
На правах рукописи

ОХТЫРСКАЯ ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОГРАММЫ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПАЦИЕНТОК С РИСКОМ РАЗВИТИЯ
ТРОМБОФИЛИИ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2011

Работа выполнена в отделении сохранения и восстановления репродуктивной функции Федерального государственного учреждения «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» Минздравсоцразвития России.

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор _____

_____ **Ксения Александровна Яворовская**

доктор медицинских наук

Анна Владимировна Шуршалипа

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук

Нана Картлосовна Тетрашвили

доктор медицинских наук,
профессор

Ксения Владиславовна Краснопольская

Ведущая организация: ГОУ РПО «Российский Университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 г. в _____ ч. на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 при ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России по адресу: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России.

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

доктор медицинских наук

Елена Анатольевна Калинина

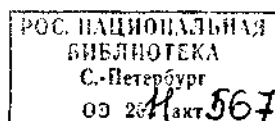
2011А
14158

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы предметом активного обсуждения исследователей становится проблема повышения результативности циклов ЭКО. Несмотря на более чем 30-летнюю историю существования метода, эффективность программ ЭКО за последние годы значительно не меняется [Отчет РАРЧ, 2010]. Высказываются предположения, что в 2/3 случаев неудачи ЭКО связаны с нарушением рецептивности эндометрия и имплантации [Achache H., 2006; Lédée-Bataille N., 2002]. Среди факторов, снижающих рецептивность эндометрия, на первое место выносят хронический эндометрит, сочетанную гинекологическую патологию (аденомиоз, миома матки), соматические заболевания (в том числе аутоиммунные), тромбофилии [Margalioth E., 2006; Станкович Е.В., 2009]. Вероятнее всего, разная патология реализуется через различные механизмы нарушения рецептивности эндометрия. Предполагают сходство механизмов, лежащих в основе повторных имплантационных потерь, с привычным невынашиванием беременности на раннем сроке [Hassan M.A.M. et al., 2005]. При этом, по мнению большинства авторов, от 30 до 60% случаев привычного невынашивания беременности связано с гиперкоагуляцией и тромбообразованием [Макацария А.Д., 2003; Greer I.A., 2003; Сидельникова В.М., 2010].

Взаимосвязь между тромбофилическими состояниями и неудачными исходами ВРТ активно обсуждается в литературе, но возможные механизмы влияния тромбофилии на исходы программ ВРТ до сих пор не ясны [Nelson S.M., 2008]. На фоне стимуляции суперовуляции происходит изменение коагуляционных параметров свертывающей системы крови [Мага М., 2004; Иванец Т.Ю., 2004]. Обсуждается возможная причинно-следственная связь гиперкоагуляции и гипофибринолиза с повторными имплантационными потерями в программах ЭКО [Nelson S.M., 2008; Angeles Martínez-Zamora M., 2011].



Имеются данные о наличии наследственной предрасположенности к гиперкоагуляции и тромбообразованию. В настоящее время к наиболее изученному наследственному полиморфизму генов предрасположенности к тромбофилии относятся: мутация FV Лейдена, мутация протромбина, полиморфизм генов PAI-1, фибриногена, тромбоцитарных гликопротеинов ITGA2, ITGB3; наиболее изученной приобретенной формой тромбофилии является антифосфолипидный синдром [Момот А.П., 2006; Сидельникова В.М., 2010]. Данные литературы относительно целесообразности обследования на наследственные и приобретенные факторы риска развития тромбофилии пациенток с повторными неэффективными программами ЭКО неоднозначны [Nelson S.M., 2008]. Требуют детального анализа исследования по изучению возможных механизмов влияния лабораторных маркеров риска развития тромбофилии на реализацию репродуктивной функции в программах ВРТ.

В настоящее время одной из методик, направленных на повышение эффективности ЭКО, является применение антикоагулянтной терапии [Utman В.; 2009]. При этом высказываются мнения о возможном положительном эффекте схем профилактической прегравидарной терапии антикоагулянтами не только на систему гемостаза, но и на белки, участвующие в формировании рецептивности эндометрия и адекватной имплантации [Nelson S.M., 2008]. Однако схемы и длительность применения этой терапии детально не исследованы.

Таким образом, изучение особенностей реализации программы ЭКО у пациенток с наследственными и приобретенными факторами риска развития тромбофилии, уточнение схем и длительности профилактической антикоагулянтной терапии является актуальным и современным.

Цель исследования: Изучить влияние наследственного полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии и антифосфолипидного синдрома на особенности реализации программы ЭКО у пациенток с бесплодием.

Задачи исследования:

1. Оценить клинико-anamnestические данные, частоту и структуру наследственного полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии и антифосфолипидного синдрома у пациенток с 2-мя и более неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

2. Оценить влияние полиморфизма гена PAI-1 675 5G/4G на морфологическое состояние эндометрия и экспрессию "классических" маркеров рецептивности эндометрия (шиноподии, стероидные рецепторы, LIF) в период "окна имплантации" у пациенток с неудачами ЭКО в анамнезе.

