

ЗАЙКОВА ВИКТОРИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

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

14.01.01 — Акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск - 2020

Работа выполнена в отделении антенатальной охраны плода Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
кандидат медицинских наук, доцент

Путилова Наталья Викторовна
Третьякова Татьяна Борисовна

Официальные оппоненты:

Мурашко Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра акушерства и гинекологии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, профессор

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», отдел репродуктологии, заведующий

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.047.04 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: г. Челябинск, ул. Воровского, 64

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте <http://www.chelsma.ru>

Автореферат разослан «_____» _____

Учёный секретарь
объединенного диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Казачкова Элла Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) сегодня рассматривается как наиболее эффективный метод, позволяющий преодолевать различные формы бесплодия. По данным литературы, беременности, наступившие в результате вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), имеют ряд особенностей по сравнению со спонтанно наступившими [1]. Известен высокий риск невынашивания беременности, а также развитие фетоплацентарной недостаточности (ФПН), влияющей на перинатальные исходы (Roque M., Valle M., Sampaio M., Geber S. Obstetric outcomes after fresh versus frozen-thawed embryo transfers: A systematic review and meta-analysis. JBRA Assist Reprod. 2018. № 3. P. 253–260).

Эффективность программ ВРТ за последние годы достигла своего плато и сохраняется на стабильном уровне, составляя 30-35% (Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2015г. Проблемы репродукции. 2017. № 5. С. 8-22). Для достижения беременности необходимо сочетание двух факторов: наличие эуплоидного эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия с высоким потенциалом имплантации эмбриона (Bashiri A., Harlev A., Agarwal A. Recurrent pregnancy loss: evidence-based evaluation, diagnosis and treatment. Springer. 2016. P. 208).

Считается, что во время стимуляции яичников высокий уровень гормонов и других факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), может создать относительно неблагоприятную среду для имплантации эмбрионов, в то же время, увеличивая риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) (Rienzi L., Gracia C., Maggiulli R., LaBarbera A.R., Kaser D.J., Ubaldi F.M., Vanderpoel S., Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. Hum Reprod. Update. 2017. № 2. P. 139–155). Было высказано предположение, что стратегия замораживания всех эмбрионов с целью их переноса в более позднее время, может привести к улучшению показателей беременности и уменьшению осложнений (Dieamant F.C., Petersen C.G., Mauri A.L., Comar V., Mattila M., Vagnini L.D., Renzi A., Petersen B., Nicoletti A., Oliveira J.B.A., Baruffi R.L., Franco J.G. Fresh embryos versus freeze-all embryos—transfer strategies: nuances of a meta-analysis. JBRA Assist Reprod. 2017. № 21. P. 260–272).

Знания о перинатальных исходах после переноса эмбрионов (ПЭ) в программах ЭКО увеличиваются. В мировой литературе особое внимание уделяется

рождению живых детей, так называемый «take-home baby», и недостаточно освещены вопросы формирования фетоплацентарного комплекса после ЭКО, патология формирования которого отражает исход программ ВРТ. Поэтому вопрос о поиске четких критериев состояния и степени нарушения фетоплацентарной системы у женщин после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса позволит прогнозировать на ранних сроках беременности ту или иную патологию и ее своевременную коррекцию, что будет способствовать улучшению перинатальных исходов.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Методология и методы исследования

В работе использована общенаучная методология, основанная на системном подходе с применением формально логических, общенаучных и специфичных методов и основах доказательной медицины. Для решения поставленных задач

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

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

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

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

Обоснованность выводов и достоверность диссертационного исследования подтверждена достаточным объемом выборок клинических исследований, корректным анализом и интерпретацией полученных результатов, статистической обработкой данных, соблюдением принципов доказательной медицины. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях проблемной комиссии и Ученого совета ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России.

Материалы диссертационной работы доложены на V конгрессе акушеров-гинекологов УФО с международным участием «Перинатальная медицина – от истоков к современности» (Екатеринбург, 2017), на научно-практической конференции «Современные тренды развития репродуктивной и перинатальной медицины» (Екатеринбург, 2018), на VI конгрессе акушеров-гинекологов УФО с

международным участием «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине» (Екатеринбург, 2019), VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Малышевские чтения. Демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» образовательный семинар «Репродуктивное здоровье в условиях новой коронавирусной инфекции» (Екатеринбург, 2020).

Положения, выносимые на защиту

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

Научная новизна

В результате проведенных исследований впервые определена роль совместного влияния полиморфизма генов, ассоциированных с риском формирования тромбофилии и фактора роста эндотелия сосудов на гиперкоагуляционные нарушения у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и после криопереноса.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

Внедрение результатов исследования в практику

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

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

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

Публикации

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

Объём и структура диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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

