Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение

высшего образования

 «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление «Медицина»

Кафедра акушерства, гинекологии и репродуктологии

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

НА ТЕМУ**: «**ВЛИЯНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ NK-КЛЕТОК НА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ПАЦИЕНТОК С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ»

 Выполнила студентка 16.С04-м группы

Шукурова Мунисс Риязовна

 Научный руководитель

д.м.н. Гзгзян Александр Мкртичевич

Санкт-Петербург

2022

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…………………………………………………………4

ВВЕДЕНИЕ………………………………………………………………………….5

1. Актуальность проблемы……………………………………………………..5

2. Цель и задачи исследования…………………………………………………6

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……………………………………………………8

1.1. Повторные неудачи имплантации. Определение…………………………..8

1.2. Этиологические факторы повторных неудач имплантации………………11

1.2.1. Генетические причины……………………………………………………….11

1.2.2. Иммунологические причины…………………………………………………12

1.2.2.1. Аутоиммунные нарушения…………………………………………………13

1.2.2.2. Аллоиммунные нарушения…………………………………………………15

1.3. Патогенетическая роль NK-клеток при повторных неудачах имплантации…………………………………………………………………………………….19

1.3.1. NK-клетки периферической крови…………………………………………...20

1.3.2. NK-клетки эндометрия и децидуальной оболочки………………………….22

1.3.3. NK-клетки при повторных неудачах имплантации………………................24

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ…………………………………………….27

2.1. Материалы исследования……………………………………………………..27

2.2. Методы исследования…………………………………………………………28

2.2.1. Морфологическая оценка качества эмбрионов………………………………29

2.2.2. Определние цитотоксической активности NK клеток………………………29

2.3. Протокол стимуляции овуляции в циклах ЭКО ……………………………32

2.4. Статистическая обработка…………………………………………………….33

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……………………………………..34

3.1 Общая характеристика исследуемых женщин...……………………...………...34

 3.2 Оценка эмбриологического этапа ..……………………………….…..………..37

 3.3 Анализ результативности протоколов ЭКО..………………………………….39

ЗАКЛЮЧЕНИЕ………………………………………………………………………44

ВЫВОДЫ……………………………………………………………………………46

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ………………………………………………………….47

# Список сокращений

аГнРГ - агонисты гонадотропин-рилизинг гормона

анГнРГ – антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

АМГ - антимюллеров гормон

ВЗОМТ - воспалительные заболевания органов малого таза

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ГнРГ - гонадотропин релизинг гормон

ИМТ - индекс массы тела

ЛГ- лютеинизирующий гормон

ПЭ – подсадка эмбриона

рФСГ - рекомбинантный фолликуло-стимулирующий гормон

УЗИ - ультразвуковое исследование

ЧАФ – число антральных фолликулов

чМГ - человеческие менопаузальные гонадотропины

ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение

β-ХГЧ - бета субъединица хорионического гонадотропина

ASRM – American Society for Reproductive Medicine

DNA-restriction fragment length polymorphism

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology

ILТ (immunoglobulin-like transcript)

NK-cells - natural killer cells

PCR sin gle-specific olegonucleotid probe hybridization

RIF- repeated implantation failure

**ВВЕДЕНИЕ**

1. **Актуальность темы исследования**

Бесплодие и привычное невынашивание беременности – мультифакториальные заболевания, обусловленные схожими этиопатогенетическими факторами, благодаря чему современные исследователи относят их под термином «ранние репродуктивные потери». Согласно данным 2021 гогда Российской ассоциации репродукции человека, частота инфертильных браков достигает 24% [29], частота невынашивания беременности-15-20% [52], в каждом четвертом случае - привычная потеря второй беременности (3-5%) и в каждом десятом - третьей и последующей беременностей (1-2%) [25, 69].

Развитие беременности на ранних сроках более всего подвержено генетическим и иммунологическим факторам. Если генетические аномалии в кариотипе родителей и эмбрионов исключены, на первое место выходят иммунологические нарушения [48, 56].

В генезе репродуктивных нарушений роль иммунологических факторов остается не до конца понятной. Среди иммунологических факторов, повышающих риск репродуктивных нарушений, описаны: антифосфолипидные антитела, антитела к аннексину V, протромбину, антиспермальные, антитиреоидные, антитела к ХГЧ, совпадения по HLA локусам II класса у супругов, изменение секреции цитокинов и др. [28, 38, 51].

Один из наиболее актуальных вопросов – это роль NK-клеток (natural killer cells) в генезе репродуктивных нарушений. Данная проблема обсуждается уже более 20 лет - с тех пор как была опубликована работа A. Beer с соавт., в которой было показано, что при планировании беременности уровень NK-клеток в периферической крови коррелирует с репродуктивными потерями и неудачами в протоколах ЭКО [58].

Доказано, что NK-клетки в секреторную фазу цикла и при наступлении беременности мигрируют в эндометрий из периферической крови, где их

количество резко увеличивается [27]. NK-клетки в децидуальной оболочке располагаются по ходу ворсин трофобласта и спиральных артерий, им отводится важная роль в регуляции формирования и развития плацентарной ткани [14, 21]. Количество, функциональную активность NK-клеток изучают как в периферической крови, так и в эндометрии.

В ходе исследований, полученные несогласованные данные, связаны с различными критериями формирования выборок, методами оценки активности NK-клеток, временем забора материала. Так, было показано, что количество NK-клеток в эндометрии женщин с репродуктивными неудачами выше, чем у фертильных женщин [72]. Роль NK-клеток периферической крови в патогенезе репродуктивных неудач обсуждается. Одним авторам удалось выявить связь между уровнем и активностью NK-клеток крови и репродуктивными потерями [8, 13, 34], другим нет [15, 54, 69].

Следовательно, определение функциональной активности NK-клеток до беременности с целью оценки риска репродуктивных неудач представляет научный и практический интерес.

1. **Цели и задачи исследования**

**Цель исследования:**

* Оценить влияние цитотоксической активности NK-клеток в периферической крови на результативность программ ВРТ у женщин с бесплодием и повторными неудачами имплантации

# Задачи исследования:

1. Оценить влияние цитотоксической активности NK-клеток в периферической крови на характеристики эмбрионального этапа циклов ЭКО у пациенток с бесплодием и повторными неудачами имплантации
2. Оценить результаты циклов ЭКО у пациенток с бесплодием и повторными неудачами имплантации в зависимости от влияния цитотоксической активности NK-клеток
3. Оценить влияние цитотоксической активности NK-клеток в периферической крови на частоту наступления беременности у пациенток и с повторными неудачами имплантации.

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**Глава 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧ ИМПЛАНТАЦИИ В ПРОГРАММЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

* 1. **Повторные неудачи имплантации.** **Определение.**

Результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в последние годы несомненно растет, однако у 60% женщин все так же клиническая беременность в одном лечебном цикле не наступает, а у 20% - после трех циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [47].

Безусловно, даже перенос морфологически качественного эмбриона в полость матки с эндометрием, структурно соответствующим фазе менструального цикла, не всегда приводит к наступлению беременности, а наступившая беременность в ряде случаев останавливается в развитии на ранних сроках [13].

Процесс имплантации зависит от синхронизации различных факторов, таких, как качество эмбриона, оптимальные условия культивирования *эмбриона*, рецептивность эндометрия и адекватное состояние материнской иммунной системы [31]. Приблизительно за две трети неудач имплантации ответственна неадекватная рецептивность эндометрия, тогда как состояние эмбриона- только за одну треть. Главный процент прекращения развития эмбрионов связан с наличием у них хромосомных аномалий [46].

Исследователи уделяют большое внимание изучению роли различных факторов в генезе повторных имплантационных потерь.

Повторные неудачи имплантации (repeated implantation failure - RIF) в программе экстракорпорального оплодотворения – клиническая ситуация, когда неоднократно не удается достичь стадии визуализации плодного яйца в полости матки при ультразвуковом исследовании (УЗИ) после переноса эмбриона (ов). Coughlan, рассматривал два варианта данной ситуации: в первом из них отсутствуют доказательства имплантации (отрицательные уровни β-субъединицы хорионического гонадотропина (βХГ)), а во втором имеются доказательства имплантации (положительные уровни βХГ), но по данным УЗИ, плодное яйцо отсутствует [9].

Определение RIF на разных этапах изучения данной проблемы объяснялись по-разному. Вначале RIF диагностировали при переносе 12 эмбрионов в нескольких циклах ВРТ, не учитывая количество последних [60]. Позже другая группа исследователей определила повторные неудачи имплантации как неспособность достижения беременности после переноса 10 или более эмбрионов в 2-6 циклах ВРТ [14]*.* На Европейском обществе репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) в 2005 году RIF определили, как отсутствие беременности при переносе 3-х и более эмбрионов в 10 и более циклах ЭКО [14]. В 2006 году Margalioth et al. полагали, что RIF определяется как отсутствие наступления беременности после переноса 3-х эмбрионов в 3-х циклах ЭКО/ПЭ [27]. Немного позднее определение повторных неудач имплантации описали как неспособность достижения беременности после переноса 5 эмбрионов на стадии бластоцисты вне зависимости от количества циклов ВРТ [11].

При установлении RIF некоторые авторы основываются только на количестве перенесенных эмбрионов, другие - на количестве неудачных циклов. Так, Aletebi F. полагает, что RIF – это отсутствие клинической беременности после переноса 3 или более эмбрионов [20]. Huang и соавторы верифицируют RIF после двух неудачных циклов, Sacks и соавторы – после трех попыток *ЭКО* [12] [59]. Другие исследователи учитывают оба фактора и считают, что о RIF свидетельствует отсутствие беременности после переноса от 2 до 10 и более эмбрионов в минимум двух или трех циклах ВРТ[11]. Рolansky считает, что для определения RIF общее число перенесенных эмбрионов должно быть не менее 4-х на стадии дробления или 2-х бластоцист [11]. Большинство авторов учитывают эмбрионы только хорошего качества, имеющие количество клеток, соответствующее дню развития, а в случае переноса бластоцисты - качество внутренней клеточной массы и трофоэктодермы [11] [12] [59]. Другие критерии включают наличие бластомеров одинакового размера, равномерность их распределения, а также наличие менее 10% фрагментации [22].