3. Оценить влияние полиморфизма гена PAI-1 675 5G/4G на экспрессию остеооптина, VEGF и белка PAI-1 в эндометрии в период "окна имплантации" у пациенток с неудачами ЭКО в анамнезе.

4. Провести сравнительную оценку показателей гемостазиограммы в процессе реализации программы ЭКО у пациенток с высокой и низкой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии.

5. Провести сравнительную оценку фолликуло-, оогенеза, раннего эмбриогенеза у пациенток с высокой и низкой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии.

6. Оценить влияние профилактической схемы антикоагулянтной терапии на исходы программ ЭКО. Разработать алгоритм предварительного обследования пациенток программы ЭКО на наследственные и приобретенные факторы риска развития тромбофилии, подготовки их к реализации программы и проведению этапов ЭКО.

Научная новизна

В результате выполнения данной работы установлено, что у пациенток с повторными неэффективными попытками ЭКО повышена экспрессия белка PAI-1 в поверхностном эпителии эндометрия в период "окна имплантации", что дает новую информацию о механизмах, лежащих в основе нарушения имплантации. Определены маркеры рецептивности эндометрия, на

экспрессию которых оказывает влияние наследственный полиморфизм гена PAI-1 675 5G/4G. Выявлена прямая корреляционная зависимость между 4G аллелем PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии.

Практическая значимость

В результате проведенной работы выявлено влияние полиморфизма гена PAI-1 675 5G/4G на рецептивность эндометрия. Полученные нами данные указывают на целесообразность обследования пациенток программы ЭКО на наследственный полиморфизм генов предрасположенности к тромбофилии.

Установлено, что у пациенток с высокой частотой полиморфизма генов системы гемостаза отмечается более частое и выраженное повышение Д-димера ко дню переноса эмбрионов в полость матки, что указывает на высокий риск активации внутрисосудистого свертывания крови и тромботических осложнений у пациенток данной группы.

В данной работе продемонстрировано повышение эффективности программы ЭКО до 40% на фоне профилактической антикоагулянтной терапии по сравнению с 22,2% в стандартном протоколе ЭКО у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе и высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии.

Положения, выносимые на защиту

1. Пациентки с 2-мя и более неэффективными попытками ЭКО в анамнезе характеризуются высокой частотой наследственного полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии в различных сочетаниях (89,9%), из которых наиболее часто встречается гомо- и гетерозиготный полиморфизм гена PAI-1 (4G/4G, 5G/4G) – 30,5% и 47,2%.

2. Более частое и выраженное повышение Д-димера в лютеиновую фазу цикла ЭКО у пациенток с высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии свидетельствует о повышенном риске активации внутрисосудистого свертывания крови, что является основанием

для профилактического использования низкомолекулярных гепаринов.

3. Для женщин с неудачными попытками ЭКО в анамнезе в эндометрии в период "окна имплантации" характерно снижение экспрессии LIF, VEGF, остеоопонтина и высокий уровень белка PAI-1 по сравнению с группой здоровых фертильных женщин. Присутствие 4G аллеля PAI-1 сопровождается более высокой экспрессией белка PAI-1 в эндометрии.

4. Терапия малыми дозами антикоагулянтов в лютеиновую фазу цикла ЭКО у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе и высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии является профилактикой активации внутрисосудистого свертывания крови и позволяет повысить результативность программы ЭКО до 40%.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы доложены на IV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2010), 20th World Congress on Fertility and Sterility (Munich, 2010). Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников отделения I гинекологии ФГУ «НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России 18.03.2011 г. и заседании апробационной комиссии ФГУ «НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России 29.03.2011 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Применение профилактической антикоагулянтной терапии в лютеиновую фазу цикла ЭКО у пациенток группы риска развития тромбофилии внедрено в практику работы отделения сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в т.ч. 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах компьютерного текста, состоит из введения и 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 18 рисунками. Использованная литература включает 22 источника на русском и 103 источника на английском языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В соответствии с поставленной целью и задачами в данное исследование были включены 108 пациенток репродуктивного возраста с трубно - перитонеальным фактором бесплодия и 2-мя и более неэффективными попытками ЭКО в анамнезе, обратившихся в отделение 1 гинекологии ФГУ «НЦ АГ и П им. академика В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России (руководитель – к.м.н. А.Н. Абубакиров). Все пациентки были обследованы на наличие антифосфолипидного синдрома и наследственный полиморфизм генов предрасположенности к тромбофилии.

Определение генетического полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR) с использованием диагностических наборов компании ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия) в лаборатории молекулярно-генетических исследований ФГУ «НЦ АГ и П им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России (руководитель – д.б.н. Д.Ю. Трофимов). В работе проведено исследование мутации V фактора Leiden (G1691A); протромбина (G20210A); полиморфизма генов фибриногена (G455A); PAI-1 (675 5G/4G); тромбоцитарных гликопротеинов ITGA2 (C307T), ITGB3 (T1565C). Антитела к фосфолипидам и кофакторам определяли в лаборатории клинической иммунологии ФГУ «НЦ АГ и П им.