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

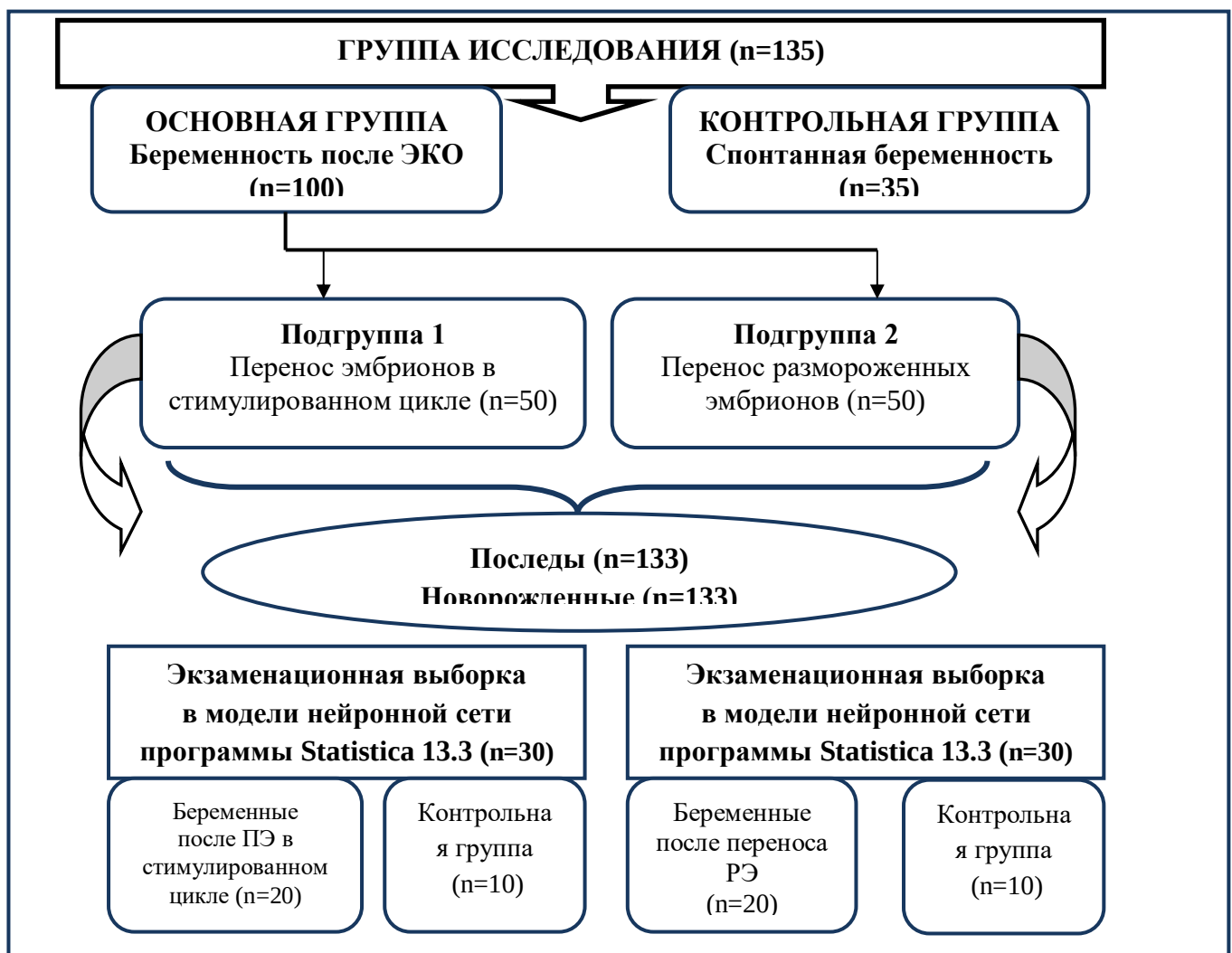


Рисунок 1 - Дизайн исследования

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

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

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

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

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

Критерии включения пациенток в основную группу:

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

Критерии исключения из исследования:

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

Методология исследования: открытое продольное когортное контролируемое исследование.

Для достижения цели и поставленных задач нами были использованы следующие методы:

1. Сбор анамнеза и общеклиническое исследование: проводился сбор соматического, акушерско-гинекологического анамнеза, течение настоящей беременности.

2. Молекулярно-генетические методы исследования: молекулярно-генетическое типирование полиморфных вариантов ключевых генов тромбофилии (*F51691G>A*, *F220210G>A*, *F7: 10976 G>A*, *FGB455 G>A*, *FXIII: 103 G>T*, *PAI-1*

5G>4G, ITGA2: 807 C>T, ITGB3 1565T>C) и ангиогенеза (VEGF-A: -2578C>A и +936C>T). Регистрация и учет результатов проводились автоматическим программным обеспечением для детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология» и «НПО ТЕСТГЕН», Россия).

3. Исследование системы гемостаза: коагулограмма (АЧТВ, ТВ, ФГ, РФМК, МНО) на коагулографе серии Helena, модель Helena AC-4 (HELENA BioSciences Europe, Великобритания) и тромбоэластография (R, K, MA, ANGLE, CI и LY30) на тромбоэластографе TEG, регистрационный номер ФС№2006/2518, США, расходные материалы для TEG ФС№2006/2519, США.

4. Биофизический профиль плода оценивался при помощи ультразвукового исследования с доплерометрией на аппарате ультразвуковом медицинском диагностическом «Medison V-20 компании Samsung.