Tan и соавторы исключают криопротоколы из определения RIF, основываясь на том, что частота имплантации размороженных после криоконсервации эмбрионов ниже, чем в «свежих» циклах [14]. Однако систематический обзор и мета–анализ 3-х рандомизированных клинических исследований, показал более высокую частоту клинической и прогрессирующей беременности в криопротоколах [12]. По данным Shapiro частота родов живым плодом в криоциклах существенно выше в сравнении со свежими циклами (OR 3.8, 95% CI 2,1-7,2; р <0,0001) [14]. Таким образом, при определении RIF необходимо учитывать как свежие циклы ЭКО, так и криопротоколы.

Последнее предлагаемое определение RIF от Coughlan включает в себя не только количество эмбрионов и количество программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), но и возраст пациентки. Они определяли RIF как неспособность достижения клинической беременности после переноса, четырех эмбрионов хорошего качества, как минимум, в трех лечебных циклах ЭКО или криопротоколах у женщин в возрасте до 40 лет [9].

Термин «повторные неудачи имплантации» не является эквивалентом повторных неудач ЭКО, к которым следует относить невозможность достижения беременности после нескольких попыток у пациенток старшего репродуктивного возраста, при «бедном» овариальном ответе и субоптимальном качестве эмбрионов [9].

Можно сделать заключение, основываясь на приведенных данных литературы, что RIF – отсутствие клинической беременности у пациенток в возрасте до 40 лет после двух последовательных попыток ЭКО/ИКСИ или криоциклов, в которых общее число перенесенных эмбрионов не менее, чем 4 на стадии дробления или 2-х хорошего качества на стадии бластоцисты [11].

* 1. **Этиологические факторы повторных неудач имплантации**

Повторные неудачи в программе ЭКО могут быть связаны с дефектами гамет, эмбрионов, а также патологией матки и эндометрия.

К одним из главных причин повторных неудач имплантации (ПНИ) относят *генетические и иммунологические*.

Отдельного внимания заслуживают идиопатические RIF – неспособность к достижению беременности после переноса эмбрионов хорошего качества при исключении патологических изменений матки и эндометрия, а также любых других нарушений у женщины и отсутствие патозооспермии у мужчины [65]. Частота встречаемости идиопатических RIF составляет 8% по данным Yang X. и соавторов [70].

* + 1. **Генетические причины**

К вероятным генетическим причинам повторных неудач относят изменения в кариотипе родителей и аномалии эмбриона, возникающие *de novo*. В начале 80-х гг. отечественными исследователями было показано, что в результате хромосомных и геномных мутаций теряется около 50% всех зачатий у человека [12]. Наибольшая частота хромосомных поломок наблюдается у абортусов первого триместра. Необходимо подчеркнуть, что дисбаланс по некоторым хромосомам может приводить к очень ранней гибели зародыша, еще на доимплантационной стадии развития, что затрудняет диагностику и учет данных хромосомопатий [37, 59].

Аномалии в кариотипе родителей являются доказанной, неоспоримой причиной ПНИ. Частота их может достигать 10% среди пар с репродуктивными неудачами [35,67]. Однако, клинический опыт показывает, что даже при повторных неудачах ЭКО, потерях беременности с анеуплоидией, кариотип родителей может быть нормальным. Несмотря на то, что спонтанная анеуплоидия плода может встречаться в парах и с 2, и с 3 потерями, последующее увеличение неудач становится все более редким [20].

При исследовании кариотипа в парах с многократными репродуктивными неудачами Bolor с соавт., сообщили о мутации в гене *SYP3*, которая была выявлена у двух из 26 пациентов с идиопатическим ПНБ и ни у одной из 150 фертильных пар из группы контроля. Ген *SYP3* кодирует белок *synaptophysin*, который регулирует взаимодействие гомологичных хромосом во время мейоза. Имеется в виду, что данная мутация способствует неправильному расхождению хромосом при мейозе и приводит к повторным анеуплоидиям у плода при нормальном кариотипе родителей [17, 47].

Аномалии кариотипа у большинства абортусов, связаны с нарушением гаметогенеза у родителей, носят случайный характер. Около 2-5% случаев ( в 10 раз чаще, чем в популяции) репродуктивные потери связаны с родительскими сбалансированными структурными перестройками хромосом, чаще всего сбалансированными реципрокными или Робертсоновскими транслокациями [12,31]. Сбалансированные транслокации могут передаваться из поколения в поколение фенотипически нормальными носителями, способствуя возникновению спонтанных выкидышей, бесплодия или рождения детей с аномалиями развития.

Хотя к генетическим причинам нарушения процессов репродукции необходимо относить не только изменения в гаметах родителей, но и генетические факторы предрасположенности, которые, взаимодействуя со средовыми, обуславливают развитие целого ряда состояний, в частности тромбофилии и иммунопатологию [17, 66].

* + 1. **И****ммунологические причины**

Наибольшее число прерываний беременности происходит в I триместре, причем 70% до 8 недель [57, 62]. Принято считать, что спорадическое прерывание беременности на ранних сроках — это проявление естественного отбора: аномальный кариотип диагностируется у 60% абортусов. Однако при повторных потерях частота генетически неполноценных эмбрионов значительно ниже [6]. Согласно данным H.Carp (2016), нормальный кариотип абортуса является неблагоприятным прогностическим фактором для наступления последующей беременности [27].В случае исключение генетических аномалий, на первое место среди причин повторных репродуктивных неудач ранних сроков выходят иммунологические нарушения [17,48]. В перечень рекомендованных диагностических лабораторных тестов иммунологическое обследование не входит, за исключением антифосфолипидных антител при ПНБ [25, 26, 35].

Иммунологические нарушения могут быть аллоиммунными и аутоиммунными. Если аутоиммунные реакции направлены против собственных тканей матери, то при аллоиммунных нарушениях иммунный ответ направлен против антигенов плода отцовского происхождения [18]. Данные процессы не являются взаимоисключающими, поэтому могут происходить одновременно.

* + - 1. **Аутоиммунные нарушения**

Аутоиммунные нарушения могут оказывать негативное влияние на все стадии репродуктивного процесса, включая оогенез, имплантацию и беременность [17]. Наличие аутоантител может быть маркером нарушения аутотолерантности или связано с носительством специфических аллелей антигенов HLA, таких как *DRB1* 03, который ассоциируется как с продукцией антикардиолипиновых, антитиреоидных, антинуклеарных антител, так и с привычной потерей плода [8, 71].

Ассоциация антифосфолипидного синдрома (АФС) и неблагоприятных исходов беременности хорошо известна [44, 48, 52]. Доказана роль АФС в генезе артериальных и венозных тромбозов, антенатальной гибели плода, плацентарной недостаточности, развитии преэклампсии, ПНБ на поздних сроках (более 12 недель) [4, 23, 34].

В отношении репродуктивных потерь, роль АФС остается дискутабельной: неудачи ЭКО, доклинические потери беременности, а также ПНБ ранних сроков (до 10 недель). При оценке широкого спектра АФА у женщин с бесплодием неясной этиологии и неудачами ЭКО, показано, что 8 – 9% пациенток положительны более чем на один вид АФА, а в группе контроля только 1,5% [58]. Авторы исследований отмечают наиболее часто встречающиеся: антитела к фосфатидилсерину [9,34], кардиолипину [63], волчаночный антикоагулянт (ВА) [34]. Показано, что АФА могут ингибировать процессы ангиогенеза в эндометрии и снижать выработку сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Все это приводит к нарушению механизмов имплантации и уменьшению глубины инвазии трофобласта [10, 32].

Антитела к протромбину являются патогенными в результате ингибирования факторов коагуляции, что приводит к удлинению времени фосфолипидзависимых коагуляционных тестов [66]. Вместе с тем, антитела к протромбину были обнаружены у совершенно здоровых людей [50].

В последнее время одна из ведущих ролей в патогенезе АФС отводится аннексину V. Основанный на высокой аффинности к анионным фосфолипидам, аннексин V обладает мощными антикоагулянтными способностями *in vitro*, [64]. Аннексин V, по мнению авторов является высокоспецифичным фактором риска гибели морфологически нормального плода после десятой недели беременности. Установлена прямая связь между наличием данного вида антител и неудачами протоколов ЭКО [46, 62].

В 80-е гг. прошлого века впервые была установлена возможность образования высокоафинных антител к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ), способных нейтрализовать действие гормона *in vitro* и *in vivo* [42, 49]. Антитела к ХГЧ в данное время ассоциируются с угрозой прерывания беременности на ранних сроках, плацентарной недостаточностью, развитием синдрома задержки внутриутробного развития плода [43, 69]. У женщин с бесплодием, синдромом резистентных яичников и плохим ответом в программах ВРТ описаны антитела к ХГЧ и гонадотропинам, [55, 61, 68] и выявляются среди данной категории пациентов с высокой частотой – до 35% [3]. Говорится, что антитела к ХГЧ могут служить возможной причиной самопроизвольного прерывания беременности после ЭКО [5, 16].

Антиспермальные антитела (АСА) могут продуцироваться как в мужском, так и в женском организме. Их основное влияние распространяется на процессы гаметогенеза и оплодотворения [17]. У мужчин чаще АСА обнаруживаются: в сперме, семенной жидкости, сыворотке крови, вырабатываются в случае нарушения гемато-тестикулярного барьера и, попадая в общий кровоток, инициируют иммунный ответ [30, 69]. Происходит это в результате механических повреждений, воспаления, генитальных инфекций [56]. Также они могут неблагоприятно влиять на созревание сперматозоидов, их подвижность, прохождение цервикального канала и в итоге снижать качество спермы [59, 71].

