б подгруппа (n=13)	p
IL-8+	49,30±5,22	57,95±2,94	0,207

p – достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Таким образом, вне зависимости от этиологии бесплодия в фолликулярной жидкости женщин обследованных групп по сравнению с сывороткой крови резко повышено содержание IL-8 и увеличена концентрация MCP-1 при сниженном уровне RANTES. Только у женщин с бесплодием и эндометриозом была выявлена сниженная внутриклеточная продукция IL-8 макрофагами на локальном уровне по сравнению с таковой моноцитами на системном уровне. Достоверных различий в содержании хемокинов в фолликулярной жидкости и внутриклеточной продукции IL-8 макрофагами в группах пациенток с бесплодием трубного происхождения и пациенток с бесплодием и эндометриозом, а также зависимости этих параметров от качества полученных эмбрионов выявлено не было.

Глава 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАГОЦИТОВ КРОВИ И Фолликулярной жидкости Женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе с качеством эмбрионов, полученных при проведении программы ЭКО

5.1. Особенности функционального состояния моноцитов на системном уровне у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов

Известно, что успех осуществления репродуктивной функции, как на локальном, так и на системном уровнях во многом определяется состоянием иммунной системы [63]. В частности, показано, что нарушение функции фагоцитов может быть связано с развитием бесплодия. В связи с этим нами был произведен анализ функционального состояния моноцитов крови и макрофагов фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом, а также проведена оценка зависимости качества эмбрионов, полученных в ходе программы ЭКО, от характера активации фагоцитов.

Данные, характеризующие особенности экспрессии ряда функциональных молекул, участвующих в осуществлении различных этапов фагоцитоза, на поверхности моноцитов крови женщин основных клинических групп и здоровых фертильных женщин, представлены в таблице 5.1.1. Как видно из приведенных результатов, уровень экспрессии CD16 молекул моноцитами в группе женщин с бесплодием трубного происхождения был значительно ниже соответствующего показателя в группе фертильных женщин ($p=0,000$), а количество CD86⁺ моноцитов у женщин этой же группы было достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,051$). При сравнении относительного содержания HLA-DR⁺, CD11b⁺, CD49e⁺ моноцитов в группах здоровых женщин и пациенток с

бесплодием трубного происхождения достоверных отличий выявлено не было.

У женщин с бесплодием и эндометриозом относительное содержание HLA-DR+, CD16+, CD49e+ моноцитов было достоверно снижено ($p=0,007$, $p=0,002$ и $p=0,012$, соответственно), а количество CD86+ моноцитов - значительно повышено ($p=0,004$) по сравнению с аналогичными показателями фертильных женщин. Нами не было найдено различий в содержании моноцитов с фенотипом CD11b+ у женщин с эндометриозом и у женщин контрольной группы.

Таблица 5.1.1

Характеристика экспрессии функциональных молекул моноцитами крови женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе и здоровых фертильных женщин ($M \pm m$)

Показатель, %	Контроль (n=24)	1 группа (n=26)	p_1	2 группа (n=19)	p_2	p_3
HLA-DR+	70,38±1,57	66,55±3,40	0,319	59,24±3,47	0,007	0,142
CD16+	60,69±1,59	49,89±2,21	0,000	50,43±2,49	0,002	0,872
CD11b+	66,07±2,21	61,05±3,38	0,228	59,95±2,76	0,095	0,803
CD49e+	63,39±3,59	62,64±2,18	0,861	50,91±2,50	0,012	0,002
CD86+	41,20±5,80	56,85±4,02	0,051	67,79±2,12	0,004	0,029

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1 группы;

p_2 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2 группы;

p_3 – достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

Сравнительный анализ фенотипического профиля моноцитов в обеих группах показал (рис. 5.1.1), что у пациенток с бесплодием и эндометриозом количество CD49e+ было снижено по сравнению с показателем в группе женщин с бесплодием трубного происхождения ($p=0,002$), а уровень CD86+ моноцитов – напротив, превышал аналогичный показатель у женщин с бесплодием трубного происхождения ($p=0,029$). Содержание HLA-DR+,

CD16+, CD11b+ моноцитов в двух клинических группах было аналогичным (рис. 5.1.1).

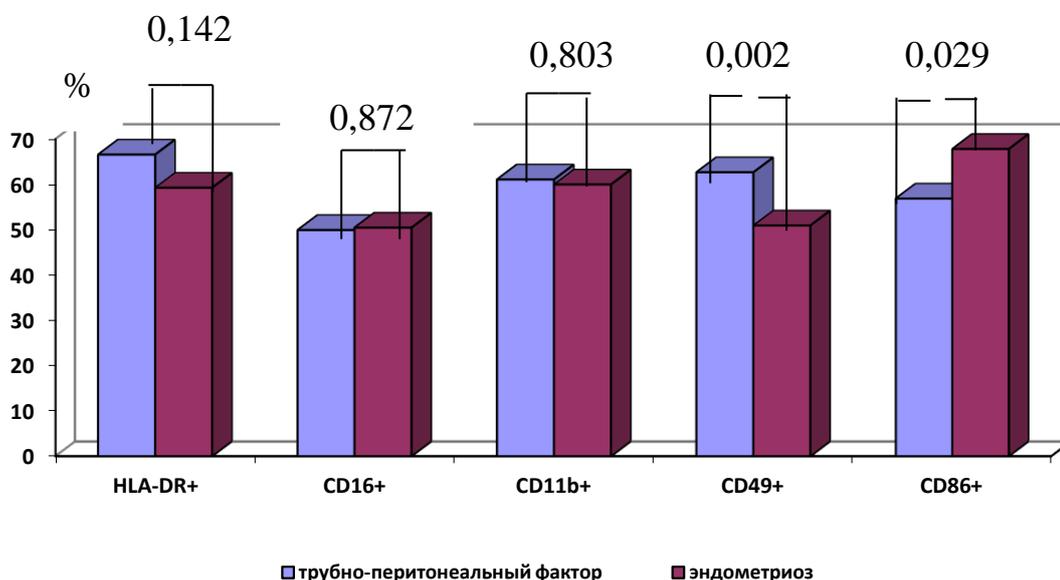


Рис.5.1.1 Сравнительная характеристика экспрессии функциональных молекул моноцитами крови женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом

В таблице 5.1.2 представлены данные, характеризующие фенотипический профиль моноцитов крови женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества эмбрионов. Нами было выявлено, что уровень экспрессии CD16 молекул моноцитами в группе женщин с бесплодием трубного происхождения был ниже при получении эмбрионов как высокого, так и низкого качества ($p=0,000$, $p=0,048$, соответственно). В подгруппе женщин с получением эмбрионов низкого качества было выявлено снижение содержания CD11b+ моноцитов и повышение уровня CD86+ моноцитов ($p=0,015$, $p=0,027$, соответственно). Проведение сравнительного анализа фенотипического профиля моноцитов в двух подгруппах пациенток с бесплодием трубного происхождения показало, что у пациенток с эмбрионами низкого качества отмечалось более высокое содержание CD16-позитивных моноцитов и сниженное количество CD11b+ моноцитов по сравнению с женщинами, у которых при проведении

программы ЭКО были получены эмбрионы высокого качества ($p=0,030$, $p=0,013$, соответственно).

Таблица 5.1.2

Сравнительная характеристика экспрессии функциональных молекул моноцитами крови женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель, %	Контроль (n=10)	1а подгруппа (n=11)	p_1	1б подгруппа (n=15)	p_2	p_3
HLA-DR+	70,38±1,57	71,22±5,61	0,890	64,01±4,27	0,186	0,329
CD16+	60,69±1,59	44,49±2,87	0,000	53,85±2,85	0,048	0,030
CD11b+	66,07±2,21	70,24±3,90	0,383	54,49±3,38	0,015	0,013
CD49e+	63,39±3,59	63,42±2,74	0,995	61,87±3,61	0,770	0,740
CD86+	41,20±5,80	51,90±6,46	0,250	60,98±4,89	0,027	0,295

p_1 - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1а подгруппы;

p_2 – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 1б подгруппы;

p_3 – достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

Данные сравнительного анализа фенотипического профиля моноцитов пациенток с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов представлены в таблице 5.1.3. Нами выявлено, что в случаях получения эмбрионов как высокого, так и низкого качества у женщин с бесплодием и эндометриозом в периферической крови снижено содержание CD16+ моноцитов ($p=0,006$, $p=0,046$, соответственно), но повышен уровень CD86+ клеток ($p=0,002$, $p=0,006$, соответственно). Отличительной характеристикой подгруппы женщин с бесплодием и эндометриозом с эмбрионами низкого качества, являлся более низкий уровень HLA-DR+, CD11b+ и CD49e+ моноцитов ($p=0,000$, $p=0,013$, $p=0,014$, соответственно). Подгруппу пациенток с бесплодием и эндометриозом с эмбрионами низкого качества отличало от подгруппы женщин с эмбрионами высокого качества, более низкое содержание HLA-DR+ и CD11b+ моноцитов ($p=0,001$, $p=0,026$, соответственно).

Таблица 5.1.3

Сравнительная характеристика экспрессии функциональных молекул моноцитами крови женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель, %	Контроль (n=10)	2а подгруппа (n=10)	p ₁	2б подгруппа (n=14)	p ₂	p ₃
HLA-DR+	70,38±1,57	71,01±2,85	0,849	50,68±3,99	0,000	0,001
CD16+	60,69±1,59	49,86±2,73	0,006	50,88±4,04	0,046	0,837
CD11b+	66,07±2,21	63,67±2,87	0,516	50,65±3,64	0,013	0,026
CD49e+	63,39±3,59	57,88±5,26	0,413	49,20±3,44	0,014	0,209
CD86+	41,20±5,80	70,79±3,19	0,002	65,46±2,75	0,006	0,228

p₁ - достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2а подгруппы;

p₂ – достоверность различий между показателями здоровых фертильных женщин и пациенток 2б подгруппы;

p₃– достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Заслуживает особого внимания выявленный нами факт взаимосвязи между низкими значениями показателя HLA-DR+ моноцитов и получением эмбрионов низкого качества, который наиболее ярко проявился в группе женщин с бесплодием и эндометриозом, хотя и у пациенток с бесплодием трубного происхождения также прослеживалась эта закономерность. Мы предположили, что показатель относительного содержания в крови HLA-DR+ моноцитов можно использовать в качестве критерия для прогнозирования качества эмбрионов, которые будут получены у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом в результате программы ЭКО. Для проверки этого предположения мы провели ретроспективный анализ экспрессии HLA-DR молекул моноцитами крови у 35 женщин с бесплодием, из них у 17 женщин с бесплодием трубного происхождения и у 18 женщин с бесплодием и

эндометриозом. У 13 женщин из обследованных 35 пациенток содержание HLA-DR+ моноцитов было равным или большим 68%, и при ретроспективном обследовании было установлено, что впоследствии у 10 из этих пациенток при проведении программы ЭКО были получены эмбрионы высокого качества. У 3 человек при таких же показателях получения эмбрионов высокого качества не произошло. У 22 женщин из обследованных 35 пациенток содержание HLA-DR+ моноцитов было ниже 68%. При ретроспективном обследовании было установлено, что при проведении программы ЭКО у 18 женщин были получены эмбрионы низкого качества, а у 4 пациенток при таких же показателях получения эмбрионов низкого качества не произошло. Таким образом, при значении относительного содержания HLA-DR+ моноцитов, равном 68% и более можно прогнозировать получение эмбрионов высокого качества в результате проведения программы ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом. Точность прогнозирования получения эмбрионов высокого качества по нашим данным составляет 80%, чувствительность – 71,4% , специфичность – 85,7% (рис.5.1.2). На основании полученных данных нами был разработан «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием» (Патент №2441243 от 27.01.2012г.). Способ можно использовать в практической работе специализированных центров при лечении женщин с бесплодием с помощью вспомогательных репродуктивных технологий.

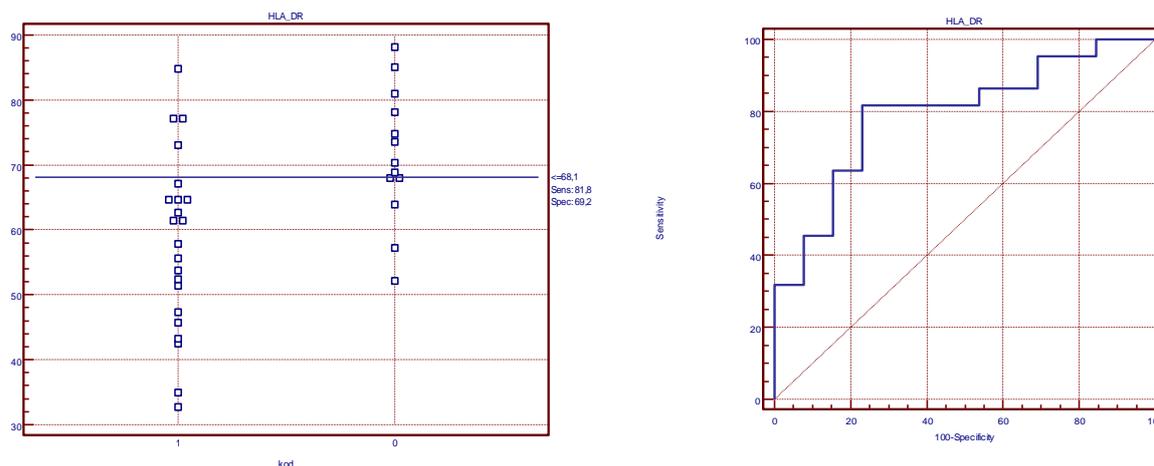


Рис. 5.1.2 ROC - анализ показателей, характеризующих содержание HLA-DR⁺ моноцитов в крови женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом, в зависимости от качества полученных эмбрионов

Таким образом, группу женщин с бесплодием трубного происхождения отличало от группы здоровых женщин более низкое содержание в крови CD16⁺ моноцитов и высокий уровень CD86⁺ моноцитов. Для подгруппы пациенток с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами низкого качества характерно сниженное содержание CD11b⁺ моноцитов, а у женщин с эмбрионами высокого качества отмечались минимальные значения показателя CD16⁺ моноцитов. Группу женщин с бесплодием и эндометриозом отличало от группы здоровых женщин достоверное снижение экспрессии на поверхности моноцитов HLA-DR, CD16 и CD49e молекул и повышенная экспрессия CD86 молекул. Дифференцированный анализ данных в зависимости от качества полученных эмбрионов показал, что у пациенток с бесплодием и эндометриозом с эмбрионами высокого качества отмечались минимальные изменения функционального состояния моноцитов, проявляющиеся в снижении уровня CD16⁺ клеток и повышении количества CD86⁺ моноцитов, тогда как у пациенток с эмбрионами низкого качества были дополнительно снижено содержание HLA-DR⁺, CD11b⁺ и CD49e⁺ моноцитов. Определение относительного содержания HLA-DR⁺ моноцитов позволяет прогнозировать получение эмбрионов высокого

качества в результате проведения программы ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом.

5.2. Характеристика функционального состояния макрофагов фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе в зависимости от качества полученных эмбрионов.

При сравнении функционального состояния макрофагов фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом (таблица 5.2.1) нами было установлено достоверное снижение содержания CD49e+ макрофагов ($p=0,023$) у женщин с бесплодием и эндометриозом, а количество CD16+, CD11b+ и CD86+ макрофагов значительно повышалось по сравнению с аналогичными показателями в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения ($p=0,015$, $p=0,008$ и $p=0,013$, соответственно). Нами не было найдено различий в содержании макрофагов с фенотипом HLA-DR+ у женщин с бесплодием и эндометриозом и у женщин с бесплодием трубного происхождения.

Таблица 5.2.1

Характеристика экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе ($M \pm m$)

Показатель, %	1 группа (n=30)	2 группа (n=19)	p
HLA-DR+	61,70±2,42	56,12±2,65	0,129
CD16+	44,65±2,12	54,88±3,33	0,015
CD11b+	49,83±3,09	61,26±2,67	0,008
CD49e+	63,88±2,98	52,98±3,38	0,023
CD86+	36,17±3,57	48,61±2,74	0,013

p– достоверность различий между показателями женщин 1 и 2 групп

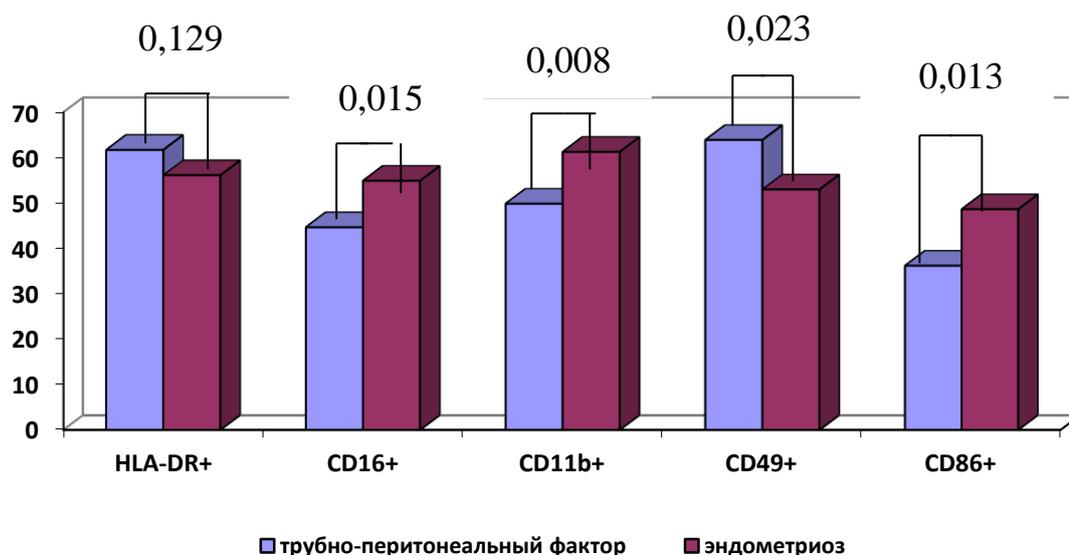


Рис.5.1.3 Сравнительная характеристика экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом

Изучая экспрессию функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов (таблица 5.2.2), нами было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии CD86 молекул макрофагами в подгруппе с эмбрионами низкого качества по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе с эмбрионами высокого качества ($p=0,040$).

Таблица 5.2.2

Характеристика экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов ($M \pm m$)

Показатель, %	1а подгруппа (n=18)	1б подгруппа (n=12)	p
HLA-DR+	60,61±2,82	63,17±4,36	0,628
CD16+	43,42±3,01	46,51±2,84	0,461
CD11b+	48,28±3,14	53,11±7,22	0,553
CD49e+	62,74±3,88	65,01±4,75	0,717
CD86+	44,80±4,56	29,23±4,38	0,040

p– достоверность различий между показателями женщин 1а и 1б подгрупп

Содержание макрофагов с фенотипами HLA-DR+, CD16+, CD11b+ и CD49e+ значительно не изменялось у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от качества полученных эмбрионов при проведении программы ЭКО (таблица 5.2.2).

Данные сравнительного анализа фенотипического профиля макрофагов пациенток с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов представлены в таблице 5.2.3. Нами выявлено, что у женщин с бесплодием и эндометриозом с эмбрионами низкого качества в фолликулярной жидкости было снижено содержание HLA-DR+ макрофагов ($p=0,050$), по сравнению с подгруппой женщин с эмбрионами высокого качества. Экспрессия других изученных функциональных молекул макрофагами пациенток с бесплодием и эндометриозом, у которых были получены эмбрионы высокого качества, не отличалась от аналогичных показателей пациенток, у которых были получены эмбрионы низкого качества при проведении ЭКО.

Таблица 5.2.3

Характеристика экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом в зависимости от качества полученных эмбрионов (M±m)

Показатель,%	2а подгруппа (n=11)	2б подгруппа (n=11)	p
HLA-DR+	61,23±3,34	51,01±3,38	0,050
CD16+	53,86±4,99	55,78±4,72	0,784
CD11b+	61,48±3,48	60,65±3,69	0,874
CD49e+	52,45±5,44	53,38±4,61	0,899
CD86+	46,70±3,72	49,99±3,98	0,553

p– достоверность различий между показателями женщин 2а и 2б подгрупп

Таким образом, группу женщин с бесплодием и эндометриозом отличало от группы женщин с бесплодием трубного происхождения более высокое содержание CD16+, CD11b+, CD86+ макрофагов в фолликулярной жидкости и низкий уровень CD49e+ макрофагов. Для подгруппы пациенток с

бесплодием трубного происхождения и эмбрионами низкого качества было характерно сниженное содержание CD86+ макрофагов. Женщин с бесплодием и эндометриозом с эмбрионами низкого качества отличало от пациенток с эмбрионами высокого качества при проведении программы ЭКО наличие сниженного уровня экспрессии HLA-DR молекул макрофагами фолликулярной жидкости.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы получили широкое распространение методы ВРТ, в том числе и ЭКО для лечения бесплодия в супружеских парах. Наиболее часто этот метод используют при лечении пациенток с бесплодием трубного происхождения и при эндометриозе [26,55]. Несмотря на достигнутые успехи, частота наступления беременности после ЭКО у этих пациенток остается невысокой [26, 51].

Для повышения эффективности ЭКО необходимо более полное понимание механизмов, вызывающих развитие бесплодия. Принято считать, что основными факторами, лимитирующими наступление беременности после ЭКО, являются нарушение рецептивности эндометрия и качество эмбрионов, полученных при оплодотворении *in vitro* [67,70]. В настоящее время остаются до конца не изученными факторы, участвующие в обеспечении качества эмбриона. Известно, что важную роль в регуляции различных этапов репродуктивных процессов, в том числе и оогенеза, играют иммунные механизмы. Особую роль многие исследователи отводят факторам врожденного иммунитета, в частности фагоцитам и вырабатываемыми ими цитокинам [95].

В связи с этим, целью нашего исследования было выявить наиболее значимые клинические факторы, связанные с нарушением репродуктивной функции пациенток с бесплодием трубного происхождения, а также с бесплодием и эндометриозом, определяющие качество эмбрионов, полученных при проведении ЭКО. Кроме того, мы попытались уточнить роль фагоцитов крови и фолликулярной жидкости, а также хемокинов, вырабатываемых ими, в регуляции процессов, обеспечивающих качество эмбрионов при проведении ЭКО.

В нашей работе в условиях отделения ВРТ ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России было

проведено обследование 99 женщин с бесплодием трубного происхождения и 63 женщин с бесплодием и эндометриозом, участвующих в программе ЭКО.

В ходе сбора анамнеза было установлено, что в группе женщин с бесплодием и эндометриозом отмечалось нарушение менструальной функции в виде НЛФ – у 27% женщин, что было достоверно чаще, чем у женщин с трубным фактором бесплодия. Наши результаты согласуются с данными многих авторов о наличии нарушений менструальной функции при эндометриозе, что может являться одной из причин обращения женщин к гинекологу [139].

Нами были отмечены достоверные различия при изучении репродуктивной функции обследованных женщин. В литературе есть данные о преобладании первичного бесплодия у женщин с эндометриозом [27] и в нашем исследовании мы нашли этому подтверждение. Согласно нашим результатам, частота первичного бесплодия у пациенток с эндометриозом и бесплодием была достоверно выше, чем в группе женщин с бесплодием трубного происхождения и составила 57,1%. Известно, что первичное бесплодие менее благоприятный фактор для исхода программы ЭКО, так как при нем происходят более глубокие нарушения в репродуктивной системе, в том числе связанные с нарушением рецептивности эндометрия, большое значение также оказывают и иммунные механизмы, а также генетические факторы, непосредственно участвующие в патогенезе первичного бесплодия [91, 100, 219].

Все женщины с трубно-перитонельным бесплодием в отличие от пациенток с бесплодием и эндометриозом отмечали в анамнезе воспалительные процессы придатков матки. Согласно имеющимся литературным данным, именно данная патология является одной из основных причин возникновения бесплодия трубного происхождения [49].

Внематочная беременность в анамнезе также значительно чаще отмечалась у женщин с бесплодием трубного происхождения по сравнению с женщинами с бесплодием и эндометриозом (48,5% и 12,7% случаев). Этот

факт представляется вполне закономерным, поскольку известно, что одним из факторов, приводящих к внематочной локализации плодного яйца, является цилиарная дискинезия и воспалительный процесс реснитчатого эпителия слизистой оболочки труб, что, безусловно, имело место у пациенток с бесплодием трубного происхождения [4, 45]. В связи с этим в данной группе женщин преобладало вторичное бесплодие – 75,8%, которое имело место значительно чаще, чем у женщин с бесплодием и эндометриозом. Полученные нами данные о различной частоте первичного и вторичного бесплодия у пациенток с бесплодием трубного происхождения и пациенток с бесплодием и эндометриозом, участвующих в программе ЭКО, хорошо согласуются с данными литературы [19].

Оперативные вмешательства на яичниках (аднексэктомии, резекции яичника) в анамнезе чаще отмечены у женщин с бесплодием и эндометриозом (47,6%), по сравнению с бесплодием трубного происхождения (25,3%, $p=0,003$) и, несомненно, вызывали снижение овариального резерва у этих женщин, что также является доказанным литературным фактом [200, 206].

Хронический эндометрит имели в анамнезе 37,9% женщин с бесплодием и эндометриозом, что свидетельствует о наличии хронического воспалительного процесса на локальном уровне у этих женщин. Роль воспаления, как на системном, так и на локальном уровне давно обсуждается в литературе в качестве фактора, участвующего в механизмах развития эндометриоза. В настоящее время многие авторы считают, что основной ролью в патогенезе эндометриоза является наличие воспаления в матки и перитонеальной полости, благодаря которому создаются условия, благоприятные для эктопического роста эндометриальных клеток. Считают, что высокий уровень воспалительных реакций при эндометриозе обусловлен активацией фагоцитов, особенно перитонеальных макрофагов [71, 131, 177, 179]. У женщин с бесплодием и эндометриозом чаще проводились стимуляция овуляции КБ в естественном цикле (в 36,5% случаях) и ИОСМ (в

33,3% случаях) в отличие от женщин с бесплодием трубного происхождения. Известно, что именно эти методы лечения применяются в первую очередь у женщин с бесплодием и эндометриозом [175], поэтому полученные нами результаты представляются вполне логичными.

Мы не выявили достоверных различий при анализе частоты экстрагенитальной патологии у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом.

Принято считать, что для повышения эффективности методов ВРТ, в частности, ЭКО, необходимо оценивать овариальный резерв пациенток, которым предстоит вступить в программу ЭКО [8, 96, 109, 226].

В нашей работе для уточнения состояния овариального резерва у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом мы сравнили показатели сывороточного содержания ФСГ, АМГ и ингибина В с аналогичными показателями овариального резерва женщин с доказанной фертильностью, которые обратились в Центр здоровья семьи ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России для введения ВМС. Уровень ФСГ был достоверно повышен в обеих обследованных группах по сравнению с группой здоровых женщин, а уровень ингибина В - достоверно снижен в обоих случаях. Нами не было выявлено статистически значимых различий в сывороточном содержании АМГ у женщин обеих групп наблюдения и у здоровых фертильных женщин. Проведение сравнительно анализа параметров овариального резерва женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом не выявило значимых различий в сывороточном содержании ФСГ, ингибина В и АМГ.

Согласно литературным данным, показатели овариального резерва являются надежными критериями прогноза эффективности ЭКО. Поэтому особый интерес представляет выявление взаимосвязи между особенностями показателей овариальный резерва женщин с различными формами бесплодия.

Повышенный уровень гонадотропинов в сочетании с низким уровнем половых стероидов указывает на недостаточность функции половых желез. Неадекватная продукция ФСГ отражает дисфункцию гипоталамо-гипофизарной оси [12].

Таким образом, учитывая данные о влиянии ФСГ на фолликулогенез, многие авторы придерживаются мнения о том, что его повышенный сывороточный уровень (> 10 мЕд/л) у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом прогнозирует низкий овариальный ответ в программе ЭКО [8, 26, 85].

Есть работы, посвященные уровню ФСГ как предиктору успешного исхода ЭКО вне зависимости от причины бесплодия, а именно показано, что содержание сывороточного ФСГ менее 10 мЕд/л является наиболее благоприятным для наступления беременности в результате программы ЭКО. [185, 199]. Полученные нами данные полностью согласуются с литературными. В нашем исследовании мы выявили повышение уровня ФСГ у пациенток обеих групп наблюдения, что позволяет говорить о снижении овариального резерва при бесплодии трубного происхождения и при бесплодии и эндометриозе.

В последнее время в качестве надежных параметров оценки овариального резерва рассматриваются показатели сывороточного содержания ингибина В и АМГ. Ингибин В и АМГ принадлежат к семейству трансформирующего фактора роста, который включает в себя факторы роста, гормоны ингибины, активины и ряд других факторов. Все члены этого семейства являются димерными гликопротеинами, вовлеченными в регуляцию роста и дифференцировки тканей [80]. Ингибин А выявляется в основном у женщин, тогда как ингибин В и АМГ синтезируются клетками Сертоли у мужчин и гранулезными клетками у женщин. Ингибины селективно угнетают секрецию ФСГ у мужчин и у женщин, уменьшают количество рецепторов ЛГ-РГ в гипофизе и обладает паракринным действием в гонадах. Ингибин В отражает овариальный резерв яичников в препубертате, в период полового

созревания, женщин фертильного возраста, в перименопаузе. АМГ оказывает ингибирующее влияние на рекрутирование примордиальных фолликулов в яичниках, а также может ингибировать ФСГ - зависимую селекцию доминантного фолликула на ранней антральной стадии. Концентрация АМГ у женщин коррелирует с числом антральных фолликулов, с возрастом, лучше всего отражает снижение репродуктивной функции у здоровых женщин с доказанной фертильностью [108]. Тесты на ингибин В и АМГ достаточно чувствительны для ранних признаков снижения овариального резерва, поскольку они синтезируются непосредственно развивающимися преантральными и антральными фолликулами [80].

В нашем исследовании мы оценивали сывороточное содержание ингибина В и АМГ у пациенток основных клинических групп и сравнивали полученные значения с показателями у здоровых фертильных женщин. По нашим данным, бесплодие у женщин, как трубного происхождения, так и связанное с эндометриозом, сопровождалось нарушениями в продукции ингибина В. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в обеих группах пациенток с бесплодием был снижен сывороточный уровень ингибина В. Достоверных различий в группах по содержанию АМГ в группах выявлено не было.

Известно, что снижение овариального резерва с возрастом, связанное с уменьшением числа функционально активных фолликулов в яичниках женщин, сопровождается падением уровня ингибина В в крови [133]. Оценка уровня ингибина В приобрела в последнее время большую клиническую значимость особенно при проведении вспомогательных репродуктивных технологий. Выявлено, что ингибин В является предиктором успешного получения ооцитов и наступления клинической беременности в протоколах ЭКО [147], а уровни ингибина В, ингибина А и активина А коррелируют с размерами фолликулов [128].

В некоторых работах приводятся данные сравнительного анализа содержания ингибина В в периферической крови или в фолликулярной

жидкости пациенток с бесплодием различного генеза и их связь с успехом различных этапов ЭКО. Установлено, что у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом снижено содержание ингибина В и АМГ в сыворотке крови, что свидетельствует об угнетении овариального резерва при данных видах бесплодия [96, 102, 109]. В работе других авторов указано, что уровень ингибина В и число полученных ооцитов было значительно снижено у пациенток с эндометриозом, что, по мнению исследователей, свидетельствует о нарушении функционирования клеток гранулезы при эндометриозе [202].

В работах многих авторов отмечено, что содержание АМГ в сыворотке крови у женщин с бесплодием и эндометриозом снижено по сравнению с фертильными женщинами, что может служить предиктором сниженного овариального резерва при эндометриозе [72, 73, 74, 149, 176]. Некоторые исследователи отводят роль низкого уровня АМГ как показателя нарушения роста фолликулов и созревания ооцитов в программе ЭКО [106, 203].

По литературным данным, при бесплодии трубного происхождения также отмечается низкий уровень АМГ, что является маркером сниженного овариального резерва и впоследствии выражается в плохом ответе на стимуляцию суперовуляции и получении не более 5 ооцитов при трансвагинальной пункции яичников в ходе программы ЭКО [134]. В то же время, есть данные о том, что уровень сывороточного АМГ коррелирует с числом антральных фолликулов и полученных ооцитов в результате стимуляции в программе ЭКО, но нет различий в его содержании у женщин с бесплодием трубного происхождения в зависимости от уровня обструкции маточных труб и односторонней или двухсторонней окклюзии [146]. Однако показано, что даже с низким уровнем АМГ (<0,4 нг/мл) у женщин с бесплодием и эндометриозом возможно наступление беременности и рождение ребенка в результате проведения программы ЭКО [189].

Таким образом, до сих пор нет единого мнения о том, как уровень АМГ влияет на эффективность программы ЭКО на разных ее этапах в зависимости

от причины бесплодия. Полученные нами данные в целом согласуются с литературными и позволяют говорить о том, что в нашем исследовании показатель сывороточного содержания ингибина В в большей степени отражал состояние овариального резерва обследованных женщин.

В программе ЭКО у женщин обеих групп нами были получены одинаковые результаты по стимуляции овуляции, оплодотворению. Однако получение эмбрионов высокого качества и наступление беременности, которая завершилась родами в результате программы ЭКО, чаще было у женщин с бесплодием трубного происхождения.

Таким образом, суммируя все вышеизложенные результаты нашего исследования, можно сделать вывод о том, что в целом, эффективность программы ЭКО была выше у женщин с бесплодием трубного происхождения. Полученные нами результаты совпадают с мнением большинства исследователей, считающих, что эффективность циклов ЭКО максимальна при лечении бесплодия трубного происхождения по сравнению с другими формами бесплодия [1, 22, 35]. Однако, несмотря на достаточно высокую эффективность ЭКО у пациенток с бесплодием трубного происхождения, получение эмбрионов высокого качества в этой группе отмечено лишь в 53,5% случаев. У женщин с бесплодием и эндометриозом эмбрионы высокого качества были получены – в 36,5%. Учитывая важную роль качества эмбрионов в обеспечении успеха ЭКО, особый интерес приобретает определение факторов, которые непосредственно влияют на качество эмбрионов.

Дифференцированный анализ клинических данных у женщин обеих групп наблюдения в зависимости от качества полученных эмбрионов показал, что возраст женщин в группе с бесплодием трубного происхождения является важным прогностическим критерием качества эмбрионов. В нашем исследовании получение эмбрионов высокого качества при проведении программы ЭКО чаще отмечалось у пациенток в возрасте до 37 лет и значительно реже у женщин в возрасте 38 лет и старше (71,7%

против 3,8%; скорректированное ОШ 5,4; 95% ДИ 1,08-26,73; $p=0,027$). По данным литературы известно, что физиологический процесс постепенного угасания функции яичников – одна из основных проблем на пути эффективности программ ЭКО [50]. Есть мнение, что эффективность ЭКО преимущественно зависит от возраста пациентки, состояния овариального резерва и не зависит от выбранных схем индукции овуляции. Условно наиболее благоприятным рассматривается возраст женщины до 41 года, что определяет целесообразность использования ооцитов донора у женщин старше этого возраста [15, 66, 153, 184]. Таким образом, возраст пациенток является важным фактором, влияющим в целом на исход программы ЭКО, а также связанным с качеством эмбрионов, полученных при оплодотворении *in vitro*.

Гипоменорею чаще отмечали женщины, у которых получены эмбрионы низкого качества (13% и 17,5 %, соответственно). Полученные нами данные соответствуют мнению большинства авторов о том, что в основе механизмов развития гипоменореи репродуктивного периода лежат нарушения функции гипофиза, яичников и неполноценность эндометрия вследствие внутриматочных манипуляций или воспалительных заболеваний [39, 210]. Кроме того, гипоменорея может быть связана с недостаточной продукцией эстрогенов [75, 84, 223]. Очевидно, что все эти факторы влияют на оогенез, а значит и на качество ооцитов, а в дальнейшем и на качество эмбрионов, полученных при оплодотворении *in vitro*.

Изучение гинекологического анамнеза показало, что хронический эндометрит в анамнезе у женщин с бесплодием трубного происхождения повышал риск получения эмбрионов низкого качества (21,7% против 3,8%, скорректированное ОШ 7,1; 95% ДИ 1,46 - 34,28; $p=0,007$). Роль системного и локального воспаления как фактора, участвующего в механизмах нарушения оогенеза, давно обсуждается в литературе [56, 64]. Наличие хронического эндометрита можно рассматривать в качестве одного из факторов, непосредственно влияющего на качество полученных в программе ЭКО эмбрионов.

Наличие ИППП в анамнезе у женщин с бесплодием трубного происхождения также повышало риск получения эмбрионов низкого качества (73,9% против 41,5%, скорректированное ОШ 4,0; 95% ДИ 1,70 – 9,39; $p=0,001$). Полученные нами результаты согласуются с мнением большинства исследователей о том, что непосредственной причиной окклюзии маточных труб являются перенесенные ранее воспалительные процессы, чаще всего инициируемые генитальными инфекциями [22, 76, 121, 159]. Учитывая эти данные, можно предположить, что наличие ИППП в анамнезе у женщин с бесплодием трубного происхождения опосредованно может оказывать негативное влияние и на процесс созревания яйцеклеток, а в дальнейшем и на процесс оплодотворения эмбрионов у этих пациенток.

Нами было выявлено, что у женщин с бесплодием и эндометриозом гиперплазия эндометрия в анамнезе повышала риск получения эмбрионов низкого качества в результате программы ЭКО (27,5% против 4,3%, скорректированное ОШ 8,3; 95% ДИ 1,00 – 69,57; $p=0,022$). По мнению некоторых авторов, одной из причин развития гиперплазии эндометрия являются нарушения гормонального статуса [145]. Именно эти изменения могут быть связаны и с нарушениями процесса оогенеза в яичниках, повышая риск получения эмбрионов низкого качества у пациенток с бесплодием и эндометриозом.

Оперативные вмешательства на органах малого таза, перенесенные пациентками по поводу бесплодия, по нашим данным, также оказывали существенное влияние на эффективность ЭКО. Так, оперативные вмешательства на яичниках у женщин с бесплодием и эндометриозом повышали риск получения эмбрионов низкого качества (57,5% против 30,4%; скорректированное ОШ 3,1; 95% ДИ 1,04-9,17; $p=0,034$). Среднее количество перенесенных операций на органах малого таза у женщин с бесплодием и эндометриозом, у которых получены эмбрионы низкого качества, было больше по сравнению с пациентками с эмбрионами высокого качества. Полученные нами результаты показывают, что неоднократные

хирургические вмешательства на яичниках у пациенток с бесплодием ухудшают результаты ЭКО. Наши данные совпадают с точкой зрения многих авторов, согласно которой неоднократные операции на придатках матки приводят к резкому снижению овариального резерва яичников, ухудшению их кровоснабжения, а значит и нарушению процессов оогенеза [23, 26, 30]. Наличие в анамнезе одной попытки ЭКО снижает шанс получения эмбрионов низкого качества (39,1% против 15%, скорректированное ОШ 0,3; 95% ДИ 0,08-0,92; $p=0,033$), что может быть объяснено более глубоким обследованием супружеской пары после первой неудачной попытки (исключение генетической патологии, нарушений системы гемостаза, фолатного обмена и т.д.) и своевременно назначенным лечением, которые повышает шанс получения эмбрионов высокого качества и в целом прогноз исхода программы ЭКО [28, 50, 196, 209].

Мы также проанализировали взаимосвязь показателей овариального резерва с качеством полученных эмбрионов у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом. При проведении УЗИ органов малого таза перед программой ЭКО достоверных различий в количестве фолликулов у женщин с эмбрионами различного качества выявлено не было. При измерении объема яичников установлено, что при значении этого параметра менее 8 см^3 повышался шанс получения эмбрионов низкого качества у женщин с бесплодием трубного происхождения (54,3% против 28,3%, скорректированное ОШ 3,0; 95% ДИ 1,31- 6,94; $p=0,007$), а при объеме яичников более 8 см^3 наоборот шанс получения эмбрионов низкого качества был снижен (71,7% против 45,7% случаев, скорректированное ОШ 0,3; 95% ДИ 0,14- 0,76; $p=0,007$). Данный факт является логичным, так как небольшие размеры антральных фолликулов повышают шанс бедного ответа на стимуляцию суперовуляции, а значит, будут получены неполноценные ооциты, а в последствие и эмбрионы низкого качества [103, 165, 192].

Для уточнения взаимосвязи между состоянием овариального резерва пациенток с бесплодием трубного происхождения и пациенток с бесплодием и эндометриозом и качеством полученных эмбрионов мы провели индивидуальный анализ показателей ФСГ, ингибина В и АМГ у женщин с высоким и низким качеством эмбрионов.

Установлено, что при бесплодии трубного происхождения получение эмбрионов высокого качества чаще происходило у женщин с показателями сывороточного содержания ФСГ менее 10 мЕД/л (98,1% случаев в подгруппе с эмбрионами высокого качества, и 84,8% случаев в подгруппе с эмбрионами низкого качества, скорректированное ОШ 0,1; 95% ДИ 0,01- 0,91; $p=0,018$). При этом получение эмбрионов низкого качества чаще было отмечено у пациенток с повышенными (более 10 мЕД/л) показателями ФСГ (15,2% случаев при получении эмбрионов низкого качества и 1,9% случаев при получении эмбрионов высокого качества, скорректированное ОШ 9,3; 95% ДИ 1,10- 79,00; $p=0,018$). По литературным данным, сывороточный уровень $ФСГ > 10$ мЕД/л у женщин с бесплодием прогнозирует бедный овариальный ответ в программе ЭКО [8, 26, 85], что впоследствии отражается на качестве ооцитов и эмбрионов, полученных при оплодотворении *in vitro*.

Согласно полученным нами результатам, показатели сывороточного содержания АМГ в большей степени, были связаны с качеством эмбрионов, полученных при проведении ЭКО у женщин обеих групп. При бесплодии трубного происхождения получение эмбрионов низкого качества чаще отмечалось у пациенток с низкими (менее 1 нг/мл) показателями АМГ (44,4% случаев в подгруппе с эмбрионами низкого качества и 8,3% случаев в подгруппе с эмбрионами высокого качества, скорректированное ОШ 8,8; 95% ДИ 1,25 – 62,19; $p=0,034$). При этом частота нормальных и высоких значений АМГ в группе женщин с бесплодием трубного происхождения была одинаковой при получении эмбрионов как низкого, так и высокого качества. Среди пациенток с бесплодием и эндометриозом, у которых были получены эмбрионы высокого качества, мы выявили большой процент встречаемости

значений АМГ более 2,5 нг/мл (42,9% случаев), тогда как в подгруппе пациенток, у которых были получены эмбрионы низкого качества, таких значений АМГ отмечено не было ($p=0,023$). При этом низкие и нормальные значения АМГ с одинаковой частотой встречались в группе женщин с бесплодием и эндометриозом при получении эмбрионов как низкого, так и высокого качества. Известно, что низкие или наоборот слишком высокие показатели АМГ приводят к ухудшению параметров фолликулогенеза в стимулированных циклах и тем самым нарушению оплодотворения ооцитов [183, 186, 193].

Также мы изучили данные, характеризующие взаимосвязь ряда параметров программы ЭКО с качеством полученных эмбрионов. Установлено, что у женщин с бесплодием трубного происхождения толщина эндометрия на день проведения TVP менее 7мм чаще отмечалась при низком качестве эмбрионов (28,3%), по сравнению с женщинами с высоким качеством эмбрионов (3,8%, скорректированное ОШ 10,1; 95% ДИ 2,13 – 47,41; $p=0,001$). Наши результаты совпадают с литературными данными, о том, что размер матки и толщина эндометрия коррелируют с результатами стимуляции суперовуляции в программе ЭКО, то есть чем тоньше эндометрий, тем беднее ответ яичников на стимуляцию [18, 20, 197, 198].

Как при бесплодии трубного происхождения, так и при бесплодии и эндометриозе получение более 10 ооцитов после TVP снижало шанс получения эмбрионов низкого качества (при бесплодии трубного происхождения - 52,8% против 28,3%, скорректированное ОШ 0,4; 95% ДИ 0,15 – 0,81; $p=0,011$; при бесплодии и эндометриозе - 60,9% против 27,5%, скорректированное ОШ 0,2; 95% ДИ 0,08 – 0,72; $p=0,010$). В тех случаях, когда у женщин было получено менее 5 ооцитов после TVP яичников, как в группе с бесплодием трубного происхождения, так и в группе с бесплодием и эндометриозом отмечалось достоверное повышение частоты получения эмбрионов низкого качества (при бесплодии трубного происхождения - 18,9% против 52,2%, скорректированное ОШ 4,7; 95% ДИ 1,91– 11,53;

$p=0,000$; при бесплодии и эндометриозе – 26,1%, против 60%, скорректированное ОШ 4,3; 95% ДИ 1,38 – 13,09; $p=0,009$). Получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* и у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом повышало риск получения эмбрионов низкого качества (84,8% против 13,2% - при бесплодии трубного происхождения, скорректированное ОШ 36,7; 95% ДИ 11,81 – 113,5; $p=0,000$, при бесплодии и эндометриозе - 77,5% случаев против 30,4% случаев, скорректированное ОШ 7,9; 95% ДИ 2,48 – 25,05; $p=0,000$). Полагают, что эффективность ЭКО зависит от количества полученных при трансвагинальной пункции ооцитов и чем больше их количество, тем шанс получения эмбрионов хорошего качества выше, а значит и прогноз ЭКО более благоприятный [187, 207].

В результате проведения программы ЭКО беременность наступила у 67,9% женщин с бесплодием трубного происхождения и эмбрионами высокого качества и у 6,5% женщин с эмбрионами низкого качества. Эти отличия достоверны (скорректированное ОШ 0,03; 95% ДИ 0,01-0,12; $p=0,000$). При бесплодии и эндометриозе беременность наступила у 69,6% женщин только с эмбрионами высокого качества ($p=0,000$). Получение эмбрионов низкого качества повышало шанс негативного исхода программы ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения (93,5% против 32,1%, скорректированное ОШ 30,4; 95% ДИ 8,2-111,9; $p=0,000$). Таким образом, как при бесплодии трубного происхождения, так и при бесплодии и эндометриозе, получение эмбрионов высокого качества ассоциировано с наступлением беременности, а получение эмбрионов низкого качества - с отсутствием беременности в результате проведения программы ЭКО.

Для уточнения механизмов, регулирующих оогенез и влияющих на качество эмбрионов, получаемых в программе ЭКО, особый интерес представляет изучение роли иммунной системы в обеспечении этих процессов. В настоящее время можно считать доказанным факт непосредственного участия иммунной системы в механизмах, регулирующих

различные этапы репродуктивных процессов, в том числе и процессы оогенеза [212]. Однако роль клеток иммунной системы и вырабатываемых ими цитокинов в обеспечении успеха различных этапов программы ЭКО пока еще изучена недостаточно.

В ходе нашего исследования мы попытались определить наличие взаимосвязи между характером системных и локальных реакций врожденного иммунитета у женщин с бесплодием и качеством эмбрионов, полученных у них в ходе проведения ЭКО, на основании чего разработать новые эффективные критерии для прогноза получения эмбрионов высокого и низкого качества. Для выполнения поставленной цели мы провели анализ содержания в сыворотке и фолликулярной жидкости хемокинов (IL-8, MCP-1, RANTES) и оценили особенности функционального состояния основных продуцентов хемокинов – моноцитов и фолликулярных макрофагов у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом. Полученные нами результаты позволяют говорить о том, что существует прямая взаимосвязь между характером активации реакций врожденного иммунитета у женщин в момент забора яйцеклеток и качеством эмбрионов, которые впоследствии будут получены после оплодотворения *in vitro*.

При этом в ряде случаев в двух группах обследованных женщин наблюдались сходные иммунологические изменения, которые, по всей видимости, зависели от наличия бесплодия у пациенток. Так, в периферической крови и у женщин с бесплодием трубного происхождения, и у пациенток с бесплодием и эндометриозом было снижено содержание хемокина RANTES, уровня CD16⁺ моноцитов, но повышено количество CD86⁺ моноцитов.

Известно, что RANTES является одним из членов подсемейства β -хемокинов [194]. RANTES является селективным и высоко эффективным хемоаттрактантом для эозинофилов, моноцитов, макрофагов и Т-лимфоцитов как *in vitro*, так *in vivo* [77, 152]. Изначально RANTES рассматривался как

хемокин, секретируемый преимущественно Т-клетками, однако к настоящему времени установлено, что он продуцируется многими типам клеток, включая тромбоциты, макрофаги, эозинофилы, и фибробласты, а также эндотелиальные, эпителиальные и эндометриальные клетки [77]. RANTES обеспечивает миграцию клеток иммунной системы в очаги инфекции и повреждения, а также вовлекается в осуществление прямой антимикробной активности за счет индукции продукции NO макрофагами [154]. По мнению многих авторов, RANTES играет важную роль в регуляции репродуктивных процессов, поскольку присутствует в значительных количествах в семенной плазме [98], в эндометрии [143], в перитонеальной [90] и фолликулярной жидкости [195].

Специфика действия RANTES заключается в том, что помимо хемоаттрактантного действия этот хемокин обладает иммунорегуляторными свойствами. Так, RANTES оказывает хемотаксическое влияние преимущественно на Th1 клетки и Т-клетки – памяти [87]. При этом дефицит продукции RANTES может приводить к нарушению Т-клеточной пролиферации и продукции цитокинов Т-лимфоцитами в ответ на антигенную стимуляцию, а также к индукции иммунного ответа Th2-типа с усилением экспрессии IL-10 [87]. Известно, что гиперактивация Th2 лимфоцитов с усилением реакций гуморального звена иммунитета может лежать в основе развития аутоиммунной патологии [63]. По данным литературы, во многих случаях развитие бесплодия ассоциировано с усилением аутоиммунных реакций и продукцией аутоантител различной специфичности [93]. Роль этих антител в репродукции пока еще дискутируется. Однако ряд данных, свидетельствующих о непосредственном участии аутоантител в повреждении терминальных спиральных артерий при невынашивании беременности, позволяет отнести аутоиммунные нарушения к важным механизмам, способствующим развитию бесплодия [89]. Таким образом, снижение системной продукции RANTES может быть одним из факторов, способствующих усилению активности аутоиммунных реакций и

лежащих в основе развития бесплодия у пациенток с трубным фактором и эндометриозом.

Заслуживает особого внимания выявленное прямое воздействие RANTES на сперматозоиды в женском генитальном тракте [194]. Хорошо известно, что в процессе оплодотворения человеческие сперматозоиды подвергаются серии биохимических и функциональных изменений, называемых капациацией. Каскад контролируемых физиологических событий, происходящих в течение капациации, вызывает усиление подвижности сперматозоидов, способствует их адгезии к zona pellucida, ответу на физиологические индукторы акросомальной реакции и инициирует оплодотворение ооцита. Установлено, что RANTES регулирует подвижность сперматозоидов, действуя на их хемотаксис [194]. Учитывая эти данные, можно предположить, что угнетение продукции RANTES может негативно влиять на репродуктивную функцию женщин вследствие нарушения регуляции подвижности сперматозоидов в женском репродуктивном тракте.

У женщин обеих клинических групп отмечались также сходные изменения функционального состояния моноцитов, которые появлялись значительным снижением относительного содержания в крови CD16⁺ моноцитов и повышением количества CD86⁺ клеток.

Известно, что молекула CD16 является рецептором для Fc-фрагментов IgG и обеспечивает взаимодействие фагоцитарных клеток с клетками-мишенями и внеклеточным матриксом [63]. Одновременно Fc-рецепторы участвуют в распознавании опсонизированных мишеней, что определяет их важную роль в процессах фагоцитоза [63]. Показано, что экспрессия CD16 молекул на клеточной мембране моноцитов во многом определяет особенности функционального состояния этого типа фагоцитарных клеток. Сравнительное изучение популяций CD16⁺ и CD16⁻ моноцитов, циркулирующих в крови, показало, что наличие мембранной экспрессии CD16 молекул свидетельствует о более зрелом состоянии моноцитов. CD16⁺ моноциты обладают максимальной способностью к антигенной презентации

за счет высокого уровня экспрессии HLA-DR молекул [88]. Этот пул клеток оказывает мощное провоспалительное действие за счет усиленной продукции TNF α [218]. Есть данные, что CD16⁺ моноциты стимулируют ответ Т-лимфоцитов на бактериальные и вирусные агенты в 3 раза сильнее, чем CD16⁻ популяция [230]. Кроме того, CD14⁺CD16⁺ моноциты более эффективно, чем другие популяции, осуществляют клиренс апоптотирующих клеток [116].

Поскольку CD16⁺ моноциты считаются пулом «провоспалительных моноцитов» [230], изменение их количества часто ассоциировано с развитием патологических состояний. В частности, показано, что в крови больных системной красной волчанкой снижено количество циркулирующих CD14⁺CD16⁺ моноцитов [214]. У пациентов с аутоиммунным полиэндокринным синдромом I типа также отмечалось снижение циркулирующего пула CD16⁺ моноцитов, которое было ассоциировано со снижением активности регуляторных Т-лимфоцитов, предотвращающих развитие ответа на антигены собственного организма [126]. Можно предположить, что выявленное нами снижение циркулирующего пула CD16⁺ в периферической крови женщин с бесплодием, так же, как и низкий уровень системной продукции RANTES, непосредственно связано с усилением активности аутоиммунных реакций. Гипотеза об аутоиммунной природе эндометриоза была высказана достаточно давно, и к настоящему времени получены многочисленные доказательства этой гипотезы [16]. Менее изучен вопрос о наличии аутоиммунных нарушений у пациенток с бесплодием трубного происхождения. Однако результаты некоторых исследований свидетельствующих о том, что хроническая хламидийная инфекция, которая является одной из основных причин окклюзии маточных труб, вызывает продукцию перекрестно-реагирующих антител. Эти антитела, в свою очередь, могут вызывать аутоиммунные нарушения у пациенток с бесплодием трубного происхождения [155].

Изменения еще одного параметра врожденного иммунитета – снижение количества CD86⁺ моноцитов, также отмечалось нами в обеих группах женщин с бесплодием. По данным литературы, CD86 относятся к семейству B7 молекул, которые оказывают ко-стимуляторный или ко-ингибирующий эффект при взаимодействии со своими лигандами на поверхности лимфоцитов, молекулами CD28 и CTLA-4, регулируя процесс внутриклеточного сигналинга с участием протеинкиназы С [172]. Установлено, что экспрессия этой молекулы на поверхности фагоцитов повышается при вирусной инфекции, в частности, при инфицировании вирусом Эпштейна-Барр [120]. Как известно, вирусное инфицирование является одним из важнейших факторов, вызывающих нарушения репродуктивной функции женщин [25]. Поэтому выявленное нами повышение количества CD86-позитивных моноцитов как у пациенток с бесплодием трубного происхождения, так и у пациенток с бесплодием и эндометриозом может быть связано с развитием противoinфекционного иммунного ответа. С другой стороны, повышенная экспрессия CD86 молекул фагоцитами крови было отмечено у пациентов с системной красной волчанкой [81], что позволяет нам связать изменения в содержании CD86⁺ моноцитов с наличием аутоиммунных нарушений при бесплодии трубного происхождения и при бесплодии и эндометриозе.

Отличительной чертой пациенток с бесплодием трубного происхождения было высокое сывороточное содержание MCP-1 по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. При этом у женщин с бесплодием и эндометриозом сывороточное содержание MCP-1 не изменялось по сравнению с показателями здоровых женщин, но было значительно ниже такового у пациенток с бесплодием трубного происхождения. К настоящему времени показано, что MCP-1 играет важную роль в репродуктивных процессах, в частности, этот хемокин вместе с IL-1 β участвует в обеспечении успешной имплантации эмбриона [68, 82]. Ранее было показано, что продукция IL-1 β значительно снижена при бесплодии,

ассоциированном с эндометриозом [43]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что сниженная продукция МСР-1 у женщин с бесплодием и эндометриозом по сравнению с таковой у пациенток с бесплодием трубного происхождения может быть связана с угнетением выработки у них IL-1 β и отражает более глубокое нарушение репродуктивной функции при эндометриозом, связанное с неудачами имплантации. Данные литературы о более низкой частоте имплантации эмбриона при проведении ЭКО у женщин с бесплодием и эндометриозом по сравнению с таковой при бесплодии трубного происхождения подтверждают это предположение [62, 174].

Выявленный нами высокий уровень системной продукции МСР-1 у пациенток с бесплодием трубного происхождения, по-видимому, можно рассматривать как наиболее благоприятный для успешной имплантации вариант. В последнее время получила широкое распространение точка зрения о том, что механическая индукция локального воспаления в матке способствует успешной имплантации бластоцисты, индуцируя развития иммунного ответа и усиление экспрессии в эндометрии интегриновых и адгезионных молекул, обеспечивающих тесное взаимодействие эмбриона с маточным эпителием [220]. Выявленная ассоциация между высоким содержанием в сыворотке крови провоспалительного цитокина IL-1 β и успехом ЭКО также подтверждает эту точку зрения [105]. Поэтому высокое сывороточное содержание МСР-1 у пациенток с бесплодием трубного происхождения можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на обеспечение успеха имплантации при данной форме бесплодия.

Только у пациенток с бесплодием и эндометриозом мы выявили существенные изменения функционального состояния моноцитов по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. Так, при эндометриозе в крови было снижено содержание HLA-DR⁺ и CD49⁺ моноцитов.

Выявленные нами изменения в экспрессии HLA-DR молекул моноцитами периферической крови свидетельствуют о нарушении антиген-распознающей функции моноцитов. Наши результаты согласуются с полученными ранее результатами о сниженной экспрессии HLA-DR молекул фагоцитами крови и перитонеальной жидкости при эндометриозе [16]. Известно, что HLA-DR молекулы являются продуктами генов главного комплекса гистосовместимости 2 класса. Эти молекулы имеют прямое отношение к представлению антигенных пептидов Т-хелперам [63]. Снижение их экспрессии на поверхности фагоцитарных клеток может вести к нарушению ранних этапов запуска и развития адаптивного иммунного ответа [63]. CD49e молекулы относятся к классу $\beta 1$ - или VLA- интегринов, которые способствуют адгезии клеток к внеклеточному матриксу путем связывания фибронектина, одного из основных его компонентов [83]. Снижение экспрессии молекул CD49e ранее было отмечено для перитонеальных макрофагов пациенток с эндометриозом [14]. По-видимому, угнетение экспрессии функциональных молекул на поверхности циркулирующих моноцитов при эндометриозе может иметь непосредственно отношение к патогенетическим факторам развития данного заболевания. Нарушение способности фагоцитарных клеток к полноценному распознаванию антигенов и взаимодействию с другими клеточными типами лежит в основе развития и роста эктопической ткани, что имеет место при эндометриозе [63].

По ряду параметров пациентки с бесплодием и эндометриозом отличались от женщин с бесплодием трубного происхождения. При бесплодии и эндометриозе в крови было более низкое содержание MCP-1 и CD49e+ моноцитов, но повышенное количество IL-8+ и CD86+ моноцитов по сравнению с показателями у женщин с бесплодием трубного происхождения. Все эти изменения свидетельствуют о более выраженных нарушениях функционального состояния периферических фагоцитов при данной форме бесплодия.

При выявлении иммунологических факторов, участвующих в обеспечении качества эмбриона при проведении ЭКО, особый интерес представляет изучение гуморального фона и клеточного состава фолликулярной жидкости, поскольку именно локальное микроокружение, в том числе и цитокиновое, в котором происходит рост и созревание яйцеклетки, в первую очередь может влиять на качество будущего эмбриона [69]. Для уточнения характера иммунорегуляции на уровне яичников мы провели сравнительный анализ иммунологических параметров крови и фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом.

Анализ данных выявил резкие отличия сыворотки крови и фолликулярной жидкости у пациенток обеих групп по хемокиновому составу. Так, в фолликулярной жидкости всех обследованных женщин уровень IL-8 превышал таковой в сыворотке крови практически в 10 раз. Локальный уровень MCP-1 также был выше системного, однако это повышение (1,5-2 раза) было не так выражено, как у IL-8. Противоположная направленность изменений локального содержания была выявлена нами для RANTES. Уровень этого хемокина в фолликулярной жидкости был резко снижен по сравнению с его сывороточным содержанием.

Таким образом, отличительной чертой фолликулярной жидкости при бесплодии трубного происхождения и при бесплодии и эндометриозе является высокое содержание IL-8. Ранее была показана важная роль IL-8 в регуляции процесса созревания фолликулов. В имеющихся работах были продемонстрированы значительные изменения в цитокиновом составе фолликулярной жидкости в течение фолликулярной фазы, и эти изменения преимущественно касались содержания IL-8 [79]. Установлено, что концентрация IL-8 в фолликулярной жидкости была выше в перiovуляторную фазу [79]. Исследованиями на животных было продемонстрировано, что содержание IL-8 в эстроген-активных доминантных и преовуляторных фолликулах было значительно выше, чем в

фолликулах малых размеров [115, 215]. При этом IL-8 непосредственно регулировал синтез стероидных гормонов в клетках гранулезы, участвуя в процессе лютеинизации после овуляции [115]. Известно, что IL-8 активно продуцируется различными клеточными типами, такими как нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эпителиальные клетки и др. [63]. На уровне яичников одними из основных продуцентов IL-8, по-видимому, являются клетки гранулезы [148]. В экспериментальной системе было показано, что изолированные из фолликулярной жидкости клетки гранулезы синтезировали и секретировали в больших количествах IL-8, который, в свою очередь, активировал внутриклеточный сигналинг, опосредованный Ca(2+)-зависимым IL-8-специфическим рецептором и p38 митоген-активированной протеинкиназой, в моноцитах и индуцировал их направленную миграцию по химическому градиенту. Причем моноциты также приобретали способность к усиленной продукции этого хемокина, что создавало условия, благоприятные для массированного поступления лейкоцитов в формирующийся corpus luteum [148]. Предполагают, что основным индуктором продукции IL-8 клетками гранулезы является лизофосфатидиновая кислота, которая содержится в больших количествах в фолликулярной жидкости преовуляторного фолликула и рецепторы которой экспрессируются на клетках гранулезы [160]. По-видимому, выявлено нами резкое повышение содержания IL-8 в фолликулярной жидкости пациенток обеих клинических групп относительно показателей сывороточного содержания этого хемокина, которое не сопровождалось какими-либо изменениями его продукции фолликулярными макрофагами относительно выработки IL-8 моноцитами, связано с усилением его локальной выработки именно клетками гранулезы. Более того, нами была выявлена даже более низкая внутриклеточная продукция IL-8 фолликулярными макрофагами по сравнению с моноцитами пациенток с бесплодием и эндометриозом. По-видимому, этот факт следует расценивать как один из факторов, негативно влияющих на процесс фолликулогенеза при данном типе бесплодия.

Хотелось бы отметить, что в спектре цитокинов фолликулярной жидкости в группе женщин с бесплодием трубного происхождения доминировал RANTES, тогда как у пациенток с бесплодием и эндометриозом среди трех изученных нами цитокинов преобладал MCP-1, тогда как уровень RANTES был минимальным. По-видимому, при бесплодии и эндометриозе происходят более глубокие нарушения синтеза и продукции RANTES, которые проявляются не только на системном, но и на локальном уровне.

Макрофаги фолликулярной жидкости по некоторым своим характеристикам также отличались от популяции моноцитов. Как известно, макрофаги являются наиболее многочисленной популяцией клеток иммунной системы, присутствующей в яичниках [99]. Их роль в регуляции овариальных процессов до конца еще не установлена, но полагают, что фолликулярные макрофаги участвуют в регуляции ангиогенеза, а также являются важнейшим источником цитокинов и факторов роста, поддерживающих развитие и рост фолликула [69, 99, 151, 161].

По нашим данным, и у женщин с бесплодием трубного происхождения, и у пациенток с бесплодием и эндометриозом содержание CD86+ макрофагов в фолликулярной жидкости было значительно ниже уровня CD86-позитивных моноцитов. Отличительной чертой группы женщин с бесплодием трубного происхождения было сниженное содержание CD11b+ фолликулярных макрофагов по сравнению с аналогичным показателем в популяции моноцитов.

Полученные результаты, свидетельствующие о низком уровне экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости и угнетении продукции ими хемокина IL-8, позволяют говорить об отсутствии адекватной активации макрофагов яичников у женщин с бесплодием независимо от его этиологии. Существует гипотеза, что процесс овуляции, характеризующийся выходом яйцеклетки из яичника в фаллопиевую трубу, где происходит оплодотворение, представляет по своей сути воспалительный процесс. Показано, что фолликул при созревании

становится гиперемичным, продуцирует простагландины, а клетки гранулезы экспрессируют при овуляции провоспалительные цитокины [201]. Вероятно, у обследованных нами пациенток и с бесплодием трубного происхождения и с бесплодием и эндометриозом не происходит формирования необходимой провоспалительной доминанты на локальном уровне, что может вести к нарушению созревания яйцеклетки и развитию эмбриона низкого качества, обладающего сниженной способностью к имплантации.

Нами также был выявлен ряд отличий в экспрессии функциональных молекул макрофагами фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием и эндометриозом по сравнению с фолликулярными макрофагами женщин с бесплодием трубного происхождения. Так, при эндометриозе уровень CD16+, CD11b+, CD86+ макрофагов был повышен, а содержание CD49e+ макрофагов – снижено по сравнению с показателями в группе пациенток с бесплодием трубного происхождения.

По-видимому, при эндометриозе на локальном уровне изменения функционирования макрофагов в целом соответствуют тем нарушениям, которые были выявлены нами на системном уровне. Эти изменения позволяют говорить о более выраженных нарушениях иммунного ответа при эндометриозе, проявляющимися усиленной активацией аутоиммунных процессов непосредственно на уровне яичников, что может оказывать негативное влияние на репродуктивную функцию этих пациенток.

Таким образом, в целом развитие бесплодия у женщин, участвующих в программе ЭКО, ассоциировано с существенными изменениями показателей врожденного иммунитета как на системном, так и на локальном уровне. Отмечаемое на системном уровне снижение активности RANTES, угнетение экспрессии моноцитами CD16 молекул при повышенной экспрессии CD86 молекул может лежать в основе усиления аутоиммунных реакций как при бесплодии трубного происхождения так и при бесплодии и эндометриозе. У пациенток с бесплодием трубного происхождения дополнительно отмечается высокое сывороточное содержание MCP-1, что можно расценивать как

компенсаторный механизм, способствующий более высокой частоте успеха ЭКО у этих пациенток. При бесплодии и эндометриозе негативное влияние на репродуктивную функцию могут оказывать выявленные нами изменения фенотипического состава моноцитов, которые проявляются низким содержанием HLA-DR+, CD49e+ моноцитов, а также повышением внутриклеточной продукции IL-8 в пуле моноцитов и свидетельствуют об угнетении функционального состояния моноцитов при данном типе бесплодия. Значительные изменения в экспрессии функциональных молекул на поверхности фолликулярных макрофагов у женщин с бесплодием и эндометриозом по сравнению с показателями пациенток с бесплодием трубного происхождения, которые проявлялись высоким содержанием CD16+, CD11b+, CD86+ клеток и низким – CD49e+ макрофагов позволяют говорить о выраженном усилении аутоиммунных реакции при эндометриозе не только на системном, но и на локальном уровне.

На следующем этапе нашего исследования мы провели дифференцированный анализ иммунологических показателей у пациенток двух основных клинических групп в зависимости от качества эмбрионов, которые были получены у них в ходе проведения ЭКО. В результате проведенного анализа был выявлен иммунологических параметров, которые менялись в зависимости от качества эмбрионов.

У пациенток с бесплодием трубного происхождения получение эмбрионов высокого качества отмечалось при высоких значениях MCP-1, минимальных показателях CD16+ моноцитов, нормальном уровне RANTES и CD86+ моноцитов. Можно предположить, что получение эмбрионов высокого качества у женщин с бесплодием трубного происхождения отмечается преимущественно в тех случаях, когда иммунологические параметры в максимальной степени соответствуют нормативным значениям. Только для этой подгруппы пациенток было характерно повышенное сывороточное содержание MCP-1. По-видимому, отсутствие нарушений системной продукции RANTES и нормальное функционирование CD86

молекул, определяющее полноценное взаимодействие фагоцитов крови с клетками адаптивного иммунитета и отсутствие аутоиммунных нарушений, при усилении активности системных провоспалительных реакций, обусловленных МСР-1, отражает наиболее благоприятный иммунологический фон, способствующий нормальному развитию яйцеклетки, из которой впоследствии будут получены эмбрионы высокого качества.

Получение эмбрионов низкого качества у пациенток этой клинической группы было ассоциировано с угнетением системной продукции RANTES, снижением содержания CD11b⁺ моноцитов и CD86⁺ фолликулярных макрофагов при повышенном содержании IL-8⁺ моноцитов. Выше нами уже было отмечено негативное влияние на состояние репродуктивной системы женщин низкой выработки RANTES. Известно, что CD11b молекулы непосредственно вовлекаются в адгезивные реакции по типу клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс [161], поэтому снижение их экспрессии на клеточной мембране фагоцитов может приводить к неполноценному фагоцитозу за счет нарушения взаимодействия фагоцитов с клетками-мишенями. Низкий уровень экспрессии CD86 молекул макрофагами фолликулярной жидкости позволяет говорить об отсутствии адекватной активации макрофагов яичников. Таким образом, у женщин бесплодием трубного происхождения и получением эмбрионов низкого качества не происходит формирования воспалительной доминанты, играющей важную роль в нормальном процессе созревания яйцеклетки. Следствием этого, по-видимому, является получение неполноценного ооцита и, как следствие – в дальнейшем эмбриона низкого качества.

В группе женщин с бесплодием и эндометриозом получение эмбрионов высокого качества также ассоциировалось с минимальным количеством иммунных нарушений. Выявленные у женщин этой подгруппы изменения иммунологических параметров соответствовали описанным выше изменениям, характерным для всех обследованных женщин с бесплодием, и

проявлялись сниженным сывороточным уровнем RANTES, пониженным количеством CD16⁺ моноцитов и повышенным – CD86⁺ моноцитов. Максимальное число иммунных нарушений было выявлено нами при получении эмбрионов низкого качества. Как подгруппа женщин с бесплодием трубного происхождения, так и подгруппа пациенток с бесплодием и эндометриозом и получением эмбрионов низкого качества характеризовались низким уровнем CD11b⁺ моноцитов и высоким – IL8⁺ моноцитов и фолликулярных макрофагов. Отличительной чертой подгруппы с бесплодием и эндометриозом и получением эмбрионов низкого качества было низкое содержание в крови и фолликулярной жидкости HLA-DR⁺ фагоцитов при угнетении экспрессии CD49e на поверхности моноцитов.

Следует особо выделить выявленный нами факт взаимосвязи экспрессии HLA-DR молекул с качеством эмбрионов. Несмотря на то, что в целом по средним групповым значениям уровня HLA-DR⁺ моноцитов у пациенток с бесплодием трубного происхождения мы не выявили достоверных изменений в зависимости от качества полученных у них эмбрионов, но проведенный нами индивидуальный анализ данных показал, что как при бесплодии трубного происхождения, так и при бесплодии и эндометриозе низкие показатели HLA-DR⁺ моноцитов отмечались преимущественно у тех пациенток, у которых были получены эмбрионы низкого качества и, напротив, высокие значения уровня HLA-DR⁺ моноцитов были характерны для пациенток, у которых при оплодотворении *in vitro* было получено эмбрионы высокого качества. Нами было определено пороговое значение показателя HLA-DR⁺ моноцитов и установлено, что в случаях, когда этот показатель составляет 68% и более, у женщин, участвующих в программе ЭКО, прогнозируется получение эмбрионов высокого качества. Точность прогноза составляет 80,0%, чувствительность – 71,4%, специфичность – 85,7%. На основании полученных данных нами был разработан «Способ прогнозирования качества эмбриона при проведении

ЭКО у женщин с бесплодием», на который получен Патент № 2441243 от 27 января 2012г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя результаты проведенного нами исследования, можно сделать заключение о том, что качество эмбрионов, полученных при проведении ЭКО у пациенток с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом, зависит от ряда клинических параметров, а также определяется состоянием врожденного иммунитета как на системном (периферическая кровь), так и на локальном (фолликулярная жидкость) уровне. У пациенток с бесплодием трубного происхождения, которые отличались от женщин с бесплодием и эндометриозом более высокой частотой вторичного бесплодия, бактериального вагиноза и внематочных беременностей в анамнезе. К факторам риска получения эмбрионов низкого качества относились: возраст пациенток 38 лет и старше, хронический эндометрит, наличие ИППП в анамнезе, высокий (более 10 мЕд/л) уровень ФСГ, низкий (менее 1 нг/мл) уровень АМГ, объем яичников менее 8 см³, толщина эндометрия менее 7мм, получение менее 5 ооцитов при TVP и менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro*. У пациенток с бесплодием и эндометриозом, для которых было характерно первичное бесплодие, высокая частота нарушений менструальной функции по типу НЛФ, хронического эндометрита, оперативных вмешательств на яичниках в анамнезе, факторами риска получения эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО являются: гиперплазия эндометрия и оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе, забор менее 5 ооцитов при TVP и получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro*. Наступление беременности в результате программы ЭКО чаще отмечается при бесплодии трубного происхождения, чем при бесплодии и эндометриозе.

Негативное влияние на состояние репродуктивной функции пациенток, как с бесплодием трубного происхождения, так и с бесплодием и эндометриозом могут оказать такие изменения врожденного иммунитета, как низкое сывороточное содержание хемокина RANTES, низкий уровень CD16+

моноцитов и высокий – CD86⁺ моноцитов. У пациенток с бесплодием и эндометриозом отмечаются более выраженные изменения функционального состояния моноцитов крови и макрофагов фолликулярной жидкости, которые проявляются по сравнению с группой пациенток с бесплодием трубного происхождения высоким уровнем IL-8⁺ моноцитов, максимально повышенным содержанием CD86⁺, но сниженным – CD49e⁺ моноцитов и макрофагов при низком сывороточном уровне MCP-1. Отличительной чертой пациенток с бесплодием трубного происхождения было повышенное по сравнению с показателями здоровых женщин сывороточное содержание MCP-1. Получение эмбрионов высокого качества как у женщин с бесплодием трубного происхождения, так и у пациенток с бесплодием и эндометриозом отмечалось преимущественно у женщин с минимальным количеством выявленных иммунных нарушений. Получение эмбрионов низкого качества при бесплодии трубного происхождения было ассоциировано с низким сывороточным содержанием RANTES, высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами, сниженной экспрессией CD11b молекул моноцитами и CD86 молекул фолликулярными макрофагами. У женщин с бесплодием и эндометриозом эмбрионы низкого качества получены при низких показателях относительного содержания HLA-DR⁺, CD11b⁺, CD49e⁺ моноцитов и HLA-DR⁺ макрофагов. При значениях относительного содержания HLA-DR⁺ моноцитов 68% и более прогнозируется получение эмбрионов высокого качества как у пациенток с бесплодием трубного происхождения, так и у женщин с бесплодием и эндометриозом.

ВЫВОДЫ

1. Для пациенток с бесплодием трубного происхождения характерно: вторичное бесплодие (75,8%), высокая частота воспалительных процессов органов малого таза (100%), бактериального вагиноза (7,4%), внематочных беременностей (48,5%) в анамнезе. Для женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии характерно: первичное бесплодие (57,1%), высокая частота нарушений менструальной функции по типу НЛФ (27%), хронического эндометрита (37,9%), оперативных вмешательств на яичниках (47,6%) в анамнезе. Получение эмбрионов высокого качества при проведении программы ЭКО чаще отмечается при бесплодии трубного происхождения (53,5%) по сравнению с бесплодием при эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии (36,5%).

2. Факторами риска получения эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО у женщин с бесплодием трубного происхождения являются: получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (ОШ= 36,7), толщина эндометрия менее 7мм (ОШ=10,1), уровни ФСГ в крови более 10мЕд/л (ОШ=9,3) и АМГ менее 1нг/мл (ОШ=8,8), хронический эндометрит в анамнезе (ОШ=7,1), возраст пациенток 38 лет и старше (ОШ=5,4), получение менее 5 ооцитов (ОШ=4,7), ИППП в анамнезе (ОШ=4,0), объем яичников менее 8 см³ (ОШ=3,0). Факторами риска получения эмбрионов низкого качества при проведении ЭКО у женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии являются: гиперплазия эндометрия в анамнезе (ОШ=8,3), получение менее 3 эмбрионов при оплодотворении *in vitro* (ОШ=7,9) и менее 5 ооцитов при TVP (ОШ=4,3), оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе (ОШ=3,1).

3. Пациентки как с бесплодием трубного происхождения, так и с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии имеют сниженное содержание хемокина RANTES в периферической крови по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. Для пациенток

с бесплодием трубного происхождения характерно повышенное сывороточное содержание MCP-1, а для женщин с эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – высокий уровень IL-8+ моноцитов. При бесплодии трубного происхождения получение эмбрионов низкого качества связано с низким уровнем RANTES и высокой внутриклеточной продукцией IL-8 моноцитами. При бесплодии и эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии получение эмбрионов низкого качества отмечается при высоком содержании в крови IL-8+ моноцитов.

4. У женщин с бесплодием трубного происхождения и у пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии в периферической крови снижено содержание CD16+ моноцитов и повышено количество CD86+ моноцитов по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин. У пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии снижено содержание HLA-DR+ и CD49e+ моноцитов. У женщин с бесплодием трубного происхождения и получением эмбрионов низкого качества в отличие от женщин, у которых были получены эмбрионы высокого качества, снижено содержание моноцитов с фенотипом CD11b+ и повышен уровень CD16+ моноцитов. У женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии при получении эмбрионов низкого качества в крови снижен уровень CD49e+ моноцитов и снижено содержание HLA-DR+ и CD11b+ моноцитов по сравнению с женщинами, у которых получены эмбрионы высокого качества.

5. Для фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием трубного происхождения и пациенток с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии характерно более высокое по сравнению с периферической кровью содержание IL-8 и MCP-1, но сниженный уровень RANTES. Отличительной характеристикой фолликулярных макрофагов женщин с бесплодием трубного происхождения является низкая экспрессия CD11b молекул, а в группе пациенток с бесплодием и эндометриозом

маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – сниженная внутриклеточная продукция IL-8 макрофагами по сравнению с показателями в популяции моноцитов.

6. В фолликулярной жидкости женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии по сравнению с пациентками с бесплодием трубного происхождения имеет место повышенная экспрессия CD16, CD11b и CD86 молекул и сниженная - CD49e молекул макрофагами. При этом получение эмбрионов низкого качества при бесплодии трубного происхождения ассоциировано со сниженным содержанием CD86+ макрофагов, а при бесплодии и эндометриозе маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии – сниженным уровнем экспрессии HLA-DR молекул макрофагами фолликулярной жидкости по сравнению с показателями пациенток, у которых были получены эмбрионы высокого качества.

7. Показатель относительного содержания HLA-DR+ моноцитов периферической крови 68% и более позволяет прогнозировать получение эмбрионов высокого качества у женщин с бесплодием трубного происхождения и у женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии при проведении программы ЭКО с точностью 80%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется проводить иммунологическое обследование женщин с бесплодием трубного происхождения и женщин с бесплодием и эндометриозом маточных труб и тазовой брюшины I-II стадии, планирующих проведение ЭКО, с определением в периферической крови относительного содержания HLA-DR⁺ моноцитов и при его значениях 68% и более прогнозировать получение эмбрионов высокого качества, а при значении менее 68% - получение эмбриона низкого качества с точностью 80% для своевременного назначения дополнительных лечебных мероприятий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

аГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона

антГнРГ – антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

ВМС – внутриматочное средство

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ДИ - доверительный интервал

ЕК – естественные киллеры

КБ - клостилбегит

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИОСМ – искусственное оплодотворение спермой мужа

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МСГ - метросальпингография

НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы

ОШ – отношение шансов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – перенос эмбриона

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЧМГ – человеческий менопаузальный гонадотропин

ЧНИ – частота наступления имплантации

чХГ – человеческий хорионический гонадотропин

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

IL – интерлейкин

МСР – моноцитарный белок хемотаксиса

TVР – трансвагинальная пункция фолликулов

RANTES - регулируемый активацией фактор, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-клетками

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирова, А. А. Факторы, влияющие на исходы ЭКО (обзор литературы) / А. А. Амирова, Т. А. Назаренко, Н. Г. Мишиева // Проблемы репродукции. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 68–74.
2. Антитела к гормонам репродуктивной системы как возможный фактор риска неблагоприятного исхода в циклах экстракорпорального оплодотворения / И. В. Менжинская [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 2. – С. 41–45.
3. Аншина, М. Б. Принципы гормонального мониторинга в программе ЭКО / М. Б. Аншина // Проблемы репродукции. – 1995. – Т. 1, № 2. – С. 43–48.
4. Белобородов, С. М. Цилиарная дискенезия в патогенезе трубного бесплодия / С. М. Белобородов // Проблемы репродукции. – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 39–45.
5. Белоцкий, С. М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинический эффект / С. М. Белоцкий, Р. Р. Авталион. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 240 с.
6. Боярский, К. Ю. Старение репродуктивной системы и результативность вспомогательных репродуктивных технологий / К.Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 1996. – № 4. – С. 57–67.
7. Боярский, К. Ю. Цитогенетический анализ ооцитов, полученных у женщин старшей возрастной группы / К. Ю. Боярский, С. Е. Василевская // Проблемы репродукции. – 1998. – № 2. – С. 34–35.
8. Боярский, К. Ю. Клиническое значение тестов определения овариального резерва в лечении бесплодия: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01 / Боярский Константин Юрьевич. – СПб., 2000. – 26 с.

9. Влияние возраста женщины на процесс оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов в культуре / О. А. Воробьева [и др.] // Проблемы репродукции. – 1998. – № 6. – С. 46–49.
10. Влияние патологии эндометрия и нарушений в системе гемостаза на исходы вспомогательных репродуктивных технологий / Е. Б. Рудакова [и др.] // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2009. – № 7. – С. 101–106.
11. Воробьева, О. А. Особенности оплодотворения ооцитов доимплантационного развития эмбрионов человека в зависимости от показателей гаметогенеза: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.25 / Воробьева Ольга Анатольевна. – СПб., 2001. – 34 с.
12. Гинекология / В.И. Дуда [и др.]. – М.: АСТ; Минск: Харвест, 2005. – 896 с.
13. Гинекология: национальное руководство / под ред. В. И. Кулакова [и др.]. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2011. – 1120 с.
14. Елисеева, М. А. Функциональное состояние перитонеальных макрофагов и влияние на него *in vitro* препарата глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) у женщин с наружным генитальным эндометриозом: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01, 14.03.09 // Елисеева Мария Андреевна. – Иваново, 2010. – 24 с.
15. Значение овариального резерва в лечении бесплодия у женщин старшего репродуктивного возраста / Т. А. Назаренко [и др.] // Проблемы репродукции. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 56–59.
16. Иммунологическая загадка беременности / Н. Ю. Сотникова [и др.]; под ред. Н. Ю. Сотниковой. – Иваново: Издательство МИК, 2005. – 276с.
17. Калинина, Е. А. Научно-клинический анализ работы отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия в 2011 году / Е. А.

- Калинина, К. У. Алиева, М. Б. Стрельченко // *Акушерство и гинекология*. – 2013. – № 1. – С. 81–85.
18. Каменецкий, Б. А. Применение ультразвукового сканирования эндометрия в программах вспомогательной репродукции / Б. А. Каменецкий // *Проблемы репродукции*. – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 33–38.
19. Корнеева, И. Е. Трубно-перитонеальное бесплодие: современный подход к лечению / И. Е. Корнеева, З. З. Токарева, Е. Н. Медведева // *Мать и дитя: материалы IX Всерос. науч. форума*. – М., 2007. – С. 427–428.
20. Корсак, В. С. Значимость толщины и ультразвуковой структуры эндометрия в программе ЭКО / В. С. Корсак, Б. А. Каменецкий, А. Б. Михайлов // *Проблемы репродукции*. – 2001. – Т. 7, № 3. – С. 36–39.
21. Корсак, В. С. Российская ассоциация репродукции человека. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2010 г. / В. С. Корсак. – М., 2012. – 31 с.
22. Краснопольская, К. В. Длительность непроходимости маточных труб и эффективность программ ЭКО / К. В. Краснопольская, А. С. Калугина // *Акушерство и гинекология*. – 1999. – № 6. – С. 31–33.
23. Краснопольская, К. В. Экстракорпоральное оплодотворение в комплексном лечении женского бесплодия: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.01 / Краснопольская Ксения Владиславовна. – М., 2003. – 304 с.
24. Кулаков, В. И. Репродуктивное здоровье: проблемы, достижения, перспективы / В. И. Кулаков // *Проблемы репродукции*. – 1999. – № 2. – С. 2–5.
25. Кулаков, В. И. Репродуктивное здоровье населения России / В. И. Кулаков // *Гинекология*. – 2007. – № 9(1). – С. 7–9.
26. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / под ред. В. И. Кулакова, Б. В. Леонова, Л. Н. Кузьмичева. – М.: МИА, 2008. – 592 с.

27. Логинова, О. Н. Клинические особенности наружного генитального эндометриоза / О. Н. Логинова, М. М. Сонова // Акушерство. Гинекология. Репродукция. – 2011. – № 3. – С. 5–9.
28. Макацария, А. Д. Антифосфолипидный синдром, генетические тромбофилии в патогенезе основных форм акушерской патологии / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе // Русский медицинский журнал. – 2006. – Специальный выпуск. – С. 2–10.
29. Манухин, И. Б. Гинекологическая эндокринология. Клинические лекции: руководство для врачей / И. Б. Манухин, Л. Г. Тумилович, М. А. Геворкян. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 280 с.
30. Морозова, А. В. Результативность экстракорпорального оплодотворения у пациенток, перенесших оперативные вмешательства на придатках матки: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01 / Морозова Анна Владиславовна. – М., 2007. – 24 с.
31. Мотовилова, Н. О. Значение иммунологических факторов в прогнозе эффективности циклов ЭКО у женщин репродуктивного возраста: автореф. дис.... канд. мед. наук: 14.00.01 / Мотовилова Наталия Олеговна. – СПб., 2012. – 24 с.
32. Назаренко, Т. А. Стимуляция функции яичников / Т. А. Назаренко. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 272 с.
33. Назаренко, Т. А. Клинические аспекты лечения бесплодия в браке. Диагностика и терапевтические программы с использованием методов восстановления естественной фертильности: руководство / Т. А. Назаренко, К. В. Краснопольская. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 376 с.
34. Нарушения функции щитовидной железы и репродуктивное здоровье женщин / И. В. Бердашкевич, И. Е. Корнеева, В. В. Фадеев, С. Г. Перминова // Проблемы репродукции. – 2008. – Т. 14, № 5. – С. 24–34.

35. Об эффективности экстракорпорального оплодотворения / Н. Д. Фанченко [и др.] // Проблемы репродукции. – 2000. – Т. 6, № 5. – С. 22–26.
36. Ольховская, М. А. Комплексная оценка состояния эндометрия в программе ЭКО: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01 / Ольховская Мария Андреевна. – М., 2007. – 24 с.
37. Оценка морфологии переимплантационных эмбрионов на различных стадиях развития *in vitro* (обзор литературы) / М. М. Левиашвили, Н. Г. Мишиева, Н. Ю. Костромина, Т. А. Назаренко // Проблемы репродукции. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 74–79.
38. Пальмер, П. Е. Руководство по ультразвуковой диагностике / П. Е. Пальмер. – М.: Медицина, 2000. – 334 с.
39. Петунина, Н. А. Современные подходы к лечению ожирения / Н. А. Петунина // Гинекология. – 2002. – Т. 4, № 1. – С. 32–35.
40. Прогнозирование качества эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения / М. А. Липин [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(14), № 2(1). – С. 102–103.
41. Рецептивность эндометрия у пациенток с эндометриозом ассоциированным бесплодием (обзор литературы) / Е. А. Калинина, А. В. Колотовкина, Е. А. Коган, Л. В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 55–62.
42. Роль иммунных факторов в функционировании репродуктивной системы женщины / Н. О. Мотовилова, А. Н. Буйнова, А. А. Доценко, А. Ю. Грязнов // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2010. – № 2/1. – С. 57–58.
43. Романова, С. В. Значение факторов врожденного иммунитета в патогенезе наружного генитального эндометриоза I-II стадии у пациенток с бесплодием и обоснование использования препарата глюкозаминилмурамилдипептида в комплексной терапии данной

- патологии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01 / Романова Светлана Владимировна. – Иваново, 2013. – 24 с.
44. Руководство по социальной педиатрии / под ред. В. Г. Дьяченко. – Хабаровск: ДВГМУ, 2010. – 336 с.
45. Селезнева, Н. Д. Хирургическое лечение трубного бесплодия и стерилизация / Н. Д. Селезнева // Оперативная гинекология / под ред. В. И. Кулакова. – М.: Медицина, 1998. – С. 336–342.
46. Сидельникова, В. М. Подготовка и ведение беременности с привычным невынашиванием: методические пособия и клинические протоколы / В. М. Сидельникова. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 219 с.
47. Симбирцев, А. С. Цитокины – классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–22.
48. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа / Л. В. Ковальчук [и др.]. – М.: РГМУ, 2001. – 158 с.
49. Сметник, В. П. Неоперативная гинекология: руководство для врачей / В. П. Сметник, Л. Г. Тумилович. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 632 с.
50. Смольникова, В. Ю. Повторные неудачи имплантации и применение ПГД для оптимизации программ ВРТ (обзор литературы) / В. Ю. Смольникова, Л. Н. Кузьмичев, Н. В. Романова // Проблемы репродукции. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 63–67.
51. Современные методы преодоления бесплодия / под ред. Е. М. Яковенко, С. А. Яковенко. – М.: Миклош, 2010. – 280 с.
52. Современные подходы к комплексной оценке и подготовке эндометрия у пациенток программы ЭКО (обзор литературы) / К. У. Алиева [и др.] // Гинекология. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 16–18.
53. Структура женского бесплодия и прогноз восстановления репродуктивной функции при использовании современных

- эндоскопических методов / В. И. Кулаков [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2001. – № 3. – С. 33–36.
54. Таболова, В. К. Влияние хронического эндометрита на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий: морфо-функциональные и молекулярно-генетические особенности / В. К. Таболова, И. Е. Корнеева // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 10. – С. 17–22.
55. Трубное бесплодие и экстракорпоральное оплодотворение / А. В. Коновалова, А. А. Соломатина, А. А. Науменко, К. И. Степанов // Российский вестник акушера–гинеколога. – 2011. – Т. 17, № 2. – С. 75–78.
56. Феоктистов, А. А. Оценка частоты, морфологической и микробиологической структуры хронического эндометрита у пациенток с трубно-перитонеальной формой бесплодия и неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения / А. А. Феоктистов, Т. В. Овсянникова, Д. П. Камилова // Гинекология. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 31–34.
57. Формирование бластоцист и частота наступления имплантации у женщин разных возрастных групп в зависимости от длительности бесплодия в анамнезе / А. В. Светлаков, М. В. Яманова, А. Б. Салмина, О. А. Серебренникова // Проблемы репродукции. – 2003. – Т. 9, № 4. – С. 59–63.
58. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского бесплодия (теоретические и практические подходы): руководство для врачей / под ред. В. И. Кулакова, Б. В. Леонова. – М., 2001. – 782 с.
59. Элдер К., Эйвери С., Милез К. / IVF. Лабораторные процедуры. Bourn hallam group. – 1990. – 23 с.
60. Эндометриоз: этиология и патогенез, проблема бесплодия и современные пути ее решения в программе экстракорпорального

- оплодотворения / Л. Н. Кузьмичев [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2001. – № 2. – С. 8–10.
61. Эффективность программы ЭКО у женщин с миомой матки с учетом маркеров рецептивности эндометрия – пиноподий, LIF, VEGF-A, КЛАУДИНА-5 / А. Е. Мартынова, В. Ю. Смольникова, Т. А. Демура, Е. А. Коган // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 8. – С. 40–45.
62. Яманова, М. В. Эндокринное бесплодие: клеточная и молекулярная патология имплантации / М. В. Яманова, А. Б. Салмина. – М.: Медика, 2009. – 208 с., ил.
63. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
64. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation / L. Bianchi [et al.] // J Proteomics. – 2013. – Vol. 2, № 90. – P. 61–76.
65. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif / J. F. Bazan [et al.] // Nature. – 1997. – Vol. 385. – P. 640–644.
66. A study of recipient related predictors of success in oocyte donation program / P. Gupta [et al.] // J Hum Reprod Sci. – 2012. – Vol. 5(3). – P. 252–257.
67. Achache, H. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation / H. Achache, A. Revel // Hum Reprod. – 2006. – Vol. 12(6). – P. 731–746.
68. Actions of the chemotactic chemokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 and MIP-1 on human monocytes / M. Ugucioni [et al.] // Eur. J. Immunol. – 1995. – Vol. 25. – P. 64.
69. Adrenomedullin and vascular endothelial growth factor production by follicular fluid macrophages and granulosa cells / J. Balasch [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19. – P. 808–814.
70. Aghajanova, L. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics / L. Aghajanova, A. E.

- Hamilton, L. C. Giudice // *Semin Cell Dev Biol.* – 2008. – Vol. 19(2). – P. 204–211.
71. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review / K. Khoufache, [et al.] // *Minerva Endocrinol.* – 2012. – Vol. 37(1). – P. 75–92.
72. Antimüllerian hormone (AMH); a reliable biomarker of oocyte quality in IVF / P. Lehmann [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2014. – Vol. 31(4). – P. 493–498.
73. Antimüllerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study / O. Shebl [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2009. – Vol. 25(11). – P. 713–716.
74. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging / de A. Vet [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77(2). – P. 357–362.
75. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization / D. B. Seifer [et al.] // *Fertil Steril.* – 1996. – Vol. 66(4). – P. 593–598.
76. Apoptosis related genes expressed in cultured Fallopian tube epithelial cells infected in vitro with *Neisseria gonorrhoeae* / P. A. Reyes [et al.] // *Biol. Res.* – 2007. – Vol. 40(3). – P. 319–327.
77. Appay, V. RANTES: a versatile and controversial chemokine / Appay, V., S. L. Rowland-Jones // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22. – P. 83–87.
78. Barnhart, K. Effect of endometriosis on in vitro fertilization / K. Barnhart, R. Dunsmoor-Su, C. Coutifaris // *Fertil Steril.* – 2002. – Vol. 77. – P. 1148–1155.
79. Baskind, N.E. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients / N. E. Baskind, N. M. Orsi, V. Sharma // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 102(2). – P. 410–418.

80. Bernard, D. J. Mechanisms of inhibin signal transduction / D. J. Bernard, S. C. Chapman, T. K. Woodruff // *Recent. Prog. Horm. Res.* – 2001. – Vol. 56. – P. 417–450.
81. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function / V. Gerl [et al.] // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – Vol. 69(7). – P. 1370–1377.
82. Bourdieu, A. Synchronous regulation of the determinants of endometrial receptivity to interleukin 1 at key stages of early embryo implantation in vivo / A. Bourdieu, V. Martel, A. Akoum // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 101(4). – P. 1183–1193.
83. Bowen, J. A. The role of integrins in reproduction / J. A. Bowen, J. S. Hunt // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 223. – P. 331–343.
84. Boyum, A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* – 1968. – Vol. 97. – P. 51–76.
85. Broekmans, F. J. Prognostic models for high and low ovarian response in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol / F. J. Broekmans, P. J. Verweij, M. J. Eijkemans // *Hum Reprod.* – 2014. – Vol. 5. – deu090.
86. Cahill, D. J. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis / D. J. Cahill, M. G. Hull // *Hum. Reprod. Update.* – 2000. – Vol. 6(1). – P. 56–66.
87. CCL5-CCR5-mediated Apoptosis in T Cells. Requirement for glycosaminoglycan binding and CCL5 aggregation / T. T. Murooka [et al.] // *The journal of biological chemistry.* – 2006. – Vol. 281, № 35. – P. 25184–25194.
88. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and

- contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure / R. D. Abeles [et al.] // *Cytometry*. – 2012. – Vol. 81(10). – P. 823–834.
89. Cervera, R. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction / R. Cervera, J. Balasch // *Hum. Reprod. Update*. – 2008. – Vol. 14. – P. 359–366.
90. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial Stromal cells and peritoneal fluid / D. Hornung [et al.] // *Mol Hum Reprod*. – 2001. – Vol. 7. – P. 163–168.
91. Chiamchanya, C. Study of the causes and the results of treatment in infertile couples at Thammasat Hospital between 1999-2004 / C. Chiamchanya, W. Su-angkawatin // *J Med Assoc Thai*. – 2008. – Vol. 91(6). – P. 805–812.
92. Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate / Y. Nakaoka, E. Okamoto, N. Miharu, K. Ohama // *Hum.Reprod*. – 1998. – Vol. 13, № 2. – P. 419–424.
93. Cline, A. M. Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in-vitro fertilization? / A. M. Cline, W. H. Kutteh // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. – 2009. – Vol. 21. – P. 291–295.
94. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+T lymphocytes / S. Muller [et al.] // *Eur. J. Immunol*. – 1995. – Vol. 25. – P. 1744.
95. Comparative multiplex analysis of cytokines, chemokines and growth factors in follicular fluid of normoresponder women undergoing ovum donation with gonadotropin-releasing hormone agonist versus gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols / N. Malhotra [et al.] // *Hum. Reprod*. – 2013. – Vol. 6(3). – P. 205–212.
96. Comparisons of inhibin B versus antimullerian hormone in poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization / R. Tan [et al.] // *Fertil. Steril*. – 2011. – Vol. 96(4). – P. 905–911.

97. Comparison of Endocrine Profile and In Vitro Fertilization Outcome in Patients with PCOS, Ovulatory PCO, or Normal Ovaries / Y. P. Zhong [et al.] // *Int. J. Endocrinol.* – 2012; 2012:492803
98. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men / J. A. Politch, L. Tucker, F.P. Bowman, D. J. Anderson // *Hum Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 2928–2935.
99. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature / E. C. Turner [et al.] // *Reproduction.* – 2011. – Vol. 141. – P. 821–831.
100. Contemporary genetic technologies and female reproduction / Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2010 / B. C. Fauser [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2011. – Vol. 17(6). – P. 829–847.
101. Correlation between expression of selectins and migration of eosinophils into the bovine ovary during the periovulatory period / F. Rohm, K. Spanel-Borowski, W. Eichler, G. Aust // *Cell Tissue Res.* – 2002. – Vol. 309. – P. 313–322.
102. Correlations between anti-mullerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes / S. Cupisti [et al.] // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – Vol. 12, № 12. – P. 604–608.
103. Correlations between antral follicle count and ultrasonographic ovarian parameters and clinical variables and outcomes in IVF cycles / A Ben-Haroush [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2012. – Vol. 28(6). – P. 432–435.
104. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET / K. S. Lee [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2001. – Vol. 18, № 9. – P. 490–498.
105. Cytokine and hormonal profile in serum samples of patients undergoing controlled ovarian stimulation: interleukin-1beta predicts

- ongoing pregnancy / T. C. Bonetti [et al.] // *Hum Reprod.* – 2010. – Vol. 25(8). – P. 2101–2106.
106. de Carvalho, B. R. Increased basal FSH and AMH levels as predictors of low-quality follicles in infertile women with endometriosis / B. R. de Carvalho, A. C. Rosa -e-Silva, J. C. Rosa -e-Silva // *Int J Gynaecol Obstet.* – 2010. – Vol. 110 (3). – P. 208–212.
107. Detection of soluble ST2 in human follicular fluid and luteinized granulosa cells/ J.H. Southcombe [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (9). – P. 10.
108. Determination of antimullerian hormone in women / R. Kucera [et al.] // *Ceska Gynecol.* – 2013. – Vol. 78(3). – P. 282-288.
109. DHEA supplementation may improve IVF outcome in poor responders: a proposed mechanism / J. H. Hyman [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2013. – Vol. 168(1). – P. 49–53.
110. Dietterich, C. Increased endometrial thickness on the day of human chronic gonadotropin injection does not adversely affect pregnancy or implantation rates following in vitro fertilization – embryo transfer / C. Dietterich, J. Check, K. Clweij // *Fertil Steril.* – 2002. – Vol. 77. – P. 781–786.
111. Do endometriomas induce an inflammatory reaction in nearby follicles / H. K. Opoien [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28(7). – P. 1837–1845.
112. Driscoll, G. I. Variation in the determination of follicular diameter: an inter-unit pilot study using an ultrasonic phantom / G. I. Driscoll, J. P. Tyler, D. Carpenter // *Hum Reprod.* – 1997. – Vol. 12(11). – P. 2465–2468.
113. Dunson, D. B. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle / D. B. Dunson, B. Colombo, D. D. Baird // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 5. – P. 1399–1403.
114. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF- β 1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment / M. Z. Gao [et al.] // *J Assist*

- Reprod Genet. – 2012. - Vol. 29(10). – P. 1091–1096.
115. Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture / T. Shimizu [et al.] // *Cytokine*. – 2012. – Vol. 57(1). – P. 175–181.
116. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction / G. Zizzo, B. A. Hilliard, M. Monestier, P. L. Cohen // *J Immunol*. – 2012. – Vol. 1, № 189(7). – P. 3508–3520.
117. Endometriosis and Infertility - a consensus statement from ACCEPT / J. Koch [et al.] // *Obstet. Gynaecol*. – 2012. – Vol. 27. – P. 1479–1482.
118. Endometriosis and oocyte quality / H. Saito [et al.] // *Gynecol Obstet Invest*. – 2002. – Vol. 53, Suppl. 1. – P. 46–51.
119. Eosinophils in the human corpus luteum: the role of RANTES and eotaxin in eosinophil attraction into periovulatory structures / G. Aust [et al.] // *Mol Hum Reprod*. – 2000. – Vol. 6(12). – P. 1085–1091.
120. Epstein-Barr virus induces the differentiation of semi-mature dendritic cells from cord blood monocytes / Y. Y. Jin [et al.] // *Hum Immunol*. – 2014. – Vol. 75(4). – P. 306–316.
121. Factors predicting the cumulative outcome of IVF/ICSI treatment: a multivariable analysis of 2450 patients / Q. F. Cai, F. Was, R. Huang, H. W. Zhang // *Hum. Reprod*. – 2011. – Vol. 26. – P. 2532–2540.
122. Factors that predict the probability of a successful clinical outcome after induction of oocyte maturation with a gonadotropin-releasing hormone agonist / N. Kummer [et al.] // *Fertil. Steril*. – 2011. – Vol. 96. – P. 63–68.
123. Fatemi, H.M. High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol./ H.M. Fatemi, K. Doody, G. Griesinger, H. Witjes, B. Mannaerts // *Hum Reprod*. – 2013. – Vol. 28(2). – P. 442–452.

124. Fertility and Maternal Age: Strategies to improve pregnancy outcome / L. Krey, H. Liu, J. Zhang, J. Grifo // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 943. – P. 26–33.
125. Fisher, D.A. *The Quest diagnostics manual. Endocrinology test selection and interpretation*, 4th ed. San Juan Capistrano. – CA: Quest Diagnostics Nichols Institute, 2007. – 369 p.
126. Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type I / A. S. Wolff [et al.] // *Scand J Immunol.* – 2010. – Vol. 71(6). – P. 459–467.
127. Follicular fluid insulin like growth factor-1(FF IGF-1) is a biochemical marker of embryo quality and implantation rates in in vitro fertilization cycles / B. N. Mehta [et al.] // *Journal of Human Reproductive Science.* – 2013. – Vol. 6, Issue 2. – P. 140–146.
128. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize / X. Wen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol. 85, № 6. – P. 1723–1729.
129. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success / A. Sarapik [et al.] // *Clin.Dev.Immunol.* – 2012. – P. 2012
130. Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans / A. Pichert, D. Schlorke, S. Franz, J. Arnhold // *Biomater.* – 2012. – Vol. 2(3). – P. 142–148.
131. Gazvani, R. New considerations for the pathogenesis of endometriosis / R. Gazvani, A. Templeton // *International Journal of Gynecology &Obstetrics.* – 2002. – Vol. 76. – P. 117–126.
132. Gordon, I. O. Defective antitumour function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients / I. O. Gordon, R. S. Freedman // *Clin. Cancer. Res.* – 2006. – Vol. 12, № 5. – P. 1515–1524.
133. Gougeon A. The biological aspects of risks of infertility due to age: the female side / A. Gougeon // *Rev. Epidemiol. Sante. Publique.* – 2005. –

Vol. 53, № 2. – P. 37–45.

134. Grynnerup, A. G. Antimullerian hormone levels in salpingectomized compared with non salpingectomized women with tubal factor infertility and women unexplained infertility / A. G. Grynnerup, A. Lindhard, S. Sorensen // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2013. – Vol. 92(11). – P. 1297-1303.
135. Hardy, K. Cell death in the mammalian blastocyst / K. Hardy // *Mol. Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 3. – P. 919–925.
136. High circulating CD3+CD56+CD16+ natural killer-like cells levels predict a better IVF treatment outcome / J. Zhou [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 97(2). – P. 197–203.
137. Holoch, K. J. Endometriosis and infertility / K. J. Holoch, B. A. Lessey // *Clin Obstet Gynecol.* – 2010. – Vol. 53(2). – P. 429–438.
138. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation / P. Caballero-Campo [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 8(4). – P. 375–384.
139. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis / J. S. Cunha-Filho [et al.] // *Horm Metab Res.* – 2001. – Vol. 33(4). – P. 216–220.
140. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates leukocyte migration and adhesion / T. Imai [et al.] // *Cell.* – 1997. – Vol. 91. – P. 521–530.
141. IL-18 and IL-18 binding protein concentration in ovarian follicular fluid of women with "tubal factor" subjected to in vitro fertilization / P. Radwan [et al.] // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* – 2013. – Vol. 67. – P. 463–470.
142. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid in relation to etiology of infertility and their relevance to IVF outcome / M. E.