5. Оценка морфофункционального состояния плацент: макроскопическое описание с использованием микроскопа Axio Scope A1 с фотокамерой Axio Cam ERc 5s, оснащенным программным обеспечением Axio Vision Rel.4.8.2 (производство Карл Цейсс, Германия) и гистологическое исследование срезов плаценты фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине с последующим иссечением через все слои, включая децидуальную пластинку, плодные оболочки, пуповину.

6. Иммуногистохимическое исследование плацент: в серийных парафиновых срезах определяли уровень экспрессии рецепторов к Аннексину V (моноклональные кроличьи антитела, клон EPR3979), и к VEGFr1 (поликлональные кроличьи антитела, клон GTX22350, GeneTex США). Результаты реакции рецепторов идентифицировались по цитоплазматическому окрашиванию клеток в коричневый цвет.

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

8. Методы статистической обработки данных: статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Office, Excel 2016», «STATISTICA 13» и «MedCalc 15.8», а также при помощи программы «Multifactor Dimensionality Reduction» (mdr 3.0.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациенток основной группы достоверно выше возраста пациенток группы контроля - $34,7 \pm 0,4$ лет, против $31 \pm 0,9$ лет соответственно ($p < 0,05$).

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

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

При анализе течения беременности у пациенток исследуемых групп угроза прерывания беременности в I и II триместрах встречалась достоверно чаще в основной группе, и составила 55% и 26% соответственно, по сравнению с контрольной группой, где данное осложнение беременности не было зарегистрировано ($p < 0,05$). В 4% ($n=2$) случаев в подгруппе 1 (ПЭ в стимулированном цикле) зафиксирован самопроизвольный выкидыш в сроке беременности 9-10 недель.

Дебют формирования ФПН со II триместра с исходом в нарушение маточно-плацентарного кровообращения (НМПК) в 2 раза чаще встречался в подгруппе 1 (ПЭ в стимулированном цикле) – 33,3% ($n=16$), по сравнению с подгруппой 2 (криоперенос) – 16% ($n=8$) ($p < 0,05$). В III триместре ФПН была выявлена в 37,5% ($n=18$) случаев в подгруппе 1, из них ЗРП как с НМПК, так и без, формировалась с одинаковой частотой - 11,1% ($n=2$). НМПК без ЗРП выявлено в 77,8% ($n=14$). В подгруппе 2 ФПН в III триместре зафиксирована в 22% ($n=11$) случаев, из которых ЗРП встречалась в 27,3% ($n=3$) случаев, НМПК – в 72,7% ($n=8$). Сочетание ЗРП и НМПК выявлено не было. У пациенток контрольной группы осложненного течения беременности в виде формирования ФПН зарегистрировано не было [3].

При исследовании плазменного звена системы гемостаза при помощи клоттинговых тестов в I триместре беременности выявлено достоверное усиление активации гемокоагуляции по внутреннему и внешнему путям, а также увеличение маркеров внутрисосудистого свертывания крови у пациенток основной группы: АЧТВ $29,6 \pm 0,5$ сек., ТВ $13,9 \pm 0,1$ сек., РФМК $10,5 \pm 0,8$ мг%, против АЧТВ $38,1 \pm 0,3$ сек., ТВ $16,8 \pm 0,1$ сек., РФМК $5,8 \pm 0,2$ мг%, в группе контроля ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам внутри основной группы получено не было. Параллельно, мы провели оценку системы гемокоагуляции методом ТЭГ. Было отмечено

достоверное укорочение времени образования сгустка К $2,0 \pm 0,1$ мин. в основной группе против $2,7 \pm 0,1$ мин. в контрольной группе ($p < 0,05$). Выявлена также достоверная активация хронометрических и структурных характеристик образования сгустка в виде увеличения скорости роста фибриновой сети ANGLE $63,2 \pm 0,9$ град., против ANGLE $47,5 \pm 0,5$ град., в группе контроля, максимальной амплитуды: МА $56,4 \pm 1,1$ мм. в основной группе, против МА $48,5 \pm 0,6$ мм. в группе контроля ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам внутри основной группы также получено не было.