В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России (руководитель – академик РАМН, д.м.н., проф. Г.Т. Сухих). Исследование включало определение уровня антител к кардиолипину, фосфатидилсерину, β 2-гликопротеину, протромбину, апексину V методом иммуноферментного анализа (ИФА).

На основании обследования 108 пациенток были разделены на две группы: I группа – с высокой частотой встречаемости полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии и антител к фосфолипидам (N=71); II группа – с низкой частотой или отсутствием полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии и антител к фосфолипидам (N=37).

Критерии включения в I группу (с высоким риском развития тромбофилии):

- наличие гетеро- или гомозиготной мутации Лейдена и/или протромбина, единичной или в сочетании с полиморфизмом других генов;
- наличие трех и более гетерозигот по генам PAI-1, ITGA2, ITGB3, фибриногену;
- наличие двух и более гомозигот по генам PAI-1, ITGA2, ITGB3, фибриногену;
- наличие положительных антител к фосфолипидам, подтвержденных в динамике с интервалом 6 недель;

Критерии включения во II группу (с низким риском развития тромбофилии):

- отсутствие полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии;
- отсутствие мутации Лейдена и протромбина;
- наличие 2-х и менее гетерозигот или 1-й гомозиготы по генам PAI-1, ITGA2, ITGB3, фибриногену.

Общеклиническое обследование пациенток проводили по стандартной схеме, включающей изучение данных анамнеза, характера менструального цикла, репродуктивной функции, общий и гинекологический осмотр, исследование инфекционного и гормонального статуса и др.

Для оценки состояния эндометрия в период “окна имплантации” всем 108 пациенткам на этапе подготовки к программе ЭКО была проведена

аспирационная пайпель-биопсия эндометрия на 6-7 день после овуляции. На основании морфологического исследования эндометрия для дальнейшего иммуногистохимического анализа (ИГХ) были отобраны биоптаты 22 пациенток. Группу контроля для данных ИГХ исследований составили 11 здоровых женщин с реализованной репродуктивной функцией, обследованных на наследственный полиморфизм генов системы гемостаза. Исследование эндометрия выполнено в лаборатории патоморфологии ФГУ «ИЦ АГ и П им. В.И.Кулакова» Минздравсоцразвития России (руководитель - проф. Е. А. Коган). Проводили определение соответствия морфологической структуры эндометрия состоянию "окна имплантации"; подсчет процента клеток поверхностного эпителия с наличием зрелых пиноподий; методом иммунопероксидазной реакции определяли уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов α (ЭРа), прогестероновых рецепторов (ПР), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), остеопонтин. Для оценки каждого показателя исследовали два среза эндометрия. Всего было проведено 264 ИГХ исследования образцов эндометрия от 22 пациенток I и II группы и 132 ИГХ исследования образцов эндометрия от 11 пациенток группы контроля. Экспрессию ЭРа и ПР определяли по стандартной методике с использованием мышинных моноклональных антител к ЭРа (клон 1D5 «DAKO») и ПР (клон 636 «DAKO»). Для анализа результатов ИГХ реакций ЭРа и ПР использовали метод гистологического счета HistoScore. Для исследования в эндометрии уровня белка PAI-1, VEGF, LIF, остеопонтина использовали первичные антитела к PAI-1 (H-135, Santa Cruz Biotechnology, USA, a rabbit polyclonal antibody, разведение 1:200); первичные антитела к VEGF (C-term, Epitomics, USA, a rabbit monoclonal antibody, clon ID: EP1176Y, разведение 1:100); первичные антитела к остеопонтину (NeoMarKens для Lab Vision Corporation, USA, разведение 1:100, epitope specific rabbit antibody). Результаты ИГХ

реакции для PAI-1, LIF, VEGF, остеопонтин оценивали полуколичественным методом в баллах по общепринятой методике.

При выполнении данного исследования всем пациенткам I и II группы была проведена программа ЭКО по длинному протоколу препаратами агонистом ГнРГ (Диферелин дейли) и рФСГ (Гонал-Ф). У пациенток I и II группы был проведен сравнительный анализ динамики показателей гемостазиограммы в программе ЭКО, фолликулогенеза, оогенеза, раннего эмбриогенеза и эффективности программ ЭКО.

Пациентки I группы (с высоким риском развития тромбофилии) при проведении программы ЭКО были разделены на две группы: Ia и Ib. Пациенткам Ia группы был проведен стандартный длинный протокол ЭКО, пациентки Ib группы дополнительно к стандартному протоколу получали профилактическую терапию антикоагулянтами (надропарин кальция 0,3 мл х 1 раз в день п/к) в лютеиновую фазу стимулированного цикла в течение 10 дней, начиная со следующего дня после трансвагинальной пункции. Нами был проведен сравнительный анализ эффективности программ ЭКО у пациенток с высоким риском развития тромбофилии в стандартном длинном протоколе и в протоколе с антикоагулянтами.

Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 7.0, StatSoft Inc. (США).

Исследование было одобрено Комитетом по этике биомедицинских исследований при ФГУ «НЦ АГ и П им. академика В.И.Кулакова» Минздравсоцразвития России.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы была проанализирована встречаемость полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии у 108 пациенток с наличием в анамнезе 2-х и более неудачных попыток ЭКО (предположительно имплантационных потерь) (рис.1).

Только 11 человек из обследованных 108 (10,1%) не имели ни одного исследуемого полиморфизма. Наиболее часто встречался гетеро- и гомозиготный полиморфизм гена PAI-1 675 5G/4G (47,2% и 30,5% соответственно).

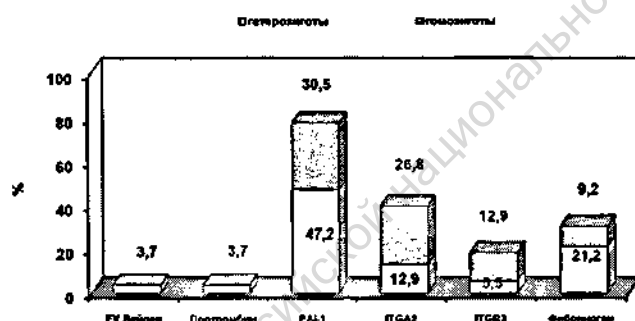


Рис. 1. Частота встречаемости наследственного полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии у пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО (n=108).

По результатам обследования пациентки были разделены на две группы: I группа с высокой частотой полиморфизма генов системы гемостаза; II группа – с отсутствием или минимальной встречаемостью полиморфизма генов системы гемостаза (см. материалы и методы). Как видно из представленных в таблице 1 данных, в I группе каждая пациентка была носителем полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии, во II группе у 11(29,7%) пациенток полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии выявлено не было. Наиболее распространенным был гетеро-

и гомозиготный полиморфизм гена PAI-1 – у 94,3% пациенток I группы и у 45,9% пациенток II группы.

Таблица 1

Частота встречаемости полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии у пациенток I и II группы

Название полиморфизма	I группа N = 71	II группа N = 37
Отсутствие полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии	-	11(29,7%)
Гомозиготная мутация FV Leiden	-	-
Гетерозиготная мутация FV Leiden	4 (5,6%)	-
Гомозиготная мутация протромбина G20210A	-	-
Гетерозиготная мутация протромбина G20210A	4 (5,6%)	-
Гомозиготный полиморфизм фибриногена	9 (12,6%)	1 (2,7%)
Гетерозиготный полиморфизм фибриногена	19 (26,7%)	4 (10,8%)
Гомозиготный полиморфизм PAI-1	30 (42,2%)	3 (8,1%)
Гетерозиготный полиморфизм PAI-1	37 (52,1%)	14 (37,8%)
Гомозиготный полиморфизм ITGA2	22 (29,5%)	6 (21,6%)
Гетерозиготный полиморфизм ITGA2	8 (11,2%)	6 (16,2%)
Гомозиготный полиморфизм ITGB3	14 (19,7%)	-
Гетерозиготный полиморфизм ITGB3	5 (7%)	1(2,7%)

Волчаночный антикоагулянт не был выявлен ни у одной пациентки. Антитела к фосфолипидам и их кофакторам среди обследованных пациенток были определены у 22,2% (24/108). При этом у большинства из обследованных пациенток (18,5%, 20/108) наблюдалось транзиторное повышение антител к фосфолипидам. И только в 3,4% (4/108) случаев повышение антител к фосфолипидам и их кофакторами было неоднократно

подтверждено в динамике и сочеталось с клиническими признаками антифосфолипидного синдрома (наличие в анамнезе 3 и более выкидышей). Данные пациентки были отнесены в I группу женщин с высоким риском развития тромбофилии. Достоверных различий по частоте транзиторного повышения антител у пациенток I и II группы выявлено не было ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ клинико-анамнестических данных пациенток I и II группы показал, что пациентки не различались по возрасту, характеру менструального цикла, гинекологическим и соматическим заболеваниям, длительности, характеру бесплодия, а также предшествующему лечению ($p > 0,05$).

При проведении программы ЭКО статистически значимых отличий в параметрах фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза между исследуемыми группами выявлено не было ($p > 0,05$). Мы посчитали важным уделить внимание сравнению динамики параметров гемостазиограммы между группами пациенток в стандартном длинном протоколе ЭКО (табл.2).