У женщин АСА могут быть обнаружены в крови, фолликулярной жидкости, вагинальном или цервикальном секрете [40].

Они образуются при нарушении целостности слизистой оболочки и встрече сперматозоидов с иммунной системой женщины [54]. На разных этапах репродуктивного процесса АСА могут вызывать бесплодие у женщин, включая посткоитальное выживание спермы в репродуктивном тракте женщины [36]. Считают, что определенные классы АСА могут препятствовать слиянию сперматозоида с яйцеклеткой [51].

Следовательно, на настоящий момент имеется широкая панель диагностических показателей аутоиммунных нарушений - органоспецифические и неорганоспецифические антитела (антифосфолипидные, антитиреоидные, антиспермальные, антитела к гонадотропным гормонам и их рецепторам, к ХГЧ и др.). Данная панель тестов не рекомендована к использованию [14, 15], т.к. значение выявления различных антител, изолированно или в совокупности, остается до конца неясным.

* + - 1. **Аллоиммунные нарушения**

В области репродуктивного здоровья аллоиммунные нарушения обсуждают с 1960-х гг.

К аллоиммунным нарушениям относят наличие у супругов общих антигенов HLA системы и повышенное содержание естественных киллерных клеток (NK-клеток CD56+, CD16+) в эндометрии, децидуальной оболочке и периферической крови женщины на прегравидарном этапе и во время беременности [30]. При привычной потере плода на ранних сроках частота аллоиммунных нарушений достигает 33% [6, 17]. Система главного комплекса гистосовместимости, или *Human Leukocyte An- tigens* (*HLA*), является не только наиболее полиморфной, но и одной из наиболее полифункциональных. Участие в контроле иммунного ответа, распознавание антигенов, регуляция взаимодействия иммунокомпетентных клеток, уровня и синтеза стероидных гормонов – являются не полным перечнем ее функций [25, 26, 53].

 Гены, кодирующие антигены комплекса HLA, включают в себя 3 класса. Гены I класса поделены на две подгруппы: Iа (классические) – к которому относятся *HLA-A, В и С*; Ib (неклассические) - *HLA-E, -F и -G*.

Гены II класса – это *HLA-D (HLA-DR, DP, DQ (А и В), DO и DN)*. Антигены HLA II класса преимущественно локализованы на иммунокомпетентных клетках. Основные отличия молекул HLA I и II классов изображены в таблице 1 [38].

Регион III класса системы HLA состоит из генов, принимающих участие в процессах воспаления и содержат аллели компонентов комплемента, а также фактора некроза опухоли (TNF) и ряда изоферментов [25, 45].

Таблица 1 - Основные отличия молекул HLA I и II классов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Свойства** | **HLA I класс** | **HLA II класс** |
| Распространение в тканях | Все ядросодержащие клетки | Только антигенпрезентирующие клетки (моноциты, В-клетки, клетки Лангерганса), эпителий Тимуса, некоторые Т-клетки |
| Функция | Представление антигенов для CD8+ Т-клеток; лиганды для рецепторов NK-клеток | Презентация антигенов для CD4+ Т- клеток |

Было исследовано, что антигены *HLA* могут влиять на развитие плода, течение и исход беременности. Данные полученные показывали, что детей, унаследовавших от отца антигены HLA отличные от материнских («гистонесовместимая» беременность), рождалось больше [41, 54]. Совместимость супругов по 3 и более антигенам HLA системы повышает риск НБ и бесплодия почти на 100%, согласно данным Серовой Л.Д., [51].

Использовалось также серологическое определение антигенов HLA, которое зависело и от качества реагента, и от техники выделения клеток. При сравнении методов диагностики антигенов локуса HLA-DR более 25% результатов, полученных серологическим способом, не подтверждались методом *DNA-restriction fragment length polymorphism* [69]. В работах, где использовалась ДНК- диагностика, не было обнаружено повышения совпадений по 2 локусам *HLA-DR* и *HLA–DQ* в парах с ПНБ. Однако, используя метод *PCR sin gle-specific olegonucleotid probe hybridization, C.Ober* с соавт в своем исследовании, показали высокую частоту *HLA-DQ* совпадений у супругов с ПНБ, [21].

Исследователями, была установлена связь между привычной потерей плода и *HLA-DR* антигеном (*DR1 и DR3*) [37]. В парах с неудачными исходами беременности супруги чаще совпадали по *HLA-DR* антигенам, в парах с НБ значительно чаще диагностировался гаплотип *HLA-B44/DR5* [7].

При обследовании супружеских пар с идиопатическим бесплодием, вступающих в очередной протокол ВРТ, показано, что в парах с неудачной попыткой частота совпадений по локусу *HLA–DQ* была выше по сравнению с теми, у кого наступила беременность [37].

HLA-G, неклассическая молекула I класса, заслуживает особого внимания, она экспрессируется на трофобласте. Ее главные отличия — это ограниченное распространение в тканях, низкий уровень полиморфизма, наличие 7 различных изоформ молекулы, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга, а также способность оказывать супрессивное действие на иммунокомпетентные клетки [19].

Рецепторы молекул HLA-G имеются на NK-клетках. Показано, что HLA-G является лигандом как минимум для двух видов ингибирующих рецепторов [39]. Рецепторами молекул HLA-G на NK-клетках являются ILТ (*immunoglobulin-like transcript*) и KIR2DL4. Их взаимодействие препятствует активации цитотоксической функции NK-клеток [24].

Связывание HLA-G и KIR2DL4 стимулирует секрецию INF-γ NK-клетками при одновременном ингибировании их цитотоксической активности в отношении клеток трофобласта [29]. Цитокин INF- γ способствует формированию плаценты, снижая миграцию клеток трофобласта и обеспечивая их скопление вблизи спиральных артерий [32]. На цитотоксических CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках так же имеются рецепторы молекул HLA-G. Уровень экспрессии рецепторов HLA-G на трофобласте определяется прогестероном и IL-10. [38].

Основной задачей HLA-G является регуляция секреции цитокинов клетками иммунной системы, для того чтобы контролировать процессы инвазии трофобласта и поддерживать местные иммуносупрессивные реакции [28]. HLA-G стимулирует секрецию таких цитокинов как IFN-γ, G-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, снижает секрецию TNF-α NK-клетками [28]. Баланс цитокинов, упомянутых выше, определяет успех процессов имплантации, инвазии трофобласта и физиологического развития плаценты. Растворимая форма HLA-G, секретируемая трофобластом, стимулирует пролиферацию децидуальных NK-клеток (decidual, dNK) [68]. HLA-G не стимулирует классический Т-клеточный ответ, подавляет активацию лимфоцитов CD8+, возможно, посредством индукции апоптоза, способствуя, таким образом, секреции противовоспалительного спектра цитокинов [33].

На сегодняшний день идентифицировано 46 аллелей гена HLA-G. Наиболее распространенные аллели белок-кодирующей области: HLA-G\*0101, HLA- G\*0102, HLA-G\*0103, HLA-G\*0104, HLA-G\*0105, HLA-G\*0106 и HLA-G\*0107

[38]. При попытке выявить связь между вариантами полиморфизмов гена HLA-G и частотой репродуктивных неудач были получены положительные результаты. Установлена связь аллелей *0105N* и *0104N* у пациенток с 2 и особенно с 5 выкидышами в анамнезе [38]. Так же, вариант полиморфизма 725С/G, был ассоциирован с потерей плода. В парах, определялся повышенный риск невынашивания беременности, где оба партнера имели такой генотип, [58].

* 1. **Патогенетическая роль NK-клеток при повторных неудачах имплантации**

**NK-клетки (natural killer cells,** **естественные киллеры)**- это гетерогенная популяция лимфоцитов I группы врожденного иммунитета (ILC– innate lymphoid cells), обеспечивающих первую линию иммунной защиты против ряда патогенов. Клетки обладают естественной цитотоксической активностью, способны продуцировать цитокины и хемокины, осуществлять координацию взаимодействия врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы; участвуют в противоинфекционном и противоопухолевом контроле, поддержании клеточного гомеостаза лимфоидной системы [1].

NK-клетки распространены в различных органах и системах организма, условно подразделяясь на NK-клетки периферической крови, где их численность составляет 5-20% лимфоцитов, и тканерезидентные NK-клетки (селезенка, печень, почки, костный мозг, тимус, лимфатические узлы, кожа и слизистые оболочки, слюнные железы, эндометрий) [2].

NK-клетки периферической крови проходят последовательные этапы дифференцировки из гематопоэтических стволовых клеток-предшественниц (ГСК) преимущественно в костном мозге, где связаны с транскрипционными факторами (T-bet, Eomes и другие), стромальными элементами и цитокинами. По мере дифференцировки, клетки приобретают зрелый фенотип и функциональную компетентность - способность к продукции литических молекул и цитокинов, после чего выходят из костного мозга в периферическую кровь [3].

Основной функцией NK-клеток является их цитотоксическая активность по отношению к клеткам-мишеням. Они могут распознавать и атаковать опухолевые, инфицированные вирусами, бактериями, а также поврежденные в результате окислительного стресса клетки, без предварительной сенсибилизации [4]. NK-клетки способны лизировать чужеродные или свои собственные измененные клетки в отсутствии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на мембране, независимо от антител и комплемента [4]. Уничтожение клеток-мишеней реализуется посредством нескольких механизмов. Контактный цитолиз происходит при высвобождении содержимого цитотоксических гранул NK-клеток, содержащих перфорин, гранзимы, сериновые протеазы в область иммунологического синапса с клеткой-мишенью. Перфорин способствует проникновению в клетку цитолитических медиаторов, что запускает процессы апоптоза. Цитотоксический эффект натуральных киллеров также реализуется при связывании рецептора TRAIL- и Fas-активированных NK-клеток с их лигандами (TRAIL-R, Fas-R) на поверхности клеток-мишеней. При их взаимодействии в клетке-мишени происходит индукция каскада сигнальных реакций, активирующих каспазу-8 и каспазу-10, инициирующих ее апоптоз [5].