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

Несмотря на проводимую терапию в течение всей беременности у пациенток основной группы отмечена достоверная тенденция к усилению активации гемокоагуляции плазменного звена гемостаза по сравнению с группой контроля как во II триместре (АЧТВ $30,7 \pm 0,4$ сек., против АЧТВ $38,4 \pm 0,5$ сек.; ТВ $14,8 \pm 0,1$ сек., против ТВ $18,1 \pm 0,1$ сек.; РФМК $14,1 \pm 0,8$ мг%, против РФМК $7,9 \pm 0,4$ мг% соответственно), так и в III триместре (АЧТВ $30,4 \pm 0,4$ сек., против АЧТВ $39,2 \pm 0,4$ сек.; ТВ $14,9 \pm 0,1$ сек., против ТВ $17,7 \pm 0,2$ сек.; РФМК $15,2 \pm 0,8$ мг%, против РФМК $8,9 \pm 0,3$ мг% соответственно, $p < 0,05$). Также у пациенток в программах ЭКО по сравнению с группой контроля по данным ТЭГ сохранялось повышение общего свертывающего потенциала крови, что характеризовалось достоверным укорочением интервала R (II триместр R $9,0 \pm 0,3$ мин., против $10,0 \pm 0,3$ мин.; III триместр R $8,3 \pm 0,3$ мин., против $9,5 \pm 0,3$ мин. соответственно, $p < 0,05$). Выявлено также статистически значимое увеличение скорости формирования сгустка К (II триместр: $1,9 \pm 0,1$ мин., против $2,6 \pm 0,1$ мин. у пациенток контрольной группы; III триместр: $1,9 \pm 0,1$ мин., против $2,7 \pm 0,1$ мин., $p < 0,05$) и роста фибриновой сети ANGLE (II триместр: $63,2 \pm 0,9$ град., против $47,1 \pm 0,3$ град. в группе контроля; III триместр: $64,1 \pm 0,8$ град., против $46,8 \pm 0,4$ град., $p < 0,05$). Достоверная разница в основной группе отмечена и по параметру МА, характеризующего плотность сгустка (II триместр: $56,3 \pm 1,4$ мм., против $48,9 \pm 0,4$ мм. в контрольной группе; III триместр: $56,8 \pm 1,0$ мм, против $47,8 \pm 0,6$ мм. $p < 0,05$). Отличий в показателях системы гемостаза по подгруппам в основной группе получено не было [4].

При сохраняющихся гиперкоагуляционных нарушениях на фоне терапии НМГ ФПН во II триместре у пациенток основной группы развилась в 38,1% случаев, из них в 66,7% случаев в подгруппе 1 и в 33,3% случаев в подгруппе 2. В III триместре ФПН сформировалась у 40,8% основной группы, из них в 62,1% и 39,9% случаев в подгруппе 1 и 2 соответственно.

Для оценки вклада генетической предрасположенности в формирование осложнений беременности, наступившей в результате ЭКО было проведено молекулярно-генетическое типирование однонуклеотидных замен в генах, кодирующих факторы свертывания крови, систему фибринолиза, тромбоцитарные рецепторы и ген сосудисто-эндотелиального фактора роста.

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

На следующем этапе исследования нами были проанализированы межгенных взаимодействий в риске развития гиперкоагуляционных осложнений у женщин с беременностью после ПЭ в стимулированном цикле с использованием метода сокращения многофакторной размерности (MDR). Было установлено, что среди моделей наибольшей воспроизводимостью и точностью для развития гиперкоагуляции во время беременности обладает трехлокусная модель *ITGA2* (*rs192974*), *VEGF-A* (*rs699947*), *FXIII* (*rs134570*). Данная модель характеризовалась 90%-ной воспроизводимостью (Cross Validation consistency) и 73%-ной точностью предсказания (Testing balanced accuracy) [9].

Также мы проанализировали все возможные комбинации полиморфных вариантов ключевых генов тромбофилии и ангиогенеза у пациентов после криопереноса в программах ЭКО с проявлениями гиперкоагуляции в первом триместре беременности и в группе контроля. Однако полученные модели не информативны, поскольку обладали недостаточной точностью предсказания и воспроизводимостью тестируемой модели.

На основе статистического анализа результатов лабораторных и молекулярно-генетических исследований были отобраны данные из группы после ПЭ в

стимулированном цикле в программах ЭКО, отличающиеся от таковых в контрольной группе относительно наличия гиперкоагуляции (по экспертной оценке) с учетом корреляционных связей по Спирмену (рисунок 2).

Проведенный логистический регрессионный анализ позволил построить статистическую модель для прогнозирования гиперкоагуляционных осложнений гестации, на основании которой выведено правило прогноза, включающее наиболее информативные параметры клоттинговых тестов, ТЭГ и молекулярно-генетического исследования:

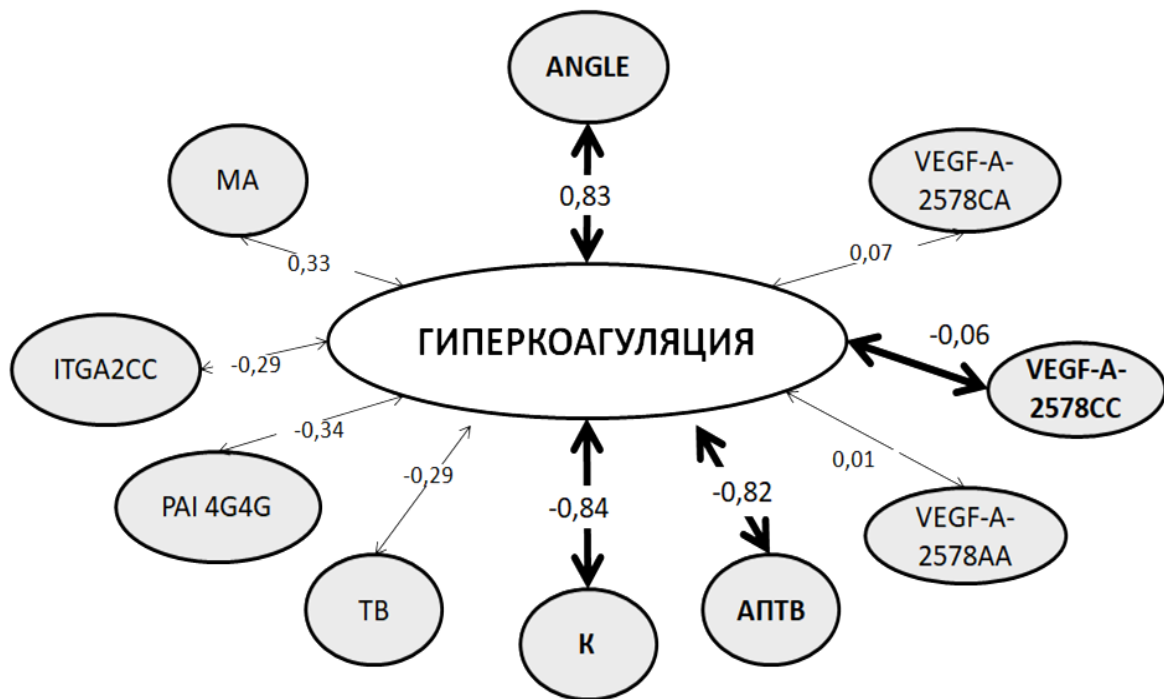


Рисунок 2 – Схема корреляционных связей

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

Где:

H – Прогностический индекс гиперкоагуляционных осложнений гестации,

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

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

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

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

$K1, K2, K3, K4, K5$ – коэффициенты,

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

4,65 – const,

Порог отсечения отбирался исходя из оптимального соотношения Se и Sp. По результатам теста, точка отсечения равна 0,89. Учитывая целесообразность

гипердиагностики в сторону гиперкоагуляции, порог отсечения принят равным 1. Чувствительность правила при значении $H > 1$ составила 96,67%, а специфичность – 100%.

При значении $H \geq 1$, прогнозируют высокий риск гиперкоагуляционных осложнений гестации во время беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО. Если значение $H < 1$, прогнозируют низкий риск гиперкоагуляционных осложнений гестации во время беременности после ПЭ в стимулированном цикле в программах ЭКО. Проверка правила проведена на экзаменационной выборке в модели нейронной сети. Несовпадение результатов оценки риска гиперкоагуляции в нейронной сети и расчета по формуле составило 3,3% с ошибкой чувствительности [6].

Аналогично были отобраны данные из подгруппы после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО с учетом корреляционных связей по Спирмену (рисунок 3).

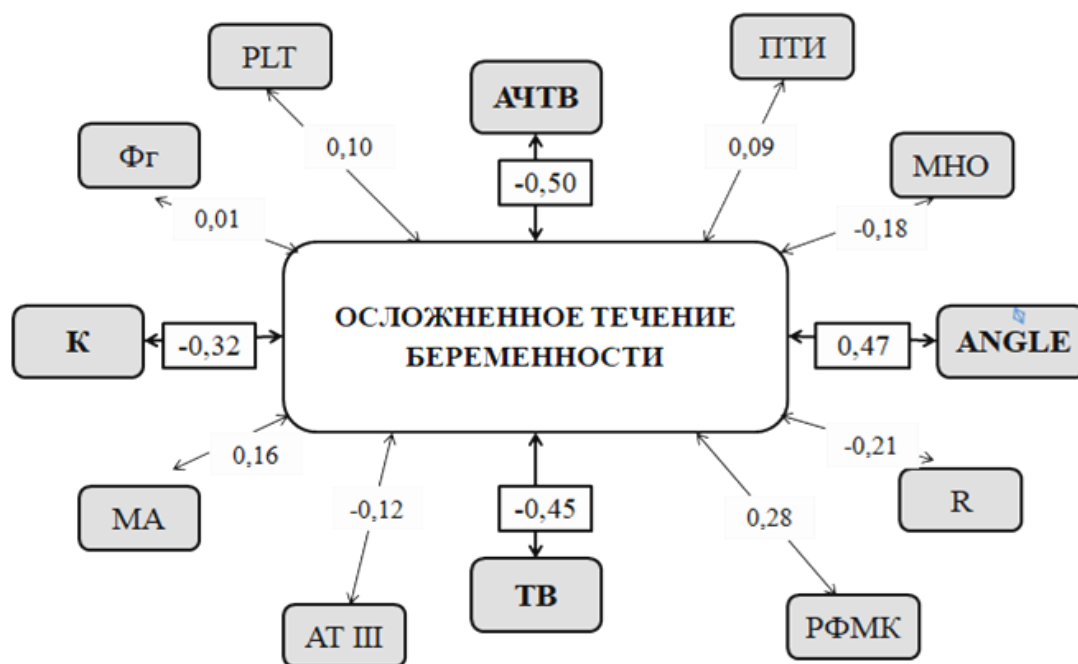


Рисунок 3 – Схема корреляционных связей

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

$$I = \text{АЧТВ} * K1 + \text{ТВ} * K2 + \text{К} * K3 + \text{ANGLE} * K4 + \text{const}$$

Где:

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

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время (сек.),

ТВ – тромбиновое время (сек.),

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

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

$K1, K2, K3, K4, K5$ – коэффициенты,

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

$5,58 - const.$

Порог отсечения отбирался исходя из оптимального соотношения Se и Sp (рисунок 4).