Показатели гемостазиограммы на 21-22 день цикла до начала длинного протокола ЭКО у 99% (107/108) пациенток соответствовали изокоагуляции. Ко дню переноса эмбрионов в полость матки у пациенток обеих групп наблюдалась активация внутрисосудистого свертывания крови. Наиболее заметные изменения наблюдались в уровне фибриногена и Д-димера. При этом у пациенток Ia группы повышение Д-димера было не только более выраженным, но и отмечалось в 2,1 раза чаще, чем во II группе (табл.2). Данное наблюдение, а также информация в литературе о положительном влиянии антикоагулянтов на имплантацию эмбрионов [Nelson S.M., 2008] послужили поводом для назначения нами пациенткам с высокой частотой встречаемости полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии (Ib группа) профилактической антикоагулянтной терапии в лютеиновую фазу стимулированного цикла.

Таблица 2

Средние показатели (M±σ) параметров гемостазиограммы

Параметры	Ia группа n=36			II группа n=37		
	21-22 д.ц	7-9 д.ц	В день ПЭ	21-22 д.ц	7-9 д.ц	В день ПЭ
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	238,1±41, 3	243,3± 37,4	260,4±37, 2	228,3±40, 8	241,3± 34,1	261,5± 33,2
МНО	0,95±0,05	0,96±0, 06	0,91±0,05	0,95±0,08	0,93± 0,07	0,93±0,07
ПТИ, %	94,6±7,9*	94,1± 7,7	100,2±9,1	98,3±6,4*	98,2±5, 9	102±6,6
АПТВ, сек	35,4±2,6	34,1± 2,4	32,3± 2,7	36±1,7	34,6± 1,5	31,3±2
Фибриноген, мг/дл	313,2± 39,8*	323,5± 41,2	395,1± 68,7*	292,8± 35,9*	310,5± 36,9	335,2± 32,5*
Тромбиновое время (ТВ), сек	18±0,6	17,1±0, 5	16,2±0,7	17,9±0,5	17,2±0, 7	15,9±0,5
Антитромбин III (АТ III), %	101,9±3,2	-	98,6±3,6	101,7±6	-	98,7±6,5
D-димер, мкг/мл	0,31±0,1*	0,34± 0,07	1,67±1,1*	0,26±0,12 *	0,32± 0,08	0,97±0,66*

¹ - жирным шрифтом выделены достоверные различия внутри группы между показателем гемостазиограммы на 21-22 д.ц. до начала протокола и в день ПЭ (p<0,05);

* - достоверные отличия между показателем гемостазиограммы в Ia группе по отношению ко II группе (p<0,05).

В I группе пациенток был проведен 71 цикл ЭКО, во II группе - 37. Эффективность стандартного протокола ЭКО у пациенток Ia группы (высокий риск развития тромбофилии) составила - 22,2%, у пациенток II группы (низкий риск развития тромбофилии) - 27% (p>0,05). Эффективность программы ЭКО на фоне профилактической антикоагулянтной терапии у пациенток Ib группы составила 40%.

С целью выявления возможного влияния полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии на рецептивность эндометрия мы провели морфологическое и ИГХ исследование эндометрия в период "окна имплантации". У пациенток обеих групп при УЗИ и гистологическом исследовании не было обнаружено патологии эндометрия (p>0,05). Также не

было выявлено зависимости между носительством полиморфизма генов системы гемостаза и морфологической структурой эндометрия в период “окна имплантации”. Для ИГХ были отобраны биоптаты 22 пациенток. Учитывая широкую распространенность полиморфизма гена PAI-1 у пациенток в нашем исследовании, а также данные литературы о роли белка PAI-1 в адгезии и инвазии бластоцисты [Buchholz T., 2003; Soltanghorae H., 2007], выбор пациенток для ИГХ был основан на наличии или отсутствии 4G аллеля PAI-1. Из I группы были отобраны биоптаты 11 пациенток с наличием 4G аллеля PAI-1, из II группы – биоптаты 11 пациенток с 5G/5G полиморфизмом PAI-1. В качестве группы контроля для результатов ИГХ мы исследовали эндометрий 11 здоровых женщин с реализованной репродуктивной функцией, обследованных на полиморфизм гена PAI-1. В первую очередь мы определили “классические” маркеры окна имплантации: процент клеток поверхностного эпителия с наличием пиноподий, уровень экспрессии рецепторов эстрадиола и прогестерона, соотношение ПР/ЭРа в строме эндометрия, уровень экспрессии LIF.

Процент пиноподий не зависел от полиморфизма гена PAI-1 и был снижен у бесплодных пациенток I и II групп по сравнению с группой контроля ($p > 0,05$), что совпадает с данными литературы о низком проценте пиноподий у пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО [Aghajanova L., 2003; Дюжева Е.В., 2010].

Статистически значимых различий между уровнем стероидных рецепторов и их соотношением в строме эндометрия между исследуемыми группами выявлено не было ($p > 0,05$). Соотношение ПР/ЭРа составило $2,6 \pm 1,6$ в I группе; $3,36 \pm 2$ во II группе; $2,49 \pm 1,1$ в группе контроля ($p > 0,05$). По данным литературы соотношение ПР/ЭРа от 2 до 3 характеризует нормальную рецепторную функцию эндометрия и является прогностически благоприятным для наступления беременности [Дюжева Е.В., 2010]. В нашей работе соотношение ПР/ЭРа у бесплодных пациенток было сопоставимо с

пациентками группы контроля. Влияния полиморфизма гена PAI-1 на экспрессию стероидных рецепторов эндометрия выявлено не было.