- Hammadeh [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2002. – Vol. 47(2). – P. 82–90.
143. Immuno-localization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissue and cells / D. Hornung [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1997. – Vol. 85. – P. 1621–1628.
144. In vitro fertilization in spontaneous cycles-our experience / R. Bauman, D. Mihaljevic, S. Kupesic, A. Kurjak // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2002. – Vol. 10, № 102(2). – P. 184–187.
145. Increasing age influences uterine integrity, but not ovarian function or oocyte quality, in the cheetah (*Acinonyx jubatus*) / A. E. Crosier [et al.] // *Biol Reprod.* – 2011. – Vol. 85(2). – P. 243–253.
146. Influence of various tubal surgeries to serum antimullerian hormone level and outcome of the subsequent IVT-ET treatment / L. Ni [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2013. – Vol. 29 (4). – P. 345–349.
147. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization / G. Fried [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2003. – Vol. 20, № 5. – P. 167–176.
148. Interaction between granulosa-lutein cells and monocytes regulates secretion of angiogenic factors in vitro / A. Połec [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26(10). – P. 2819–2829.
149. IVF outcome in women with endometriosis in relation to tumor necrosis factor and antimullerian hormone / H. Falconer [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2009. – Vol. 18 (4). – P. 582–588.
150. IVM- the first choice for IVF in Italy / M. B. Dal Canto [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2006. – Vol. 13(2). – P. 159–165.
151. Knight, P. G. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development / P. G. Knight, C. Glister // *Reproduction.* – 2006. – Vol. 132(2). – P. 191–206.

152. Krensky, A. M. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease / A. M. Krensky, Y. T. Ahn // *Nat Clin Pract Nephrol.* – 2007. – Vol. 3(3). – P. 164–170.
153. Lessey, B. A. Assessment of endometrial receptivity / B. A. Lessey // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 96. – P. 522–529.
154. Levy, J. A. The Unexpected Pleiotropic Activities of RANTES / J. A. Levy // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 3945–3946.
155. Linhares, I. M. Witkin SS. Immunopathogenic consequences of Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract / I. M. Linhares // *Cell Stress Chaperones.* – 2010. – Vol. 15(5). – P. 467–473.
156. Liu, L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes / L. Liu, J. R. Trimarchi, D. L. Keefe // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol. 62. – P. 1745–1753.
157. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study / E. G. Papanikolaou [et al.] // *Hum Reprod.* – 2005. – Vol. 20(11). – P. 3198–3203.
158. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome / Y. L. Xiong [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2011. – Vol. 159(1). – P. 148–150.
159. Luu, K. C. Endometrial calbindins are critical for embryo implantation: evidence from in vivo use of morpholino antisense oligonucleotides / K. C. Luu, G. Nie, L. A. Salamonsen // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101(21). – P. 8028–8033.
160. Lysophosphatidic acid up-regulates expression of interleukin-8 and -6 in granulosa-lutein cells through its receptors and nuclear factor-kappa B dependent pathways: implications for angiogenesis of corpus luteum and

- ovarian hyperstimulation syndrome / S. U. Chen [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol. 93(3). – P. 935–943.
161. Macrophage contributions to ovarian function / R. Wu [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – Vol. 10. – P. 119–133.
162. Maheshwari, A. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility / A. Maheshwari, M. Hamilton, S. Bhattacharya // *Hum Reprod.* – 2008. – Vol. 23(3). – P. 538–542.
163. Mahutte, N. G. Endometriosis and assisted reproductive technologies: are outcomes affected? / N. G. Mahutte, A. Arici // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2001. – Vol. 13(3). – P. 275–279.
164. Mahutte, N. G. New advances in understanding of endometriosis related infertility / N. G. Mahutte, A. Arici // *J. Reprod. Immunol.* – 2002. – Vol. 55. – P. 73–83.
165. Mehta, R. H. Growth of human preimplantation embryos in vitro / R. H. Mehta // *Reprod Biomed Online.* – 2001. – Vol. 2(2). – P.113–119.
166. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), its receptor, and macrophages in the perifollicular stroma during the human ovulatory process / P. Dahm-Kehler [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – Vol. 91(1). – P. 231–239.
167. Monocyte chemotactic protein-1 in the follicle of the menstrual and IVF cycle / P. Dahm-Khler [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2006. – Vol. 12(1). – P. 1–6.
168. Moser, B. Lymphocyte traffic control by chemokines / B. Moser, P. Loetscher // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 123.
169. MTHFR polymorphisms C677T and A1298C and associations with IVF outcomes in Brazilian women / P. Q. D'Elia [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2014. – Vol. 28 (6). – P. 733–738.
170. Murdoch, W. J. Sequence analysis of leukocyte chemoattractant peptides secreted by periovulatory ovine follicles / W. J. Murdoch, R. J.

- McCormick // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1992. – Vol. 184. – P. 848–852.
171. Murhy, P. M. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors / P. M. Murhy, M. Baggiolini, I. F. Charo // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52. – P. 145.
172. Olive, D. Lymphocyte coreceptors / D. Olive // *Med. Sci.* – 2006. – Vol. 22. – P.1069–1074.
173. Optimal reproductive competence of oocytes retrieved through follicular flushing in minimal stimulation IVF / D. H. Mendez Lozano [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2008. – Vol. 16(1). – P. 119–123.
174. Outcome of in vitro fertilization in endometriosis-associated infertility: a 5-year database cohort study / X. N. Lin [et al.] // *Chin. Med. J.* – 2012. – Vol. 125(15). – P. 2688–2693.
175. Ovulation induction increases pregnancy rate during intrauterine insemination compared with natural cycles / R. Streda [et al.] // *Ceska Gynekol.* – 2007. – Vol. 72(6). – P. 397–402.
176. Pacciarotti, A. Evaluation of serum antimullerian hormone levels to assess the ovarion reserve in women with severe endometriosis / A. Pacciarotti, P. Frati, G. N. Milazzo // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2014. – Vol. 172. – P. 62–64.
177. Pathogenesis of endometriosis / A. W. Nap [et al.] // *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynecology.* – 2004. – Vol. 18(2). – P. 233–244.
178. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility / S. Gupta [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – Vol. 90(2). – P. 247–257.
179. Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease / J. C. Lousse [et al.] // *Front Biosci.* – 2012. – Vol. 1, № 4. – P. 23–40.
180. Peritoneal fluid concentrations of β -chemokines in endometriosis / K. M. Margari [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2013. – Vol. 169(1). – P. 103–107.

181. Poppe, K. Female infertility and the thyroid / K. Poppe, B. Velkeniers // *Best Prac Res Clin Endocrinol Metabol.* – 2004. – Vol. 18(2). – P. 153–165.
182. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study / A. M. E. Lintsen [et al.] // *Human Reproduction.* – 2007. – Vol. 22, № 9. – P. 2455–2462.
183. Predicting ovarian reserve and reproductive outcome using antimullerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) in patients with previous assisted reproduction technique (ART) failure / F. Bonilla-Musoles [et al.] // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 39(1). – P. 13–18.
184. Prediction of ovarian reserve, poor response and pregnancy outcome based on basal antral follicle count and age in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / S. L. Chen [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* – 2011. – Vol. 31(4). – P. 572–577.
185. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis / L. L. van Loendersloot [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2010. – Vol. 16(6). – P. 577–589.
186. Predictive value of the ovarian volume to the response to ovulation / M. D. Moura [et al.] // *Fertil Steril.* – 1998. – Vol. 70, № 3. – P. 430–431.
187. Pregnancy prediction models and eSET criteria for IVF patients—do we need more information? / L. D. Ottosen, U. Kesmodel, J. Hindkjaer, H. J. Ingerslev // *J Assist Reprod Genet.* – 2007. – Vol. 24. – P. 29–36.
188. Preoperative serum anti-mullerian hormone level in women with ovarian endometrioma and mature cystic teratoma / J. Y. Kim, B. C. Jee, C. S. Suh, S. H. Kim // *Yonsei Med J.* – 2013. – Vol. 54(4). – P. 921–926.

189. Probability of live birth in women with extremely low antimullerian hormone concentrations / K. Lukaszuk [et al.] // *Reprod Biomed Online*. – 2014. – Vol. 28(1). – P. 64–69.
190. Properties of the novel proinflammatory supergene «intercrine» cytokine family / J. J. Oppenheim [et al.] // *Annu.Rev.Immunol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 617–633.
191. Prospective evaluation of automated follicle monitoring in 58 in vitro fertilization cycles: follicular volume as a new indicator of oocyte maturity / A. Rodríguez-Fuentes [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – Vol. 93(2). – P. 616–620.
192. Prospective evaluation of early follicular ovarian stromal blood flow in infertile women undergoing IVF-ET treatment / J. E. Jadaon [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2012. – Vol. 28(5). – P. 356–359.
193. Random anti-Mullerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels / E. Buyuk [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 95(7). – P. 2369–2372.
194. RANTES and human sperm fertilizing ability: effect on acrosome reaction and sperm/oocyte fusion / A. Barbonetti [et al.] // *Molecular Human Reproduction.* – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 387–391.
195. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization / H. Xu [et al.] // *Fertil Steril.* – 2006. – Vol. 86(6). – P. 1616–1620.
196. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos / K. S. Richter [et al.] // *Fertility and Sterility.* – 2007. – Vol. 87. – P. 53–59.
197. Relationship of the individual uterine size and the endometrial

- thickness in stimulated cycles / H. Strohmer [et al.] // *Fertil Steril.* – 1994. – Vol. 61. – P. 972–975.
198. Relationships between pregnancy rates following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and endometrial thickness and pattern / B. H. Rashidi [et al.] // *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology.* – 2005. – Vol. 120. – P. 179–184.
199. Relevance of basal serum FSH to IVF outcome varies with patient age / Sabatini L [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2008. – Vol. 17. – P. 10–19.
200. Removal of unilateral endometriomas is associated with immediate and sustained reduction in ovarian reserve / B. Urman [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2013. – Vol. 27(2). – P. 212–216.
201. Richards, J. S. Immune-like mechanisms in ovulation / J. S. Richards, Z. Liu, M. Shimada // *Trends. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 19. – P. 191–196.
202. Secretion of inhibin B during ovarian stimulation is decreased in infertile women with endometriosis / A. Dokras, A. Habana, J. Giraldo, E. Jones // *Fertil Steril.* – 2000. – Vol. 74, № 1. – P. 35–40.
203. Serum anti-mullerian hormone levels affect the rate of ongoing pregnancy after in vitro fertilization / H. Honnma [et al.] // *Reprod Sci.* – 2013. – Vol. 20(1). – P. 51–59.
204. Serum inhibin B levels measured early during FSH administration for IVF may be of value in predicting the number of oocytes to be retrieved in normal and low responders / T. Eldar-Geva [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17(9). – P. 2331–2337.
205. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles / C. L. Cook [et al.] // *Fertil Steril.* – 2000. – Vol. 73, № 4. – P. 859–861.
206. Shah, D. K. Effect of surgery for endometrioma on ovarian function / D. K. Shah, R. B. Mejia, D. I. Lebovic // *J Minim Invasive Gynecol.* –

2014. – Vol. 21(2). – P. 203–209.
207. Sharma, V. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility / V. Sharma, V. Allgar, M. Rajkhowa // *Fertil Steril.* – 2002. – Vol. 78. – P. 40–46.
208. Sirotkin, A. V. Potential leukocyte attractants in the bovine peri-ovulatory ovary / A. V. Sirotkin, M. R. Luck // *Reprod Nutr Dev.* – 1995. – Vol. 35. – P. 675–683.
209. Strandell, A. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates / A. Strandell, C. Bergh, K. Lundin // *Hum Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 2520–2525.
210. Targeting XIAP for the treatment of malignancy / A. D. Schimmer, S. Dalili, R. A. Batey, S. J. Riedl // *Cell. Death. Differ.* – 2006. – Vol. 13. – P. 179–188.
211. Templeton, A. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment / A. Templeton, J. K. Morris, W. Parslow // *Lancet.* – 1996. – Vol. 23, № 348(9039). – P. 1402–1406.
212. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss / S. K. Lee [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 67. – P. 311–318.
213. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme / C. V. Steer [et al.] // *Hum Reprod.* – 1992. – Vol. 7. – P. 117–119.
214. The expression and clinical significance of different forms of mer receptor tyrosine kinase in systemic lupus erythematosus / H. Zhu [et al.] // *J Immunol Res.* – 2014;2014:431896
215. The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age / B. A. Malizia, Y. S. Wook, A. S. Penzias, A. Usheva // *Fertil Steril.* – 2010. – Vol. 93(2). – P. 537–543.

216. The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis / T. A. Gelbaya [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – Vol. 94(3). – P. 936–945.
217. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality / A. Pellicer [et al.] // *J. Reprod Fertil Suppl.* – 2000. – Vol. 55. – P. 109–119.
218. The proinflammatory CD14+CD16+DR+ monocytes are a major source of TNF / K. U. Belge [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 3536–3542.
219. The results of in-vitro fertilization in a Dutch multicenter study / G Haan [et al.] // *Ned Tijdschr Geneeskd.* – 1990. – Vol. 134(43). – P. 2093–2098.
220. The Role of Inflammation for a Successful Implantation / N. Dekel [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2014. – Vol. 72(2). – P. 141–147.
221. TLRs, macrophages, and NK cells: our understandings of their functions in uterus and ovary / Z. Yang, B. Kong, D. M. Mosser, X. Zhang // *Int Immunopharmacol.* – 2011. – Vol. 11(10). – P. 1442–1450.
222. Townson, D. H. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis / D. H. Townson, A. R. Liptak // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 1–94.
223. Transient hyperprolactinemia has no effect on endocrine response and outcome in in vitro fertilization (IVF) / H. A. Pattinson, P. J. Taylor, J. A. Fleetham, S. A. Servis // *In Vitro Fertil Embryo Transf.* – 1990. – Vol. 7(2). – P. 89–93.
224. Treatment of endometriosis in different ethnic populations: a meta – analysis of two clinical trials BMC / C. Gerlinger [et al.] // *Women's Health.* – 2012. – Vol. 12. – P. 9.
225. Treatment versus no treatment of transient hyperprolactinemia in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection programs / N. Doldi,

- E. Papaleo, L. De Santis, A. Ferrari // *Gynecol Endocrinol.* – 2000. – Vol. 14(6). – P. 437–441.
226. Use of ovarian reserve parameters for predicting live births in women undergoing in vitro fertilization / K. Lukaszuk [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2013. – Vol. 168(2). – P. 173–777.
227. Uterine and ovarian function in endometriosis / N. Garrido, A. Pellicer, J. Remohi, C. Simon // *Semin Reprod Med.* – 2003. – Vol. 21. – P. 183–192.
228. Vlaisavljevic, V. Embryo quality and pregnancy outcome in infertile patients with endometriosis / V. Vlaisavljevic, M. Dosen, B. Kovacic // *Endometriosis – Basic Concepts and Current Research Trends* / ed by K. Chaudhury, B. Chakravarty. – Rijeka, 2012. – P. 383–398.
229. Wong, K. H. Expression, hormonal regulation, and cyclic variation of chemokines in the rat ovary: key determinants of the intraovarian residence of representatives of the white blood cell series / K. H. Wong, H Negishi, E. Y. Adashi // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143. – P. 784–791.
230. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation / L. Ziegler-Heitbrock // *J. Leukoc.Biol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 584–592.