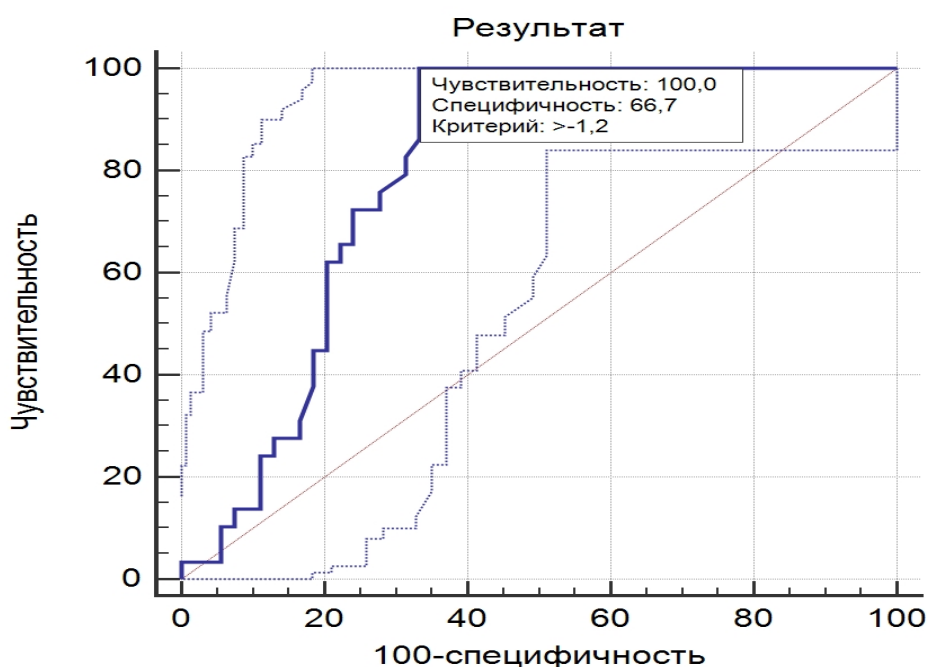


Рисунок 4 - ROC-кривая интегрального показателя I

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

При значении $I \geq -1,2$, прогнозируют высокий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО. Если значение $I < -1,2$, прогнозируют низкий риск вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО [7].

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

При изучении особенностей течения родов было выявлено, что частота преждевременных родов у пациенток основной группы была выше (6,1%), чем у беременных контрольной группы и встречалась только после ПЭ в стимулированном цикле ($p < 0,05$). Случаев преждевременных родов у пациенток после криопереноса и пациенток контрольной группы зарегистрировано не было. Ведущим методом родоразрешения в основной группе являлось кесарево сечение - в 55,1% ($n=54$) случаев, в то время как в контрольной группе частота кесарева сечения составила 28,6% ($n=10$) ($p < 0,05$).

Гестационный возраст на момент родоразрешения в контрольной группе был достоверно выше, чем у пациенток подгруппы 1 и составил $39,4 \pm 0,2$ недель против $38,4 \pm 0,3$ недель ($p < 0,05$). Средний вес новорожденных в контрольной группе составлял $3442,5 \pm 53,7$ г, в то время как в основной группе - $3,183,1 \pm 75,3$ г. ($p < 0,05$). Достоверных отличий по данным параметрам по подгруппам внутри основной группы получено не было ($p > 0,05$).

При оценке состояния новорожденных по шкале Апгар, удовлетворительное состояние (7/8 баллов) чаще фиксировалось в контрольной группе – 97,1% ($n=34$), в то время как в основной группе частота составила 76,5% ($n=75$). Следует отметить, что разница в частоте была не столь значительной и не соответствовала критериям достоверности ($p > 0,05$). Умеренная гипоксия (6/7 баллов по Апгар) достоверно чаще встречалась в основной группе новорожденных – 21,4% ($n=21$) ($p < 0,05$), в то время как в контрольной группе умеренная гипоксия была у 2,9% ($n=1$) детей. Гипоксия средней степени тяжести (5/6 баллов по Апгар) в основной группе встречалась в 2% ($n=2$) случаев и только в подгруппе 1, в контрольной группе и в подгруппе 2 подобная гипоксия не встречалась ($p < 0,05$). Случаев тяжелой гипоксии (3/4 баллов по Апгар) и перинатальных потерь в исследуемых группах не было [5].