Уровень LIF у пациенток I и II группы в миоподиях, поверхностном эпителии и строме эндометрия был достоверно ниже группы контроля независимо от локализации ($p < 0,05$), что совпадает с данными литературы о низкой экспрессии LIF у пациенток с бесплодием и повторными неудачами ЭКО [Lédée-Bataille N., 2002]. Корреляции между полиморфизмом гена PAI-1 и уровнем экспрессии LIF выявлено не было.

Таким образом, исследование наиболее изученных маркеров окна имплантации не выявило влияния полиморфизма гена PAI-1 5G/4G на "классические" маркеры рецептивности эндометрия.

Экспрессия проангиогенного фактора роста VEGF определялась в поверхностном эпителии, строме и эндотелии сосудов эндометрия. Уровень VEGF в эндометрии пациенток I и II группы был снижен по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). При этом у пациенток I группы уровень VEGF в эндотелии сосудов был достоверно более низким по сравнению с пациентками II группы ($p < 0,05$). Корреляции между полиморфизмом гена PAI-1 и уровнем экспрессии VEGF выявлено не было.

Остеопонтин – гликопротеин межклеточного матрикса, участвующий в интегрин-опосредованной адгезии и миграции клеток в период имплантации. Экспрессию остеопонтина определяли в клетках эпителия, миоподиях, в строме и в слизи просвета желез. Выявлены различия между группами в уровне остеопонтина в эндометрии и в распределении максимальной и минимальной экспрессии у бесплодных пациенток I и II группы по сравнению с группой контроля. Различий в экспрессии остеопонтина между I и II группой женщин выявлено не было ($p > 0,05$). Влияния полиморфизма гена PAI-1 на экспрессию остеопонтина также не было выявлено.

Для оценки влияния полиморфизма гена PAI-1 на состояние эндометрия мы исследовали экспрессию белка PAI-1 в эндотелии сосудов,

поверхностном эпителии и в строме эндометрия. По данным литературы 4G аллель PAI-1 имеет более высокую скорость транскрипции и 4G/4G PAI-1 гомозиготы имеют более высокий уровень белка PAI-1 в плазме крови и в тканях по сравнению с 5G/5G гомозиготами [Папченко Е.А., 1999; Buchholz T.;2003].

Уровень белка PAI-1 в эндометрии независимо от локализации был достоверно выше у пациенток с бесплодием и повторными неудачами ЭКО (I и II группа) по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Во всех трех группах максимальный уровень белка PAI-1 наблюдался в поверхностном эпителии эндометрия, при этом у пациенток с бесплодием I и II группы экспрессия PAI-1 в поверхностном эпителии была в 3-4 раза выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$) (рис.2-3). Также обращают на себя внимание статистически значимые отличия в экспрессии PAI-1 в I и II группе бесплодных пациенток. В строме и в эндотелии сосудов эндометрия уровень белка PAI-1 было достоверно выше у пациенток I группы с наличием 4G аллеля PAI-1 по сравнению с пациентками II группы с 5G/5G полиморфизмом PAI-1 ($p < 0,05$).

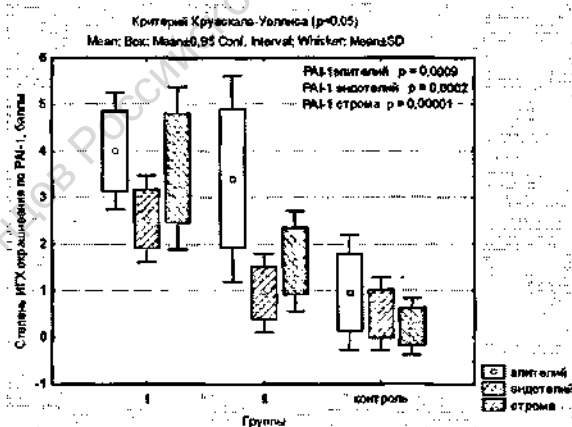


Рис.2. Экспрессия белка PAI-1 в эндометрии (баллы).



Рис.3. Экспрессия белка PAI-1 в эндометрии в период “окна имплантации” (ИГХ).

Высокий уровень белка PAI-1 в поверхностном эпителии эндометрия в период “окна имплантации” у пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе возможно является причиной подавления активаторов плазминогена, секретируемых blastocystой на этапе адгезии, и нарушения имплантации [Khamis F.,1996].

Корреляционный анализ показал наличие связи между 4G аллелем PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии (табл.3). В группе контроля прямая и статистически значимая зависимость была выявлена независимо от локализации белка PAI-1. В группе пациенток с повторными неудачами программы ЭКО статистически значимая корреляция между носительством 4G аллеля PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии была выявлена только в строме эндометрия ($R = 0,6; p < 0,05$).