NK-клетки обладают иммунорегуляторной функцией, являясь одними из основных источников цитокинов и хемокинов, таких как IFNγ, фактор некроза опухоли α (TNFα), гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор роста (GM-CSF), хемокин CCL5, регулируя активность макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток (ДК) и Т-лимфоцитов, способствуя формированию врожденного и адаптивного иммунных ответов [6].

**1.3.1. NK-клетки периферической крови**

NK-клетки периферической крови (peripheral blood NK-сells, pbNK-клетки) подразделяют на две основные субпопуляции, согласно экспрессии поверхностных антигенов кластерной дифференцировки лейкоцитов - CD56 и CD16 [7]. Около 90% pbNK-клеток слабо экспрессируют СD56 (CD56dim) и интенсивно CD16 (CD16bright), представлены фенотипом CD3-CD56dimCD16bright, для них характерно большое количество лизосомальных гранул и высокая цитотоксическая активность. Другая субпопуляция NK-клеток интенсивно экспрессируют CD56 (CD56bright) и средне/низко CD16 (CD16dim/neg) и имеет фенотип CD3-CD56brightCD16dim/neg, составляя менее 10% от общего количества натуральных киллеров крови. Данные клетки обладают регуляторными свойствами, продуцируют цитокины, хемокины, факторы роста [7]. CD56bright NK-клетки более распространены в периферических тканях организма, что указывает на их тканеспецифическую функцию [8]. Помимо CD56bright и CD56dim, выделяют также субпопуляцию NK-клеток CD56neg, отличающихся пониженной экспрессией цитотоксических рецепторов, низким уровнем перфорина и как следствие, общей гипореактивностью (Рис.1).



Рис.1. Функции CD56+ NK-клеток человека (модифицировано из Marcenaro E., 2011[9].

Особенностью NK-клеток является контроль их функциональной активности за счет экспрессии широкого репертуара активирующих и ингибирующих рецепторов на поверхности. Основные группы рецепторов представлены лектиноподобными рецепторами NKG (natural killer group), семейством иммуноглобулиноподобных рецепторов (killer immunoglobulin like receptor, KIR), цитотоксическими рецепторами NKp30, NKp44, NKp46 и другими [10]. Активность NK-клеток зависит от плотности распределения групп рецепторов, их взаимодействия с клетками-мишенями, клеточным микроокружением, растворимыми факторами.

В некоторых исследованиях было показано изменение показателей количества и функциональной активности pbNK-клеток в течение менструального цикла и при наступлении беременности, а в работе Lee S. et al, 2010г. обнаружено выраженное увеличение субпопуляции CD3-CD56dim NK-клеток крови в лютеиновую фазу цикла, при отсутствии изменений количества CD3-CD56brigh NK-клеток [11]. Также отмечено снижение цитотоксической активности pbNK-клеток в лютеиновой фазе цикла и при физиологической беременности [12-13], что не подтверждается другими авторами [14,15].

Исходя из этого, субпопуляции pbNK-клеток различаются по экспрессии цитокиновых и хемокиновых рецепторов, регуляторной и цитотоксической функции.

**1.3.2. NK-клетки эндометрия и децидуальной оболочки**

Количество иммунокомпетентных клеток эндометрия может достигать до 40% от общего числа стромальных клеток, при этом NK-клетки являются самой многочисленной популяцией лимфоцитов эндометрия. Эндометриальные NK-клетки (uterine NK cells, uNK- клетки) от общего количества эндометриальных лимфоцитов, составляют минимум 30%, однако в секреторную фазу менструального цикла их количество прогрессивно увеличивается, и в случае наступления беременности на ранних сроках достигает 75 % [16].

В настоящее время, нет единого мнения относительно происхождения uNK-клеток. Возможность их локальной дифференцировки подтверждается рядом исследований, обнаруживающих способность ГСК эндометрия к приобретению фенотипического маркера CD56+ NK-клеток [17]. Вторая теория предполагает образование uNK-клеток преимущественно путем трансэндотелиальной миграции pbNK - клеток за счет хемотаксиса с последующим приобретением эндометриального или децидуального фенотипа. Эндометрий человека продуцирует факторы, влияющие на дифференцировку NK-клеток, включая IL-15, IL-25, IL-7, хемокины CXCL10 и CXCL11, трансформирующий фактор роста β1 (TGFβ1), секреция которых увеличивается в лютеиновой фазе менструального цикла и начале беременности [18]. Миграция pbNK-клеток в эндометрий также может быть реализована в ответ на секрецию хемокинов клетками трофобласта [19]

Децидуальные NK-клетки располагаются вдоль спиральных артерий матки и являются источниками цитокинов, проангиогенных факторов (VEGF, ANG2), участвуя в ремоделировании сосудов матки и децидуальном ангиогенезе при беременности. uNK-клетки экспрессируют ряд рецепторов, включая KIR и лейкоцитарные иммуноглобулиноподобные рецепторы (LIRs), которые распознают HLA-E, HLA-G и HLA-C, экспрессируемые вневорсинчатым трофобластом [20].

Благодаря связыванию рецепторов KIR2DL4 NK-клеток с молекулами локуса HLA-G, экспрессируемыми клетками трофобласта, происходит подавление цитотоксической активности NK-клеток.

Связывание KIR2DL4 и HLA-G стимулирует секрецию NK-клетками IFNγ, индуцирующего экспрессию генов различных хемокинов, цитокинов и транскрипционных факторов клетками децидуальной ткани, что способствует построению сосудистой сети плаценты [21]. IFNγ также способствует подавлению иммунной реакции материнского организма в отношении полуаллогенного плода, стимулирует экспрессию и секрецию неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-G и HLA-E эндотелиальными клетками и клетками трофобласта [22], что способствует поддержанию состояния иммунологической толерантности в системе мать–плацента–плод.

Предложена двухволновая гипотеза накопления uNK-клеток в матке при беременности. Первая волна происходит в процессе децидуализации эндометрия и обусловлена локальной пролиферацией тканерезидентных uNK-клеток, при этом циркулирующие pbNK-клетки имеют минимальный вклад в растущий пул uNK-клеток на ранних сроках беременности. Во второй волне происходит привлечение pbNK-клеток в матку в ответ на инвазию трофобласта, процессы плацентации [24]. uNK-клетки продуцируют проангиогенные факторы, в том числе фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарный фактор роста (PLGF), которые способствуют развитию и росту плаценты в decidua basalis. Исследования человеческих uNK-клеток показывают, что эти процессы могут быть обусловлены связыванием рецепторов NKp30 и NKp44 на uNK-клетках с лигандами вневорсинчатого трофобласта и материнских стромальных клеток.

Установлено воздействие половых стероидных гормонов, эстрогена и прогестерона, на иммунорегуляторную и ангиогенную функцию uNK-клеток [25]. In vitro под влиянием эстрогенов происходит усиление экспрессии галектина-1 uNK-клетками. Эстрогены увеличивают секрецию CCL2 uNK-клетками, что влияет на пролиферацию кровеносных сосудов эндометрия, в то время как прогестерон индуцирует экспрессию IFNγ. За счет опосредованного прогестероном воздействия на клетки микроокружения эндометрия (Т–лимфоциты, стромальные клетки эндометрия), происходит продукция транскрипционного фактора Hoxa-10, PIBF и цитокинов Th2 типа (IL-18), что в совокупности влияет на снижение цитотоксичности uNK-клеток.

Таким образом, uNK-клетки участвуют в регуляции инвазии бластоцисты и клеток трофобласта в стенку матки, контролируют ремоделирование спиральных артерий матки, поддержание плодово-материнской иммунологической толерантности.

Изменения количественно-качественных показателей NK-клеток обеих популяций ассоциированы с репродуктивно-значимыми заболеваниями, в том числе с повторными неудачами имплантации и привычным невынашиванием беременности.

**1.3.3. NK-клетки при повторных неудачах имплантации**

При повторных неудачах имплантации, активно изучаются NK-клетки обеих субпопуляций, в исследованиях, Marron K. и соавт, 2019г, в образцах эндометрия середины лютеиновой фазы цикла было обнаружено повышение количества uNK-клеток в группе пациентов с ПНИ по сравнению с ПНБ, а также в группах пациенток с бесплодием без проведенных протоколов ЭКО. Также было показано увеличение количества NK-клеток цитотоксического фенотипа CD16+CD56dim и их функциональной активности, снижение количества T-reg [27]. Схожие данные были сообщены Tuckerman E. и соавт. 2010, обнаружившие изменение пропорций CD56brightCD16- (уменьшение) и CD56dimCD16 + (увеличение) uNK-клеток при ПНИ [28].

Предприняты попытки оценки диапазонов нормальных значений количества uNK-клеток и отклонений от них. КоличествоuNK-клеток относят в «окно имплантации» от 1,2% до 4,5% от общего количества стромальных клеток к нормальному, более 4,5% к высокому, менее 1,2%-к низкому, по мнению, Chen X и соавт.,2017г. В большинстве случаев, при ПНИ авторы отмечали значительно более высокий процент uNK-клеток, однако, в исследовании автора показано и снижение процента uNK-клеток в группах пациентов с ПНБ и ПНИ [29**]**.

Результаты проведенных исследований pbNK-клеток при неудачах имплантации также неоднозначны. В ряде работ продемонстрировано значительное повышение количества pbNK-клеток, в других приводятся противоположные данные или не обнаруживается различий показателей.

Так,. Sacks и соавт.,2012г. обнаружили, что пациентки с ПНИ имеют значительное увеличение количества pbNK-клеток по сравнению с фертильными женщинами [30]. Подобные результаты получены в работе Santillan и соавт.,2015г. показавших, что количество и pbNK-клеток, и uNK-клеток повышается при повторных неудачах ЭКО. Уровни pbNK-клеток составили 13,4 % у пациентов с ПНИ и 8,4 % в группе фертильных пациенток [31].

Однако, в работе Ho Y. K. и соавт., 2019г., количество pbNK-клеток у пациентов с ПНИ равное 10,6%, установлено как пограничное для прогнозирования исходов беременности в цикле ЭКО. Количество pbNK-клеток менее 10,6% ассоциировано со снижением показателей наступления имплантации и беременности по сравнению с количеством pbNK-клеток> 10,6%. [32].

Zhang H. и соавт., 2019г. не обнаружили различий в количестве, фенотипе, цитотоксической активности и рецепторном профиле pbNK-клеток при ПНИ [33]. Аналогично, Kolanska K. и соавт., 2019г. провели исследование в группах пациентов с ПНБ, ПНИ и группой фертильных пациенток с оценкой pbNK-клеток без учета фазы менструального цикла. В относительном содержании и субпопуляциях клеток между исследуемыми группами и контролем, а также в исходах беременности (выкидыш/роды) различий не обнаружено [34].

Были проведены метаанализы Seshadri S., Sunkara S. K.,2014 и Von Woon E. et al 2020, подтверждающие повышение количества обеих субпопуляций NK-клеток, однако считают, что необходимы дальнейшие исследования pbNK-клеток uNK-клеток, прежде чем использовать их в качестве критериев диагностики эффективности протоколов ЭКО, исходов беременности и назначения терапии [35,36].

 При оценке количества NK-клеток в периферической крови возникают противоречия. Относительное содержание NK- клеток выше 18% в периферической крови является абсолютно неблагоприятным прогностическим фактором течения беременности, а уровень 12–18% — относительно неблагоприятным, по мнению некоторых авторов, [27, 29, 38]. В тоже время для большинства лабораторий норма содержания NK-клеток в периферической крови, в зависимости от возраста, указана в пределах от 4-7% (нижняя граница) до 20-26% (верхняя граница).

Используют методы проточной цитометрии (материал для исследования — кровь и эндометрий), иммуногистохимии (эндометрий), чтобы определить уровень NK-клеток. Результаты варьировали в зависимости от фазы менструального цикла; критериев включения в исследование (2, 3 и более потери беременности; первичное или вторичное невынашивание или бесплодие и т. д.). Оценку количества NK-клеток осуществляли и в абсолютных, и в относительных значениях от общего числа циркулирующих лимфоцитов.

Оценка количества эндометриальных NK-клеток используется в диагностике хронического эндометрита, хотя их изолированное присутствие недостаточно для постановки диагноза [4].

На сегодняшний день отсутствуют единые стандартизированные протоколы, нормы и правила определения NK-клеток в периферической крови/эндометрии, опровергается целесообразность данных диагностических тестов. Однако, во многих репродуктивных клиниках анализ на содержание и активность NK-клеток успешно используется для расчета рисков неудачных протоколов ЭКО, прерывания беременностей, скрытых аллоиммунных нарушений [18, 33].Вместе с другими маркерами рассматривается как показание для назначения иммунотерапии — внутривенного введения иммуноглобулинов.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

# Материалы исследования

На базе ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» был проведен ретроспективный анализ 96 историй болезней женщин, проходивших лечение бесплодия в программе ЭКО в отделении вспомогательных репродуктивных технологий в 2018-2021 годах.

Критериями включения в исследование являлись следующие факторы:

1. Возраст 18-39 лет
2. Регулярный менструальный цикл
3. Вторая фаза цикла (18-22 день)
4. Повторные неудачи имплантации при проведении ЭКО в анамнезе (2 и более)
5. Согласие пациента на участие в программе исследования

Критериями исключения для данной работы являлись следующие параметры:

1. хронические заболевания
2. наличие эндокринных, сердечно-сосудистых, аутоиммунных заболеваний
3. аллергические реакции (бронхиальная астма)
4. многоплодная беременность
5. аномалии развития половых органов
6. отказ женщины от участия в программе исследования

Под критерии исследования подошли лишь 38 историй болезней женщин.

# Методы исследования

Для каждого пациента была составлена формализированная карта, которая включала в себя следующие данные:

* ФИО;
* Номер истории болезни;
* Возраст;
* Значения ИМТ;
* Суммарная доза гонадотропинов;
* Длительность стимуляции;
* Количество полученных ооцитов;
* Эффективная доза (доза гонадотропинов, требующаяся для получения 1 яйцеклетки);
* Количество полученных эмбрионов хорошего качества;
* Доза, требующаяся для получения 1 эмбриона хорошего качества;
* Исход протокола ЭКО: биохимическая, клиническая беременность, роды.

В ходе анализа историй болезней особое внимание уделялось следующим данным:

* + Клинико-анамнестическое обследование;
	+ Соматический анамнез;
	+ Данные лабораторных и инструментальных исследований (анализ уровня β-ХГЧ сыворотки крови, УЗИ органов малого таза);
	+ Анализ отдаленных результатов протокола ЭКО (клиническая беременность, роды);
	+ Статистическая обработка полученных результатов.
		1. **Морфологическая оценка качества эмбрионов.**

На стадии дробления качество эмбриона оценивалось по степени фрагментации (объему эмбриона, занимаемому безъядерными фрагментами цитоплазмы).

Наиболее общепринятая классификация дробящихся эмбрионов по качеству– AB-C-D, где А – самый лучший, D – самый худший.

 Цифрами указывают количество бластомеров[67].

* Тип A – эмбрион отличного качества без ануклеарных (безъядерных) фрагментов (4А)
* Тип В – эмбрион хорошего качества с содержанием ануклеарных фрагментов до 20% (4В)
* Тип С – эмбрион удовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов от 21% до 50% (4С)
* Тип D – эмбрион неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50% (4D)

На стадии морулы проходит оценка компактизации эмбриона:

(A) Grade 4: эмбрион полностью компактизован. Клеточные мембраны

видны нечетко, но ядра различимы;

(B) Grade 3: компактизовано более 75 % бластомеров. Эмбрион сохраняет

сферичную форму и гладкую поверхность;

(C) Grade 2: частичная компактизация (около 50 % бластомеров),

аномальная морфология эмбриона;

(D) Grade 1: компактизация менее 50 % бластомеров. Различимы

фрагменты и некомпактизовавшиеся бластомеры [69].

* + 1. **Определение цитотоксической активности NK-клеток**

Определение активности NK-клеток периферической крови проводили на проточном цитофлуориметре FacsCanto II (BD, США) по анализу экспрессии NK-клетками маркера активации CD107a.

Для анализа активности NK-клеток периферической крови использовали периферическую кровь, взятую в пробирки с антикоагулянтом (литий-гепарин). Стандартным методом скоростного центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографина (Histopaque®-1077, Sigma, США) выделяли популяцию мононуклеарных клеток. Часть клеток инкубировали в культуральной среде RPMI- 1640 (Sigma, США) с добавлением стандартного реагента для активации лейкоцитов (содержащего смесь форболмириститацетата (ФМА) и иономицина) (BD, США) в течение 3 часов при 37˚С с 5% содержанием СО2, вторую часть клеток инкубировали при тех же условиях, без добавления активатора. После инкубации, клетки отмывали раствором Хэнкса (Биолот, Россия). Далее клетки обрабатывали моноклональными антителами к CD16+56, CD3, CD45, CD107a (BD, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Экспрессию дифференцировочных антигенов определяли на проточном цитофлуориметре FacsCanto II (BD, США). Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

При уровне

Содержание NK-клеток (CD3- CD (16+56) +) в % от общего количества лимфоцитов- >25,3%

Содержание NK-клеток (CD3+ СD (16+56) +) в % от общего количества лимфоцитов- >10,2%

Содержание спонтанно активированных NK-клеток (относительное содержание NK-клеток, экспрессирующих CD 107a)- >2,0%

 Содержание индуцированно активированных NK-клеток (относительное содержание NК-клеток, эксперссирующих CD107а после активации)- >25,0%

измеряемых показателей цитотоксическая активность NK клеток считается повышенной (таблица 2).

Таблица 2- Референсные значения иммунологических показателей, оцениваемых у женщин исследуемых групп (лаборатория иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ АГиР им.Д.О.Отта)

|  |  |
| --- | --- |
| Показатель | Референсные значения |
| Относительное содержание T-регуляторных лимфоцитов (CD3+CD4+CD25+CD127+) в % от общего количества Т-хелперов (CD3+CD4+) | 2,4 – 6,9% |
| Т-лимфоциты (CD3+) | 49,1 – 83,6%0,603 – 2,990 тыс/мкл |
| T-хелперы (CD3+CD4+) | 28,2 – 62,8%0,441 – 2,156 тыс/мкл |
| Цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+) | 10,2 – 40,1%0,125 – 1,312 тыс/мкл |
| В-лимфоциты (CD19+) | 6,5 – 27,0%0,107 – 0,698 тыс/мкл |
| NK-клетки (CD3-CD16+56+) | 4,2 – 25,3%0,095 – 0,640тыс/мкл |
| Иммунорегуляторный индекс (Т-х\ЦТЛ) | 0,6 – 3,3 |
| NKT-клетки (CD3+CD16+56+) в % от общего количества лимфоцитов | 1,3 – 10,2% |
| Спонтанно активированные NK-клетки(относительное содержание NK-клеток, экспрессирующих CD107a) | 0,5 – 2% |
| Индуцированно активированные NK-клетки (относительное содержание NK-клеток, экспрессирующих CD107a после активации) | 5 – 25% |

# Протокол стимуляции овуляции в циклах ЭКО

Дозировка гонадотропинов подбиралась индивидуально в соответствии с ответом яичников на стимуляцию. Стимуляция овуляции проводилась с использованием фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) (Гонал – Ф, Пурегон) или человеческих мочевых гонадотропинов (чМГ) (Менопур, Хумог).

О созревании яйцеклеток судили по росту фолликулов с помощью ультразвукового исследования.

Рекомбинантный ХГЧ (Прегнил, Овитрель) использовался в качестве триггера овуляции, когда хотя бы два фолликула достигали диаметра 18 мм. Пункция фолликулов проводилась трансвагинально через 34-36 часов после введения ХГЧ. Полученные ооциты отмывали от фолликулярной жидкости и оплодотворяли методом инсеминации in vitro.

Перенос эмбрионов в матку осуществлялся через 2-5 дней (среднее время культивирования составило 4 дня), притом количество переносимых

 эмбрионов не превышало двух. В некоторых случаях, также, производилась криоконсервация эмбрионов для последующего возможного использования в криоциклах.

На 14-15 день после переноса эмбрионов проводился контроль уровня β-ХГЧ сыворотки крови. При превышении табличного критического значения β-ХГЧ результат ЭКО оценивался, как биохимическая беременность.

Через 21 день после подсадки эмбрионов проводился ультразвуковой контроль для определения плодного яйца в полости матки. При наличии плодного яйца в полости матки результат оценивался, как клиническая беременность.

# Статистическая обработка

Ввод, накопление, хранение и первичная сортировка данных исследования осуществлялись с использованием персонального компьютера и пакета прикладных программ Excel.

Для статистической обработки данных, полученных во время исследования, был использован пакет прикладных программ для статистического анализа SPSS.

Для оценки межгрупповых различий изучаемых показателей применялся параметрический критерий Стьюдента.

Статистический анализ качественных показателей проводился на основе данных, сгруппированных в таблицы сопряженности, с применением критерия согласия Пирсона (хи-квадрат).

 С целью нахождения линейной связи между двумя величинами использовался коэффициент корреляции Тау Кендалла.

Критический уровень значимости (р) нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимался равным 0,05.

**ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

* 1. **Общая характеристика исследуемых женщин**

В ходе исследования, полученные данные, позволили сформировать следующие две группы сравнения:

* основная группа –женщины, с повышенной цитотоксической активностью NK клеток (n=22)
* группа сравнения – женщины, с пониженной цитотоксической активностью NK клеток (n=16)

Рис 2. Характеристика групп сравнения

Статистически значимых различий между двумя группами по среднему возрасту, ИМТ, длительности бесплодия, количеству попыток ЭКО в анамнезе, проценту первичного бесплодия, уровню ФСГ, ЛГ, АМГ, пролактину, ЧАФ яичников и эндометрий в день переноса ПЭ, не обнаружено (р> 0,05)

 Более подробные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Клинико-анамнестическая характеристика пациенток с повторными неудачами имплантации.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | основная группа (n=22) | группа сравнения (n=16) |  p |
| Возраст, лет | 33,09 (±4,50) | 33,00 (±3,46) | > 0.05 |
| ИМТ | 22,17(±4,74) | 20,81(±2,59) | > 0.05 |
| Длительность бесплодия, лет | 5,79 (±2,89) | 5,60 (±3,25) | > 0.05 |
| Количество попыток ЭКО в анамнезе  | 2,90 (±1,27) | 2,75 (±1,12) | > 0.05 |
| Процент первичного бесплодия, % | 34,6% | 20,5% | > 0.05 |
| ФСГ, МЕ/л | 11,29 (±2,20) | 6,15 (±1,08) | > 0.05 |
| ЛГ, МЕ/л | 4,51(±1,86) | 5,26 (±3,48) | > 0.05 |
| Пролактин | 318,1 (±149,48) | 363 (±143,37) | > 0,05 |
| АМГ, нг/мл | 3,51 (±2,36) | 3,34 (±2,14) | > 0,05 |
| ЧАФ яичников | 13,14(±4,74) | 12,81(±4,44) | > 0,05 |
| Эндометрий в день переноса ПЭ | 11,14(±0,83) | 11,19(±0,83) | > 0,05 |
| Расчет критерия Стьюдента |

При изучении протоколов циклов ЭКО удалось получить следующие данные:

Таблица 4. Сравнительный анализ характеристик циклов ЭКО у пациенток с повторными неудачами имплантации.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | основная группа | группа сравнения |  p |
| Продолжительность стимуляции суперовуляции, дней | 8.64 (±1,29) | 8,94 (±1,18) | > 0,05 |
| Суммарная доза гонадотропинов, МЕ | 1160,23 (±696,79) | 1082,81 (±470,34) | <0,05 |
| Количество полученных фолликулов | 12,00 (±6,97) | 11,69 (±5,38) | > 0,05 |
| Количество полученных зрелых ооцитов | 5,91 (±6,92) | 12,31 (±4,39) | > 0,05 |
| Расчет критерия Стьюдента |

Исходя из данных таблицы 4, статистически значимых различий между количеством полученных в циклах ЭКО фолликулов и количеством зрелых ооцитов между двумя группами не выявлено. Однако, суммарная доза гонадотропинов в группе пациенток, с повышенной цитотоксической активностью NK клеток, составляет 1160,23 (±696,79) МЕ в то время, как в группе сравнения –1082,81 (±470,34) МЕ. Это различие является статистически значимым (р <0,05). Также прослеживается тенденция в увеличение длительности протокола стимуляции суперовуляции в основной группе пациенток, что говорит о возможном понижении чувствительности яичников к гонадотропинам в этой группе.

Для оценки выраженности ответа яичников на стимуляцию препаратами гонадотропинов используется отношение суммарной дозы гонадотропинов к количеству полученных зрелых ооцитов.

Это отношение является значением эффективной дозы гонадотропинов, которое условно отражает то количество гонадотропинов, которое необходимо потратить для созревания одного ооцита. Следовательно, чем выше эффективная доза, тем ниже ответ яичников на стимуляцию.

Эффективная доза гонадотропинов в основной группе 1,6 раз выше, чем в группе сравнения (162,47±100,69 МЕ и 96,08,5±107,13 МЕ соответственно, р <0,05 (рис 3.)

Таким образом, ответ на стимуляцию суперовуляции в группе пациенток, с повышенной цитотоксической активностью NK клеток, оказался выше, чем в группе сравнения.

Рис 3. Сравнительная оценка эффективной дозы гонадотропинов в цикле ЭКО у пациенток с повторными неудачами имплантации

 **3.2 Оценка эмбриологического этапа.**

При оценке эмбриологического этапа не было выявлено достоверных различий в обеих группах между показателями количества и качества эмбрионов, а также количеством криоконсервированных эмбрионов (таблица 5).

Таблица 5. Сравнительная оценка качества эмбрионов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | основная группа | группа сравнения | p |
| Количество эмбрионов хорошего качества (класс A,B) | 1,77 (±1,22) | 1,56 (±0,85) | > 0,05 |
| Общее количество эмбрионов | 0,82 (±0,39) | 0,94 (±0,25) | > 0,05 |
| Количество криоконсервированных эмбрионов | 0,73(±0,45) | 0,69 (±0,48) | > 0,05 |
| Расчет критерия Стьюдента |

С целью выявления связи между факторами результативности протоколов ЭКО и повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации был проведён корреляционный анализ (таблица 6).

Таблица 6. Сопоставление факторов результативности протоколов ЭКО с повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | t | Критическое значение t |  p |
| Количество зрелых ооцитов | 0,13 | 0,14 | >0,05 |
| Количество эмбрионов хорошего качества | 0.20 | 0,12 | > 0,05 |
| Количество криоконсервированных эмбрионов | 0,15 | 0,15 |  >0,05 |
| Расчет коэффициента корреляции Тау Кендалла |

Полученные данные свидетельствуют о том, что нет статистически значимой связи между количеством зрелых ооцитов и количеством эмбрионов хорошего качества, и повышенной цитотоксической активностью NK клеток.

**3.3 Анализ результативности протоколов ЭКО.**

Успешность протокола ЭКО оценивалась на основании следующих показателей:

* анализа *β*-ХГЧ в сыворотке крови на 14 день после переноса эмбрионов и его сопоставление с табличным критическим значением (биохимическая беременность)
* наличия плодного яйца в полости матки с помощью метода УЗИ через 7-10 дней после анализа на *β*-ХГЧ (клиническая беременность).

В обеих группах исследования число биохимических беременностей оказалось равным числу беременностей, подтверждённых по УЗИ.

Таблица 7. Частота наступления беременности (биохимической и клинической) в результате программы ЭКО и степень цитотоксической активности NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | основная группа | группа сравнения | χ2 |  p |
| Наступление беременности | 5 | 7 | 1,895 | > 0.05 |
| Беременность не наступила | 17 | 9 |
| Расчет критерия Пирсона (хи-квадрат) |

Рис. 4 Сравнительная оценка групп по частоте наступления беременности

По данным таблицы 7, статистически значимых различий в частоте наступления беременности в ходе циклов ЭКО между группами сравнения нет.

Однако прослеживается тенденция в сторону повышения шанса наступления беременности в группе пациенток, с повышенной цитотоксической активностью NK клеток.

Для оценки шанса наступления беременности и повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации

был проведен расчёт отношения шансов (OR) и были получены следующие результаты (таблица 8):

Таблица 8. Влияние цитотоксической активности NK клеток на возможность наступления беременности в программе ЭКО у пациенток с повторными неудачами имплантации

|  |  |
| --- | --- |
|  |  p |
| Шанс наступления беременности в основной группе | 1,925 | >0,05 |
| Шанс наступления беременности в группе сравнения | 0.728 | > 0,05 |
| Отношение шансов (OR) | 2,644 | > 0,05 |

Анализируя данные приведенного расчета, можно сделать вывод о том, что вероятность наступления беременности в группе пациенток с повышенной цитотоксической активностью NK клеток в цикле ЭКО в 2,6 раз ниже, чем в группе сравнения (OR= 2,644 р> 0,05).

Также для оценки шанса получения эмбрионов хорошего качества и повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации был проведен расчёт отношения шансов (OR) и были получены следующие результаты (таблица 9):

Таблица 9. Влияние цитотоксической активности NK клеток на возможность получения эмбрионов хорошего качества в программе ЭКО у пациенток с повторными неудачами имплантации

|  |  |
| --- | --- |
|  |  p |
| Шанс получения эмбрионов хорошего качества в основной группе | 4,875 | <0,05 |
| Шанс получения эмбрионов хорошего качества в группе сравнения | 0.225 | <0,05 |
| Отношение шансов (OR) | 21,667 | <0,05 |

Анализируя данные приведенного расчета, можно сделать вывод о том, что вероятность получения эмбрионов хорошего качества в группе пациенток с повышенной цитотоксической активностью NK клеток в цикле ЭКО в 21,67 раз ниже, чем в группе сравнения (ОR= 21,667, р <0,05).

 Результаты, полученные в ходе исследования, отражают тенденцию в популяции, для повышения точности и надежности результатов требуется увеличить численность выборки.

С целью нахождения связи между факторами результативности протоколов ЭКО и повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации был проведён корреляционный анализ (таблица 10).

Таблица 10. Сопоставление факторов результативности протоколов ЭКО с повышенной цитотоксической активностью NK клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | основная группа | группа сравнения | χ2 |  p |
| Качество эмбрионов хорошего качества  | да | 18 | 15 | 1,154 | > 0.05 |
| нет | 4 | 1 |
|  |
| Расчет критерия Пирсона (хи-квадрат) |

Полученные данные свидетельствуют о том, что не прослеживается статистически значимая связь между количеством эмбрионов хорошего качества, и повышенной цитотоксической активностью NK клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Несмотря на интенсивные исследования, роль NK-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются открытыми. Хотя уже сейчас можно считать, что NK-клетки являются иммунологическим маркером неблагополучия в процессе наступления и развития беременности.

Но необходимо знать о том, что NK — это комплексный показатель, который зависит от многих факторов (пола, возраста, фазы менструального цикла, наличия беременности, стресса, физической активности, наличия вирусных инфекций и т. д.).

Также функциональная активность NK-клеток может быть критерием для назначения иммуномодулирующей терапии, в частности ВВИГ и быть маркером контроля ее эффективности.

Были проанализированы две группы пациенток, сопоставимых по клинико-анамнестическим данным (среднему возрасту, ИМТ, длительности бесплодия, количеству попыток ЭКО в анамнезе, проценту первичного бесплодия, уровню ФСГ, ЛГ, АМГ, пролактину, ЧАФ яичников и эндометрий в день переноса ПЭ). При этом в основной группе были пациентки с повторными неудачами имплантации с повышенной цитотоксической активностью NK клеток, тогда как в группе сравнения были пациентки с повторными неудачами имплантации с пониженной цитотоксической активностью NK клеток.

Были определены статистически значимые различия (p <0.05) в средней суммарной и эффективной дозах назначаемых гонадотропинов, при этом пациенткам из основной группы назначалась в 1,6 раз большая эффективная доза, чем пациенткам из группы сравнения. Таким образом, было определено, что в группе пациенток, с повышенной цитотоксической активностью NK клеток, овариальный ответ на стимуляцию препаратами гонадотропинов ниже в сравнении с таковым у пациенток, с пониженной цитотоксической активностью NK клеток.

Статистически значимых различий между двумя группами сравнения не удалось обнаружить в количестве полученных зрелых ооцитов. Однако удалось выяснить, что шанс получения эмбрионов хорошего качества в группе пациенток с повышенной цитотоксической активностью NK клеток в цикле ЭКО в 21,67 раз ниже, чем в группе сравнения (p <0.05).

**Выводы:**

1. Повышенная цитотоксическая активность NK-клеток понижает чувствительность яичников у пациенток с повторными неудачами имплантации на стимуляцию суперовуляции препаратами гонадотропинов, что иллюстрируется более высокой по сравнению с группой сравнения суммарной (1160,23±696,79МЕ и 1082,81±470,79МЕ соответственно, p <0,05) и эффективной дозой гонадотропинов (162,47±100,69МЕ и 96,08±107,13МЕ соответственно, p <0,05).

2. Повышенная цитотоксическая активность NK-клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации в цикле ЭКО снижает количество эмбрионов хорошего качества в 21,67 раз. (OR = 21,667; p <0,05).

3. Повышенная цитотоксическая активность NK-клеток у пациенток с повторными неудачами имплантации в цикле ЭКО понижает вероятность наступления беременности в 2,6 раз (OR =2,645; p >0,05).

**Литература:**

1. Абакушина, Е. В., Кузьмина, Е. Г., Коваленко, Е. И. (2012). Основные свойства и функции NK-клеток человека. Иммунология. 2012;33 (4): 220-224. /Abakushina E.V., Kuzmina E.G. and Kovalenko E.I. (2012). The main characteristics of human natural killer cells. Immunology. 2012; 33 (4): 220-224.
2. Актуальные вопросы диагностики хронического эндометрита / Г.О. Кливленд, И.В. Ключаров, Р.А. Дзамуков [и др.] // Практическая медицина. – 2016.- № 4-2 (96). – С. 41-46.
3. Антитела к гормонам репродуктивной системы как возможный фактор риска неблагоприятного исхода в циклах экстракорпорального оплодотворения / И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко, Т.Т. Сароян [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2012. - №2. – С. 41–45.
4. Антифосфолипидные антитела, их патогенетическое и диагностическое значение при акушерской патологии / В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева, Н.А. Макацария [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2014. - №2. - С. 39- 60.
5. Ассоциация антител к гонадотропинрелизинг-гормону с нарушением репродуктивной функции человека / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, П.А. Кирющенков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155, №6. - С. 675–678.
6. Беспалова, О.Н. Генетические факторы риска невынашивания беременности: автореф. дис. … д-ра мед. наук / О.Н. Беспалова. – СПб., 2009. – 41 с.
7. Боярский, К.Ю. Возможно ли использование методик, применяемых при диагностике и лечении привычного невынашивания беременности, к случаям повторных неудач ЭКО? / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков // Репродуктивные технологии сегодня и завтра: материалы XXI Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека. – М., 2011. – С. 137.
8. Иммунохимические свойства аутоантител к хорионическому гонадотропину у женщин с невынашиванием беременности / И.В. Менжинская, М.М. Кашенцева, Л.В. Ванько [и др.] // Иммунология. - 2015. - №1. - С.30-34
9. Клинико-лабораторные характеристики антифосфолипидного синдрома у женщин с отягощенным акушерским анамнезом / Ф.Т. Халимова, А.В. Гулин, Е.В. Малышева [и др.] // Вестник ТГУ. – 2012. – Т. 17, №4. - С. 1285.
10. Кривонос, М.И. Антифосфолипидный синдром и ранние репродуктивные потери / М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, С.А. Сельков // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2016. - № 4. - С. 114-122.
11. Митюрина Е.В., Перминова С.Г, Амян Т.С. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения Акушерство и гинекология.-2016.-№11.-С.34-40
12. Михайлова, В. А., Овчинникова, О. М., Онохина, Я. С., Чугунова, А. А., Зайнулина, М. С., Сельков, С. А., & Соколов, Д. И. Функциональная активность NK-клеток периферической крови при гестозе. Иммунология. 2014; 35 (1): 4-8. / V.A. Mikhaylova, O.M. Ovchinnikova, Y.S. Onohina, A.A.Chugunova, M.S. Zainulina, S.A. Selkov, D.I. Sokolov. Functional activity of peripheral b ood NK-cells at preeclampsia. . Immunology. 2014; 35 (1): 4-8.
13. Охтырская, Т.А. Имплантационные потери в программах ЭКО: роль наследственной и приобретенной тромбофилии / Т.А. Охтырская, К.А. Яворовская, Т.А. Назаренко // Проблемы репродукции. – 2010. - №2. – С.53-57.
14. Приказ Минздрава России от 20.12.2012 N 1273н "Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при привычном невынашивании беременности" (Зарегистрировано в Минюсте России 19.02.2013 N 27206). URL: http://www.consultant.ru/document/cons\_doc\_LAW\_143885/ (Дата обращения 26.06.2019)
15. Приказ Минздрава России от 30.10.2012 N 556н (ред. от 01.02.2018) "Об утверждении стандарта медицинской помощи при бесплодии с использованием вспомогательных репродуктивных технологий" (Зарегистрировано в Минюсте России 21.03.2013 N 27823).URL: http://www.consultant.ru/document/cons\_doc\_LAW\_145731/ (Дата обращения 26.06.2019)
16. Сидельникова, В.М. Невынашивание беременности: руководство для практикующих врачей / В.М.Сидельникова, Г.Т.Сухих. - М.: МИА-Пресс, 2018. – 536 с.
17. Тетруашвили, Н.К. Ранние потери беременности (иммунологические аспекты, пути профилактики и терапии): автореф. дис. … д-ра мед. наук / Н.К. Тетруашвили. – М., 2008. – 48 с.
18. Тромбофилии в акушерской практике / М.С. Зайнулина, Е.А. Корнюшина, А.С. Глотов [и др.]; ред. Э.К. Айламазян, В.С. Баранов. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009.– 56 с.
19. Этиологические аспекты репродуктивных потерь / И.И. Иванов, М.В. Черипко, А.А. Могилевская [и др.] // Таврический медико-биологический вестник.– 2013. – Т.16, №2, ч. 2 (62). - С.181-186.
20. Aletebi F. Hysteroscopy in women with implantation failures after in vitro fertilization: Findings and effect on subsequent pregnancy rates. Middle East Fertility Society Journal.2010;15:288–91.
21. Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, et al. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. Immunologic Research. 2015;62(3):341-356. doi:10.1007/s12026-015-8664-y.
22. An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the pe- ripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome / M.Y. Thum, S. Bhaskaran, H.I. Abdalla [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, N 10. – P. 2395-2400.
23. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and manage- ment of patients / A. Tincani, L. Andreoli, C. Casu [et al.] // Lupus. – 2010. – Vol. 19, № 4. – P. 432-435.
24. Apps R, Sharkey A, Gardner L, et al. Ex vivo functional responses to HLA-G differ between blood and decidual NK cells. Molecular Human Reproduction. 2011;17(9):577-586. doi:10.1093/molehr/gar022.
25. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. URL: http://atlasgeneticsoncology.org/ (дата обращения 19.11.2019).
26. Branch, D.W. The truth about inherited thrombophilias and pregnancy / D.W. Branch // Obstetrics and Gynecology. – 2010. – Vol. 115, N 1. – P.2–4.
27. Carp, H. Recurrent Pregnancy Loss / H. Carp. - 2nd ed. - Tel Aviv: CRS Press, 2015. – 456 р.
28. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, et al. Conversion of Peripheral Blood NK Cells to a Decidual NK-like Phenotype by a Cocktail of Defined Factors. The Journal of Immunology. 2013;190(8):3939-3948. doi:10.4049/jimmunol.1202582.
29. Chen X, Mariee N, Jiang L, et al. Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishment of a reference range. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2017;217(6). doi:10.1016/j.ajog.2017.09.010.
30. Current trends of reproductive immunology practices in vitro fertilization (IVF) – a first world survey using IVF-Worldwide.com / J. Kwak-Kim, A.R. Han, A. Gilman- Sachs [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2013. – Vol. 69, N 1. – P. 12–20.
31. Das M., Holzer H.E. Reccurent implantation failure: gamete and embryo factors. Fertil. Steril. 2012; 97:1021-27
32. Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migra- tion: a role for INF-gamma / Y. Hu, J.P. Dutz, C.D. MacCalman [et al.] // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177, N 12. - Р. 8522-8530.
33. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure / G. Sacks, Y. Yang, E. Gowen [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2012. – Vol. 67, N5. – P. 434-442.
34. Di Nisio, M. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis / M. Di Nisio, A.W.S. Rutjes, N. Ferrante [et al.]// Blood. – 2011. – Vol. 118, №10. – P. 2670–2671.
35. ESHRE Early Pregnancy Guideline Development Group. Recurrent pregnancy loss/ Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 2017 р.15- 19.
36. Fu B, Wei H. Decidual natural killer cells and the immune microenvironment at the maternal-fetal interface. Science China Life Sciences. 2016;59(12):1224-1231. doi:10.1007/s11427-016-0337-1.
37. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. Current Opinion in Immunology. 2016;39:82-89. doi:10.1016/j.coi.2016.01.007.
38. Gong H, Chen Y, Xu J, et al. The regulation of ovary and conceptus on the uterine natural killer cells during early pregnancy. Reproductive Biology and Endocrinology. 2017;15(1). doi:10.1186/s12958-017-0290-1.
39. Heilmann L.,Schorsch M.,Hahn T.CD3‑CD56+CD16+natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. Am. J. Reprod. Immu‑ nol. 2010; 63 (3): 263–5.
40. Ho Y-K, Chen H-H, Huang C-C, et al. Peripheral CD56 CD16 NK Cell Populations in the Early Follicular Phase Are Associated With Successful Clinical Outcomes of Intravenous Immunoglobulin Treatment in Women With Repeated Implantation Failure. Frontiers in Endocrinology. 2020;10. doi:10.3389/fendo.2019.00937.
41. Huang C.C., Wang C.J., Soong Y.K., Wang H.s., Wang M.L., Lin C.Y. et al. Chang C.L. Site – specific endometrial injury improves implantation and pregnancy in patients with repeated implantation failure. Reprod Biol Endocrinol.2011;9:140.
42. Hudspeth K, Donadon M, Cimino M, et al. Human liver-resident CD56bright/CD16neg NK cells are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways. Journal of Autoimmunity. 2016;66:40-50. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.011.
43. Jabrane-Ferrat N. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. Frontiers in Immunology. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01397.
44. Kolanska K, Suner L, Cohen J, et al. Proportion of Cytotoxic Peripheral Blood Natural Killer Cells and T-Cell Large Granular Lymphocytes in Recurrent Miscarriage and Repeated Implantation Failure: Case–Control Study and Meta-analysis. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2019;67(4):225-236. doi:10.1007/s00005-019-00546-5.
45. Lam VC, Lanier LL. NK cells in host responses to viral infections. Current Opinion in Immunology. 2017;44:43-51. doi:10.1016/j.coi.2016.11.003.
46. Lee S, Kim J, Jang B, et al. Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women. The Journal of Immunology. 2010; 185(1):756-762. doi:10.4049/jimmunol.0904192.
47. Liu L., Zhou F., Lin X., Li T., Tong X., Zhu H. et al. Reccurent IVF failure with elevated progesterone on the day of hCG administration. Europ. Journal of Obstet. Gynecol. and Reprod. Biology.2013;171:78-83
48. Lockwood CJ, Huang SJ, Chen C-P, et al. Decidual Cell Regulation of Natural Killer Cell–Recruiting Chemokines. The American Journal of Pathology. 2013;183(3):841-856. doi:10.1016/j.ajpath.2013.05.029.
49. Marcenaro E, Carlomagno S, Pesce S, et al. NK cells and their receptors during viral infections. Immunotherapy. 2011;3(9):1075-1086. doi:10.2217/imt.11.99.
50. Marron K, Walsh D, Harrity C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2018;36(2):199-210. doi:10.1007/s10815-018-1300-8.
51. Mekinian A. Unexplained Recurrent Miscarriage And Recurrent Implantation Failure: Is There A Place For Immunomodulation? 2016. doi:10.26226/morressier.56e174d5d462b8028d88a933.
52. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56dim and CD- 56bright NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. Medical Immunology (Russia). 2017; 19(1):19-26.doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26.
53. Polanski L.T., Baumgarten M.N., Quenby S., Brosens J., Campbell B.K., Raine-Fenning N.J. What exactly do we mean by “recurrent implantation failure”? A systematic review and opinion. Reprod. BioMedicine Online. 2014; 28:409-23.
54. Roque M., Lattes K., Serra S., Solà I., Geber S., Carreras R. et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2013;99(1):156-62.
55. Sacks G., Yang Y., Gowen E., Smith S., Fay L., Chapman M. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. Am. J. Reprod. Immunol. 2012;67:434–42.
56. Sacks G, Yang Y, Smith S, Chapman M. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. Journal of Reproductive Immunology. 2012;94(1):24. doi:10.1016/j.jri.2012.03.280.
57. Santillán I, Lozano I, Illán J, et al. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? Journal of Reproductive Immunology. 2015;108:142-148. doi:10.1016/j.jri.2014.12.009.
58. Sauer, R. Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure / R. Sauer, R. Roussev, S. Ra- jasingam [et al.] // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 93, № 7. – P. 2441–2443.
59. Seillet C, Belz GT, Huntington ND. Development, Homeostasis, and Heterogeneity of NK Cells and ILC1. Natural Killer Cells Current Topics in Microbiology and Immunology. 2015:37-61. doi:10.1007/82\_2015\_474.
60. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction Update. 2014;20(3):429-438. doi:10.1093/humupd/dmt056.
61. Shapiro B.S., Daneshmand S.T., Garner F.C., Aguirre M., Hudson C. Freeze – all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. Reprod. BioMedicine Online.2014; 29 (3): 286 – 90.
62. Sojka DK, Yang L, Plougastel-Douglas B, Higuchi DA, Croy BA, Yokoyama WM. Cutting Edge: Local Proliferation of Uterine Tissue-Resident NK Cells during Decidualization in Mice. The Journal of Immunology. 2018;201(9):2551-2556. doi:10.4049/jimmunol.1800651.
63. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine natural killer cells: To protect and to nurture. Birth Defects Research. 2018;110(20):1531-1538. doi:10.1002/bdr2.1419.
64. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syn- drome: role in pregnancy losses and thrombosis / J.H. Rand, X.X. Wu, A.S. Quinn [et al.]// Lupus. – 2010. – Vol. 19, № 4. P. 460-469.
65. Tremellen K., Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. J Reprod Immunol. 2012;93(1):58-63.
66. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. Journal of Reproductive Immunology. 2010;87(1-2):60-66. doi:10.1016/j.jri.2010.07.001.
67. Tuckerman E. et al. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF.J. Reprod. Immunol. 2010; 87 (1–2): 60–6.
68. Wallace, A.E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodel- ling partnership / A.E. Wallace, R. Fraser, J.E. Cartwright // Hum. Reprod. Update. – 2012. – Vol. 18, N 4. – P. 458–471.
69. Winger E.E. Elevated preconception CD56+ 16+ and/or Th1: Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile wom‑ en undergoing IVF. Am. J. Reprod. Immunol. 2011; 66 (5): 394–03.
70. Yang X., Huang R., Wang Y., Liang X. Pituitary suppression before frozen embryo transfer is beneficial for patients suffering from idiopathic Repeated Implantation Failure. J Huazhong Univ Sci Technol.2016;36(1):127-31.
71. Zhang H, Huang C, Chen X, et al. The number and cytotoxicity and the expression of cytotoxicity-related molecules in peripheral natural killer (NK) cells do not predict the repeated implantation failure (RIF) for the in vitro fertilization patients. Genes & Diseases. 2020;7(2):283-289. doi:10.1016/j.gendis.2019.03.005.