При морфологическом исследовании плацент у женщин с беременностью после ЭКО более выражено проявлялись компенсаторно-приспособительные процессы. Частота встречаемости ФПН была достоверно выше, и составила 57,2%, против 5,7% в группе контроля ($p < 0,05$). Наибольшее число случаев формирования ФПН встречалось в подгруппе 1 – 62,6%, а в подгруппе 2 составило - 52%.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов плаценты установлено, что выраженная экспрессия VEGFr1 и Аннексина V клетками ворсинчатого трофобласта была достоверно выше в контрольной группе по сравнению с группой после переноса эмбрионов в программах ЭКО и составила $33,8 \pm 4,4\%$ и $13,9 \pm 3\%$ соответственно (VEGFr1) и $89 \pm 2,6\%$, против $41,3 \pm 4,5\%$

(Аннексин V) ($p < 0,05$). Достоверных отличий по подгруппам основной группы получено не было [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Беременности, наступившие после применения методов ВРТ, стоит ассоциировать с более высоким риском формирования патологии фетоплацентарного комплекса и развития осложнений гестационного периода. Проведенное исследование и полученные результаты позволили разработать алгоритм ведения беременности у пациенток в программах ЭКО на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса путем проведения молекулярно-генетического исследования гена фактора роста эндотелия сосудов и исследования системы гемостаза (рисунок 5).

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

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

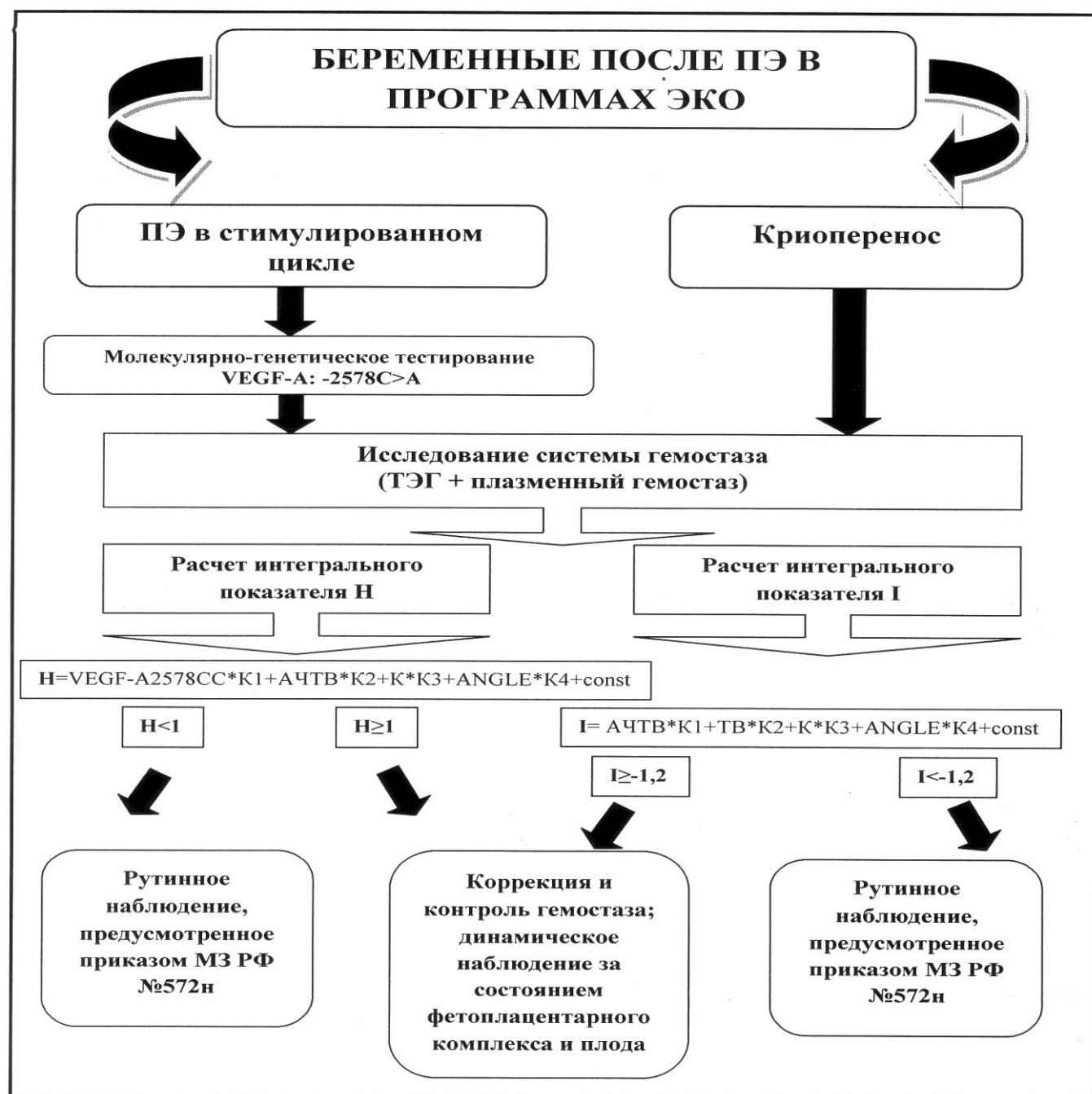


Рисунок 5 – Алгоритм ведения беременности у пациенток в программах ЭКО на основе прогнозирования патологии фетоплацентарного комплекса

ВЫВОДЫ

1. Перенос эмбрионов в стимулированном цикле чаще проводится у пациенток с бесплодием трубного происхождения, тогда как криоперенос осуществляется у пациенток с бесплодием, связанным с отсутствием овуляции. Течение беременности с одинаковой частотой осложняется угрозой прерывания с ранних сроков при различных вариантах переноса эмбриона, тогда как формирование

фетоплацентарной недостаточности после переноса эмбрионов в стимулированном цикле встречается в 2 раза чаще по сравнению с криопереносом и дебютирует раньше, начиная со II триместра, что реализуется в более высокий удельный вес рождения недоношенных детей.