Таблица 3

Корреляция (R) между 4G аллелем PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии в период “окна имплантации”

Группы	PAI-1		
	Эпителий	Строма	Эндотелий сосудов
I группа (n=11)	0,339 $p > 0,05$	0,6 $p < 0,05$	0,37 $p > 0,05$
II группа (n=11)	-	-	-
Группа контроля (n=11)	0,85 $p < 0,01$	0,75 $p < 0,01$	0,84 $p < 0,01$
Всего (n = 33)	0,37 $p < 0,05$	0,634 $p < 0,01$	0,716 $p < 0,01$

Таким образом, результаты нашей работы показали, что наследственный полиморфизм генов предрасположенности к тромбофилии широко распространен среди пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО и способствует более частой и более выраженной активации внутрисосудистого свертывания крови, возникающей ко дню переноса эмбрионов в полость матки. Одним из оптимальных путей повышения эффективности и безопасности программы ЭКО у пациенток с высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии является терапия малыми дозами антикоагулянтов в лютеиновую фазу стимулированного цикла. В литературе широко обсуждается влияние НМГ на гепарин-связывающие белки, вовлеченные в имплантацию (VEGF, HB-EGF) [Nelson S.M., 2008]. Показано стимулирующее влияние надропарина кальция на активаторы плазминогена, что может быть актуальным для пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, учитывая высокий уровень белка PAI-1 в поверхностном эпителии эндометрия [Макацария А.Д., 2003]. Все вышеперечисленное обращает внимание специалистов-репродуктологов на важность обследования пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе на наследственный полиморфизм генов предрасположенности к тромбофилии и целесообразность применения профилактической антикоагулянтной терапии в программах ЭКО у пациенток группы риска.

ВЫВОДЫ

1. У 22,5% пациенток с 2-мя и более неудачными попытками ЭКО в анамнезе и носительством полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии отягощен семейный тромботический анамнез; в репродуктивном анамнезе в 2,7 раза чаще отмечены случаи самопроизвольного прерывания беременности (38,9%), в том числе у 10,1% женщин – привычное невынашивание беременности. Различные варианты сочетания наследственного полиморфизма генов предрасположенности к

тромбофилии (мутация FV Лейдена, протромбина G20210A, фибриногена G455A, PAI-1 -675 5G/4G, тромбоцитарных гликопротеинов ITGA2 и ITGB3) отмечены у 90% женщин с повторными неудачами ЭКО; наиболее часто (77,7%) выявляется гетеро- и гомозиготный полиморфизм гена PAI-1 675 5G/4G.

Повышенные уровни антифосфолипидных антител выявлены у 22,2% пациенток с повторными неудачами ЭКО, при этом у 18,5% обследованных женщин повышение антител носит транзиторный характер.

2. Для пациенток с повторными неудачами ЭКО независимо от носительства полиморфизма гена PAI-1 675 5G/4G в период "окна имплантации" при нормальной морфологической структуре эндометрия характерен низкий процент пиноподий (<50%), снижение экспрессии LIF, что отражается на рецептивности эндометрия и приводит к неудачам имплантации.

3. В период "окна имплантации" у пациенток с повторными неудачами ЭКО независимо от носительства полиморфизма гена PAI-1 выявлено снижение экспрессии VEGF, снижение и перераспределение экспрессии остеопонтина, повышение в 3-4 раза уровня белка PAI-1 в поверхностном эпителии эндометрия по сравнению с группой фертильных женщин. Выявлена взаимосвязь между 4G аллелем PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии. У пациенток с гетеро- и гомозиготным полиморфизмом PAI-1 (4G/4G и 5G/4G) отмечен более высокий уровень белка PAI-1 в эндометрии, что может быть одной из причин неудач имплантации.

4. При сопоставимых параметрах стимуляции овуляции, фолликуло- и оогенеза в группе женщин с высокой частотой встречаемости полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии ко дню переноса эмбрионов в полость матки в 2,1 раза чаще отмечено повышение Д-димера, что указывает на высокий риск активации внутрисосудистого свертывания крови и тромботических осложнений.

5.Эффективность программы ЭКО при сопоставимых параметрах фолликуло-, оогенеза и раннего эмбриогенеза у женщин с высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии ниже, чем у пациенток с низкой частотой или отсутствием полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии (22,2% и 27%, $p>0,05$).

6. Использование профилактических доз низкомолекулярных гепаринов (надропарин кальция 0,3 мл п/к) в лютеиновую фазу стимулированного цикла у женщин с повторными неудачами ЭКО в анамнезе и высокой частотой полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии позволяет увеличить частоту наступления беременности до 40% по сравнению с 22,2% в стандартном протоколе ЭКО.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1.Пациенткам с неудачами имплантации в анамнезе для определения индивидуальной подготовки к следующему циклу ЭКО необходимо проведение комплексного обследования, включающего в себя диагностику наследственного полиморфизма генов предрасположенности к тромбофилии, антител к фосфолипидам, исследование параметров гемостазиограммы, морфологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия.

2. При наличии у пациентки мутации Лейдена, протромбина, а также сочетания 3-х и более гетерозиготных или 2-х и более гомозиготных полиморфизмов по генам PAI-1, фибриногену, тромбоцитарным гликопротеинам ITGA2, ITGB3, положительных антител к фосфолипидам пациентка должна быть отнесена к группе высокого риска по активации внутрисосудистого свертывания крови на фоне гормональной стимуляции в программе ЭКО.

3.Пациенткам с неудачными попытками ЭКО в анамнезе и носительством гетеро- или гомозиготного полиморфизма гена PAI-1 5G/4G с целью повышения эффективности программы ЭКО рекомендованы

профилактические дозы низкомолекулярных гепаринов (надропарин кальция 0,3 мл x 1 раз в день п/к) в течение 10 дней, начиная со следующего дня после трансвагинальной пункции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВАК – высшая аттестационная комиссия
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
Гн-РГ – гонадотропин релизинг гормон
ИГХ – иммуногистохимический анализ
НМГ – низкомолекулярные гепарины
ПР – прогестероновые рецепторы
ПЭ – перенос эмбрионов в полость матки
рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
ЭРа – эстрогеновые рецепторы α
FV – V фактор свертывающей системы крови
ITGA2 – ген рецептора тромбоцитов интегрин $\alpha 2$
ITGB3 – ген тромбоцитарного рецептора фибриногена
LIF – лейкемия-ингибирующий фактор
PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Охтырская, Т.А. Роль наследственных и приобретенных факторов риска развития тромбофилии в программах ВРТ / Т.А. Охтырская, К.А. Яворовская, А.В. Шуршалина // Вестник РУДН серия Медицина Акушерство и гинекология. – 2009. - №7. – С. 95 – 101.

2. Охтырская, Т.А. Роль наследственных и приобретенных тромбофилий в реализации программ ВРТ / Т.А. Охтырская, К.А. Яворовская, А.В. Шуршалина // Мать и дитя: Материалы X юбилейного Всероссийского научного форума. – М., 2009. – С. 379.

3.Охтырская, Т.А. Влияние наследственной и приобретенной тромбофилии на эффективность программ ВРТ / Т.А.Охтырская, К.А.Яворовская, А.В.Шуршалина // IV Международный конгресс по репродуктивной медицине. – М., 2010. – С. 268.

4.Охтырская, Т.А. Имплантационные потери в программах ЭКО: роль наследственной и приобретенной тромбофилии (обзор литературы) / Т.А.Охтырская, К.А.Яворовская, А.В.Шуршалина // Проблемы репродукции. – 2010. - №2 – т.16 – С. 53-58.

5.Охтырская, Т.А. Морфологическое состояние эндометрия в период имплантационного окна у женщины с наследственными и приобретенными тромбофилиями / Т.А.Охтырская, К.А.Яворовская, Л.С.Ежова, Т.А.Назаренко // Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: Материалы XXIII Международного конгресса с курсом эндоскопии. – М., 2010. – С.205.

6.Okhtyrskaya, T.A.The role of thrombophilia in IVF implantation failure / S.G. Perminova, K.A.Yavorovskaya, T.A.Okhtyrskaya, A.V.Shurnalina //20th World Congress on Fertility and Sterility. – Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology - 2010. – V.7 – №4. - P. 304.

7.Охтырская, Т.А. Влияние наследственного полиморфизма гена PAI-1 на исходы программ ВРТ / Т.А.Охтырская, К.А.Яворовская, Л.С.Ежова // Мать и дитя: Материалы XI Всероссийского научного форума. - М., 2010. – С.469.

8. Okhtyrskaya, T.A. The role of PAI-1 in recurrent ART failure/ K.A.Yavorovskaya, T.A.Okhtyrskaya, T.A. Demura, N.M. Faizulina, L.S. Ezhova, E.A. Kogan//27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology. – ESHRE 2011 Selected Abstracts. – P-231.

9.Охтырская, Т.А. Роль PAI-1 в повторных неудачах ВРТ/ Т.А.Охтырская, К.А.Яворовская, Н.М. Файзуллина, Л.С. Ежова, Т.А. Демура, А.В. Шуршалина// Проблемы репродукции. – 2011. - №4.- С. 53-58.

Приложение 1. Алгоритм предварительного обследования пациенток программы ЭКО на наследственные и приобретенные факторы риска тромбофилии, подготовки их к реализации программы и проведению этапов ЭКО



Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать: 22.06.11
Объем: 1,5 усл.п.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 782
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г. Москва, пр-т Вернадского, 39
(495) 363-78-90; www.reglet.ru

41 - 14 158

2011A
14158

Из фондов Российской национальной библиотеки