2. У пациенток после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения отмечена достоверная активация гемокоагуляции как по внутреннему, так и по внешнему путям, и повышение общего свертывающего потенциала крови после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения. Слабая экспрессия проангиогенных факторов (VEGFr1 и Аннексин V) в плацентарной ткани у этой категории больных обуславливает неполноценность строения ворсинчатого дерева и формирование фетоплацентарной недостаточности.
3. Гиперкоагуляционные осложнения у женщин после переноса эмбрионов в стимулированном цикле ассоциированы с сочетанным полиморфизмом гена рецептора тромбоцитов (*ITGA2: 807 C>T*) и XIII фактора свертывания крови (*FXIII: 103 G>T*), а также фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF-A: 2578 C>A*), обладающих аддитивным действием, что отражено в трехлокусной модели, характеризующейся 90%-ной воспроизводимостью и 73%-ной точностью предсказания.
4. Анализ распределения аллелей и генотипов по изученным генам в группе пациенток после криопереноса показал отличие только по полиморфизму *ITGA2: 807 C>T*, влияние которого на патологию выражено незначительно, так как значимых ассоциаций генотипов по этому локусу с формированием гиперкоагуляции выявлено не было.
5. Проведенное исследование позволило выявить наиболее значимые критерии формирования патологии фетоплацентарного комплекса и разработать 2 правила прогноза осложнений гестации у пациенток после переноса эмбрионов в стимулированном цикле и криопереноса, имеющие высокую степень информативности. На основании прогностических правил разработан алгоритм ведения беременности у данной категории пациенток, направленный на улучшение перинатальных исходов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шумовская, В.В. Особенности формирования фетоплацентарного комплекса после переноса свежих и витрифицированных эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова, Д.О. Мазуров // *Акушерство и гинекология*. – 2018. - № 10. С. 20-24.
2. Шумовская, В.В. Генетические аспекты состояния системы гемостаза при беременности в результате экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова // *Материалы научно-практической конференции «Современные тренды развития репродуктивной и перинатальной медицины»*. – 2018. – С. 118-119. - Екатеринбург (тезисы).
3. Шумовская, В.В. Особенности течения беременности и родов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова // *Материалы VI конгресса акушеров-гинекологов УФО «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине»*. – 2019. – С. 95-97. – Екатеринбург (тезисы).

4. Шумовская, В.В. Состояние системы гемостаза и его генетические аспекты при беременности, наступившей в результате экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова, Л.А. Пестряева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2019. - №1. – С. 60-65.
5. Шумовская, В.В. Беременность и роды после переноса эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Шумовская. Н.В. Путилова // Лечение и профилактика. – 2019. № - 2. С. 16-21.
6. Патент на изобретение РФ № 2720241. Способ прогнозирования гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса «свежих» эмбрионов в программах ЭКО. / Шумовская В.В., Путилова Н.В., Путилов С.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России. - № 2720241; заявл. 17.11.2019г.; опубл. 28.04.2020, Бюл. № 13.
7. Патент на изобретение РФ № 2729441. Способ прогнозирования вероятности осложненного течения беременности после переноса витрифицированных эмбрионов в программах ЭКО. / Шумовская В.В., Путилова Н.В., Путилов С.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России. - № 2729441; заявл. 30.03.2020г.; опубл. 06.08.2020, Бюл. № 22.
8. Зайкова, В.В. Особенности формирования фетоплацентарного комплекса после переноса эмбрионов в программах ВРТ / В.В. Зайкова, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова // Материалы VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Малышевские чтения. Демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» образовательный семинар «Репродуктивное здоровье в условиях новой коронавирусной инфекции». – 2020. – С. 26-27– Екатеринбург, 2020 (тезисы).
9. Зайкова, В.В. Прогнозирование гиперкоагуляционных осложнений гестации после переноса эмбрионов в стимулированном цикле в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Зайкова, Н.В. Путилова, Т.Б. Третьякова, Л.А. Пестряева // Учебное пособие. – Екатеринбург: «Типография ситипринт», 2020. – 38 с. ISBN 978-5-89918-043-9.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
ЗРП – задержка роста плода
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
МНО - международное нормализованное отношение
НМГ – низкомолекулярные гепарины
ПОНРП – преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты
ПЭ – перенос эмбрионов
РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы
РЭ – размороженные эмбрионы
СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников
ТВ - тромбиновое время
ФГ - уровень фибриногена
ФПН – фетоплацентарная недостаточность
ХФПН – хроническая фетоплацентарная недостаточность
ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение
ANGLE - скорость роста фибриновой
CI - коагуляционный индекс
К - время образования сгустка
LY30 – лизис сгустка
МА - максимальная амплитуда
R - время реакции
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов