Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

На правах рукописи

Жуцзыгули Абудувайли

РОЛЬ ПРОТЕИНА ALK5 В ПРОФИЛЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Научная специальность 3.1.4
Акушерство и гинекология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Рухляда Н.Н

Санкт-Петербург
2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ……...……4
ВВЕДЕНИЕ..... 5
ГЛАВА I. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... 13
1.1. Современный взгляд на проблему ранних репродуктивных потерь 13
1.2. Проблема ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий в фокусе современных научных исследований 20
1.3. Факторы риска ранних репродуктивных потерь у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий 25
1.4. Роль ALK5 в репродуктивной оси 40
Резюме по обзору литературы 54
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 56
2.1. Организация исследования 56
2.2. Общая клиническая характеристика женщин, которые были включены в исследование 57
2.3. Методы исследования 59
ГЛАВА III. АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, СВЯЗАННЫХ С РАННИМИ РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ..... 63
3.1. Этиологические факторы риска ранних репродуктивных потерь у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий на основе клинико-статистического анализа..... 63
3.2. Иммуногистохимическое исследование децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях на выявление

экспрессии протеина ALK5 87
3.3. Прогностическое и клиническое значение экспрессии протеина ALK5 в профиле ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий 102
Резюме по главе III 104
ГЛАВА IV. АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 106
ВЫВОДЫ 124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 127

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ACVR2B – Activin A receptor type 2B

ACVRL1 – Activin A receptor like type 1

AMHR2 – Anti-Mullerian hormone receptor type 2

BMPR1A – трансформирующий фактор роста альфа рецептор 1

BMPR2 – рецептор с серин/треонинкиназной активностью

DKK – белок, кодируемый одноименным геном, расположенным у людей на коротком плече 10-й хромосомы. По функции относится к белкам развития. Задействован в таком биологическом процессе, как сигнальный путь Wnt.

ESC – Эмбриональные стволовые клетки

IVF – Экстракорпоральное оплодотворение

PGR – прогестерон

PRL – пролактин

SMAD – семейство структурно похожих белков, которые являются основными преобразователями сигналов для рецепторов суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF-B)

TGFBR1, ALK5 – Бета-рецептор I трансформирующего фактора роста (киназа, подобная рецептору активина А типа II)

TGFBR2 – трансформирующий фактор роста бета рецептор 2

TGFβ – трансформирующие факторы роста β

uNK – клетки естественные киллеры матки

WNT – ген, регулирующий эмбриональное развитие

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ИМТ – индекс массы тела

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХГЧ – Хорионический гонадотропин человека

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Современное состояние репродуктивного здоровья населения определяется комплексом социальных, экономических и медицинских аспектов и характеризуется ростом частоты бесплодия в браке от 10-15 % до 18-20 % в разных странах мира [23]. По данным отечественных авторов каждая пятая семейная пара в России не может иметь детей [48]. Для супружеских пар, которые столкнулись с проблемой бесплодия, часто единственной возможностью стать родителями является применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) - методов терапии бесплодия, которые рассматриваются как одни из наиболее перспективных методов, активное внедрение которых в клиническую практику делает актуальным повышение их эффективности и безопасности для здоровья матери и будущего ребенка [49].

В то же время, результаты многочисленных исследований указывают на отягощенное течение беременности после применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также высокий уровень ранних репродуктивных потерь, что предопределяет проблему обеспечения их минимизации [45]. По данным литературы, беременность после оплодотворения in vitro, сравнивая с физиологическим гестационным процессом сопровождается высоким риском невынашивания (26-66 %) [57].

Патогенез развития ранних репродуктивных потерь на сегодня является дискутабельной и нерешенной проблемой, которую считают следствием эндотелиопатий, иммунологических, гемостазиологических или гормональных нарушений, где факторами риска являются воспалительные заболевания органов малого таза, дисменорея, внутриматочные вмешательства, предыдущие потери беременности, анатомические аномалии матки и приобретенные дефекты (миомы, спайки, полипы), которые в комплексе увеличивают риск развития ранних репродуктивных потерь в 2,0 и более раз [39].

Слизистая оболочка матки, называемая эндометрием, должна претерпеть значительные изменения, чтобы стать восприимчивой к имплантации бластоцисты. Эндометрий состоит из железистого и просветного эпителия и стромы, и когда эндометрий является восприимчивым, эмбрионы могут прикрепляться к эпителию эндометрия и вторгаться в стромальный компартмент.

Стромальные клетки отвечают на вторжение эмбриона волной пролиферации с последующей дифференцировкой; это морфологическое и функциональное преобразование называется децидуализацией [71]. Эти шаги являются фундаментальными для процесса имплантации и зависят от действия яичникового прогестерона, передающего сигналы через его родственный рецептор. Децидуальной оболочке приписывают несколько функций: обеспечивает растущий эмбрион факторами роста и цитокинами; регулирует местный иммунный ответ на границе плода и матери; поддерживает гомеостаз тканей при инвазии трофобластов; защищает бластоцисты от воспаления и активных форм кислорода; поддерживает ангиогенные процессы, необходимые для создания новых сосудов для перфузии и питания эмбриона.

Для имплантации необходимо синхронизировать развитие эмбриона и циклы матки. Эта синхронность требует сложных межклеточных перекрестных процессов, и несмотря на то, что была раскрыта роль участия в имплантации многих факторов, до сих пор неясно, как эти факторы действуют и взаимодействуют. Одна группа сигнальных белков, которая экспрессируется в матке на ранних сроках беременности, представляет собой суперсемейство трансформирующих факторов роста β (TGFβ).

Выявление сигнальных процессов, регулируемых TGFβ во время имплантации эмбриона, важно для понимания здоровья эндометрия. Взаимодействие лиганд-рецептор вызывает каскад передачи сигнала, при котором рецепторы типа II (т. е. TGFBR2, ACVR2, ACVR2B, BMPR2 и AMHR2) активируют функционально связанные рецепторы типа I (т. Е.

ACVRL1 / ALK1, ACVR1 / ALK2, BMPR1A / ALK3, ACVR1B / ALK4, TGFBR1 / ALK5, BMPR1B / ALK6 и ACVR1C / ALK7) посредством фосфорилирования. Активированные рецепторные комплексы TGFβ взаимодействуют с регулируемыми внутриклеточными рецепторами SMAD (R-SMAD), которые затем связываются с SMAD4, чтобы получить доступ к ядерному транскрипционному аппарату и модулировать транскрипцию генов.

Условное устранение рецептора 1 TGFβ (TGFBR1, известного как ALK5) приводит к заметным дефектам в женских половых путях. При отсутствии TGFBR1 обнаруживаются дефекты в событиях, связанных с беременностью, включая имплантацию, развитие клеток трофобласта, рекрутирование uNK и васкуляризацию матки [79]. Дальнейшие исследования выявили участие SMAD-зависимых и SMAD-независимых путей в ингибировании TGFβ1 экспрессии PRL и IGFBP-1 соответственно [83]. Более того, TGFβ1 ингибирует экспрессию PGR и антагониста WNT Dickkopf-1 (DKK) в дифференцированных ESC посредством соответствующих SMAD-зависимых и SMAD-независимых механизмов [79]. В отличие от ингибирующей роли TGFβ1 в децидуализации, другие исследователи продемонстрировали, что секреция TGFβ1 увеличивается во время децидуализации in vitro человеческих ESC, и что рекомбинантный TGFβ1 способствует процессу децидуализации [102].

Причина противоречивых эффектов TGFβ1 на децидуализацию ESC не известна, но может быть связана с различиями в экспериментальных условиях, используемых в разных исследованиях. Таким образом, необходимо дальнейшее понимание клеточных, молекулярных и эпигенетических механизмов, связанных с передачей сигналов суперсемейства TGFβ, лежащих в основе децидуализации. В частности, расшифровка взаимосвязи между сигнальными цепями TGFβ и их потенциальных взаимодействий с эпигенетическими модификациями / некодирующими РНК может оказаться полезной при разработке новых терапевтических стратегий для лечения заболеваний матки, связанных с недостаточностью децидуализации.

Стоит отметить, что уточнение механизмов развития ранних репродуктивных потерь позволит выбрать патогенетически обоснованный подход к реабилитационным мероприятиям в случае неблагоприятных последствий беременности. Учитывая вышесказанное, актуальность проведения настоящего исследования и его клиническая значимость обусловлена отсутствием научно-обоснованных подходов к выявлению преддикторов ранних репродуктивных потерь у женщин с индуцированной беременностью.

Цель исследования: Изучить факторы и определить роль ALK5 в профиле ранних репродуктивных потерь при применении ВРТ.

Задачи исследования:

1. Провести ретроспективный клинико-статистический анализ данных у женщин с бесплодием и репродуктивными потерями после ЭКО.

2. Выявить ведущие этиолого-патогенетические факторы ранних репродуктивных потерь у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий, имеющие прогностическое значение осложненного течения 1 триместра гестации.

3. Провести иммуногистохимическое исследование децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях, выявить закономерные уровни экспрессии протеина ALK5.

4. Уточнить прогностическое и клиническое значение экспрессии протеина ALK5 в развитии ранних репродуктивных потерь в циклах ЭКО.

Объект исследования: беременность у женщин, включенных в программу оплодотворения in vitro.

Предмет исследования: этиологические факторы риска ранних репродуктивных потерь у женщин и уровень экспрессии протеина ALK5 в абортивной ткани после вспомогательных репродуктивных технологий.

Научная новизна.

Полученные результаты научного поиска позволили дополнить патогенетическую концепцию развития дезадаптационных процессов в

фетоплацентарной системе женщин с индуцированной беременностью, которая осложнилась репродуктивной потерей на ранних сроках гестации, и предложить этиопатогенетический профиль ранних репродуктивных потерь при применении вспомогательных репродуктивных технологий с учетом системных предпосылок (воспалительный фактор, активация провоспалительных цитокинов и эндотелиопатия).

Впервые установлено, что потеря беременности в первом триместре ассоциируется с нарушением процессов межклеточного взаимодействия, продукции гормонов и специфических белков беременности, которые являются индикаторами становления и функционирования плацентарного комплекса, эндотелиальной дисфункции и несостоятельности регуляции провоспалительных механизмов, в том числе и низкий уровень экспрессии ALK5 в децидуальной ткани.

По результатам проведенного исследования впервые определены наиболее весомые комбинации основных факторов риска ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий, а именно: сочетание возрастного фактора, гинекологических заболеваний, трубно-перитонеального бесплодия, применение определенной программы оплодотворения in vitro позволило прогнозировать вероятные ранние репродуктивные потери у женщин с индуцированной беременностью. Установлено, что уровень экспрессии ALK5 в децидуальной ткани является предиктором эмбриональных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий.

Впервые установлен фактор вероятного повышения пролиферативной активности Th1-лимфоцитов по причине критически низкого уровня положительной экспрессии TGFBR1, нарушающего формирование сосудистого русла, повреждающего плацентарную ткань и переориентирующего иммунный ответ с Th2-типа на Th1 активации цитотоксического звена, что проявляется в иммунологической агрессии

материнского организма по отношению к плоду как возможных маркеров прогнозирования негативных перинатальных последствий.

Теоретическая и практическая значимость.

Обоснована целесообразность установления факторов риска ранних репродуктивных потерь у женщин с индуцированной беременностью, что позволило формировать группы риска осложненного течения раннего гестационного периода. Предложенный алгоритм прогнозирования нарушений в случае развития ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий позволило своевременно выделить критерии мониторинга и пролонгирования беременности. Предложены предикторы прогнозирования нежелательных перинатальных последствий (повышения пролиферативной активности Th1-лимфоцитов по причине критически низкого уровня положительной экспрессии TGFBR1).

На основе оценки уровня экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани, которые являются индикаторами скрытого гестационного неблагополучия (повышения пролиферативной активности Th1-лимфоцитов) в сочетании с клинико-анамнестической характеристикой, определенные ранние прогностические критерии патологического течения беременности, обоснованы критерии формирования групп риска ранних репродуктивных потерь у женщин с бесплодием, пролеченным с помощью программы оплодотворения in vitro, что позволит в дальнейшем снизить частоту осложнений беременности и перинатальных потерь у этой категории пациенток.

Личный вклад соискателя.

Совместно с научным руководителем избрана тема, определены цель и задачи, разработана тактика клинического обследования и формирования исследуемых групп, самостоятельно проведен анализ научной литературы по теме диссертации, проведено комплексное клинико-лабораторное обследование женщин, проанализированы результаты общеклинических,

иммунологических исследований, проведена статистическая обработка и обобщение результатов.

Апробация и внедрение результатов исследования в практику.

результаты исследования доложены и обсуждены на V Национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети - будущее страны» ФГБОУ ВО СПбГПМУ МЗ РФ (Санкт-Петербург, 2021).

внедрение результатов в практику осуществлялось в ходе экспериментальной работы на базе гинекологического отделения и отделения вспомогательных репродуктивных технологий Перинатального центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации.По материалам выполненного исследования опубликовано 4 печатные работы, в том числе 3 в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации; 1 в журналах, индексируемых в Scopus.

Положения, выносимые на защиту.

1. Ранние репродуктивные потери после ВРТ являются следствием действия большого количества патологических причин с реализацией разнообразных часто перекрестных, патофизиологических путей, поэтому выделить доминирующий этиологический фактор существующими методами диагностики не всегда возможно. Одним из важных этиопатогенетических звеньев развития ранних репродуктивных потерь после ВРТ является пониженная экспрессия ALK5.

2. К наиболее весомым комбинациям ведущих факторов вероятного развития ранних репродуктивных потерь после ВРТ относятся: комбинация срока бесплодия и фактором бесплодия, а также количеством попыток ВРТ;

вид бесплодия и исход предыдущих беременностей; привычное невынашивание, высокая доля внутриматочных вмешательств (гистероскопия, медикаментозные и инструментальные аборты) и внутренний эндометриоз повышали риск ранних репродуктивных потерь; высокий индекс массы тела и более трех неудачных попыток ВРТ в анамнезе увеличивает риск ранних репродуктивных потерь; сочетание позднего репродуктивного возраста с продолжительностью бесплодия более 10 лет, наличием более трех неудачных попыток ВРТ и оперативных вмешательств на органах малого таза увеличивает риск возникновения ранних репродуктивных потерь.

3. В группе женщин, у которых беременность прервалась самопроизвольно, имеет место значительное снижение уровня положительной экспрессии TGFBR1, которое в комбинации с показателями возраста увеличивает риск самопроизвольного выкидыша, что может быть дополнительным фактором, который способствует развитию микроциркуляторных и гемодинамических нарушений и вносит собственный вклад в увеличение коагуляционного потенциала, вызывая в том числе и нарушения процессов имплантации.

4. Гистологически подтвержденная плацентарная дисфункция связана с повышением пролиферативной активности Th1-лимфоцитов по причине критически низкого уровня положительной экспрессии TGFBR1, нарушающих формирование сосудистого русла, повреждающих плацентарную ткань и переориентируют иммунный ответ с Th2-типа на Th1 активации цитотоксического звена, что проявляется в иммунологической агрессии материнского организма по отношению к плоду.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 151 страницах печатного текста. Состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций. Список использованных источников состоит из 230 наименований, из них 69 - отечественных и 161 - зарубежных. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 8 рисунками.

ГЛАВА I. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Современный взгляд на проблему ранних репродуктивных потерь

Девяностые годы XX века оставили неблагоприятную демографическую ситуацию и низкие показатели здоровья населения: сегодня жители стран СНГ живут в среднем на 14 лет меньше, чем жители Западной Европы. Так, средняя продолжительность жизни в России на 5 лет ниже, чем в Европейском регионе и на 9 лет ниже, чем в странах Европейского Союза, а поколение детей лишь на 60% замещает поколение родителей [44; 95]. Ожидаемая продолжительность здоровой жизни в России в 2019 году составила 63,7 года – наименьшая цифра среди европейских стран, тогда как самый высокий показатель в 71,9 года принадлежит Исландии. К сожалению показатель естественного прироста населения в РФ остается отрицательным, а суммарный коэффициент рождаемости является достаточно низким и Россия еще далека от достижения естественного уровня замещения [58].

Здоровье человека, его формирование, сохранение и укрепление является центральной проблемой фактически всех стран мира. Стратегия сохранения здоровья человека находится под пристальным вниманием ООН и ВОЗ, и отражена в таких документах как «Всемирная Декларация по охране здоровья» [141], «Здоровье-21. Основы политики достижения здоровья для всех в Европейском регионе ВОЗ» [128].

Нормативно-правовое обеспечение службы планирования семьи и сохранения репродуктивного здоровья в РФ имеет международные истоки, ведь право на охрану репродуктивного здоровья было отмечено на конференции ООН по вопросам народонаселения и развития, состоявшейся в сентябре 1994 году в Каире с участием представителей 188 стран мира.

Именно тогда был сделан акцент на необходимости усиления внимания правительств к вопросам репродуктивного здоровья.

По определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), репродуктивное здоровье – это состояние полного физического, умственного и социального благополучия, а не просто отсутствие болезней репродуктивной системы или нарушения ее функций [48]. Принципиальной особенностью репродуктивного процесса является его очевидная демографическая значимость как процесса, формирующего общественное здоровье в настоящем и будущем [64].

Очевидно, что для улучшения общественного здоровья необходимо уменьшить негативные тенденции репродуктивного процесса за счет улучшения общего и репродуктивного здоровья женщин. Тем не менее сложившаяся в России неблагоприятная демографическая ситуация, характеризующаяся естественной убылью и ухудшением здоровья населения (на начало 2020 года рождаемость снизилась на 5,4%, а смертность выросла на 3,1%) [49], определяет особую социальную и политическую значимость проблемы повышения рождаемости и снижения репродуктивных потерь.

Понятие «репродуктивные потери» означает потерю продуктов зачатия на всех этапах развития плода – в результате самопроизвольного и вынужденного (по медицинским и социальным показаниям) прерывания беременности, мертворождения, а также смерть детей первого года жизни [11; 44].

Потеря беременности – одна из самых распространенных проблем современной репродуктологии. Частота этой патологии колеблется от 10% до 30% и не имеет тенденции к снижению [138]. По данным литературы, 75-80% потерь происходят в I триместре беременности, причем 38% из них в первые 7-8 недель [148].

Считается, что 15-25 % всех беременностей заканчиваются самопроизвольным выкидышем в I триместре и являются ранними репродуктивными потерями [16].

Проблема ранних репродуктивных потерь на протяжении многих лет остается очень актуальной. Ранние репродуктивные потери являются полиэтиологической патологией, соответственно патогенез ее тоже многогранен, но несмотря на многочисленные исследования, на сегодняшний день не существует единой концепции патогенеза [22].

В общем примерно 25% женщин теряли по крайней мере одну беременность. Это очерчивается понятием спорадические репродуктивные потери (СРП). Привычные репродуктивные потери (ПРП) – потеря трех и более беременностей. ПРП наблюдаются у 1-8% женщин репродуктивного возраста [33; 42].

Анатомические аномалии составляют от 10% до 15% случаев ПРП и, как правило, считаются причиной выкидыша те аномалии, которые могут нарушить кровоснабжение эндометрия. К ним относятся врожденные аномалии матки, внутриматочные спайки, миома или полипы матки. Хотя врожденные аномалии матки чаще связаны с потерями во втором триместре или преждевременными родами, они также играют определенную роль в ПРП.

Среди возможных предпосылок репродуктивных потерь присутствуют генетические аномалии у родителей или у плода, антифосфолипидный синдром, анатомические и эндокринные факторы, унаследованные тромбофилии и иммунные факторы [19; 63; 67]. Ученые считают, что вклад хромосомных аномалий в материале ранних репродуктивных потерь в генез последних однозначно не очерчен. По данным некоторых исследований, частота хромосомных аномалий составляет 51-60%, по другим данным – 5-29%.

Предполагается, что с увеличением количества потерянных беременностей у женщины вероятность наличия хромосомной аномалии у плода уменьшается [31; 62; 70]. Также авторами установлено, что частота хромосомных аномалий при спорадических потерях беременности выше (39,9%) по сравнению с регулярными потерями (27,1%) в 1,47 раза.

Дефект лютеиновой фазы (ДФЛ), синдром поликистозных яичников

(СПКЯ), сахарный диабет, заболевание щитовидной железы и гиперпролактинемия относятся к эндокринологическим нарушениям, которые составляют примерно от 17% до 20% ПРП. Одним из основных этиологических факторов ранних репродуктивных потерь являются гормональные нарушении, среди которых ключевое место занимает прогестеронова недостаточность [47].

По данным литературы, причиной развития акушерской патологии в 70-75% случаев являются наследственные и приобретенные аномалии гемостаза [88.]. В последние годы появилось значительное количество публикаций, посвященных наличию ассоциации между развитием невынашивания беременности и тромбофилией, как наследственной, так и приобретенной, при этом более 15% белого населения имеют наследственную тромбофильную мутацию. Наиболее распространенными из них являются лейденская мутация фактора V, мутация в промоторной области гена протромбина и мутации в гене, кодирующем метилентетрагидрофолатредуктазу (MTHFR). Эти общие мутации связаны с умеренным риском тромбов, и остается спорным вопрос, связаны ли гомозиготные мутации MTHFR с сосудистыми заболеваниями вообще. Напротив, более серьезные тромбофильные дефициты, такие как дефицит антитромбина и протеина S, гораздо реже встречаются в общей популяции. Возможная связь между ПРП и наследственными тромбофилиями основана на теории, согласно которой нарушение развития и функции плаценты, вторичное по отношению к венозному и / или артериальному тромбозу, может привести к выкидышу. Наследственные тромбофилии, наиболее часто связанные с ПРП, включают гипергомоцистеинемию, возникающую в результате мутаций MTHFR, резистентность к активированному протеину C, связанную с лейденскими мутациями фактора V, дефицит протеина C и протеина S, мутации протромбинового промотора и мутации антитромбина. Приобретенные тромбофилии, связанные с ПРП, включают гипергомоцистеинемию и резистентность к активированному протеину C. По данным ряда авторов, удельный вес тромбофилии в структуре

причин синдрома потери плода составляет 40-75 % [13; 30].

Установлено, что наследственная тромбофилия – это генетически обусловленная склонность к образованию венозных тромбозов, что наблюдается у лиц моложе 45 лет с семейной историей тромбозов и нетипичной локализацией тромбообразования. По данным литературы, врожденные дефекты гемостаза наблюдаются в 0,1– 0,5% популяции. В норме система гемостаза находится в состоянии равновесия, которое обеспечивает слабая активация коагуляционного каскада и естественная активность антикоагулянтной и фибринолитической систем, что предотвращает развитие спонтанных тромбозов [14; 53].

Ученые исследовали, что при тромбофилии создаются условия для нарушения процессов имплантации, плацентации, роста плода, развивается системная эндотелиальная дисфункция. Кроме того, компоненты системы гемостаза участвуют не только в регуляции свертываемости крови, но и являются медиаторами воспаления. Генетически обусловленные и приобретенные изменения гемостаза активируют провоспалительный ответ и формируют прокоагуляционный потенциал, который является этиопатогенетическим фактором, обусловливающим бесплодие, неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения, ранние преембриональные потери и приводят к поздним акушерским осложнениям.

Наличие дополнительных факторов риска тромбозов может потенцировать эффекты тромбофилии у беременных [12].

Согласно современным представлениям, к самым распространенным тромболитическим состояниям, которые приводят к репродуктивным потерям, относятся: антифосфолипидный синдром, дефицит антитромбина III, дефицит протеина С, дефицит протеина S, мутация V фактора G1691A (FV Leiden), мутация гена протромбина G20210A (II фактор) и метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR C677T) [41]. С антифосфолипидным синдромом ученые связывают следующие акушерские осложнения, как привычное невынашивание беременности (ПНБ) –

рецидивные спонтанные выкидыши, преждевременные роды, внутриутробную гибель плода, задержку утробного развития плода, преэклампсию и пр. При наличии антифосфолипидного синдрома репродуктивные потери значительно чаще происходят в I триместре беременности [36]. Частота антифосфолипидного синдрома у общей популяции составляет 5-6%; при невынашивании беременности – 50–75% [2].

Некоторые инфекции, включая Listeria monocytogenes, Toxoplasma gondii, краснуху, вирус простого герпеса (ВПГ), корь, цитомегаловирус и вирусы Коксаки могут играть роль в спорадических спонтанных выкидышах. Роль инфекционных агентов в ПРП менее ясна, предполагаемая частота встречаемости ПРП при которых составляет 0,5% от 2 до 5% [56].

По данным литературы, немалую роль в этиологии спорадического прерывания беременности и привычного невынашивания играют патология плацентации, генитальные инфекции, в частности дисбиоз влагалища. По данным различных авторов частота дисбиотических нарушений при беременности у женщин достигает от 48,6% до 84,3% [55]. Известно, что дисбиоз влагалища являются фактором риска спорадических выкидышей и привычного невынашивания [56].

По данным литературы, одним из наиболее распространенных заболеваний женских половых органов, которые влияют на течение беременности, является бактериальный вагиноз. Частота обнаружения бактериального вагиноза во многом зависит от контингента обследуемых женщин, составляя 17-19% среди пациенток служб планирования семьи, 15-37% среди беременных и 61-87% среди пациенток с патологическими выделениями [40]. По данным эпидемиологических исследований, распространенность бактериального вагиноза среди беременных разных стран мира колеблется от 10% до 40% [46].

Ученые отмечают, что актуальность проблемы влияния инфекции на течение беременности в I триместре объясняется высоким уровнем инфекционной заболеваемости беременных, предшествующей и приводящей

к развитию различной акушерской патологии. Установлено, что инфекционные заболевания и нарушения микробиоценоза родовых путей приводят к увеличению частоты самопроизвольных выкидышей в 13 раз [17]. Однако, не у всех беременных с наличием возбудителей урогенитальной инфекции происходит самопроизвольное прерывание беременности. Некоторыми авторами установлена важная роль в развитии данной патологии иммунных механизмов на уровне слизистых оболочек нижнего отдела генитального тракта [24].

Были высказаны предположения о связи между спорадическим и / или ПРП и профессиональным и экологическим воздействием органических растворителей, лекарств, ионизирующего излучения и токсинов, хотя из проведенных исследований трудно сделать убедительные выводы, поскольку они имеют тенденцию быть ретроспективными и смешиваются с альтернативными или дополнительными воздействиями окружающей среды [183].

Три конкретных фактора воздействия – курение, алкоголь и кофеин – заслуживают особого внимания, учитывая их широкое распространение. Хотя материнский алкоголизм (или частое употребление алкоголя) неизменно ассоциируется с более высокими показателями самопроизвольного прерывания беременности, связь репродуктивных потерь с более умеренным приемом алкоголя остается незначительной. Исследования, связывающие умеренное потребление алкоголя с невынашиванием беременности, показали увеличение риска выкидыша при употреблении более 3 порций в неделю в течение первого триместра (отношение шансов 2,3), при более 5 порций в неделю отношение шансов увеличивается до 4,8. Кажется логичным, что курение сигарет может увеличить риск самопроизвольного аборта из-за приема никотина, который, как известно, уменьшает маточный и плацентарный кровоток.

Тем не менее, связь между курением и потерей беременности остается спорной в связи с тем, что только часть проведенных исследований

обнаружили эту связь. Появляются доказательства того, что кофеин, даже в низких количествах (от 3 до 5 чашек кофе в день), может увеличить риск самопроизвольного выкидыша с дозозависимым ответом. Связь потребления кофеина, алкоголя и никотина с ПРП слабее, чем их связь со спорадической потерей беременности [229]. В 50 % случаев причина ПРП является не установленной и определяется понятием «идиопатическое привычное невынашивание беременности» [38].

К вопросу лечения невынашивания беременности на ранних сроках, следует отметить, что на сегодняшнее время стандартов терапии этой патологии не существует. Но накоплен достаточный международный опыт, обобщенный в соответствующих рекомендациях по ведению беременных. И повышение качества медицинской помощи наряду с улучшением социального статуса населения, определяющих репродуктивное здоровье населения и уровень репродуктивных потерь, имеет первостепенное значение в демографическом развитии России.

1.2. Проблема ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий в фокусе современных научных исследований

Неблагоприятная демографическая ситуация в РФ, прежде всего резкое падение рождаемости, связано с обострением проблем функционирования семей как источника воспроизводства населения страны, снижением их демографического потенциала, обусловленного бесплодием. По данным Международного комитета по мониторингу вспомогательных репродуктивных технологий и Всемирной организации здравоохранения, бесплодие – это «заболевание репродуктивной системы, определяемое невозможностью наступления клинической беременности после 12 месяцев или более регулярных незащищенных половых актов» [189]. Однако это определение не признает важность возраста женщины и не принимает во внимание требование регулярной овуляции для оптимизации шансов на

зачатие.

Более подходящим определением было бы «неспособность забеременеть после 12 месяцев незащищенных и частых половых контактов в контексте регулярной овуляции у женщины в возрасте менее 37 лет. К более раннему обследованию следует обращаться, если женщине 37 лет и более, есть факторы риска бесплодия (включая нерегулярную овуляцию, патологию тазовых органов, преждевременную менопаузу в семейном анамнезе) или существует риск мужского бесплодия. В этих обстоятельствах может оказаться целесообразным направление к специалисту через 6 месяцев или даже сразу [127].

Частота бесплодных браков в третьем тысячелетии увеличилась до 18% и имеет тенденцию к дальнейшему росту. По глобальным оценкам, почти 72,4 миллиона пар испытывают проблемы с фертильностью [209]. Россия по состоянию на 2017 год занимает 179-е место из 224 в мировом рейтинге по показателю фертильности (1,61), до 15% семей в России не могут иметь детей по причине бесплодия, в связи с чем проблема лечения бесплодия признана приоритетным направлением государственных программ здравоохранения РФ [48].

Пути решения проблемы бесплодия зависят от его типа, который определяется причинами, его повлекшими. Отрасль репродуктологии как науки не является новой, ее активное развитие началось в 70-х годах XX века, когда были созданы и испытаны первые препараты для медикаментозной стимуляции яичников. Первые попытки переноса эмбрионов человека и разработки метода вспомогательных репродуктивных технологий, которые завершились рождением ребенка, были выполнены Г. Эдвардсом и П. Стрептоу в 1978 году (Англия). С тех пор технология начала стремительно развиваться и ее стали использовать для лечения трубно-перитонеального бесплодия. Первый в мире «ребенок из пробирки» родился в Великобритании в 1978 году (Луиза Браун), а в России – в 1986 г. К 2000 году успешно появились на свет уже около 900 тысяч младенцев [4].

Достижения современной науки активно используют немалый арсенал методик для решения проблемы низкого репродуктивного потенциала нации, среди которых можно отметить развитие миниинвазивных хирургических методов коррекции бесплодия, генетических скринингов и высокоточных прицельных наносистем в репродуктивной медицине.

Методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) совершенствуются с каждым днем, преследуя лишь единственную цель – достижение желанной и долгожданной беременности и рождения здорового ребенка у родителей, не имеющих возможности зачатия естественным путем [37]. На сегодняшний день неуклонно растет число пар, обращающихся за помощью к ВРТ, таким как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ИКСИ), зачатие и, в конечном итоге, собственное рождение здорового живого ребенка.

Международный комитет по исследованию вспомогательных репродуктивных технологий (ICMART) предоставил статистику роста востребованности и результативности вспомогательных репродуктивных технологий. Эксперты называют технологию ЭКО прорывом в медицине и прогнозируют большое будущее развитию всей отрасли репродуктивных технологий. По данным статистики ICMART, ЭКО, проведенное пациенткам до 35 лет, приводит к долгожданной беременности в 32% случаев.

При обращении женщин в возрасте от 35 до 37 лет эффективность ЭКО может достигать 28%, в 38-39 лет – 21%, а в 40-42 года – 14%. На сегодняшний день количество циклов ВРТ увеличивается во всем мире в геометрической прогрессии. Количество детей, рожденных с помощью ВРТ по состоянию на 2020 год, превысило пятимиллионный рубеж [141]. При этом Россия входит в десятку лидеров по циклам ВРТ. К 2020 г. регистр располагает сведениями о 902 578 циклах ВРТ, проведенных в России, и 225 354 рожденных детей [23].

Однако следует заметить, что вспомогательные репродуктивные технологии не являются единственной альтернативой традиционным методам лечения бесплодия, но имеют определенные приоритеты за счет

высокоточных, прицельных миниинвазивных технологий, аккумулируя в себе передовые достижения мировой медицины. Эффективность консервативного лечения инфертильности трубно-перитонеального происхождения достигает 37% в связи с низкой эффективностью, в подавляющем количестве пациенток показано применение лечебных программ вспомогательных репродуктивных технологий [45].

Современные методики вспомогательных репродуктивных технологий включают в себя GIFT, ZIFT, ICSI (MESA, TESA, TESE, PESE), оплодотворения in vitro и методы медикаментозной коррекции гормонального фона, индукцию овуляции с непосредственным воздействием на половые клетки. Многочисленные комбинации методик ВРТ привели к успешному наступлению долгожданных беременностей, а сам метод отнесли к общепринятому стандарту лечения бесплодия [39].

Каждая программа ВРТ состоит из важных последовательных этапов, одним из которых является индукция овуляции для получения достаточного количества зрелых преовуляторных ооцитов для дальнейшего оплодотворения. Этот этап обязательно присутствует во всех циклах ВРТ. Следующие этапы отличаются между собой и зависят от выбора программы ВРТ. Результат успеха цикла ВРТ прямо пропорционально зависит от характера овариального ответа пациентки на индукцию овуляции. Частота неудачных попыток ВРТ у пациенток с недостаточным овариальным ответом составляет 22% [81]. Относительно особых требований перед использованием методик ВРТ, можно сформулировать ключевые моменты: не следует добиваться наступления беременности ценой нанесения вреда организму пациентки за счет проведения непрерывных циклов стимуляции при условии, что предыдущие циклы закончились неудачно, ведь процент наступления беременности наибольший при первых попытках использования ВРТ и имеет четкую тенденцию к снижению при каждой следующей процедуре [102].

Следует помнить, что нельзя улучшать показатель эффективности ВРТ за счет переноса 3-4 эмбрионов с целью получения многоплодной беременности,

потому что риски превышают пользу полученных результатов и повышают частоту возникновения акушерских осложнений, связанных с многоплодной беременностью. По мнению ведущих репродуктологов, оптимальной тактикой лечения бесплодия является выбор стратегии трансфера одного эмбриона – «Single Embryo Transfer Strategy» (SETS) [158].

Проблема успешного лечения бесплодия с последующим наступлением долгожданной беременности является лишь первой ступенькой на пути к счастливому материнству, за которой находятся двери в самый сложный этап – обеспечение вынашивания беременности и рождения здорового ребенка. ВРТ является лечебной процедурой, которая практически на каждом этапе связана с возможными осложнениями, которые угрожают здоровью и даже жизни пациентки. В процессе проведения контролируемая овариальная стимуляция (КОС) наиболее грозным осложнением является синдром гиперстимуляции яичников (ГСЯ) [114]. Большую роль среди осложнений ВРТ имеют психоэмоциональные расстройства [176].

Известно, что у женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом достаточно большой процент развития осложнений во время беременности. Беременности, наступившие в результате ВРТ, имеют более высокую долю невынашивания, многоводия, а также формирование плацентарной недостаточности, влияющей на перинатальное благополучие, а переходя в острую клиническую форму угрожая жизни матери и ребенка [105]. Значительной является доля репродуктивных потерь, эктопической беременности и преждевременных родов (ПП). Основными причинами неблагоприятных перинатальных последствий является невынашивание беременности на фоне плацентарной дисфункции (ПД) и преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) [155].

Частота невынашивания после ВРТ колеблется в пределах 10-27% от общего числа беременностей у женщин, вставших на учет в женскую консультацию. Так, по данным исследования Winter E. et al. общий уровень потери беременности, произошедшей до 6-7 недель составил 16% [116]. Из

1200 одноплодных беременностей по данным исследования Tummers P. et al. [188] общая частота самопроизвольных абортов составила 21,8% (262 самопроизвольных аборта). Общая частота ранних репродуктивных потерь по данным ретроспективного когортного исследования риска репродуктивных потерь на протяжении всей беременности, полученной после АРТ, включало 5485 клинических беременностей, наступивших в результате ВРТ, проведенного Hu L. et al. [134] составила 12,5%. Из 685 циклов невынашивания беременности 460 закончились ранним выкидышем, остальные были зафиксированы на более поздних сроках.

Итак, прорыв в области ВРТ в новейшей истории науки позволил парам, ранее неспособным зачать ребенка, достичь жизнеспособной беременности, и в то же время открыло новое направление в предикторах ранних репродуктивных потерь. Хотя ВРТ улучшила результаты для испытывающих затруднения в зачатии пар, возникла новая проблема: неудачная имплантация.

1.3. Факторы риска ранних репродуктивных потерь у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий

Среди основных причин репродуктивных потерь после ВРТ ведущими выступают инфекционные, эндокринные, анатомические, психологические и генетические факторы, которые приводят к формированию аномального эмбриона или пороков развития плода с последующим прогрессированием патологической беременности.

Достоверных данных для сравнения частоты выкидышей при спонтанной беременности и при ВРТ нет, но общепринято считать, что частота выкидыша несколько выше после ВРТ. Основная причина более высокого риска – возраст пациенток, который в среднем на 3-5 лет выше, чем у фертильной популяции на момент первой беременности. Действительно, исследования риска самопроизвольного выкидыша показывают, что возраст матери является важным фактором риска репродуктивных потерь после ВРТ. Естественное снижение репродуктивного потенциала женщины с течением времени имеет

две основные причины: уменьшение количества ооцитов в яичнике и снижение их качества. Антимюллеров гормон, гликопротеиновый гормон, секретируемый клетками гранулезы преантральных и антральных фолликулов яичников, достигает пика в 20 лет и постепенно снижается до наступления менопаузы. Программы донорства ооцитов ясно свидетельствуют о том, что риск невынашивания связан именно со старением ооцитов, а не со старением матки. Более того, исследования ооцитов и эмбрионов с использованием метода флуоресцентной гибридизации in-situ (FISH) показали, что частота анеуплоидии в человеческих ооцитах увеличивается с возрастом, возрастая у женщин в возрасте> 35 лет и даже в большей степени> 40 лет [226].

Salumets et al. обнаружили, что основным прогностическим фактором, влияющим на исход беременности при переносе замороженных эмбрионов, особенно при использовании метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ), был возраст матери. Возраст пациентки на момент сбора и замораживания ооцитов был единственным определяющим фактором для биохимического исхода беременности. Начиная примерно с 39 лет, частота биохимических беременностей была значительно выше. На частоту родов также влияет возраст матери и качество эмбриона [199].

Shapiro B.S. et al. обнаружили, что с увеличением возраста матери повышаются показатели асинхронности эмбриона и эндометрия. 50% переводов были асинхронными у женщин младше 35 лет по сравнению с 68,1%, которые были асинхронными у женщин старше 35 лет. Кроме того, частота имплантации, которая рассчитывалась для каждого переноса бластоцисты и, следовательно, рассматривалась как числовое значение, была значительно ниже в циклах ЭКО у женщин в возрасте старше 35 лет (в среднем 24,5 ± 36,8) по сравнению с женщинами моложе 35 лет (в среднем 41,1 ± 42,1), а частота биохимических беременностей была значительно выше у женщин старше 35 по сравнению с женщинами моложе 35 (28,1% против 14,9% соответственно).

Уровень живорождения был значительно выше у женщин моложе 35 лет

(50,7%), чем у женщин старше 35 лет (28,5%). У пациенток старше 35 лет также наблюдалось снижение выхода ооцитов, образования бластоцист и толщины эндометрия [201].

Частота имплантации как при пересадке свежих, так и замороженных эмбрионов у пациенток в возрасте моложе 35 лет (41,3% и 47,1%) значительно выше, чем у женщин в возрасте старше 44 лет (1,9% и 16,2%). Интересно отметить, что частота имплантации при использовании донорских ооцитов, представляющих все возрастные категории, составила 53,6% при переносе свежих эмбрионов и 40,2% при переносе замороженных эмбрионов [94]. Это также подтверждает идею о том, что качество эмбриона, включая генетические характеристики, снижается с увеличением возраста матери. Волков В.Г. и Ахильгова З.С. отмечают, что достаточно высокие цифры возраста беременных позволяют убедиться в более поздней реализации репродуктивных функций современной женщиной. Анализ данных показал, что ведущими медико-социальными факторами самопроизвольного прерывания беременности в ранние сроки после ВРТ можно считать возраст женщины и партнера старше 35 лет, курение партнера, неразвивающаяся беременность в анамнезе и перенесенные гинекологические заболевания. Риск невынашивания беременности несколько выше у женщин с хроническим сальпингоофоритом, нарушением менструальной функции и патологией шейки матки [21].

Winter et al. изучили факторы риска беременности, включая возраст матери, ИМТ, курение, СПКЯ, этиологию бесплодия, реакцию на стимуляцию, качество и количество замененных эмбрионов и тип лечения на 1196 беременных женщинах, получающих ВРТ. Они показали, что показатель выкидыша составлял 16 % до 6-7 недели беременности. Кроме того, курение и низкое качество перенесенного эмбриона были связаны с увеличением ранних репродуктивных потерь. В то время как возраст, ожирение и другие факторы статистически не показали увеличения риска ранних репродуктивных потерь. Хотя женщины старше 40 лет имели повышенный риск, это не было

значительным после поправки на другие факторы. Риск для худых (ИМТ <18,5) и страдающих ожирением (ИМТ> 35) женщин также не был значительно выше в проведенном авторами многофакторном анализе. [116]. Тогда как по данным Moragianni V.A. et al. у пациенток, подвергающихся ВРТ, пациентки с ожирением I, II и III классов (ИМТ> 30) имели самый высокий шанс неудачной имплантации, продемонстрированный соответствующими отношениями шансов: 0,69 (0,53–0,90), 0,52 (0,36–0,74), и 0,58 (0,35–0,96) по сравнению с пациентками с нормальным весом (ИМТ 18,5–24,99).

Хотя не было зарегистрировано различий между разными группами ИМТ в отношении ВРТ, пациенты с ожирением класса III (ИМТ> 40) имели самые высокие общие показатели ранних репродуктивных потерь [173]. Кроме того, женщины с избыточным весом и ожирением (ИМТ> 25) при проведении ВРТ, у которых было собрано меньшее количество ооцитов, был более высокий риск неудачной имплантации и выкидыша, чем у женщин с нормальным весом и с таким же количеством собранных ооцитов [181]. Женщинам с ожирением потребовалось больше циклов стимуляции гонадотропинами, но при этом у них было статистически меньше ооцитов для сбора (в среднем 8 против 10 у женщин без ожирения, P=0,03). Это предполагает, что ожирение может повлиять на качество ооцитов и развитие фолликулов [118]. Хотя ПРП отличаются от повторной неудачной имплантации, повышенный ИМТ считается наиболее важным фактором риска выкидыша у пациенток, страдающих от ПРП, после увеличения возраста [155].

Самопроизвольные аборты в буквальном смысле запрограммированы в организме женщины в большом проценте случаев и только неоднократные попытки программ ЭКО могут преодолеть процент неудач [73]. В пользу этого факта говорит кумулятивный эффект, то есть, однажды преодолев барьер рецидивирующих самопроизвольных выкидышей, шансы на успех в программе ЭКО значительно возрастают. Об этом убедительно свидетельствует исследование Cameron N.J. et al. [107], где в своем первом полном цикле у 9321 (8,3%) женщин был как минимум один

самопроизвольный аборт и не было родов; 33 152 (29,5%) имели по крайней мере одно живорождение, а 70 076 (62,3%) не имели беременностей.

После двух дальнейших полных циклов консервативные CLBR (которые предполагают, что женщины, которые впоследствии прекратили лечение, никогда не имели живорождений), составили 40,9, 49,0 и 30,1%, тогда как оптимальные CLBR (которые предполагают, что женщины, которые прекращают лечение, имеют такой же шанс на живорождение, как и те, пролеченные) составили 49,5; 57,9 и 38,4% в группах с невынашиванием беременности, живорождением и отсутствием беременности соответственно. Коэффициенты совокупного живорождения для женщин, которые имели самопроизвольный аборт в первом полном цикле были на 42% выше, чем у тех, кто не имел беременности [отношение шансов (95% ДИ) = 1,42 (1,34, 1,50)], и вдвое выше для живорождений по сравнению с отсутствием беременности [2,04 (1,89, 2,20)].

Согласно данным исследования Shen J.D. et al. [99], хромосомная аномалия является ведущей причиной самопроизвольных абортов на ранних сроках беременности, а частота хромосомных аномалий увеличивается с увеличением материнского возраста. Zhang Y.F. et al. [113] изучали влияние числа предыдущих самопроизвольных абортов на успешность первого цикла ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов. Авторами получены данные о том, что однократный самопроизвольный аборт в анамнезе не оказывает очевидного влияния на успешность формирования эмбриона, но оказывает негативное влияние на частоту успеха клинических беременностей, частоту ранних самопроизвольных абортов и частоту живорождений в первом цикле ЭКО / ИКСИ; с увеличением числа самопроизвольных абортов, риски невынашивания растут.

Meng J. et al. [142] показали, что эндометрий матки при каждом последующем цикле переноса эмбрионов в группе пациенток с предшествующей хирургической эвакуацией был намного тоньше по сравнению с группой без хирургической эвакуации (9,0 ± 1,6 мм против 9,4 ±

1,9 мм, P = 0,01). Однако, авторами не было выявлено значительных различий в частоте имплантации, клинической беременности, частоте живорождений или дальнейших выкидышах между группой хирургической эвакуации и группой без хирургической эвакуации (P> 0,05). Уровень рождаемости был выше в группе с толщиной эндометрия ≥ 8 мм по сравнению с группой <8 мм у пациентов, перенесших хирургическую эвакуацию (43,0% против 17,4%, P <0,05).

Wang Y. et al. [77] исследовали взаимосвязь самопроизвольных абортов и искусственных абортов в анамнезе женщин, участвующих в программах ЭКО. Согласно полученным ими данным частота самопроизвольных абортов была значительно выше (30/170 [17,6%] против 41/420 [9,8%]; P = 0,002), а эндометрий был значительно тоньше (8,8 ± 1,8 против 9,7 ± 1,8 см; P = 0,001) среди пациентов с искусственным абортом в анамнезе по сравнению с теми, у кого его не было. В анализе подгрупп пациентов с искусственным абортом в анамнезе у женщин, перенесших хирургический аборт, частота живорождений была ниже по сравнению с медикаментозным абортом (29/76 [38%] против 101/378 [27%]; P = 0,039). Кроме того, женщины, у которых в анамнезе было более двух хирургических абортов, имели более низкие показатели родов в реальном времени и клиническую беременность (обе P <0,05).

Курение приводит к значительному увеличению риска репродуктивных потерь для каждой беременности по сравнению с некурящими пациентками, получающими ВРТ [69; 217]. Было обнаружено, что у курящих женщин, подвергающихся ВРТ, во время стимуляции яичников уровень эстрадиола был ниже. Токсины сигарет могут играть роль в нарушении формирования желтого тела и имплантации эмбриона [101]. Fuentes A. et al. продемонстрировали, что у курящих женщин с более высоким уровнем котинина (метаболит никотина) в сыворотке во время циклов ВРТ извлекалось значительно меньше яйцеклеток, хотя уровни котинина не оказывали значительного влияния на частоту имплантации в циклах [119].

Материнское курение чаще было связано со спонтанным выкидышем с

нормальным кариотипом плода, чем с аномальным кариотипом, что позволяет предположить, что токсические эффекты окиси углерода и никотина могут быть основными факторами, причиняющими вред. Окись углерода может вызвать истощение запасов кислорода у плода, а никотин может привести к сужению сосудов и снижению количества питательных веществ для плода из-за подавления аппетита матери [69; 74]. Показано, что частота наступления беременности среди курящих женщин в целом ниже по сравнению с некурящими, однако различия в частоте зачатия между двумя группами минимальны [101].

Также необходимо учитывать влияние курения на мужскую фертильность. Kunzle R. et al. обнаружили, что у курильщиков мужского пола значительно уменьшилось количество сперматозоидов (229,4 ± 251,5 × 10 6клеток по сравнению с 278,1 ± 264,2 × 10 6 клеток, P = 0,0001), более высокий процент аномальной морфологии (21,2 ± 14,6% нормальных форм против 23,7 ± 15,5% нормальных форм, P = 0,0007), снижение подвижности (105,6 ± 132,7 × 10 6 клеток против 126,6 ± 136,8 × 10 6 клеток, P = 0,0016) и повышенного уровня pH, измеренного по концентрации цитрата (86,7 ± 57,3 против 111,7 ± 303,1, P = 0,0072) [153].

Было показано, что повышенный уровень кортизола, также известного как «гормон стресса», увеличивает вероятность выкидыша в 2,7 раза (95% ДИ = 1,2–6,2) в течение первых 3 недель после зачатия по сравнению с женщинами с низким уровнем кортизола. Производство кортизола в организме повышается в ответ на психологические, иммунологические и другие стрессоры, это позволяет предположить, что он служит маркером, сигнализирующим о неблагоприятном состоянии женского организма для зачатия и вынашивания [180]. Это говорит о том, что предотвращение или уменьшение факторов материнского стресса может положительно сказаться на беременности.

В отличие от этого исследования Pasch L.A. et al. обнаружили, что психологический стресс, такой как клиническая тревога или депрессия, не

оказывает значительного влияния на исход ВРТ у женщин, впервые проходящих лечение бесплодия. Однако именно неудача ВРТ может привести к более высокому уровню тревожности и депрессии сразу после отрицательного результата. Более высокие показатели депрессии после ВРТ у женщин с репродуктивной потерей наблюдались чаще, чем у женщин, достигших успешной беременности (44% против 30%, P <0,001). Неудача ВРТ также была связана с более высоким уровнем тревожности после ЭКО по сравнению с женщинами, которые смогли успешно забеременеть (60% против 50%, P <0,001) [184]. Важно учитывать, что это исследование касалось только тех, кто впервые проходил лечение бесплодия.

Hur et al. показали, что женский возраст, повышенный базальный уровень эстрадиола, повышенный базальный уровень ФСГ, тонкий эндометрий значимо связаны с повышенным риском доклинической потери беременности после ВРТ [140]. Напротив, исследование Zargar M. et al. не показало какой-либо существенной корреляции между потерей беременности и женским возрастом, диабетом, курением и ожирением, что указывает на эффект вероятности этих переменных и не подразумевает их эффективность в отношении успеха беременности [164]. Эти результаты подтверждают результаты предыдущих исследований, показывающие значительно более высокий уровень потери беременности после ЭКО среди пациенток с ТРО-Ab по сравнению с пациентами без ТРО-Ab [192; 228].

По данным Tummers P. из 1200 одноплодных беременностей после ВРТ 938 (78,2%) продолжались, в результате чего общая частота самопроизвольных абортов составила 21,8% (262 самопроизвольных аборта). Результат с точки зрения выживаемости при беременности двойней оказался лучше, чем при одноплодной беременности. Хотя женщины с беременностью двойней были несколько моложе, чем женщины с одноплодной беременностью, эту разницу нельзя объяснить различиями в возрасте. После установления сердечной деятельности плода риск аборта при беременности ЭКО снижается вдвое. Вероятность выживания значительно выше у

беременных двойней на всех стадиях первого триместра, что указывает на когортный феномен [188].

Mills et al. продемонстрировали, что риск выкидыша увеличивался у пациенток с плохо контролируемым инсулинозависимым сахарным диабетом, в то время как не было обнаружено значительного повышения риска среди пациенток с хорошо контролируемым диабетом. Более того, другие интертекционные заболевания могут значительно увеличить риск выкидыша, включая синдром поликистозных яичников, гипотиреоз, некоторые инфекционные заболевания и аутоиммунные заболевания [168].

Zargar M. et al. не было обнаружено какой-либо значительной корреляции между материнскими переменными диабета, индексом массы тела (ИМТ> 30), фактором мужского бесплодия, СПКЯ и исходами беременности [P-значение> 0,05]. Более того, не было никакой корреляции для других факторов риска, включая возраст матери, тип АРТ (ИКСИ / ЭКО / FET), эндометриому, курение матери, неудачи ЭКО в анамнезе, аномалии матки., цервикальная недостаточность, многоплодная беременность и количество или качество переноса эмбрионов [P-Value> 0,05]. Отсутствие связи между успешностью беременности и типом АРТ означает, что применение различных видов АРТ (ВМИ или ЭКО и ИКСИ) мало повлияло на исход беременности [164].

Мета-анализ, проведенный Hornstein et al. продемонстрировали, что данные семи исследований не выявили статистически значимой связи между наличием антифосфолипидных антител и клинической беременностью или частотой живорождений в будущих циклах ВРТ, хотя точные уровни не были указаны [133]. Накапливаются данные о некритериальных клинических и лабораторных проявлениях АФС, одним из критериев которых является два или более необъяснимых неудачных цикла ЭКО. Кроме того, некоторые исследования показали, что этим женщинам помогает стандартное лечение АФС [76].

Есть некоторые данные, предполагающие, что наследственные тромбофилии могут быть вовлечены в подгруппу женщин с необъяснимой

рецидивирующей неудачей имплантации. Azem F. et al. обнаружили, что частота наследственных тромбофилий, таких как дефицит метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), лейденский фактор V, дефицит протромбина и дефицит антитромбина III, выше у женщин с ранними репродуктивными потерями по сравнению с контрольной группой (44% против 18,2%, P = 0,012) [78].

После исключения указанных выше факторов, в основе 70% случаев ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ лежат иммунологические нарушения, которые не были своевременно диагностированы.

По данным исследований, нормальное выполнение репродуктивной функции у женщин происходит благодаря гармоничному функционированию иммунологических механизмов. Само оплодотворение является реакцией антиген-антитело, потому что плод-это аллотрансплантат, который имеет 50% чужеродных антигенов родительского происхождения. Физиологический течение беременности обеспечивают многие факторы, связанные с особенностями иммунных реакций материнского организма, которые, с одной стороны, сохраняют толерантность к аллогенному плоду, а с другого-готовы запустить все необходимые цепи защиты против вероятных чужеродных агентов [27; 32].

По литературным данным, основным механизмом сохранения беременности является иммуносупрессия, которая реализуется с помощью цитокинов. Основная масса цитокинов синтезируется лимфоцитами. Когда обнаруживаются местные защитные реакции несостоятельными, то цитокины действуют на системном уровне, а именно – влияют на все органы и системы, участвующие в поддержании гомеостаза. Под их влиянием на центральную нервную систему меняется весь комплекс поведенческих реакций, происходят изменения в продуцировании большинства гормонов, синтезе белков и составе плазмы. Цитокины осуществляют связь между эндокринной, нервной, кровеносной и иммунной системами, привлекают эти системы к

формированию комплексной защитной реакции организма [28].

Ученые установили, что цитокины регулируют практически все этапы гестационного процесса: имплантацию бластоцисты, формирование плаценты, развитие плода, продукцию гормонов плацентой, апоптоз клеток, «созревание» шейки матки и механизм родов [75]. Считается, что физиологическая беременность зависит от предпочтения Т-хелперов 2-го типа (Th 2) – цитокинов (интерлейкина (IL) - 4, IL-5, ИL-10, ИL-15), которые являются противовоспалительными, нецитотоксичными. Они способствуют развитию трофобласта, контролируют ангиогенез, повышают продукцию хорионического гонадотропина человека, осуществляют иммуносупрессию [72; 83; 130].

Установлено, что цитокины Т-хелперов 1-го типа(Th1) – (фактор некроза опухоли альфа, IL-2, -6, -8, -12) – провоспалительные, цитотоксические, эмбриотоксические, способные разрушать клетки трофобласта, стимулируют деятельность натуральных киллеров и активируют каскад коагуляции. Чрезмерное количество провоспалительных цитокинов приводит к активации протромбиназы, что обусловливает тромбозы, инфаркты трофобласта, его отслоению и, наконец, – выкидыш в первом триместре [83].

Сложный процесс имплантации и инвазии трофобластов имеет решающее значение для успешного установления беременности. Обычно эмбрион имплантируется в эндометрий во время имплантационного окна, и восприимчивость матки к имплантации в этот период максимальна. Восприимчивость эндометрия включает экспрессию молекулярных факторов, которые управляют диалогом матери и плода и инициируют децидуализацию стромы эндометрия [106]. Молекулы-кандидаты, включая цитокины и факторы роста, секретируются эндометриальными и трубными эпителиальными клетками и были описаны нами ранее как основные регуляторы имплантации бластоцисты [144].

С инфекцией во время беременности ассоциируют такие осложнения, как самопроизвольное прерывание и замирание беременности. Самыми опасными

среди инфекций относительно досрочного прерывания беременности считаются урогенитальные (хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз) и TORCH-инфекции. По данным литературы, инвазия трофобласта в децидуальную оболочку матки и внутреннюю треть миометрия являются важнейшим моментом в успешном формировании плаценты. Одним из ответственных за этот процесс является именно IL-8, который влияет на индукцию ангиогенеза в месте прикрепления эмбриона. Повышение секреции IL-8 в системе мать–плацента–плод свидетельствует о его роли в поддержании иммунологической толерантности во время беременности [6; 72].

Способность цитокина вызывать миграцию клеток и усиливать их адгезивные свойства определяет его как посредника в формировании острой воспалительной реакции. IL-8, который продуцируют клетки плаценты, потенцирует иммунную компетентность плацентарных клеток против бактерий, атакующих фетоплацентарный комплекс [224].

На сегодня доказана роль эндогенного прогестерона в предупреждении реакции отторжения плода, а именно: эндогенный прогестерон может подавлять продукцию Th1-цитокинов и смещать баланс Th1 / Th2 в сторону преимущества Th2 [224]. Еще до оплодотворения прогестерон обусловливает секреторную трансформацию эндометрия, подготавливает его к имплантации, способствует росту, развития и васкуляризации миометрия, нейтрализует действие окситоцина, снижает синтез простагландинов. Опосредованно, с помощью Т-лимфоцитов, прогестерон тормозит реакцию отторжения плода. Во время взаимодействия прогестерона с рецепторами Т-клеток продуцируют прогестероиндуцированный блокирующий фактор, который влияет на естественные киллеры, а именно направляет иммунную реакцию матери на эмбрион в сторону менее активных естественных киллеров.

Иммунный ответ матери реализуется за счет Th2, которые синтезируют регуляторные цитокины (IL-4, IL-10, IL-13). При недостаточной концентрации прогестерона в сыворотке крови или при повреждении его рецепторов будет недостаточно производиться прогестероиндуцированный блокирующий

фактор. В этих условиях иммунный ответ матери на трофобласт связан с Th1, которые продуцируют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли альфа, IL-1, IL-6). Эндогенный прогестерон также стимулирует местную продукцию протеинов, связывающих природные киллеры, вызывая их апоптоз [83]. В эндометрии наблюдается недоразвитие желез, стромы, сосудов, недостаточное накопление гликогена, белков, факторов роста, чрезмерное количество провоспалительных цитокинов, что приводит к неадекватной реакции плодного яйца, и в результате происходит выкидыш [123].

У многих женщин, перенесших ранние репродуктивные потери после ВРТ, также был установлен хронический эндометрит (ХЭ) в результате бактериальной колонизации, часто с минимальными клиническими признаками инфекции или без них [100]. Bouet et al. подтвердил распространенность 14% ХЭ с помощью гистологического исследования у женщин, перенесших ранние репродуктивные потери. Кроме того, гистероскопия имела 40% чувствительность для обнаружения ХЭ, визуализируя отека слизистой оболочки, гиперемии эндометрия и наличия микрополипов [85].

Cicinelli et al. обнаружили, что у 66% женщин диагноз ХЭ был поставлен с помощью гистероскопии, 57,5% - с помощью гистологии, а 45% также были положительными по культуре. Большинство обнаруженных патогенов состоят из обычных бактерий, таких как Streptococcus группы B, Escheria Coli, Enterococcus Faecalis или Mycoplasma.

В некоторых случаях причиной могут быть инфекции, передающиеся половым путем, такие как хламидиоз [100]. Молекулярный метод диагностики ХЭ показал многообещающие результаты, представленные Moreno I. et al.. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ-ПЦР) может идентифицировать бактериальную ДНК с точностью 76,92%, когда образцы показали соответствие при гистероскопии, гистологии и культуре. ОТ-ПЦР показала 75% чувствительность и 100% специфичность. Это позволяет обнаруживать культивируемые и некультивируемые бактерии,

колонизирующие эндометрий, даже без гистологических признаков инфекции [175].

Бактерии, присутствующие в эндометрии, приводят к аномальному количеству лимфоцитов и, как следствие, к среде, которая нарушает нормальную восприимчивость эндометрия. Уровень имплантации среди тех, кто излечился от инфекции, составил 37% по сравнению с 17% среди тех, кто не лечился, однако эти показатели не достигли статистической значимости. Тем не менее, уровень живорождений при следующем цикле ЭКО после излечения инфекции был значительным: 61% по сравнению с 13% среди тех, кто не мог быть вылечен [100].

В некоторых случаях не обязательно хроническая инфекция приводит к снижению частоты имплантации, а скорее компоненты бактериальной флоры, присутствующие в эндометрии. Хотя когда-то считалось, что эндометрий является стерильной средой, теперь принято считать, что Lactobacillus колонизируют эту область в дополнение к влагалищу [174].

Существует несколько типов патологий матки, включая полипы, миомы и спайки, которые могут повлиять на частоту имплантации у пациентов, перенесших ВРТ. В большинстве случаев у пациенток нет симптомов, а иногда эти проблемы могут даже остаться незамеченными при трансвагинальном УЗИ, это позволяет предположить, что требуется другой метод оценки полости матки, такой как гистероскопия [93]. Миомы могут вызвать деформацию полости эндометрия, а спайки, которые часто развиваются после операции или инфекции, могут препятствовать прикреплению эмбриона к поверхности просвета. Kodaman P.H. et al. сообщают, что гидросальпинги также могут оказывать негативное влияние на имплантацию у женщин, подвергающихся ЭКО. Хотя это не совсем понятно, некоторые механизмы были рассмотрены, такие как лишение нормального развития эмбриона из-за недостатка питательных веществ и энергии в жидкости [152]. Кроме того, жидкость может отрицательно влиять на восприимчивость эндометрия, а также может физически вымывать эмбрион, предотвращая имплантацию

[198].

Мюллеровы аномалии, такие как перегородка матки и двурогая матка, также должны приниматься во внимание у пациенток с ранними репродуктивными потерями. Перегородка матки может способствовать выкидышам, поскольку у пациенток с нелечеными перегородками после ЭКО результаты хуже, чем у тех, кто перенес гистероскопическую метропластику. Однако у женщин с двустворчатой маткой имплантация обычно нормальная, но у таких пациенток риск потери беременности в середине триместра выше [105].

Сам эндометрий также может быть источником неудач имплантации. Предыдущая травма эндометрия, длительный прием противозачаточных таблеток и нарушение маточного кровотока – все это потенциальные причины тонкого эндометрия [156].

Оценка кровотока в лучевых артериях матки полезна для оценки степени притока крови к эндометрию. Когда наблюдается уменьшение кровотока, рост эпителиальных клеток и продукция фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) могут быть снижены, что в конечном итоге лишает эндометрий необходимых факторов ангиогенеза и роста для достижения необходимой толщины с целью успешной имплантации. Miwa et al. провели трансвагинальное допплеровское ультразвуковое исследование, которое показало, что индекс сопротивления лучевой артерии матки был значительно выше у пациенток с тонким эндометрием <8 мм, чем с эндометрием нормальной толщины > 8 мм (0,852 (0,826–0,955) против 0,751 (0,549–0,840), P <.05) [171] Было установлено, что толщина эндометрия влияет на частоту имплантации. При толщине от 9 мм до 16 мм вероятность наступления беременности увеличивается с 53 до 77%, показывая, что существует значительная разница в частоте имплантации [193].

Таким образом, установление факторов риска ранних репродуктивных потерь имеет важное клиническое значение для повышения эффективности ВРТ, а также для лучшего понимания возможных механизмов ранней неудачи беременности.

1.4. Роль ALK5 в репродуктивной оси

У людей и других приматов процесс имплантации эмбриона заключается в развитии оплодотворенной яйцеклетки до стадии бластоциста и последующей имплантации в эндометрий матки. Имплантация эмбриона предполагает, как взаимодействие между эмбрионом и матерью, таки и участие в этом процессе группы цитокинов [145; 166]. Так, после ряда стадий развития, таких как дробление, образование морулы и бластоцисты, оплодотворенная яйцеклетка достигает полости матки. Эпителиальные клетки эндометрия вне места имплантации яйцеклетки начинают подвергаться апоптозу, готовые принять адгезию и инвазию трофэктодермальных клеток бластоцисты, что способствует установлению тесного контакта между эмбрионом и матерью. Этот процесс очень похож на феномен метастазирования и распространения опухолевых клеток, но одним из самых больших отличий процесса апоптоза эндометриальных клеток является то, что процесс имплантации эмбриона в эндометрий не неограничен, но одновременно на него влияет децидуализация стромальных клеток эндометрия для достижения дальнейшего сбалансированного состояния.

По данным исследований, нормальное выполнение репродуктивной функции у женщин происходит благодаря гармоничному функционированию иммунологических механизмов. Само оплодотворение является реакцией антиген-антитело, потому что плод – это аллотрансплантат, который имеет 50% чужеродных антигенов родительского происхождения. Физиологический течение беременности обеспечивают многие факторы, связанные с особенностями иммунных реакций материнского организма, которые, с одной стороны, сохраняют толерантность к аллогенному плоду, а с другой – готовы запустить все необходимые цепи защиты против вероятных чужеродных агентов [27; 32].

Во время нормальной беременности пролиферация и постоянный апоптоз децидуальных клеток эндометрия всегда находятся в сбалансированном

состоянии. Между границей раздела матери и плода постепенно формируется микросреда, в которой организм матери может не только принять и поддерживать непрерывное развитие эмбриона, но также контролировать и избегать бесконечное вторжение трофобластов. Это обуславливает возможность принятия организмом матери чужеродных трансплантатов, в том числе перенос эмбриона с оплодотворением донорской яйцеклетки. В поддержании баланса микросреды (микроокружения) участвуют помимо хорошо известных стероидных гормонов, таких как прогестерон и эстроген и их рецепторы, большое количество цитокинов, иммунных факторов, молекул клеточной адгезии, гликоконъюгатов и т. д. [204].

По литературным данным, основным механизмом сохранения беременности является иммуносупрессия, которая реализуется с помощью цитокинов. Основная масса цитокинов синтезируется лимфоцитами. Когда обнаруживаются местные защитные реакции несостоятельными, то цитокины действуют на системном уровне, а именно – влияют на все органы и системы, участвующие в поддержании гомеостаза. Под их влиянием на центральную нервную систему меняется весь комплекс поведенческих реакций, происходят изменения в продуцировании большинства гормонов, синтезе белков и составе плазмы. Цитокины осуществляют связь между эндокринной, нервной, кровеносной и иммунной системами, привлекают эти системы к формированию комплексной защитной реакции организма [28].

Ученые установили, что цитокины регулируют практически все этапы гестационного процесса: имплантацию бластоцисты, формирование плаценты, развитие плода, продукцию гормонов плацентой, апоптоз клеток, «созревание» шейки матки и механизм родов [75]. Считается, что физиологическая беременность зависит от предпочтения Т-хелперов 2-го типа (Th 2) – цитокинов (интерлейкина (IL) - 4, IL-5, ИL-10, ИL-15), которые являются противовоспалительными, нецитотоксичными. Они способствуют развитию трофобласта, контролируют ангиогенез, повышают продукцию хорионического гонадотропина человека, осуществляют иммуносупрессию

[72; 83; 130]. Установлено, что цитокины Т-хелперов 1-го типа(Th1) – (фактор некроза опухоли альфа, IL-2, -6, -8, -12) – провоспалительные, цитотоксические, эмбриотоксические, способные разрушать клетки трофобласта, стимулируют деятельность натуральных киллеров и активируют каскад коагуляции. Чрезмерное количество провоспалительных цитокинов приводит к активации протромбиназы, что обусловливает тромбозы, инфаркты трофобласта, его отслоению и, наконец, – выкидыш в первом триместре [83].

Сложный процесс имплантации и инвазии трофобластов имеет решающее значение для успешного установления беременности. Обычно эмбрион имплантируется в эндометрий во время имплантационного окна, и восприимчивость матки к имплантации в этот период максимальна. Восприимчивость эндометрия включает экспрессию молекулярных факторов, которые управляют диалогом матери и плода и инициируют децидуализацию стромы эндометрия [106]. Молекулы-кандидаты, включая цитокины и факторы роста, секретируются эндометриальными и трубными эпителиальными клетками и были описаны нами ранее как основные регуляторы имплантации бластоцисты [144]. Аномалия в любой части этой огромной цепочке событий может спровоцировать развитие факторов, которые в конечном итоге приведет к возникновению самопроизвольного аборта [178].

Кроме того, поддержание баланса между матерью и эмбрионом также требует активного участия иммунного ответа. Некоторые ученые предположили, что самопроизвольный аборт, особенно ранний самопроизвольный аборт и биохимическая беременность, можно рассматривать как результат иммунного отторжения. Когда эта особая и сложная иммунная регуляторная сеть между матерью и плодом становится ненормальной, нарушение состояния баланса может привести к патологической беременности [160].

В последние годы исследования показали, что возникновение

самопроизвольного аборта связано с аномальной децидуализацией эндометрия. Так, в естественном состоянии существует множество биологических цитокинов, связанных с децидуализацией стромальных клеток эндометрия человека, включая многие члены семейства трансформирующего фактора роста-β, такие как TGF-β, факторы дифференциации роста (growth differentiation factors, GDFs, активин (activin) и т. д. Эти факторы играют важную роль в регулировании пролиферации и дифференцировки клеток [150; 202].

Семейство трансформирующего фактора роста-b – это новый недавно открытый фактор роста и его основная функция заключается в регуляции роста и дифференцировки клеток [195]. Суперсемейство TGF-β лигандов представляет большую группу (>60) протеинов, являющихся полифункциональными факторами роста. Данное суперсемейство включает в себя три изоформы TGF-β (TGF- b 1, TGF- b 2 и TGF- b 3), пять изоформ активинов, костные морфогенетические белки (BMP-1/толлоид, BMP-2, BMP-3/остеогенин, BMP-3 b /фактор роста и дифференцировки 10, BMP-5, BMP-6/ VG 1-связанная последовательность, BMP-7/остеогенный протеин-1, BMP-8/остеогенный протеин-1, BMP-8 b /остеогенный протеин-3, BMP-9/фактор роста и дифференцировки-2, BMP-10, BMP-11/фактор роста и дифференцировки-11, BMP-15/фактор роста и дифференцировки-9 b) и микостатин. Изоформы TGF - b и некоторые BMP (BMP -2, BMP -4, BMP -6 и BMP-7) экспрессируются эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками сосудов [202].

Уже в 1985 году научные исследователи добились успеха в клонировании гена TGF-β, который может быть хорошо выражен (экспрессироваться) в кишечной палочке. TGF-β представляет собой цитокин с множественными функциями и обладает широким спектром биологической активности [159; 220]. Настоящее исследование показывает, что существует пять подтипов TGF-β. У млекопитающих, включая человека, были обнаружены только TGF-β1, TGF-β2 и TGF-β3, и экспрессия TGF-β1 была самой высокой. В целом,

TGF-β в основном экспрессируется в тканях с активной дифференцировкой клеток в организме, а именно в печени, костном мозге и остеобластах [103]. Среди них TGF-β1 в основном экспрессируется в костных тромбоцитах человека и костях человека, в то время как TGF-β2 главным образом экспрессируется в костях млекопитающих и в тромбоцитах свиньи; TGF-β3 в основном продуцируется клетками мезенхимального происхождения [112].

Многие клетки в организме человека обладают способностью секретировать TGF-β, но эти TGF-β находятся в неактивном состоянии, но при определенных условиях неактивный TGF-β может активироваться. TGF-β может оказывать значительное биологическое воздействие на различные ткани, и выражаться в пролиферации, дифференцировке клеток и иммунной регуляции, в аутокринной или паракринной форме [110; 218]. Рецептор TGF-β (TGF-β receptor, TβR) представляет собой высокоаффинный связывающий белок на поверхности клеточной мембраны TGF-β, состоящий из нескольких аминокислот [148]. У всех млекопитающих, включая человека, TGF-β может синтезироваться и секретироваться почти всеми нормальными тканевыми клетками. Его существование имеет большое значение для поддержания периода беременности. Во время нормальной беременности цитокины Th2-типа (такие как IL-4, IL-5, IL-10 и др.) оказывают защитное действие на беременность, тогда как цитокины Th1-типа имеют противоположный эффект [108; 216]. Th1 / Th2 два типа цитокинов взаимодействуют, обеспечивая материнско-плацентарный иммунный баланс микросреды, и возникновение самопроизвольного аборта тесно связано с разрушением этого баланса [221].

В большинстве случаев TGF-β1 можно рассматривать как ингибитор роста клеток, а также он может ингибировать лизис различных клеток-киллеров на эмбрионе, предотвращать иммунное отторжение эмбриона у матери и избежать возникновения выкидыша. Поэтому некоторые ученые считают, что TGF-β принадлежит к одному из членов цитокинов Th2. В последние годы экспрессия TGF-β у пациенток с эмбриональным абортом изучалась многими учеными. Так, Linghui C. et al. исследовали экспрессию TGF-β1 и его

рецепторов типа I и типа II в хориональной и децидуальной тканях 20-ти пациенток с ранним самопроизвольным абортом и обнаружили, что по сравнению с децидуальной и хориональной тканью нормальной беременности, экспрессия TGF-β1 и его рецепторов в тканях хориона и децидуальной оболочке пациентов с самопроизвольным абортом снизилась [98].

Кроме того, исследования показали, что, будучи членом суперсемейства TGF-β, одним из немногих ингибиторов, ген Lefty может индуцировать секрецию и экспрессию матриксных металлопротеиназ в пролиферативных клетках эндометрия, и он экспрессируется при менструации эндометрия человека. Однако экспрессия гена Lefty не обнаруживается в эндометрии во время имплантации эмбриона [211]. Точно так же исследования децидуальной ткани пациенток с ранним самопроизвольным абортом показали, что у них относительные уровни экспрессии мРНК и белка Lefty были значительно выше, чем при нормальной беременности.

Протеины суперсемейства TGF-b взаимодействуют с двумя типами специфических трансмембранных рецепторных серин/треониновых киназ. Различают 7 разновидностей рецепторов I типа (активин-подобные рецепторные киназы/ALK) и 5 разновидностей рецепторов II типа (TbR - II: BMPR 2, AMHR 2, TGFR 2, ActR 2 A, ActR 2 B). Димерные лиганды суперсемейства TGF-b связываются с рецепторами обоих типов. Изотипы TGF-b связываются с рецепторами I типа (ALK-1 и ALK-5) и II типа, протеины BMP – с рецепторами I типа (ALK-1, ALK-2, ALK-3, ALK-6) и II типа (BMPR-II, ActR-II A, ActR-II B), активины – с рецепторами IIA типа (ActRIIA) и IIB типа (ALK4). Взаимодействие лиганда с рецепторами ведет к организации рецепторного тетрамера.

TGF-β-рецептор (TβR) представляет собой высокоаффинный связывающий белок на поверхности клеточной мембраны TGF-β и существует в трёх основных типах, а именно TβR I, TβR II, TβR III. Среди них TβR III не участвует напрямую в процессе передачи сигнала и отвечает только за представление TGF-β молекулам рецептора [71]. Как TβR I, так и TβR II

представляют собой семейства трансмембранных рецепторов гликопротеина серин-треонинкиназы, которые широко экспрессируются в клетках и тканях, при связывании с TGF-β они образуют гетеромерный комплекс и играют главную роль в передаче сигнала. Взаимодействие лиганда с рецепторами приводит к организации рецепторного тетрамера.

Формирование рецепторного тетрамера обусловливает фосфорилирование рецептора I типа рецептором II типа, что приводит к индукции активности киназы рецептора I типа. В дальнейшей внутриклеточной передаче сигнала участвуют протеины Smad. Семь подтипов TβR I (ALK1-ALK7) были идентифицированы и подтверждены у млекопитающих с различными биологическими свойствами, специфическими лигандами и сигнальными путями соответственно. В течение времени виды постоянно эволюционируют, но многие важные роли суперсемейства TGF-β и его сигнальные пути, такие как рост и дифференцировка клеток, остаются неизменными.

Молекулы семейства TGF-β связываются со специфическими рецепторами на поверхности принимающей клетки и объединяют их. Это позволяет рецепторам активировать так называемые белки SMAD внутри клетки. Активированные SMAD перемещаются в ядро клетки, где регулируют активность генов-мишеней. Это, в свою очередь, меняет поведение клетки. Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) представляет собой многофункциональный секретируемый цитокин, который играет решающую роль в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток [179].

Киназы, подобные рецепторам активина (ALK), представляют собой группу из семи рецепторов типа I, ответственных за передачу сигналов семейства TGFβ, и используются многими лигандами внутри суперсемейства. Кратко рассмотрим функции каждого из них и подробнее остановимся на ALK5.

ALK1 (ACVL1) хорошо изучен в связи с его ролью в васкулогенезе. Во время заживления ран экспрессия ALK1 увеличивается, вызывая ветвление кровеносных сосудов, а после закрытия раны его экспрессия снижается [170;

179].

Ингибирование эндотелиальной передачи сигналов ALK1 посредством использования нейтрализующего антитела ALK1 существенно ингибирует васкулогенез и ангиогенез, даже когда присутствуют факторы роста, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и основной фактор роста фибробластов (bFGF) [139]. Интересно, что некоторые исследования показали, что ALK1 / Smad1 / 5/9 работает синергетически с путем Notch для регуляции ангиогенеза. Rostama B. и его коллеги обнаружили, что дельта-подобный лиганд 4 (Dll4) / Notch с активацией BMP9 / ALK1 индуцирует покой клеток посредством p21 и тромбоспондина-1, а также индуцирует экспрессию генов Hey в эндотелиальных клетках легких. Кроме того, после потери Dll4, ALK1 / Smad1 / 5/9 становится регулируемым, тем самым компенсируя потерю передачи сигналов Notch [196].

Сходным образом обработка первичных эндотелиальных клеток человека с помощью BMP9 индуцирует гены Hey1 и Hey2 посредством сотрудничества с Notch, однако обработка растворимым ALK1 ингибирует экспрессию, демонстрируя тесную взаимосвязь этих двух путей [219]. Утрата функции ALK1 является основной причиной синдрома аутосомно-доминантной сосудистой дисплазии, известного как наследственная геморрагическая телеангиэктазия 2 типа (HHT2) [139].

ALK2 (ACVR1) – это костный рецептор BMP. Было обнаружено, что различные лиганды TGFβ, Activin и BMP, такие как BMP9 и Activin B, индуцируют передачу сигналов ALK2 [90]. В первую очередь изучается его роль в остеогенезе и хондрогенезе, ALK2 необходим для пролиферации и дифференцировки хондроцитов [194]. Важность ALK2 в остеогенезе полностью осознается в развитии прогрессирующей оссикальной фибродисплазии (FOP), которое характеризуется прогрессирующей оссификацией мышц, сухожилий, связок и соединительных тканей [182].

Хотя некоторые функции ALK3 (BMPR1A) предполагают сходство с ALK2, этот белок имеет существенное сходство последовательностей с

другим членом семейства ALK, ALK6 [157]. Глобальный дефект ALK3 приводит к летальному исходу для эмбрионов [169]. ALK3 экспрессируется в клетках остеолинии и костного мозга и необходим для постнатального образования кости; поэтому предполагается, что основная функция ALK3 – это остеогенез [163].

ALK4 (ACVR1B) – универсальный рецептор, играющий решающую роль в развитии. В моделях мышей глобальный нокаут Alk4 (Acvr1b) является эмбриональным летальным из-за нарушения развития эпибласта и внеэмбриональной эктодермы, что приводит к неправильной гаструляции [125].

Передача сигналов активина A, опосредованная через ALK4, играет важную роль в репродукции [161]. Условный дефект Alk4 в матке приводит к снижению фертильности из-за дефектов развития плаценты [186]. Передача сигналов через ALK4 / ALK7 в мужских половых путях необходима для развития зародышевых клеток и пролиферации клеток Сертоли [167].

ALK6 (BMPRIB) действует в первую очередь как рецептор BMP, с преимущественным связыванием с BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP15 и GDF5, однако также наблюдается связывание лиганда вещества, ингибирующего Мюллериан (MIS) [80]. В развитии позвоночных экспрессия ALK6 строго контролируется и в первую очередь обнаруживается в мезенхимальных прехрящах, хондроцитах и остеобластах. Во время дифференцировки остеобластов экспрессия ALK6 повышается, что указывает на роль этого белка в формировании костей [163]. Об этом также свидетельствует ассоциация мутаций ALK6 в развитии брахидактилий типа A1 и типа A2.

Дополнительным доказательством причастности ALK6 к образованию кости является развитие скелетных нарушений дисплазии Греба и акромезомелической дисплазии дю Пана [208]. С этими нарушениями связаны различные мутации, влияющие на активность киназного домена ALK6 [207]. Экспрессия ALK6 наиболее высока в мозге, легких и яичниках во зрелых

тканях [169]. В яичниках ALK6 необходим для фолликулогенеза. Его экспрессия колеблется на всех стадиях, однако снижение или нарушение экспрессии ALK6 на поверхности гранулезных клеток было связано со снижением роста фолликулов [190].

Об ALK7 (ACVR1C) известно немного. До недавнего времени рецептор типа II и лиганды, взаимодействующие с ALK7, были неизвестны [146]. К настоящему времени идентифицировано несколько лигандов, включая GDF3, Activin B и Activin AB [223]. ALK7 демонстрирует высокое сходство последовательностей с ALK4 и ALK5, однако структура внеклеточного домена отличается от других рецепторов I типа [146]. В постнатальном развитии и в зрелом возрасте ALK7 в основном экспрессируется в центральной нервной системе, где сигнальный путь, как предполагается, участвует в пролиферации и дифференцировке нейронов, а также в поджелудочной железе и толстой кишке [84].

Подобно ранее рассмотренным рецепторам, ALK5 (TGFBR1) играет решающую роль в развитии и репродукции. ALK5 лучше всего охарактеризован как первичный рецептор для лигандов TGFβ (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3), однако дополнительно сообщается, что GDF8 и GDF9 так же передают сигнал через этот рецептор. GDF8 может передавать сигнал через ALK5 для активации Smad3, ERK1 / 2 и стероидогенного острого регуляторного белка (StAR) в клетках гранулезы. Этот эффект может быть заблокирован ингибированием ALK5 [117]. GDF9 передает сигналы через BMPRII и ALK5, кодируя Smad2 и Smad3 для активации клеток коры надпочечников и клеток Сертоли [215]. Оба необходимы для фолликулогенеза [117]. ALK5 играет ключевую роль в каноническом пути передачи сигналов TGF-β. ALK5 может катализировать фосфорилирование рецептора-регулируемые Smad белков (Smad2 и Smad3), которые образуют гетеромерный комплекс с общим опосредованным Smad4 и транслокацию в ядро, где они регулируют транскрипцию [179].

ALK5 необходим для репродуктивной функции. Мыши с условным

нокаутом Alk5 в матке бесплодны. Даже мутантные Alk5 мыши с мутацией D266A knock-in в петле L45, следовательно, не позволяющие Alk5 фосфорилировать Smad2, выживают только до E10.5 из-за дефектов в формировании сосудистой сети [143]. Нацеленная делеция Alk5 в компартменте нервного ствола приводит к летальному исходу для эмбриона из-за невозможности закрытия верхней губы и неба [159].

Удаление Alk5 нарушает развитие дивертикулов яйцевода и миометрия. Кроме того, у этих мышей гиперпролиферативные матки и нерегулярные железы [121]. Этот фенотип демонстрируется во время имплантации, поскольку трофобласты не имеют организации, сокращается популяция естественных клеток-киллеров матки и снижается ремоделирование артерий [186]. Эти результаты предполагают, что ALK5 необходим не только для трансдукции передачи сигналов семейства TGFβ, но также необходим для опосредования части иммунного ответа матки.

Хотя потеря экспрессии Alk5 в матке приводит к дефектным процессам, конститутивная экспрессия рецептора также проблематична. Условное увеличение функции маточного Alk5 привело к увеличению толщины миометрия, что привело к гипермускуляризации матки. В эндометрии конститутивная активность Alk5 способствует дифференцировке фибробластов и сигнатуре гена гладких мышц. Интересно, что делеция Alk5 в матке имела существенные эпителиальные эффекты, тогда как конститутивная активация сильно изменяла микроокружение матки [120].

В исследовании Monsivais D. [172] авторы искусственно блокировали биомолекулярные пути Alk5 в матке, используя мышей с рецептором прогестерона, чтобы определить физиологическую роль Alk5 в репродуктивном процессе.

Несмотря на нормальные функции яичников и искусственную децидуализацию у мышей с условной инактивацией (cKO), отсутствие ALK5 в матке приводило к значительному снижению репродуктивных возможностей из-за аномалий, наблюдаемых на разных стадиях беременности, включая

дефекты бластоцисты, имплантации, дезорганизацию клеток трофобласта, меньшее количество клеток естественных киллеров матки (uNK) и нарушение ремоделирования спиральной артерии.

TGF-β действует на децидуальные клетки через ALK5, вызывая экспрессию других факторов роста и цитокинов, которые являются ключевыми регуляторами пролиферации просвета эпителия, развития трофобласта и созревания uNK во время беременности. Авторы отмечают снижение инвазивности трофобласта, связанное с повышенным уровнем его апоптотической гибели. Исследователи полагают, что индукция апоптоза трофобласта может осуществляться макрофагами двумя путями: секрецией TNFα и его действием на ALK5, экспрессируемые трофобластом, а также созданием дефицита триптофана под действием экспрессируемой макрофагами индоламин-2,3-диоксигеназы [191].

Ангиогенез соответствует образованию новых кровеносных сосудов из ранее существовавшей сосудистой сети путем прорастания, расщепления и ремоделирования примитивной сосудистой сети. И васкулогенез, и ангиогенез участвуют в развитии функциональной сосудистой системы у эмбриона, но также вносят свой вклад в формирование постнатальных кровеносных сосудов. У взрослых неоваскулярный ответ возникает в различных физиологических и патологических условиях, включая заживление ран, восстановление после инфаркта миокарда, заболевания, связанные с воспалением, рост солидной опухоли и метастазирование опухоли. Васкулогенез и ангиогенез строго регулируются факторами роста. Эти факторы включают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов-2 (FGF-2), фактор роста тромбоцитов и трансформирующий фактор роста-β1 (TGFβ1) [211].

Во время эмбрионального формирования человеческого организма эмбрион зависит от кровоснабжения для развития и роста. Поскольку кровь поступает через кровеносные сосуды, образование кровеносных сосудов является важным процессом как во время эмбрионального развития человека, так и на постнатальных этапах жизни. Эндотелиальные клетки выстилают

внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, и они необходимы для образования кровеносных сосудов, поскольку они пролиферируют, мигрируют и вторгаются во внеклеточный матрикс (ВКМ), формируя сосудистые структуры по всему телу человека. В качестве основного подтипа рецепторов типа I TGF-β, ALK5 играет важную роль в формировании сосудов во время эмбрионального развития.

Специфический для эндотелиальных клеток (ЭК) ALK1 увеличивает пролиферацию и миграцию ЭК, тогда как повсеместно экспрессируемый ALK5 ингибирует оба этих процесса. Поскольку ALK1 требует киназной активности ALK5 для оптимальной активации, отсутствие ALK5 в ЭК приводит к дефектному фосфорилированию обоих путей Smad при стимуляции TGF-бета [220].

Чтобы понять, почему передача сигналов TGF-бета через ALK1 и ALK5 оказывает противоположное влияние на ЭК и имеет ли это место in vivo, Itoh F. et al. [143] сравнили фенотип мышей с нокаутом ALK5 (ALK5 (KI / KI)), у которых остаток аспарагиновой кислоты 266 в петле L45 ALK5 был заменен остатком аланина, с фенотипами нокаута ALK5 (ALK5 (- / -)) и мышей дикого типа. У мышей ALK5 (KI / KI) обнаружены ангиогенные дефекты с эмбриональной летальностью на E10,5-11,5. Хотя фенотип мышей ALK5 (KI / KI) был очень похож на фенотип мышей ALK5 (- / -), иерархическая структура кровеносных сосудов, сформированных у эмбрионов ALK5 (KI / KI), была более развитой, чем у мышей ALK5 (KI / KI). Мутанты ALK5 (- / -). Таким образом, мутация петли L45 в ALK5 частично спасла самые ранние сосудистые дефекты у эмбрионов ALK5 (- / -). Это исследование подтверждает наши более ранние наблюдения, что для созревания сосудов in vivo требуются пути TGF-beta / ALK1 / BMP-Smad и TGF-beta / ALK5 / активин-Smad для нормального развития сосудов.

В исследовании Rossant J., посвящённом условной инактивации Alk5, было обнаружено развитие эстрогензависимой аденокарциномы эндометрия с отдаленными метастазами в легких. Однако, осложняет понимание роли Alk5

в имплантационных процессах тот факт, что морфология предимплантационного эмбриона человека не идентична с аналогичным процессом у эмбриона мыши, которая наиболее часто является экспериментальной моделью в контексте исследования данной темы. После оплодотворения оба эмбриона подвергаются митотическим клеточным делениям, уплотнению и кавитации с образованием бластоцисты, состоящей из слоя трофэктодермы (TE) и внутренней клеточной массы (ICM). Несмотря на это сходство, существует ряд существенных различий, таких как время деления, расщепления, образования бластоцисты и непосредственно имплантации [196].

Резюме по обзору литературы

Женщины составляют растущий сегмент пациентов, обращающихся за услугами по лечению бесплодия, такими как ВРТ. При этом частота выкидышей среди беременностей после ВРТ, как и при спонтанных зачатиях, увеличивается с возрастом. Конкретная причина субфертильности также может повлиять на частоту выкидышей: например, женщины имеющие вредные привычки, избыточный или недостаточный вес, с наличием в анамнезе инфекционных заболеваний, с некоторыми врожденными аномалиями матки, миомами и эндокринными нарушениями имеют более высокий уровень ранних репродуктивных потерь, чем те, у которых их нет.

В женском репродуктивном тракте TGFβ, Alk5 и его нижестоящие сигнальные факторы, SMAD2 и SMAD3, имеют решающее значение для структурной целостности миометрия и яйцеводов. Фактически, условная абляция TGFBR1/Alk5 в мышцах матки и стромальных компартментах матки с рецептором Amhr2-cre приводит к аномальному развитию гладких мышц, что приводит к дивертикулам яйцеводов и нарушению транспорта эмбрионов. Альтернативно, удаление TGFBR1/Alk5 из маточной мышцы, стромы и эпителия с помощью рецептора прогестерона приводит к дефектам эндометрия и плаценты, что приводит к аномальному развитию эмбриона и бесплодию. Модуляция активности рецепторов является критическим шагом для регуляции передачи сигналов TGF-β.

Было показано, что члены суперсемейства TGFβ играют роль в формировании кровеносных сосудов. В большинстве типов клеток TGFβ передает сигнал через активиноподобную киназу 5 (ALK5) рецептора TGFβ типа I, но эндотелиальные клетки экспрессируют специфический для эндотелия рецептор TGFβ типа I ALK1. Таким образом, TGFβ может передавать сигналы через рецепторы ALK1 и ALK5 в эндотелиальных клетках.

Несмотря на то, что было приложено много усилий для понимания регуляторных механизмов активности и стабильности рецептора Alk5, его значение в развитии сосудов эмбриона с целью обеспечения сохранения

беременности, многие вопросы еще не решены.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация исследования

Исследование выполнено на базе гинекологического отделения, кафедры патологической анатомии и отделения вспомогательных репродуктивных технологий Перинатального центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Забор децидуальной ткани проводился амбулаторно на базе кафедры акушерства и гинекологии СПБ ГПМУ, иммуногистохимическое исследование проведено на базе кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины СПБ ГПМУ.

Комиссия по вопросам биоэтики при Санкт-Петербургском государственном педиатрическом медицинском университете считает, что данная работа отвечает всем этическим требованиям (протокол № 1/6 от 21 января 2019 г). В заключении указано, что работа соответствует принципам Хельсинской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации, Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, соответствующим положениям ВОЗ, Международного совета медицинских научных обществ, Международного кодекса медицинской этики и законам РФ, полностью исключает ущемление интересов пациенток и нанесение вреда их здоровью.

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования, научные поиски осуществлялись в несколько этапов.

На первом этапе анализировались источники научной литературы по теме исследования. Формулировались цель, гипотеза, задачи, объект и предмет исследования, подбирались методы исследования, адекватные задачам исследования.

На втором этапе исследования проведен ретроспективный клинико-статистический анализ 120 медицинских карт беременных после ВРТ, отобранных за период с 2018 по 2020 год. Анализ материалов проводился с

помощью программы Microsoft Exel 2016, в которую вносились задокументированные данные из медицинских карт. Показатели результатов в данном исследовании были обработаны путем вычисления средней выборочной (M), оценки стандартного отклонения средней выборочной (m). Полученные данные анализировались с помощью непараметрических тестов. Для расчета статистически значимых различий между группами использовался критерий Манна-Уитни (U-критерий).

На третьем этапе исследования проведено иммуногистохимическое исследование децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях с целью выявления экспрессии ALK5. Образцы децидуальной ткани собраны в гинекологическом отделении Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета с января 2018 по декабрь 2020 года, в исследовании использованы ткани 40 пациенток в возрасте 25-40 лет, с менструальным циклом 28-30 дней, с нормой хромосомного кариотипа пары. Кроме того, проводилась оценка прогностического и клинического значения экспрессии ALK5 в профиле ранних репродуктивных потерь после ВРТ.

На четвертом этапе осуществлялась обработка полученных данных и анализ результатов исследования, формулирование выводов и рекомендаций по проведенному исследованию, подготовка текста и оформление диссертационной работы.

2.2. Общая клиническая характеристика женщин, которые были включены в исследование

Проведен ретроспективный клинико-статистический анализ, в частности отбор 344 медицинских карт беременных, которые содержали данные о раннем самопроизвольном аборте из 1274 медицинских карт пациенток перинатального центра, из которых нами взято 60 женщин в возрасте от 25 до 45 лет с индуцированной беременностью после ВРТ с зарегистрированным ранним самопроизвольным абортом в гестационном сроке 6-8 недель (или

через 4-6 недель после переноса эмбрионов). В группу сравнения было отобрано 60 медицинских карт пациенток в возрасте от 25 до 45 лет после ВРТ, у которых беременность протекала без каких-либо осложнений.

Среди двух групп пациенток после ВРТ были оценены этиологические факторы риска ранних репродуктивных потерь после ВРТ на основе клинико-статистического анализа. В рамках анализа оценивали социальный анамнез: возраст, вес, вид деятельности, образование, влияние вредных факторов и вредных привычек; гинекологический анамнез: перенесенные воспалительно-инфекционные, экстрагенитальные заболевания и оперативные вмешательства, регулярность менструального цикла, длительность и характер менструаций; репродуктивный анамнез (аборты, выкидыши, преждевременные роды), продолжительность бесплодия, количество попыток ВРТ, тип бесплодия, протокол контролируемой гиперстимуляции яичников, метод оплодотворения, общая доза гонадотропина, уровень ХГЧ в сыворотке через 14 дней после переноса (МЕ / л).

Критерием включения в группу иммуногистохимического исследования децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях с целью выявления экспрессии ALK5 (20 пациенток центра репродуктивной медицины) являлся состоявшийся ранний самопроизвольный аборт после ВТР в гестационном сроке 6-8 недель (или через 4-6 недель после переноса эмбрионов). Пациенткам центра репродуктивной медицины после процедуры переноса эмбриона через 3-4 недели после трансплантации выполняли абдоминальное ультразвуковое исследование, подтверждающее наличие внутриматочной беременности. При отсутствии признаков прогрессирования в течение 7 суток (роста ХГЧ, сердцебиения плода при УЗИ), проводилось хирургическое прерывание (20 пациенток). После внутривенной анестезии проводилась вакуум-аспирация, полученный материал отправлялся на исследование.

Критерием включения в группу контроля (20 здоровых женщин) являлось выполненное плановое хирургическое прерывание одноплодной

прогрессирующей беременности, наступившей в естественном цикле, по их желанию в гестационном сроке 6-8 недель без тенденции к угрозе прерывания беременности.

С целью получения достоверных данных при определении экспрессии ALK5 основная группа пациенток и группа сравнения подбирались с учетом их идентичности по основным показателям: возраст (25-45 лет), социально-экономическое, семейное положение, особенности акушерского-гинекологического анамнеза, экстрагенитальная патология и др. Получали информированное согласие женщин на использование биологического материала в научных целях.

Критерием исключения из иммуногистохимического исследования являлось наличие соматических, аутоиммунных, наследственных генетических заболеваний и заболеваний эндокринной системы, многоплодная беременность, случаи выявленных врожденных аномалий, отказ женщин на использование биологического материала в научных целях.

2.3. Методы исследования

Для получения объективных результатов был применен комплексный подход с использованием ряда ранее подобранных методов исследования.

Был проведен ретроспективный клинико-статистический анализ медицинских карт пациенток перинатального центра. Аналитическое исследование оценки этиологических факторов риска ранних репродуктивных потерь после ВРТ проведено с целью выявления причин возникновения и распространенности последних. Основной задачей данного исследования является выявление причинно-следственных связей между гипотетической причиной и следствием. Сравнение частоты возникновения отдельных факторов в основной и контрольной группе позволило рассчитать показатель отношения шансов (OR), по величине которого приблизительно оценивали наличие причинно-следственной связи.

На этапе клинического исследования у беременных при процедуре переноса эмбриона через 3-4 недели после трансплантации выполняли абдоминальное ультразвуковое исследование, подтверждающее наличие внутриматочной беременности. Серию продольных и поперечных сканирований проводили на ультразвуковом аппарате «Philips Clear Vue» (Германия) с использованием пакетов программного обеспечения.

У всех обследованных женщин исследовалось содержание в периферической крови отдельных гормонов, в том числе ХГЧ. Гормональные исследования сыворотки крови проводились иммуноферментным методом на анализаторе Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., США) с помощью тест-системы Immulite 2000 HCG для определения хорионического гонадотропина человека. Во время исследования применяли высокочувствительные антитела.

Обследование на урогенитальную инфекцию проводилось у всех пациенток. Твердофазным иммуноферментным анализом определялись IgM и IgG в плазме крови к возбудителям Chlamydia trachomatis. Ureaplasma urealiticum и Mycoplasma hominis, Toxoplazma gondi, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex (тип 1/2).

Пациенткам проводилось хирургическое прерывание беременности методом электрической вакуум-аспирации после внутривенной анестезии. Децидуальные ткани абортивного материала препарировали и фиксировали в 10% формалине с нейтральным буфером в течение 24 часов и заливали парафином. Парафиновые срезы депарафинизировали, регидратировали и кипятили для извлечения антигена с использованием стандартных процедур. После блокирования 3% (вес / объем) BSA в течение 1 часа срезы инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4 ° C. Иммунореактивные сигналы получали с использованием набора субстратов 3,3'-диаминобензидина (DAB).

На последнем этапе проводилась оценка прогностического и клинического значения экспрессии ALK5 в профиле ранних репродуктивных

потерь после ВРТ. Дифференциально экспрессируемые гены определяли с помощью двустороннего t-критерия (p <0,05) и кратности <0,5 и > 2 и отображали на тепловой карте с использованием GenePattern. GSEA была проведена на основе наборов генов KEGG, и для дальнейшего извлечения передовых подмножеств были выбраны наборы генов, которые соответствовали критерию коэффициента ложного обнаружения (FDR) <0,25.

Для количественной оценки результатов микропрепараты были сфотографированы в максимально возможном количестве неперекрывающихся полей зрения, полученных с использованием объектива x20 с разрешением 1600*1200 пикселей, при помощи микроскопа Leica и цифровой камеры Leica 425C. Экспрессия маркёров оценивалась количественно при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope_v9.1.19.1567. Программа калибровалась, после чего результаты иммуногистохимических реакций оценивались, исходя из показателя «позитивность» (в интерфейсе программы «positivity»). Для каждого случая рассчитывалось среднее значение позитивности всех изображений по правилам нахождения среднего.

Электронная база первичных данных создана с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2016. Обработку и анализ данных статистической информации проводили с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0 (Statistical Package for the Social Science).

Описательный анализ результатов исследования базировался на использовании методов вариационной статистики. В исследовании проведен анализ частотных характеристик (в %) для качественных параметров. Для количественных параметров мы определяли средние уровни показателей и проводили оценку их вариабельности и статистической значимости с помощью средней арифметической величины (M) и среднеквадратичного отклонения (м).

Сравнительный анализ и оценка существенности разницы между группами исследования при сравнении частотных характеристик

(качественных параметров) проводилась с использованием критерия Хи - квадрат. В случае сравнения признаков, которые редко выявлялись в исследуемых группах (5 и менее случаев) для оценки существенности межгрупповой разницы использовали точный критерий Фишера. Сравнительный анализ количественных параметров проведен с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для сравнения между группами.

На всех этапах статистического анализа проводилась проверка (оценка) статистической значимости результатов на уровне не ниже 95 % (риск погрешности не более 5 % – $p < 0,05$).

Для прогностической оценки влияния отдельных факторных признаков на вероятность репродуктивных потерь после ВРТ рассчитывали показатель отношения шансов (OR – odds ratio) и 95 % доверительный интервал с оценкой статистической значимости (p). Оценка характера взаимосвязей между исследуемыми клиническими показателями базировалась на применении корреляционно-регрессионного анализа. Для оценки силы связи в теории корреляции применяется шкала английского статистика Чеддока: слабая – от 0,1 до 0,3; умеренная – от 0,3 до 0,5; заметная – от 0,5 до 0,7; высокая – от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) – от 0,9 до 1,0.

ГЛАВА III. АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, СВЯЗАННЫХ С РАННИМИ РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

3.1. Этиологические факторы риска ранних репродуктивных потерь у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий на основе клинико-статистического анализа

Некоторые люди, которые раньше боролись с бесплодием, теперь имеют больше терапевтических шансов. В последние годы в области лечения бесплодия появилось много научных и технических достижений. Однако показатели успеха таких методов не показали значительного прогресса, несмотря на их использование за последнее десятилетие. Между тем, была обнаружена значительная разница между высокой степенью успешности овуляции после лечения и низкой частотой наступления беременности. Клиническое течение беременности у женщин после ВРТ является предметом многих научных исследований. Беременность с высокой степенью акушерского риска является вопросом малоизученным, а существующие по поводу этой темы публикации не дают однозначного ответа относительно роли различных этиологических факторов риска ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ. Изучили факторы риска беременности, включая возраст матери, индекс массы тела (ИМТ), гинекологические и соматические заболевания, этиологию бесплодия, реакцию на стимуляцию, качество и количество замененных эмбрионов и тип лечения.

Возраст женщин, вошедших в исследование, находился в диапазоне от 25 до 40 лет (таблица 1), из них в возрасте 25-29 лет 5% в группе исследования (ГИ) и 15% – в группе контроля (ГК). Возраст от 30 до 34 лет из женщин, принявших участие в исследовании, 55% были из ГИ и 68,33% из ГК. Возраст от 35 до 40 лет из женщин, принявших участие в исследовании, 23,3% были из ГИ и 15% из ГК. Возраст от 41 до 45 лет из женщин, принявших участие в исследовании, 16,67% были из ГИ и 1,67% из ГК.

Таблица 1

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от возраста

Возраст	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
25-29 лет	12	10,0	3	5,00	9	15,00
30-34 лет	74	61,7	33	55,00	41	68,33
35-40 лет	23	19,2	14	23,33	9	15,00
41-45 лет	11	9,2	10	16,67	1	1,67
M±m			35.3±4.6		32.8±3,2	
P			<0,05			

Среднестатистическое значение в ГИ составило 35.3±4.6 лет, в ГК – 32.8±3,2 лет. Анализ данных анамнеза показал прямую связь возникновения риска ранних репродуктивных потерь с возрастом женщин основной группы (p <0,05), беременность которых наступила после использование лечебных программ ВРТ в сравнении с женщинами, чья беременность протекала без каких-либо осложнений.

Пациентки ГИ оказались в среднем на несколько лет старше, чем женщины ГК. Так, среди женщин ГИ достаточно большой процент заняли беременные в возрасте более 40 лет. По нашему мнению, указанный факт связан с более высокой частотой экстрагенитальной патологии и высшим

процентом оперативных вмешательств по поводу заболеваний репродуктивной системы в данном возрастном периоде [20].

При определении веса исследуемых беременных по индексу массы тела (ИМТ), среди женщин с разным значением ИМТ не найдено достоверных отличий между основной группой и группой контроля (p>0,05) (табл. 2).

Таблица 2

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от ИМТ

Индекс массы тела, кг / м2	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
<20	9	7,5	4	6,67	5	8,33
20-26	65	54,2	32	53,33	33	55,00
26-30	40	33,3	20	33,33	20	33,33
30-40	3	2,5	2	3,33**	1	1,67
40 и более	3	2,5	2	3,33**	1	1,67
M±m			25,6±4,4		25,2±4,1	
P			>0,05			

Анализ данных показал, что у большинства женщин, вошедших в исследование. ИМТ соответствовал норме (18.5-24,9 кг/м2), у каждой 10-й женщины зарегистрирован дефицит массы тела (менее 18,5 кг/м2), у каждой 3-й отмечена избыточная масса тела (25-29,9 кг/м2), имели место случаи ожирения первой и второй степени (в соответствии 30,0-34,9 и 35,0-39,9 кг/м2).

Так, ИМТ <20 кг / м2 имели 7,5% женщин, принявших участие в исследовании, из них 6,67% были из ГИ и 8,33% из ГК. ИМТ 20-26 кг / м2 имели 54,2% женщин, принявших участие в исследовании, из них 53,3% были из ГИ и 55% из ГК. ИМТ 26-30 кг / м2 имели 40% женщин, принявших участие в исследовании, из них 33,3% были из ГИ и 33,3% из ГК. ИМТ 30-40 кг / м2 имели 2,5% женщин, принявших участие в исследовании, из них 3,3% были из ГИ и 1,67% из ГК. ИМТ 40 и более кг / м2 имели 2,5% женщин, принявших участие в исследовании, из них 3,3% были из ГИ и 1,67% из ГК.

Среднестатистическое значение в ГИ составило 25,6±4,4 лет, в ГК – 25,2±4,1 кг / м2. Анализ данных анамнеза показал не выявил связи возникновения риска ранних репродуктивных потерь с ИМТ женщин ГИ в сравнении с женщинами КГ (р >0,05), тем не менее у части женщин ГИ выявлено преобладание избыточной массы тела 30 кг/м2 и более, чем в ГК (р<0,05), что может в отдельных случаях влиять на развитие ранних репродуктивных потерь после ВРТ [20].

Абсолютное большинство женщин, вошедших в исследование, жили в городе и состояли в зарегистрированном браке. По месту жительства и семейному положению группы женщин были однородными.

Профессиональная принадлежность и вид трудовой деятельности пациенток исследуемых групп представлен в таблице 3.

Каких-либо статистически значимых различий в направлении профессиональной принадлежности и вида трудовой деятельности между ГИ и контрольной группой нам обнаружить не удалось. Обращает на себя внимание больший процент пациенток обеих групп, занимавшихся умственным трудом (служащие, врачи, научные сотрудники, служащие государственных учреждений).

Таблица 3

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от профессиональной принадлежности и вида трудовой деятельности

Профессия	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Работник прессы	4	3,33	1	1,67	3	5,00
Преподаватель	12	10,00	5	8,33	7	11,67
Врач	16	13,33	7	11,67	9	15,00
Домохозяйка	25	20,83	12	20,00	13	21,67
Работа, связанная с физическим трудом	28	23,33	15	25,00	13	21,67
Служащий государственн ого учреждения	28	23,33	16	26,67	12	20,00
Научный сотрудник	7	5,83	4	6,67	3	5,00

Также можно проследить тенденцию к большему проценту женщин, занимавшихся физическим трудом, среди пациенток ГИ, однако статистически значимого уровень показателей основной и контрольной групп не достигнут.

Осуществить анализ наличия вредных привычек оказалось невозможным в связи с тем, что данная информация отсутствовала в медицинских картах исследуемых женщин.

Анализируя характер менструального цикла пациенток исследуемых групп нами установлено, что средний возраст менархе у женщин основной группы составил 12,7±1,1 лет по сравнению с группой контроля – соответственно 11,8±1,3 лет (p>0,05). У подавляющего числа женщин, которые были включены в исследование, менструальный цикл установился сразу (p>0,05). При изучении функциональных особенностей менструального цикла мы не выявили прямой корреляционной связи между характером его нарушений и возникновением ранних репродуктивных потерь после применения лечебных программ ВРТ.

Болезненные менструации отмечали 35 (58,33%) пациенток ГИ и 28 (46,67%) пациенток контрольной группы (p>0,05). Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от характера менструального цикла

Характеристика менструального цикла	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Олигоменорея	21	17,50	10	16,67	11	18,33
Метроррагия	9	7,50	4	6,67	5	8,33

Альгодисменорея	63	52,50	35	58,33	28	46,67
Меноррагия	27	22,50	11	18,33	16	26,67

Нарушение менструального цикла отмечали 10 (16,67%) пациенток ГИ и 11 (18,33%) пациенток контрольной группы (p>0,05). Наличие метроррагии отмечали 4 (6,67%) пациенток ГИ и 5 (8,33%) пациенток контрольной группы (p>0,05). Обильное и длительное кровотечение во время менструации отмечены у 11 (18,3%) пациенток ГИ и 16 (26,7%) пациенток контрольной группы (p>0,05).

Средняя продолжительность менструального цикла до лечения бесплодия методами ВРТ составляла 28±2,5 дня у пациенток ГИ, 27,6±2,5 дня у пациенток ГК (p>0,05) (табл. 5).

Раннюю половую жизнь (до 18 лет) начали 60 (50%) испытуемых – 32 (53,3 %) обследованных женщин ГИ и 28 (46,7 %) женщин ГК (p>0,05).

Таблица 5

Продолжительность менструального цикла у женщин исследуемых групп до лечения бесплодия методами ВРТ

Продолжительность менструального цикла	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
21-24 дня	9	7,50	4	6,67	5	8,33
25-27 дней	45	37,50	18	30,00*	27	45,00

28-30 дней	55	45,83	34	56,67**	21	35,00
31-33 дня	9	7,50	4	6,67	5	8,33
M±m			28±2,5		27,6±2,5	
P			>0,05			

Примечания: * - достоверность показателей на уровне p<0,05, ** - достоверность показателей на уровне p<0,001.

Наличие гинекологической патологии у подавляющего большинства беременных с ранними репродуктивными потерями после ВРТ не выявила прямых параллелей корреляционной зависимости с такими заболеваниями, как врожденные пороки развития женских половых органов (3,33% в ГИ и 8,33% в ГК, p>0,05) (табл. 6).

Таблица 6

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от структуры гинекологической патологии

Данные гинекологического анамнеза	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Отсутствует	23	19,17	0	0,00	23	38,3
Миома матки	10	8,33	7	11,67**	3	5,00
Воспалительные процессы влагалища	29	24,17	22	36,67*	7	11,67

Данные гинекологического анамнеза	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Патология шейки матки	25	20,83	18	30,00*	7	11,67
Врожденные пороки развития женских половых органов	7	5,83	2	3,33	5	8,33
Оперативные вмешательства на органах малого таза, брюшной полости	28	15,00	17	28,33**	11	18,33
Эндометриоз	13	10,83	9	15,00*	4	6,67

Примечания: * - достоверность показателей на уровне p<0,001, ** - достоверность показателей на уровне p<0,05.

Статистически значимыми факторами ранних репродуктивных потерь у женщин ГИ, по полученным в процессе исследования данным, являются воспалительные процессы влагалища (36,67% в ГИ и 11,67% в ГК, p <0,001), эндометриоз (15% в ГИ и 6,67% в ГК, p <0,001), миома матки (11,67% в ГИ и 5% в ГК, <0,05) и патология шейки матки (30% в ГИ и 11,67% в ГК, p <0,001).

Совокупность этих неблагоприятных факторов оказывает негативное влияние на реализацию репродуктивной функции и в значительной степени повышает риски развития таких серьезных осложнений как: плацентарная дисфункция, задержка внутриутробного развития плода и послеродовые кровотечения [5]. Вероятно, наличие скрытых очагов хронических инфекций,

которые имеют латентное течение на фоне воспалительных процессов женских половых органов и нелеченой патологии шейки матки в значительной степени увеличивает риск иммунного дисбаланса [9], как одного из предикторов ранних репродуктивных потерь у пациенток после ВРТ.

Выявлена значительная доля гиперпролиферативных заболеваний: частота миомы матки в гинекологическом анамнезе зафиксирована в 7 (11,67%) медицинских картах пациенток с ранними репродуктивными потерями после ВРТ, что более чем в 2 раза чаще, чем у женщин контрольной группы ($p<0.05$). Следует отметить, что у каждой 6 пациентки ГИ диагностирован генитальный эндометриоз ($p<0.05$). Оперативные вмешательства по поводу гинекологических заболеваний отмечены у 17 (28,33%) случаях в ГИ и у 11 (18,33 %) в ГК ($p<0.05$), что подтверждает ведущую роль длительной персистенции инфекционных факторов в основе бесплодия инфекционного генеза с возможным аутоиммунным поражением и нарушением циклической трансформации и рецептивности эндометрия.

Наиболее распространенным видом оперативного вмешательства в анамнезе обследованных пациенток обеих групп были кистектомия (5%) и операции на маточных трубах (5,83%), в том числе по поводу внематочной беременности, гидро- и пиосальпинксов (табл. 7).

Таблица 7

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от структуры гинекологической патологии

Данные гинекологического анамнеза	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Оперативные вмешательства на органах малого таза, брюшной полости, из них	28	23,3	17	28,33**	11	18,33
Кистектомия, в частности резекция яичника	6	5,00	3	5,00	3	5,00
Разъединение спаек	13	10,83	10	16,67*	3	5,00
Операции на маточных трубах, в том числе по поводу внематочной беременности	7	5,83	3	5,00	4	6,67
Миомэктомия	2	1,67	1	1,67	1	1,67

Примечания: * - достоверность показателей на уровне $p<0,001$, ** - достоверность показателей на уровне $p<0,05$.

Согласно данным медицинских карт операции по поводу спаечного процесса в малом тазу встречались в 3 раза чаще в ГИ против ГК ($p<0,001$). Стоит отметить, что у женщин старшей возрастной группы оперативные вмешательства встречались вдвое чаще, против данных у молодых пациенток при единичных случаях в контрольной группе ($p<0,05$).

Очевидным остается факт, что спаечная болезнь, нарушение кровоснабжения придатков после операций на маточных трубах, а также операционная травма яичниковой ткани, без сомнения, осуществлять свой повреждающий влияние на параметры овариального резерва и стероидогенеза, что косвенно меняло гормональный фон и условия для физиологического формирования имплантационного потенциала эндометрия у части женщин ГИ.

Во время анализа анамнестических данных соматической патологии обращали внимание на перенесенные заболевания, которые могут иметь непосредственное и опосредованное влияние на становление и функционирование репродуктивной системы. Анализ характера и структуры экстрагенитальной патологии у женщин после ВРТ предоставил возможность выделить группу хронических воспалительных заболеваний мочевыделительной системы с латентным течением, которые в значительной степени влияют на рост рисков ранних репродуктивных потерь (табл. 8).

Таблица 8

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от структуры и частоты экстрагенитальной патологии

Экстрагенитальная патология	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Отсутствует	27	22,50	0	0,00	27	45,00*
Заболевания желудочно-кишечного тракта	12	10,00	7	11,67	5	8,33

Экстрагенитальная патология	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Заболевания органов дыхания (хронические)	32	26,67	18	30,00	14	23,33
Заболевания мочевыделительной системы (хронические)	23	19,17	20	33,33*	3	5,00
Заболевания сердечно-сосудистой системы	11	9,17	6	10,00	5	8,33
Заболевания кроветворной системы	7	5,83	4	6,67	3	5,00
Заболевания эндокринной системы	8	6,67	5	8,33	3	5,00
Метаболический синдром	11	16,67	7	11,67**	4	5,00

Примечания: * - достоверность показателей ГИ по сравнению с ГК на уровне $p<0,001$, ** - достоверность показателей ГИ по сравнению с ГК на уровне $p<0,05$.

В медицинских картах беременных с отягощенным соматическим анамнезом преобладали пациентки с заболеваниями мочеполовых путей и респираторного тракта. Представленные показатели подтверждают существенную роль инфекционной патологии в этиопатогенезе

невынашивания беременности. Обращает на себя внимание удельный вес заболевания эндокринной системы, сердечно-сосудистых заболеваний и ЖКТ.

Самыми распространенными формами заболеваний мочевыделительной системы, согласно полученным данным анализа обменных карт беременных, оказались: бессимптомная бактериурия, хронический пиелонефрит, многократно рецидивирующий цистит.

Все формы указанной экстрагенитальной патологии, которые мы изучали, имели субклиническое течение, беременные не предъявляли жалоб на момент госпитализации в акушерский стационар.

Наличие сопутствующей экстрагенитальной патологии подтверждена консультативными заключениями осмотра смежных специалистов при плановом консультировании беременных, пациентки отмечали их существование во время сбора анамнестических данных.

Для уточнения характера экстрагенитальной патологии использовали дополнительные методы исследования в зависимости от профиля патологии для каждой пациентки.

Особенностью последних лет является увеличение удельного веса сочетанной соматической патологии и все более глубокое распространение в популяции экстрагенитального заболевания, так называемого метаболического синдрома с клиническими признаками четко определенного симптомокомплекса.

Стоит отметить, что нарушение жирового обмена, которое проявляется избыточным или недостаточным весом тела у женщин, включенных в программу ВРТ, встречалось в 16,67% случаев. Выявленные данные, безусловно, свидетельствуют о значительном влиянии отягощенного гинекологического и соматического анамнезов на показатели репродуктивных потерь.

Проанализировав данные с обменных карт, мы выяснили ведущие факторы бесплодия у контингента женщин, которые были включены в исследование. В таблице 9 представлено в абсолютном и процентном

соотношении количество ведущих факторов инфертильности пациенток, которым проведено эффективное лечение с использованием новейших технологий ВРТ, что завершилось наступлением клинической беременности.

Итак, статистический анализ первичной документации пациенток указывает на тот факт, что основной причиной использования программ ВРТ среди исследуемого контингента женщин выступает сочетанный фактор бесплодия – 44,2% (45% среди женщин ГИ и 43,3% среди женщин ГК), второе место среди причин потери фертильности занимает трубно-перитонеальный фактор – 30,8% (33,3% среди женщин ГИ и 28,3% среди женщин ГК) и 25% (21,67% среди женщин ГИ и 28,3% среди женщин ГК) составляет эндокринное бесплодие.

Таблица 9

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от ведущего фактора бесплодия

Ведущие факторы бесплодия	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Эндокринный фактор	30	25,0	13	21,67	17	28,33
Трубно-перитонеальный фактор	37	30,8	20	33,33	17	28,33
Сочетанный фактор	53	44,2	27	45,00	26	43,33

Продолжительность бесплодия у женщин исследуемых групп представлена в таблице 10. Полученные данные свидетельствуют о значительном проценте бесплодия продолжительностью от 3 до 5 лет среди пациенток всех исследуемых групп.

Наибольший удельный вес срок бесплодия 3-5 лет составил в ГИ – 46,67%, тогда как в контрольной группе срок бесплодия 3-5 лет выявлен у 43,3%.

Таблица 10

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от продолжительности бесплодия

Срок бесплодия	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
До 2 лет	9	7,5	2	3,3	7	11,67
3-5 лет	54	45,0	28	46,67	26	43,3
6-9 лет	38	31,7	18	30,0	20	33,3
Более 10 лет	19	15,8	12	20,0*	7	11,67
M±m			6,8±3,5		6,0±2,9	
P			>0,05			

Примечания: * - достоверность показателей ГИ по сравнению с ГК на уровне p<0,001,

Удельный вес срок бесплодия до 2 лет составил в ГИ – 3,3%, тогда как в ГК срок бесплодия до 2 лет выявлен у 11,67%. Удельный вес срок бесплодия 6-9 лет составил в ГИ – 30%, тогда как в контрольной группе срок бесплодия 6-9 лет выявлен у 33,3%. Удельный вес срок бесплодия более 10 лет составил в ГИ – 20%, тогда как в ГК срок бесплодия более 10 лет выявлен у 11,67%.

Среднестатистическое значение срока бесплодия в ГИ составило 6,8±3,5 лет, в ГК – 6,0±2,9 лет. Анализ данных анамнеза показал связь возникновения риска ранних репродуктивных потерь с сроком бесплодия у женщин основной группы ($p < 0,05$), беременность которых наступила после использование лечебных программ ВРТ в сравнении с женщинами, чья беременность протекала без каких-либо осложнений. При этом чем выше был срок бесплодия, тем больше вероятность возникновения риска ранних репродуктивных потерь.

Мы так же проанализировали статистику и виды бесплодия у пациенток исследуемых групп до лечения методами ВРТ. Данные приведены в таблице 11.

Таблица 11

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от вида бесплодия

Вид бесплодия	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Первичное бесплодие	64	53,3	23	38,3	41	68,3*
Вторичное бесплодие	56	46,67	37	61,67*	19	31,67

Примечание. * - достоверная разница между основной и контрольной группами, $p<0,001$.

Так, первичное бесплодие преобладает среди испытуемых и выявлено у 53,3% женщин (38,3% среди женщин ГИ и 68,3% среди женщин ГК), вторичное бесплодие выявлено у 46,7% женщин (61,7% среди женщин ГИ и 31,7% среди женщин ГК). По полученным данным мы выявили преобладание вторичного бесплодия в сравнении с первичным среди причин вероятности возникновения риска ранних репродуктивных потерь у женщин, беременность которых наступила после использование лечебных программ ВРТ.

Анализ последствий предыдущих беременностей у обследованных женщин с вторичным бесплодием свидетельствует в пользу весомых рисков акушерских и перинатальных осложнений (табл. 12). Следует отметить что женщины ГИ, по сравнению с КГ, имеют высокий процент ранних репродуктивных потерь в виде самопроизвольного выкидыша в анамнезе (18,3% в ГИ против 5% в ГК, $p<0,001$), это можно объяснить большим количеством перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза и хирургическими манипуляциями на шейке матки.

Таблица 12

Исходы беременностей у женщин, которые имели вторичное бесплодие

Исходы беременностей	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Артифициальный аборт	9	7,50	7	11,67*	2	3,33
Самопроизвольный выкидыш	14	11,67	11	18,33*	3	5,00

Беременность, которая не развивается	17	14,17	8	13,33	9	15,00
Преждевременные роды в анамнезе	9	7,50	6	10,00	3	5,00
Срочные роды в анамнезе	7	5,83	5	8,33	2	3,33

Примечание. * - достоверная разница между основной и контрольной группами, p<0,001.

На пользу отягощенного репродуктивного анамнеза у женщин ГИ свидетельствуют процентные показатели случаев артифициального аборта (11,67% в ГИ против 3,33% в ГК, p<0,001).

Вероятно, риск ранних репродуктивных потерь зависит в некоторой степени и от метода ВРТ (табл. 13), который был избран с целью лечения инфертильности и количества предыдущих неэффективных лечебных циклов в протоколах.

Таблица 13

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от выбора методов ВРТ

Метод ВРТ	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
IVF (in vitro fertilization) ЭКО	47	39,12	16	26,67	31	51,67*

Метод ВРТ	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
ICSI (intracytoplasmic sperm injection) ИКСИ	57	47,5	35	58,33*	22	36,67
ВМИ (внутриматочная инсеминация)	11	9,17	7	11,67	4	6,67
Blastocyst vs. early cleavage stage (перенос бластоцисты в полость матки)	5	4,17	2	3,33	3	5,00

Примечание. * - достоверная разница между основной и контрольной группами, p<0,001.

Проведенный нами ретроспективный анализ лечебных методик восстановления фертильности у женщин, которые были включены в исследование, указывает на вероятную связь риска ранних репродуктивных потерь с методикой ИКСИ. Полученные данные свидетельствуют, что беременность 58,33% женщин ГИ, у которых были зафиксированы случаи ранних репродуктивных потерь, беременность наступила именно после использования лечебной программы ВРТ в виде методики ИКСИ, тогда как среди женщин ГК беременность наступила в результате применения методики ИКСИ только у 36,67% женщин (p<0,001). Беременность 26,67% женщин ГИ, у которых были зафиксированы случаи ранних репродуктивных потерь, беременность наступила после использования методики IVF, среди женщин

ГК беременность наступила в результате применения методики IVF у 51,67% женщин (p<0,001).

Беременность 11,67% женщин ГИ, у которых были зафиксированы случаи ранних репродуктивных потерь, беременность наступила после использования методики ВМИ, среди женщин ГК беременность наступила в результате применения методики ВМИ у 6,67% женщин. Беременность остальных 3,33% женщин ГИ, у которых были зафиксированы случаи ранних репродуктивных потерь, беременность наступила после использования методики переноса бластоцисты в полость матки, среди женщин ГК беременность наступила в результате применения данной методики у 5% женщин.

Эффективность лечения инфертильности, по данным мировой литературы, составляет от 23 до 47% [138], следовательно, пациентки с бесплодием в анамнезе, особенно при его длительности более 5 лет, неоднократно вынуждены проходить повторные циклы ВРТ (табл. 14).

Таблица 14

Распределение женщин, которые были включены в ретроспективный клинико-статистический анализ, в зависимости от количества циклов ВРТ

Цикл ВРТ	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
1 попытка	32	26,67	8	13,33	24	40,00*
2 попытки	37	30,83	18	30,00	19	31,67
3 попытки	43	35,83	28	46,67*	15	25,00

Цикл ВРТ	Всего (n=120)		Группа исследования (n=60)		Группа контроля (n=60)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
4 и более попыток	8	6,67	6	10,00*	2	3,33

Примечание. * - достоверная разница между основной и контрольной группами, p<0,001.

Как показано в таблице 14, 8 (13,3 %) женщин ГИ имели в анамнезе одну попытку ВРТ, в то время как у 18 (30 %) пациенток уже были две неудачные предыдущие попытки, а 28 (46,67 %) имели три попытки и у 6 (10 %) женщин – отмечено более четырех неудачных попыток. Обращает внимание тот факт, что более половины женщин, у которых диагностированы ранние репродуктивные потери, имели в анамнезе 3 и более попыток ВРТ. Среди беременных ГК одну попытку ВРТ имели в анамнезе 24 (40%) женщин, в то время как у 19 (31,67 %) пациенток уже были две неудачные предыдущие попытки, 15 (25 %) имели три попытки и у 2 (3,3 %) женщин – отмечено более четырех неудачных попыток [230].

Полученные нами данные клинико-анамнестических особенностей позволили провести оценку значимости ведущих факторов и прогнозировать риск развития ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ (табл. 15).

Клинико-анамнестический анализ в группе женщин ранних репродуктивных потерь после ВРТ, за период обследования выявлен ряд медицинских факторов, которые могли спровоцировать невынашивание беременности, и дают возможность прогнозировать риск осложненного течения 1 триместра гестации.

Таблица 15

Прогностическая оценка особенностей анамнеза и течения индуцированной беременности у женщин с ранними репродуктивными потерями

Факторы	r	P
Возраст старше 35 лет	0,264	p<0,001
Избыточная масса тела 30 кг / м2 и более	0,213	p<0,05
Расстройства оварио-менструального цикла в виде продолжительности более 28 дней	0,238	p<0,05
Миома матки	0,233	p<0,05
Воспалительные процессы влагалища	0,433	p<0,001
Патология шейки матки	0,344	p<0,001
Оперативные вмешательства на органах малого таза, из них:	0,332	p<0,05
Разъединение спаек		p<0,001
Эндометриоз		p<0,001
Заболевания мочевыделительной системы (хронические)	0,462	p<0,001
Метаболический синдром	0,438	p<0,05
Срок бесплодия более 10 лет	0,247	p<0,001
Вторичное бесплодие	0,366	p<0,001

Факторы	r	P
Артифициальный аборт в анамнезе	0,327	p<0,001
Самопроизвольный выкидыш в анамнезе	0,217	p<0,001
Метод ВРТ ICSI (intracytoplasmic sperm injection) ИКСИ	0,222	p<0,001
3 и более неудачных попыток ВРТ	0,357	p<0,001

Данные ретроспективного анализа свидетельствуют, что важными факторами развития ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ могут быть: возраст женщин (r=0,264, p<0,001), избыточная масса тела (r=0,213, p<0,05) и метаболический синдром (r=0,438, p<0,001), расстройства оварио-менструального цикла (r=0,238, p<0,05), оперативные вмешательства на органах малого таза (r=0,332, p<0,001), хронические заболевания мочевыделительной системы (r=0,462, p<0,001), длительный срок бесплодия (r=0,247, p<0,001), его вторичное развитие (r=0,366, p<0,001), артифициальный аборт (r=0,327, p<0,001) и самопроизвольный выкидыш в анамнезе (r=0,217, p<0,001), 3 и более неудачных попыток ВРТ (r=0,357, p<0,001), наиболее часто проведенные с помощью метода ICSI (r=0,222, p<0,001).

Все вышеизложенное позволяет предположить, что ранние репродуктивные потери после ВРТ являются следствием действия большого количества патологических причин с реализацией разнообразных часто перекрестных, патофизиологических путей, поэтому выделить доминирующий этиологический фактор существующими методами диагностики не всегда возможно. В большинстве случаев это комбинация нескольких причин, которые могут действовать одновременно или последовательно.

Нами установлены наиболее весомые комбинации ведущих факторов вероятного развития ранних репродуктивных потерь после ВРТ у данной категории пациенток. Среди них: комбинация срока бесплодия и фактором бесплодия (r=0,459), а также количеством попыток ВРТ (r=0,297); между видом бесплодия и исходом предыдущих беременностей (r=0,873).

Кроме этого, привычное невынашивание, высокая доля внутриматочных вмешательств (гистероскопия, медикаментозные и инструментальные аборты) и внутренний эндометриоз повышали риск ранних репродуктивных потерь; высокий индекс массы тела и более трех неудачных попыток ВРТ в анамнезе увеличивало риск ранних репродуктивных потерь; сочетание позднего репродуктивного возраста с продолжительностью бесплодия более 10 лет, наличием более трех неудачных попыток ВРТ и оперативных вмешательств на органах малого таза увеличивало риск возникновения ранних репродуктивных потерь.

3.2. Иммуногистохимическое исследование децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях на выявление экспрессии протеина ALK5

Нами впервые было проведено иммуногистохимическое исследование децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях с целью выявления экспрессии протеина ALK5. В качестве контроля была использована децидуальная ткань после искусственного аборта, проведенного во время нормально протекающей беременности. Образцы ткани были получены при медикаментозном аборте у женщин с физиологическим течением беременности (20 образцов) и при самопроизвольном прерывании беременности после ВРТ (20 образцов) в первом триместре беременности.

На рисунках 1-3 представлены образцы TGFBR1 в децидуальной ткани абортивного материала при ранних репродуктивных потерях.

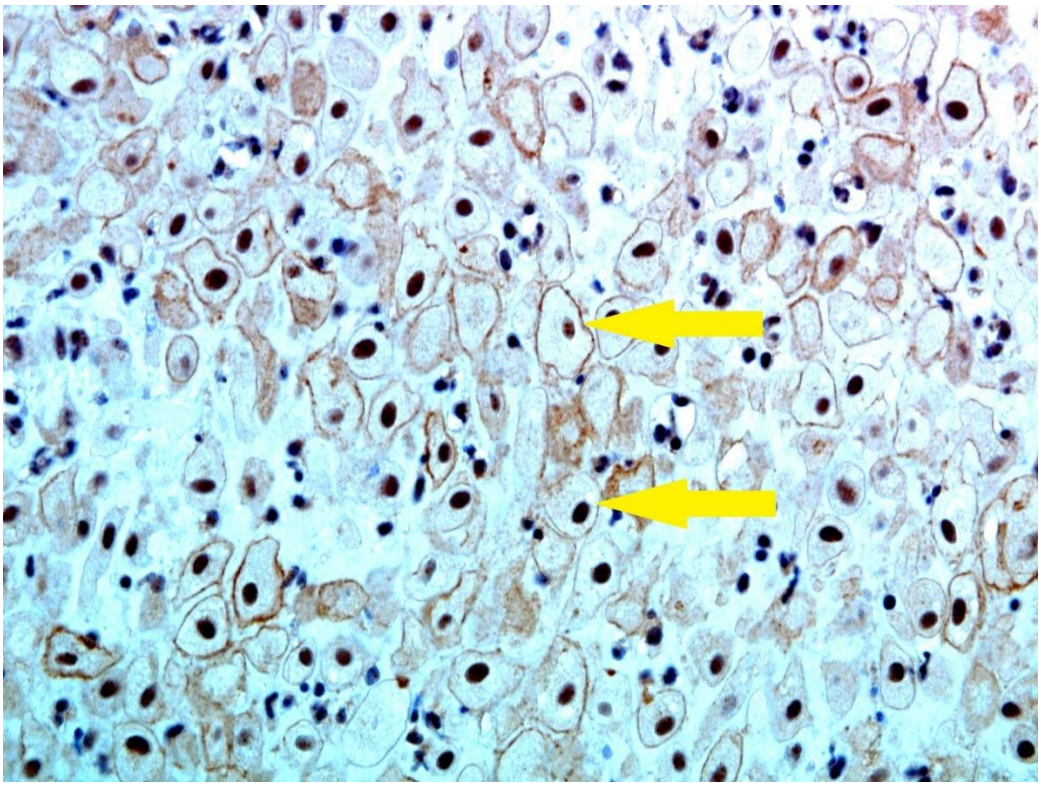


Рис. 1 TGFBR1 в децидуальных клетках, X400

Согласно результатам иммуногистохимического исследования децидуальной ткани абортивного материала в группе женщин при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ при сравнении децидуальной ткани абортивного материала в группе женщин при нормальной беременности выявлено статистически значимое достоверное отличие в степени положительной экспрессии протеина ALK5 в децидуальной ткани двух групп пациенток.

В соскобе из полости матки наблюдаются мелкие фрагменты эндометрия с лимфоплазмоцитарной инфильтрацией стромы с примесью нейтрофильных лейкоцитов и умеренным числом желез с реакцией Ариас-Стелла. Реакция Ариаса-Стеллы – это связанное с гормонами атипичное изменение эндометрия, характеризующееся гипертрофией и вакуолизацией железистых эпителиальных клеток, связанным с выраженным ядерным плеоморфизмом, увеличением и гиперхромазией.

Рис. 2 Выраженная экспрессия TGFBR1 в трофобласте ворсин хориона, Х400

Характерные гистологические особенности реакции Ариаса-Стеллы включают крупные клетки с обильной эозинофильной или вакуолизированной цитоплазмой, ядерное увеличение и гиперхромазию. Внешний вид гипертрофических ядер может широко варьироваться от круглых или яйцевидных ядер с везикулярным рисунком хроматина до неправильных ядер с компактным пикнотическим рисунком. Некоторые варианты демонстрируют заметные внутриядерные цитоплазматические инвагинации или псевдовключения. Ядра могут выступать в просвет железы, создавая вид «шиповника». Возможна потеря полярности клеток с появлением папиллярных выступов и вздутий эпителия. Митотическая активность обычно отсутствует [50; 51].

Наряду с этим в исследованном объеме материала отмечаются множественные фрагменты ткани плаценты представленной ворсинами хориона покрытыми трофобластом с разделением на синцитио- и цитотрофобласт.

Кроме того, определяются многочисленные фрагменты децидуальной ткани с выраженными дистрофическими изменениями децидуальных клеток и очаговой инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами с примесью нейтрофильных лейкоцитов с очагами мелкоглыбчатых распадов.

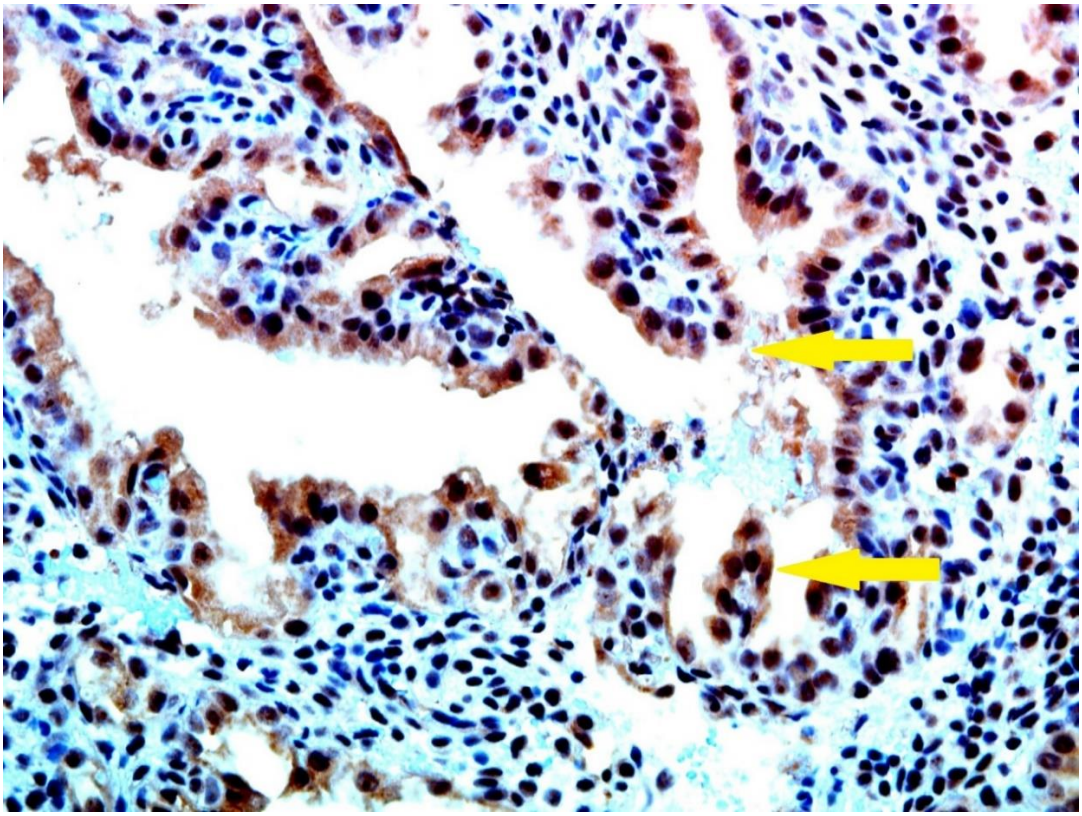


Рис. 3 TGFBR1 в эпителии желез эндометрия, Х400

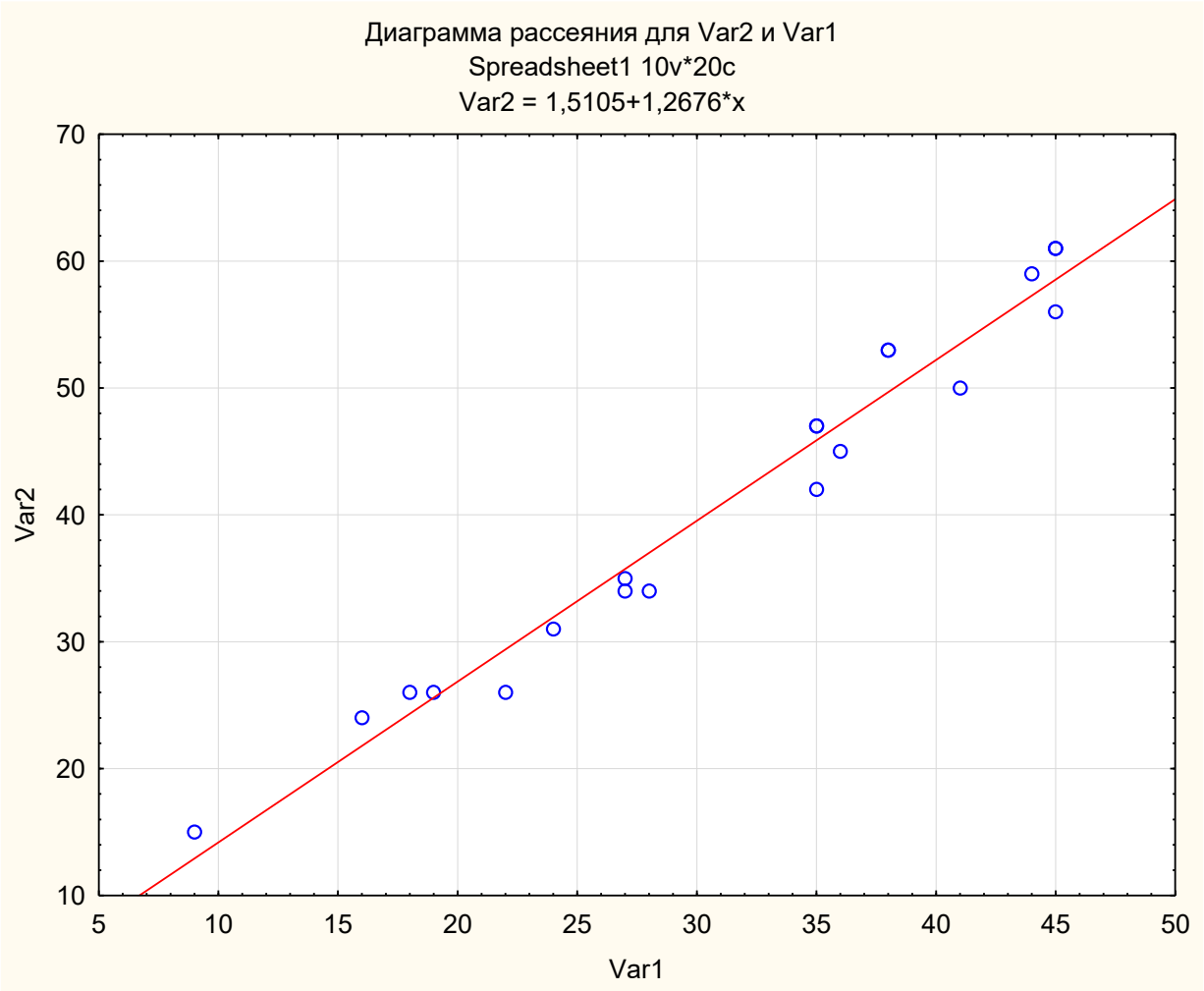
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в децидуальных клетках – от 31,38±11,65 до 39,88±13,8 в поле зрения, в клетках синцитиотрофобласта – от 35,25±8,55 до 43,69±9,34 в поле зрения, в эпителии желез эндометрия – от 24,31±7,25 до 30,75±7,46 в поле зрения, в клетках стромы эндометрия – от 3,63±2,73 до 6,06±3,19 в поле зрения (табл. 16).

Таблица 16

Сравнение показателей уровня положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте

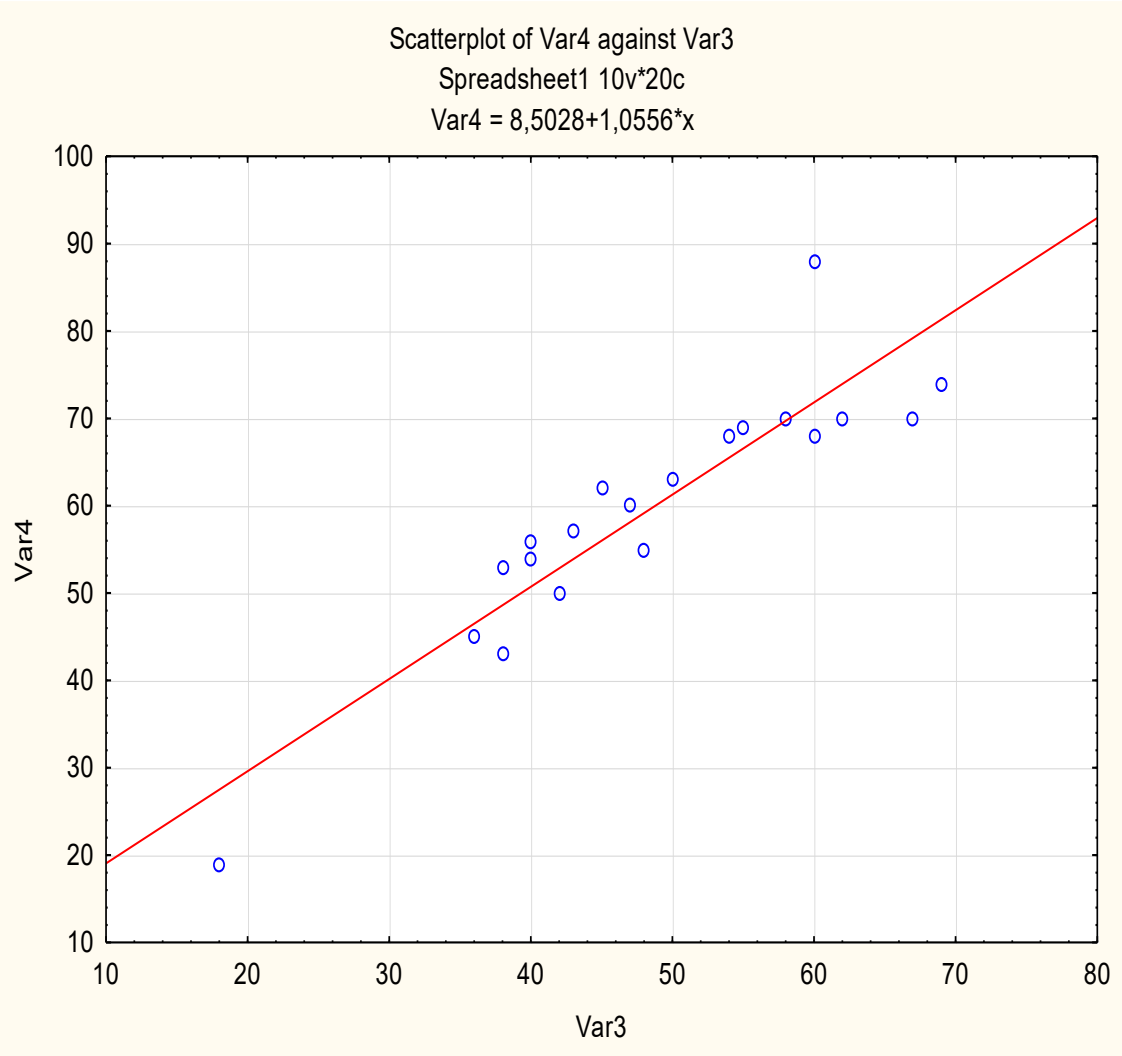
Ткань	Группа				P
	ГИ (n=20)		ГК (n=20)		
	min	Max	min	Max	
Децидуальные клетки	31,38±11,65	39,88±13,8	48,5±12,4	59,77±14,3	<0.001
Клетки синцитиотрофобласта	35,25±8,55	43,69±9,34	52,13±7,9	63,52±10,14	<0.001
Эпителий желез эндометрия	24,31±7,25	30,75±7,46	38,4±5,66	41,51±8,14	<0.001
Фибробласты стромы эндометрия	3,63±2,73	6,06±3,19	34,31±8,5	40,52±10,7	<0.001

Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при нормальной беременности составила в децидуальных клетках от 48,5±12,4 до 59,77±14,3 в поле зрения, в клетках синцитиотрофобласта – от 52,13±7,9 до 63,52±10,14 в поле зрения, в эпителии желез эндометрия – от 38,4±5,66 до 41,51±8,14 в поле зрения, в клетках стромы эндометрия – от 34,31±8,5 до 40,52±10,7в поле зрения (рис. 4-7).



Группа исследования

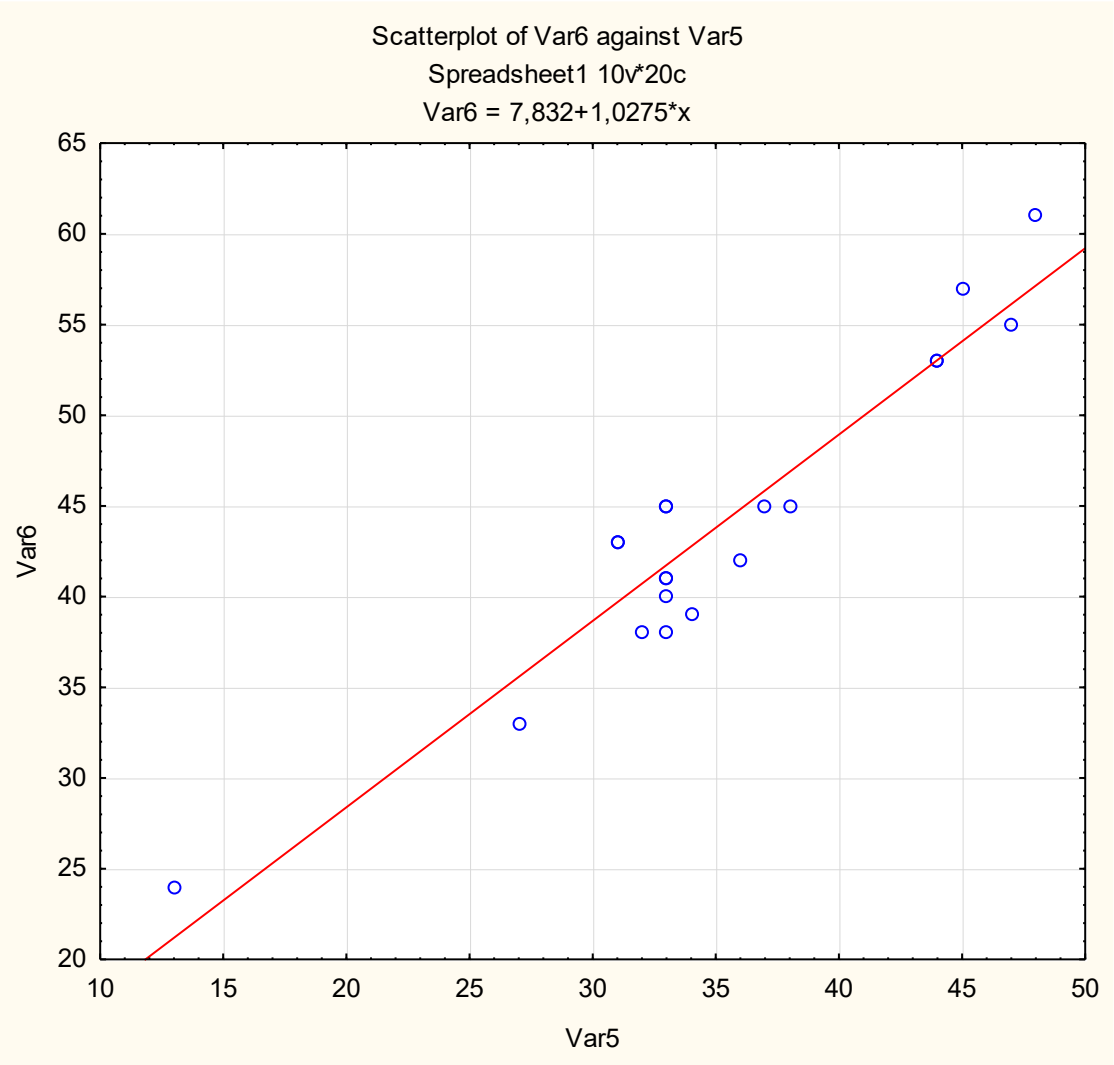
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в децидуальных клетках – от 31,38 до 39,88 в поле зрения.



Группа контроля

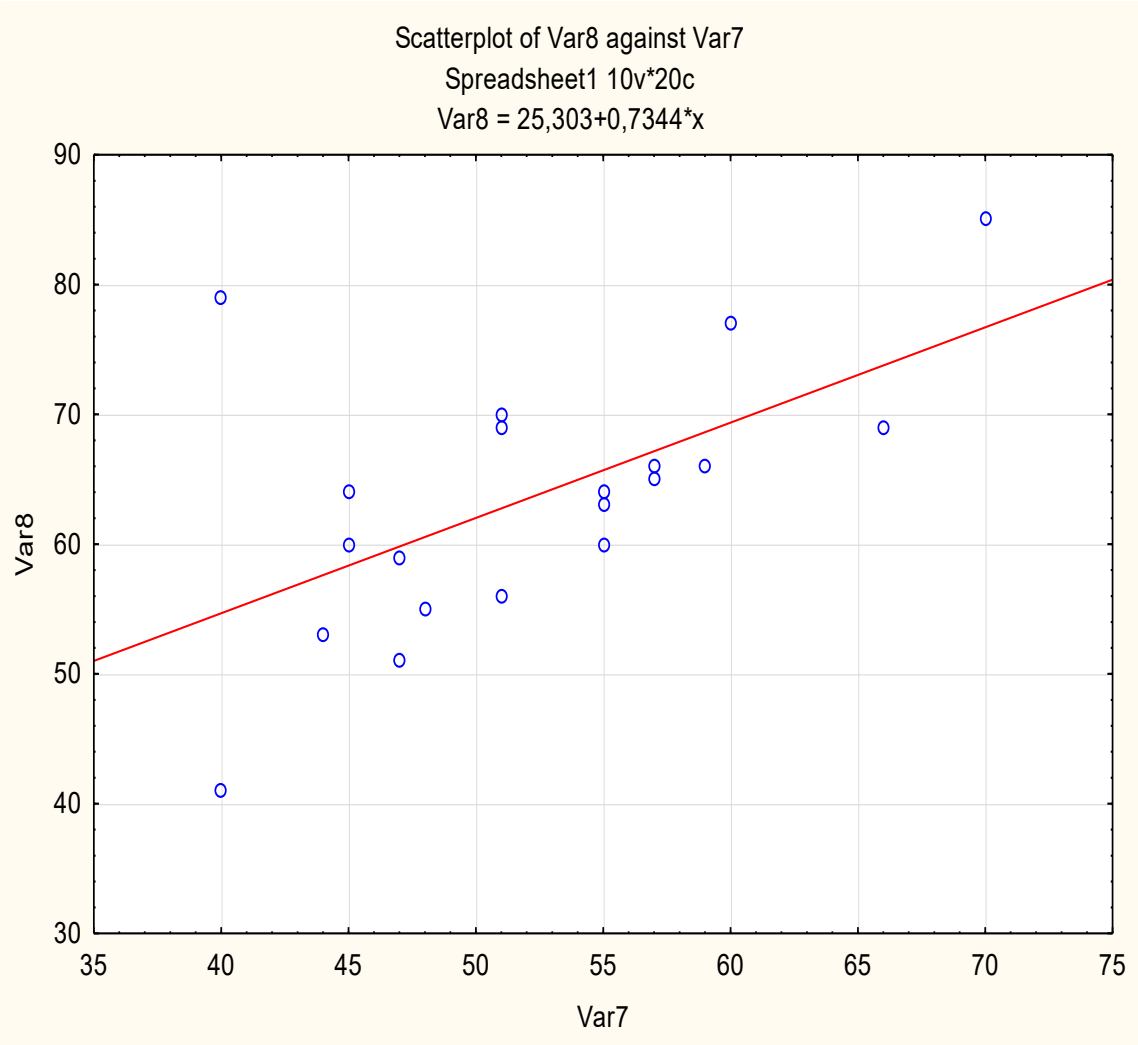
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при нормальной беременности составила в децидуальных клетках от 48,5 до 59,77 в поле зрения.

Рис. 4. Сравнение показателей уровня положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте (Децидуальные клетки)



Группа исследования

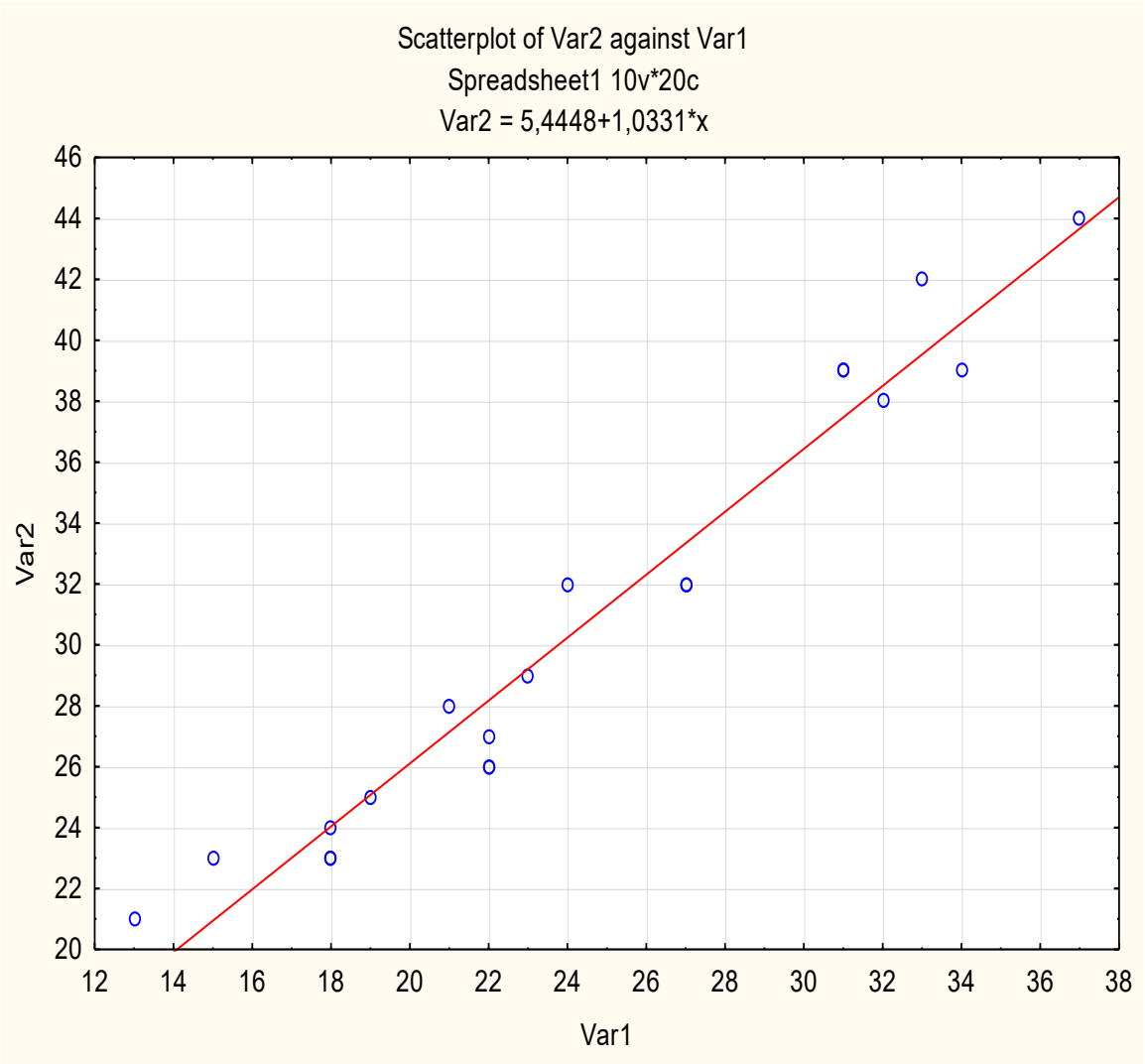
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в клетках синцитиотрофобласта – от 35,25 до 43,69 в поле зрения



Группа контроля

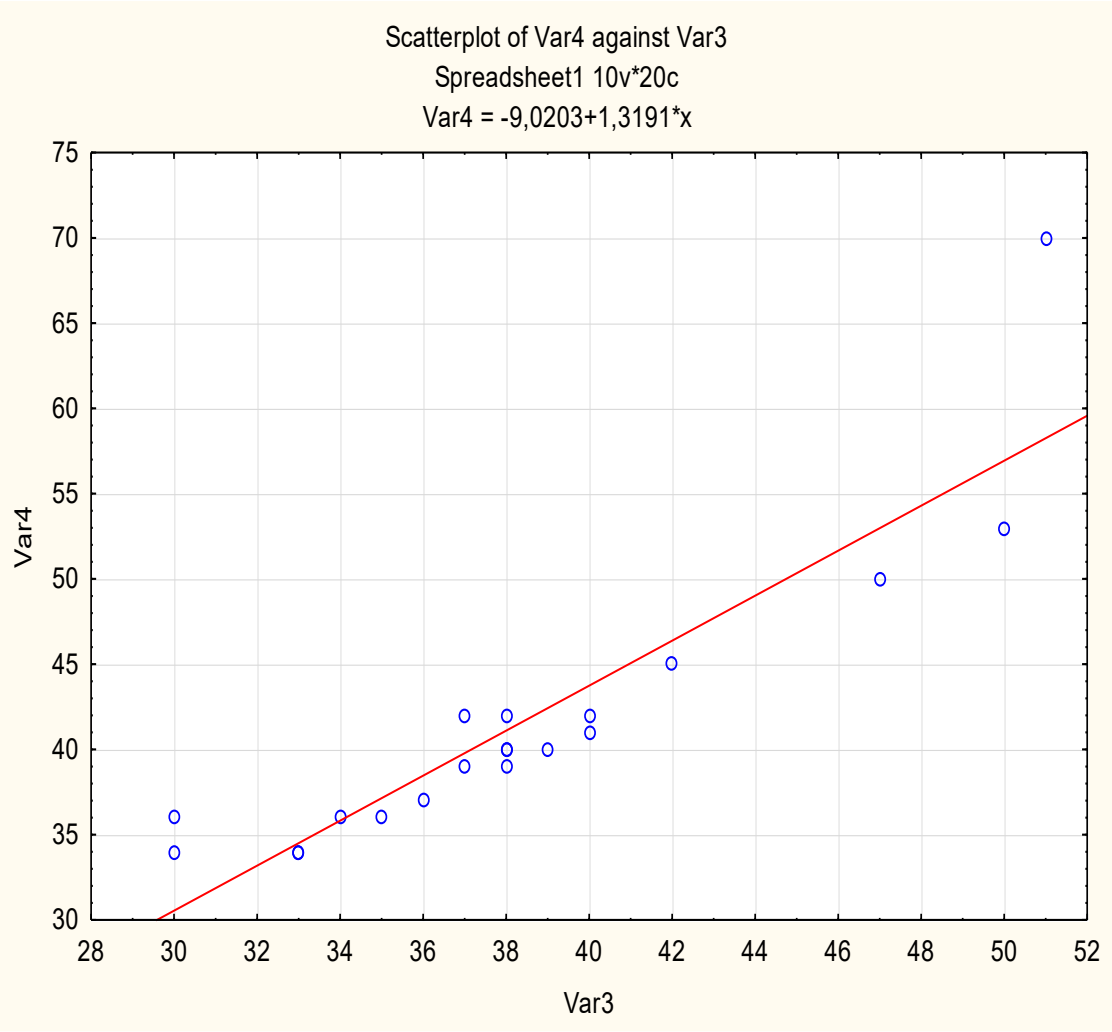
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при нормальной беременности составила в клетках синцитиотрофобласта – от 52,13 до 63,52 в поле зрения

Рис. 5. Сравнение показателей уровня положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте (Клетки синцитиотрофобласта)



Группа исследования

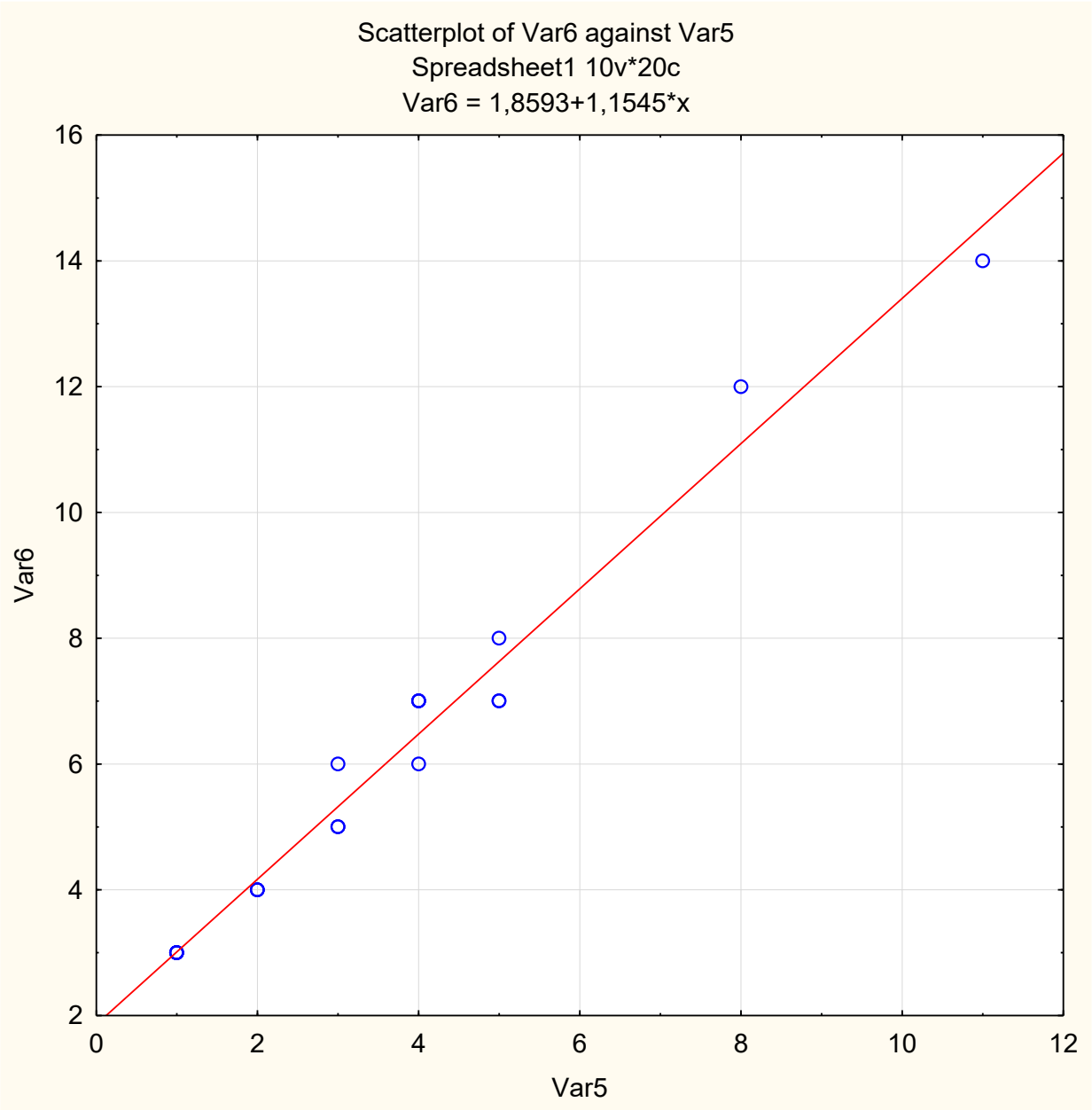
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в эпителии желез эндометрия – от 24,31 до 30,75 в поле зрения



Группа контроля

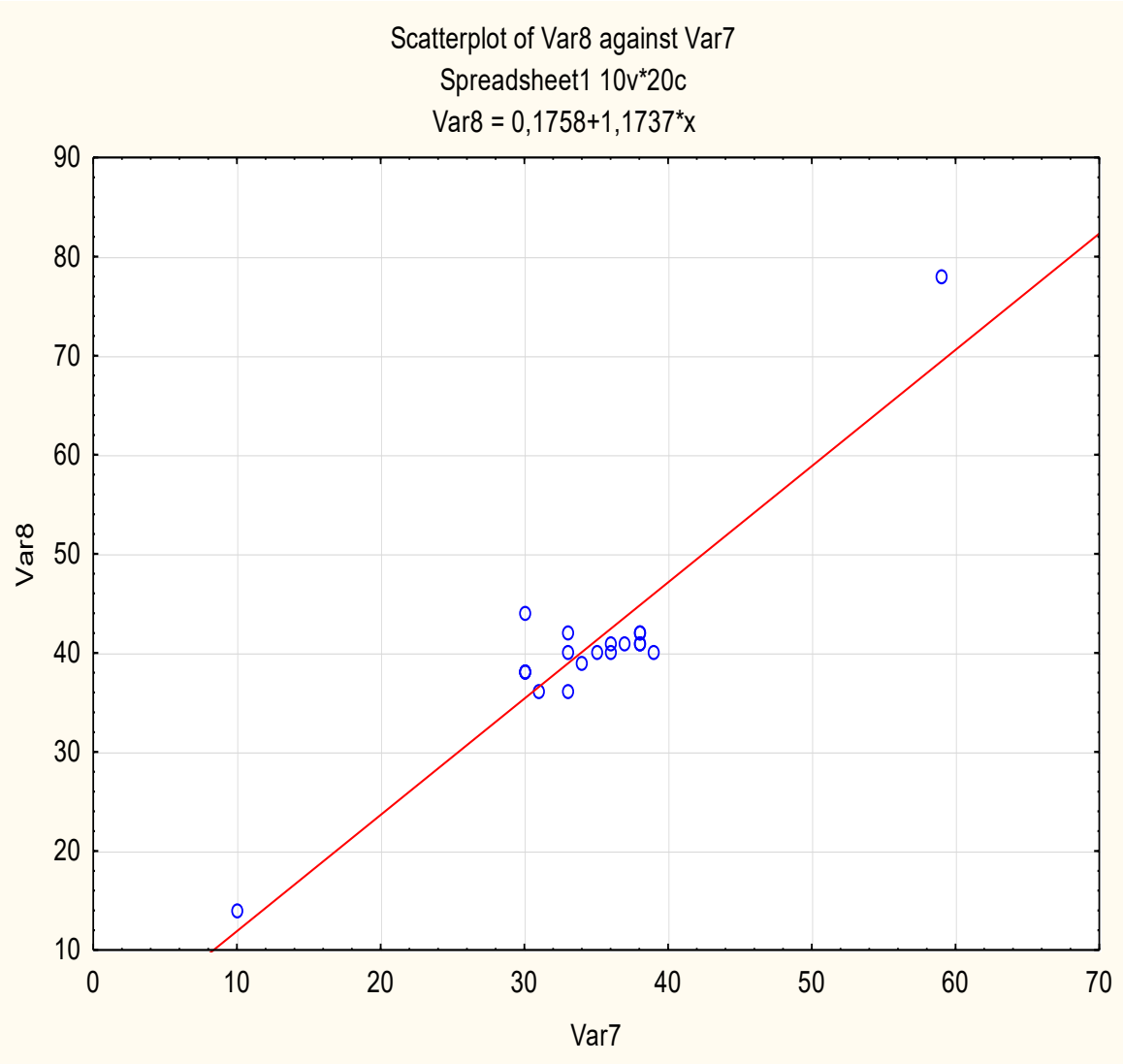
Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при нормальной беременности составила в эпителии желез эндометрия – от 38,4 до 41,51 в поле зрения

Рис. 6. Сравнение показателей уровня положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте (Эпителий желез эндометрия)



Группа исследования

Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в клетках стромы эндометрия – от 3,63 до 6,06 в поле зрения.



Группа контроля

Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 при нормальной беременности составила в клетках стромы эндометрия – от 34,31 до 40,52 в поле зрения.

Рис. 7. Сравнение показателей уровня положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте (Фибробласты стромы эндометрия)

Во всех показателях Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 была в несколько раз выше при нормальной беременности, чем при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ (<0.001).

Полученные результаты позволили сравнить уровень экспрессии TGFBR1 в группе исследования и группе контроля (рис. 8).

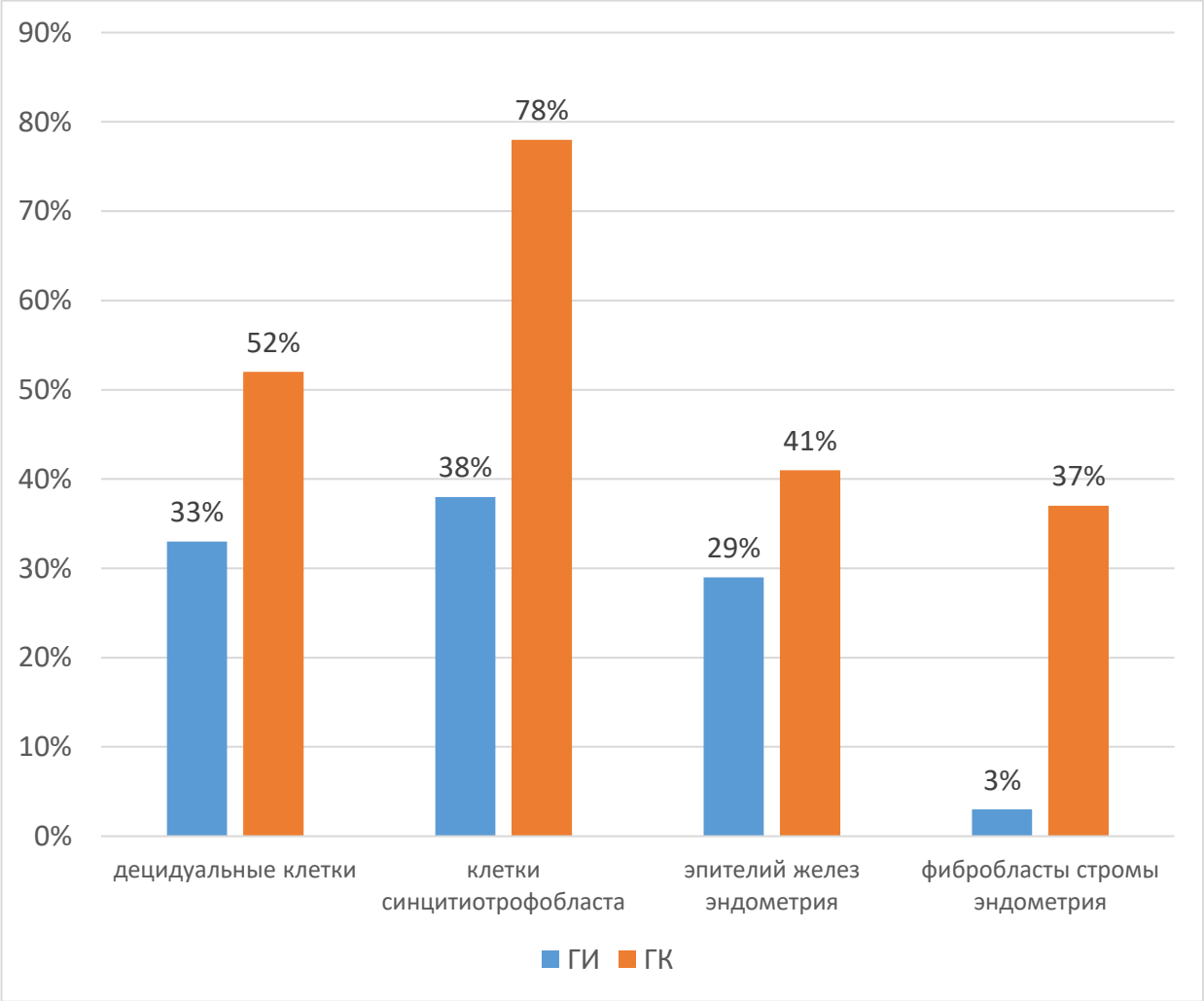


Рис. 8. Оценка площади положительной экспрессии TGFBR1 в клетках исследуемой абортивной ткани

Анализируя данные исследования, можно сделать вывод, что экспрессия TGFBR1 у женщин ГИ при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ достоверно ниже при сопоставлении с КГ пациенток при нормальной беременности (p<0,001).

Минимальную площадь экспрессии TGFBR1 наблюдали у женщин ГИ в клетках стромы эндометрия (3%), тогда как в ГК этот показатель составил 37% ($p<0,001$). Несколько более высокие показатели получены в эпителии желез эндометрия (29%), тогда как в ГК этот показатель составил 41% ($p<0,001$). Средние показатели положительной экспрессии TGFBR1 выявлены в децидуальных клетках (33%), тогда как в ГК этот показатель составил 52% ($p<0,001$). Максимальная способность к экспрессии TGFBR1 отмечена среди женщин ГИ в клетках синцитиотрофобласта (38%), в ГК этот показатель составил 78% ($p<0,001$).

Анализ полученных данных иммуногистохимического исследования абортивного материала предоставляет возможность достоверно доказать, что снижение площади экспрессии TGFBR1 у женщин ГИ при сопоставлении с КГ, свидетельствует о нарушении баланса Th1 / Th2, что влияет на содержание естественных клеток-киллеров, что приводит к ранней эмбриональной летальности из-за серьезных дефектов развития сосудов. Эндотелиальные химические соединения обеспечивают взаимодействие эндотелиоцитов с форменными элементами крови и компонентами плазмы [52].

Хроническая гипоксия в значительной степени влияет на метаболизм эндотелиоцитов, вызывая их ишемию. При первых признаках гипоксического состояния начинается увеличение синтеза активных кислородсодержащих метаболитов, которые ингибируют вазодилатационные механизмы. В условиях постоянной ишемии происходит снижение синтеза вазодилатационных факторов, которое приводит к вазоконстрикции. Это в свою очередь делает невозможным успешную имплантацию у женщин с индуцированной беременностью.

3.3. Прогностическое и клиническое значение экспрессии протеина ALK5 в профиле ранних репродуктивных потерь после вспомогательных репродуктивных технологий

Долгое время считалось, что эндометрий играет пассивную роль во время имплантации, позволяя «атаковать» вторгающийся эмбрион. Фактически, недавние исследования показали, что эндометрий и его децидуальные клетки играют гораздо более активную роль, инкапсулируя ранний эмбрион, чтобы определить его потенциал для развития и привести к здоровой беременности. В свою очередь, децидуальные клетки могут адаптироваться и поддерживать немного «более слабый» эмбрион, что позволяет имплантировать.

Хотя многие исследования дали потрясающее понимание роли сигнальных путей суперсемейства TGF-β в физиологических и патофизиологических процессах, роль сигнальных путей TGF-β во многих аспектах репродукции остается в значительной степени неизвестной. Для решения этих функций у женщин мы провели сравнение абортивной ткани женщин с самопроизвольным выкидышем после ВРТ с абортивными тканями после нормально протекающей беременности с целью оценки влияния положительной экспрессии рецептора TGF-β типа 1 (TGFBR1) на вероятность ранних репродуктивных потерь и продемонстрировали, что отсутствие передачи сигналов TGF-β через TGFBR1 в децидуальных тканях (низкий процент положительной экспрессии) приводит к аномалиям беременности. Нулевые по TGFBR1 ткани, являются эмбрионально летальными из-за серьезных сосудистых дефектов [220].

Исследование по выявлению локализации и экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани при нормальной беременности и раннем самопроизвольном аборте методом иммуногистохимии, показало, что TGFBR1 имеет разную степень положительной экспрессии в децидуальной ткани двух групп пациенток, окрашенная в коричнево-желтый или коричневый цвет, в основном локализована в цитоплазме децидуальных

клеток. При этом мы выявили, что уровень положительной экспрессии TGFBR1 ниже в децидуальной ткани при раннем самопроизвольном аборте, в то время как при нормальной беременности уровень положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани выше при статистически достоверной разнице ($p < 0.001$).

Нами выявлена тесная корреляционная связь между развитием раннего самопроизвольного аборта и уровнем экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани ($r=0,622$), в клетках синцитиотрофобласта ($r=0,778$), в эпителии желез эндометрия ($r=0,774$) и фибробластах стромы эндометрия ($r=0,867$).

Таким образом, наши данные предполагают, что TGFBR1 (ALK5), вероятно, важен для активации предшественников NK-клеток и дифференцировки uNK-клеток в местах имплантации. TGFBR1 важен для передачи сигналов TGF β / ALK1. Эндотелиальные клетки, лишенные ALK5, испытывают дефицит в ответах, индуцированных TGF β / TGFBR1.

ALK5 опосредует TGF β -зависимое рекрутирование ALK1 в рецепторный комплекс TGFbeta и активность киназы ALK5 требуется для оптимальной активации ALK1. Рецептор TGFbeta типа II также необходим для активации ALK1 с помощью TGF β. Снижение уровня экспрессии белка ALK5 в децидуальной ткани, таким образом, связана с нарушением баланса Th1 / Th2 и влияет на содержание естественных клеток-киллеров, что приводит к ранней эмбриональной летальности из-за серьезных дефектов развития сосудов.

Повышенное количество TGFBR1 в базальной децидуальной оболочке может играть важную роль в индукции иммунной толерантности, и что потеря беременности может быть вызвана снижением TGFBR1 в месте имплантации. Это в свою очередь делает невозможным успешную имплантацию.

Резюме по главе III

Проведенные исследования показали, что существует прямая корреляционная связь ранних реподуктивных потерь с возрастом старше 35 лет у беременных основной группы, что объясняется высокой частотой экстрагенитальной патологии и значительным процентом внутриматочных манипуляций диагностически-лечебного характера перед планированием программы ВРТ, следствием которых является рецепторная дисфункция эндометрия.

Ведущей причиной использования программ ВРТ среди исследуемого контингента женщин, выступает сочетанный фактор бесплодия – 44,2%, второе место среди причин потери фертильности – трубно-перитонеальный фактор (30,8%), 25% составляет эндокринное бесплодие. Наиболее удельный вес составил срок бесплодия 3-5 лет (45%), в ГИ – 46,7%; в ГК – 43,3%. Женщинам ГИ диагностировано вторичное бесплодие в 61,67% случаев, в ГК – первичное бесплодие (68,3%) ($p<0,001$).

Проведенный нами ретроспективный анализ лечебных методик восстановления фертильности указывает на вероятную связь риска ранних репродуктивных потерь с методикой ICSI.

Анализ характера и структуры экстрагенитальной патологии у женщин после ВРТ, предоставил возможность выделить группу воспалительных заболеваний мочевыделительной системы с субклиническим течением, которые чаще всего встречались у пациенток с ранними репродуктивными потерями после ВРТ (33,3%).

Статистически значимыми факторами ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ являются миома матки, воспалительные процессы влагалища и патология шейки матки, оперативные вмешательства на органах малого таза, брюшной полости, эндометриоз. Наличие очагов хронических инфекций, которые имеют латентное течение на фоне воспалительных процессов женских половых органов (36,7%) и нелеченой патологии шейки

матки (30%) в значительной степени влияют на риск ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ.

Гистологически подтвержденная плацентарная дисфункция, вероятно, связана с повышением пролиферативной активности Th1-лимфоцитов по причине критически низкого уровня положительной экспрессии TGFBR1, нарушающих формирование сосудистого русла, повреждающих плацентарную ткань и переориентируют иммунный ответ с Th2-типа на Th1 активации цитотоксического звена, что проявляется в иммунологической агрессии материнского организма по отношению к плоду.

ГЛАВА IV. АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы появилось значительное количество публикаций, посвященных наличию ассоциации самопроизвольных выкидышей на ранних сроках беременности с эндотелиопатией, иммунологическими, иммуногенетическими, гемостазиологическими и гормональными нарушениями [29]. Опыт многочисленных исследований, проведенных по этому поводу за последние десятилетия, позволил в значительной мере углубить представление о этиологии этого состояния.

Считается, что в развитии ранних репродуктивных потерь значительную играют роль следующие факторы: иммунологические причины (преобладание Т1 ответа); нарушение свертывающей системы крови у матери; персистенция бактериально-вирусной инфекции; хронический эндометрит и другие [38; 25]. Несмотря на широкое обсуждение клинического значения, особенности этиопатогенеза развития ранних репродуктивных потерь у женщин с индуцированной беременностью описываются в единичных трудах, единодушного мнения на этот счет у исследователей нет. Многочисленные аспекты невынашивания беременности и ранних репродуктивных потерь после ВРТ являются дискутабельными и требуют дальнейшего изучения.

Поэтому, учитывая вышеупомянутое, мы считаем, что детальное изучение указанного состояния, позволит нам более рационально подходить к диагностике, профилактике и медикаментозной коррекции состояний, благоприятных для возникновения ранних репродуктивных потерь, что предупредит репродуктивные потери, таким образом повысив эффективность программы ВРТ.

Согласно данным современной литературы [19], беременность после ВРТ относят к категории высокого акушерского риска, которая имеет ряд характерных особенностей течения гестационного процесса. Феномен «сосуществования генетически неидентичных» организмов матери и плода,

реализуется благодаря механизму иммунологической толерантности, которая поддерживается постоянной константой цитокинового баланса [35].

При нарушении постоянства равновесия провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у женщин с восстановленной фертильностью реализуется механизм невынашивания беременности с индукцией ранних репродуктивных потерь. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что существует прямая корреляционная связь ранних репродуктивных потерь с возрастом старше 35 лет у беременных основной группы ($p<0,05$), что объясняется высокой частотой экстрагенитальной патологии и значительным процентом внутриматочных манипуляций диагностически-лечебного характера перед планированием программы ВРТ, следствием которых является рецепторная дисфункция эндометрия. Подавляющее большинство в нашем исследовании составляли пациентки 30-40 лет (47 – 78,3%), беременность которых наступила после использования лечебных программ ВРТ. Средняя разница в возрасте составляла около 3 лет, пациентки ГИ оказались в среднем на 5 лет старше, чем женщины КГ.

Проанализировав данные первичной документации, мы выяснили, что ведущей причиной использования программ ВРТ среди исследуемого контингента женщин, выступает сочетанный фактор бесплодия – 44,2%, второе место среди причин потери фертильности – трубно-перитонеальный фактор (30,8%), 25% составляет эндокринное бесплодие. Наиболее удельный вес составил срок бесплодия 3-5 лет (45%), в ГИ – 46,7%; в ГК – 43,3%. Женщинам ГИ диагностировано вторичное бесплодие в 61,67% случаев, в ГК – первичное бесплодие (68,3%) ($p<0,001$).

Проведенный нами ретроспективный анализ лечебных методик восстановления фертильности указывает на вероятную связь риска ранних репродуктивных потерь с методикой ICSI. Количество пациенток, которым была выбрана методика ICSI составило 47,5% случаев (58,3% в ГИ и 36,7% в ГК), после IVF – 39,12% случаев (26,7% в ГИ и 51,67% в ГК), ВМИ составило

9,17% случаев (11,7% в ГИ и 6,7% в ГК), перенос бластоцисты в полость матки составило 4,17% случаев (3,3% в ГИ и 5% в ГК). Проведенный нами ретроспективный анализ лечебных методик восстановления фертильности у женщин, которые были включены в исследование, указывает на вероятную связь риска ранних репродуктивных потерь с методикой ИКСИ.

Эффективность лечения инфертильности по данным мировой литературы составляет от 23 до 47% [138], итак женщины с бесплодием в анамнезе, особенно при его продолжительности более 5 лет, неоднократно вынуждены проходить повторные циклы ВРТ. В основной группе общее количество неэффективных циклов ВРТ составляла 16,9%, в группе контроля – 2,4%. Большинство авторов, которые занимаются данной тематикой, уверены – каждая следующая неудачная попытка использование ВРТ снижает шанс наступления желаемой беременности в следующем цикле на 16,3% [66].

Анализ профессиональной принадлежности и трудовой деятельности беременных не выявил статистически значимых различий между группами, однако обращает на себя внимание больший процент пациенток, которые занимались умственным трудом. Также можно проследить тенденцию к большему проценту женщин, занимавшихся физическим трудом, среди пациенток ГИ, однако статистически значимого уровень показателей основной и контрольной групп не достигнут.

Осуществить анализ наличия вредных привычек оказалось невозможным в связи с тем, что данная информация отсутствовала в медицинских картах исследуемых женщин.

При определении веса беременных по индексу массы тела (ІМТ), среди женщин с разным значением ИМТ не найдено достоверных различий между основной группой и группой контроля ($p>0,05$).

Анализ характера менструального цикла установил, что средний возраст менархе у женщин основной группы составлял 12,7±1,1 года по сравнению с группой контроля – 11,8±1,3 лет ($p>0,05$). У подавляющего количества женщин менструальный цикл установился сразу ($p>0,05$).

При изучении функциональных особенностей менструального цикла мы не обнаружили прямого корреляционного связи между характером его нарушений и возникновением ранних репродуктивных потерь после применения лечебных программ ВРТ. Болезненные менструации отмечали 35 (58,33%) пациенток ГИ и 28 (46,67%) пациенток контрольной группы ($p>0,05$). Средняя продолжительность менструального цикла до лечения бесплодия методами ВРТ составляла 28±2,5 дня у пациенток ГИ, 27,6±2,5 дня у пациенток ГК ($p>0,05$).

Наличие гинекологической патологии у подавляющего большинства женщин с ранними репродуктивными потерями не выявила прямых параллелей зависимости с такими нозологиями, как врожденные пороки развития женских половых органов. Статистически значимыми факторами ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ являются миома матки, воспалительные процессы влагалища и патология шейки матки, оперативные вмешательства на органах малого таза, брюшной полости, эндометриоз. Наличие очагов хронических инфекций, которые имеют латентное течение на фоне воспалительных процессов женских половых органов (36,7%) и нелеченой патологии шейки матки (30%) в значительной степени влияют на риск ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ.

Анализ характера и структуры экстрагенитальной патологии у женщин после ВРТ, предоставил возможность выделить группу воспалительных заболеваний мочевыделительной системы с субклиническим течением, которые чаще всего встречались у пациенток с ранними репродуктивными потерями после ВРТ (33,3%): бессимптомная бактериурия, хронический пиелонефрит, рецидивирующий цистит в анамнезе.

Последствия предыдущих беременностей у женщин со вторичным бесплодием свидетельствуют о наличии весомых рисков акушерских и перинатальных осложнений у пациенток ГИ, в сравнении с группой контроля. Статистика показателей неразвивающейся беременности (ГИ – 13,3%, ГК – 15%), говорит в пользу обремененного репродуктивного анамнеза у женщин

исследуемых групп. В ГИ обращает на себя внимание высокий процент самопроизвольных выкидышей – 18,3% ($p<0,01$).

Полученные нами данные клинико-анамнестических особенностей позволили провести оценку значимости ведущих факторов и прогнозировать риск развития ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ:

1. Возраст старше 35 лет.
2. Избыточная масса тела 30 кг / м2 и более.
3. Расстройства оварио-менструального цикла в виде продолжительности более 28 дней.
4. Миома матки.
5. Воспалительные процессы влагалища.
6. Патология шейки матки.
7. Разъединение спаек.
8. Эндометриоз.
9. Заболевания мочевыделительной системы (хронические).
10. Метаболический синдром.
11. Срок бесплодия более 10 лет.
12. Вторичное бесплодие.
13. Артифициальный аборт в анамнезе.
14. Самопроизвольный выкидыш в анамнезе.
15. Метод ВРТ ICSI (intracytoplasmic sperm injection) ИКСИ.
16. 3 и более неудачных попыток ВРТ.

Все вышеизложенное позволяет предположить, что ранние репродуктивные потери после ВРТ являются следствием действия большого количества патологических причин с реализацией разнообразных часто перекрестных, патофизиологических путей, поэтому выделить доминирующий этиологический фактор существующими методами диагностики не всегда возможно.

Следующим этапом нашего исследования было выявление значимости экспрессии протеина ALK5 в децидуальной ткани абортивного материала при

ранних репродуктивных потерях после ВРТ. С этой целью проведено сравнение абортивного материала женщин ГИ (20 пациенток) после ранних репродуктивных потерь после ВРТ и женщин ГК (20 пациенток) после искусственного аборта, проведенного во время нормально протекающей беременности.

Прогресс в области иммунологии, который наблюдается за последнее десятилетие, сформировал фундамент нового направления медицины – иммунология репродукции, изучающей роль иммунологических факторов и механизмов во время беременности, а также иммуноопосредованные осложнения гестационного процесса.

Использование новейших диагностических возможностей и методик в повседневной врачебной практике может стать ключевым звеном для решения вопроса приоритетной гинекологической тактики при ранних репродуктивных потерях у женщин с «иммунологическим парадоксом», которым является индуцированная беременность, и предоставить возможность получить ответ относительно особенностей иммунологического статуса пациенток с ранними репродуктивными потерями после ВРТ.

До настоящего времени не существует систематизированных сведений о патогенетической связи нарушений иммунологического баланса и цитокинового профиля с ранними репродуктивными потерями после ВТР, как не существует и возможности их прогнозирования на основе мониторинга показателей иммунологического гомеостаза сыворотки крови.

Невынашивание беременности – это полиэтиологическое осложнение течения гестационного процесса, важными факторами в возникновении которого выступают нарушения иммунной регуляции, реализуемые в рамках дисбаланса биологически активных медиаторов иммунных и межклеточных взаимодействий цитокинов [1; 3; 8; 10; 15; 18; 20; 34; 42; 54; 79].

Иммунологические взаимоотношения материнского организма с плодом характеризуются динамическим равновесием, при этом плод получает собственную иммунную компетентность и пассивный иммунитет от матери.

Интенсивность иммунных реакций во время беременности имеет широкий диапазон и зависит от индивидуальной, генетически детерминированной, иммунологической резистентности женщины [73].

Особый интерес представляют исследования патогенетической связи нарушений цитокинового профиля и клеточно-гуморальной иммунореактивности в механизме ранних репродуктивных потерь при индуцированной беременности. Безусловно, модифицированная иммунореактивность материнского организма отражается в нарушении цитокинового баланса.

Эндометрий представляет собой сложную многоклеточную ткань, которая подвергается динамическому ремоделированию, чтобы создать микросреду, подходящую для поддержания беременности. Беременность – это сложный процесс, который включает отдельные события, включая децидуализацию, имплантацию и плацентацию. Эндометрий / децидуальная оболочка богаты иммунными клетками, в частности клетками uNK (естественные киллеры) и макрофагами, которые берут начало в костном мозге и избирательно проникают через кровоток к слизистой оболочке матки.

В первые 20 недель беременности uNK-клетки и макрофаги играют решающую роль в опосредовании процесса трансформации спиральной артерии, вызывая начальные структурные изменения и секретируя ряд цитокинов и хемокинов. Другая отличная и функционально важная группа клеток включает децидуальные стромальные фибробласты (DSCs), которые составляют 10-30% децидуальных клеток в первом триместре и до 60-70% клеток децидуальной оболочки.

Децидуализация относится к функциональным и морфологическим изменениям, которые происходят в эндометрии, с образованием децидуальной оболочки, в которую имплантируется бластоциста. Эти изменения включают привлечение лейкоцитов и, что важно, дифференцировку стромальных клеток эндометрия (ESC) в DSC (децидуальные стромальные клетки).

Именно способность ESC дифференцироваться в это альтернативное состояние, по-видимому, является ключевым элементом децидуальной трансформации. DSC представляют собой отдельный тип клеток, являющийся результатом терминальной дифференцировки и генетического перепрограммирования ESC. Это перепрограммирование включает подавление генов, участвующих в провоспалительной реакции и сопротивлении тканевой инвазии, наряду с повышенной экспрессией генов, которые способствуют клеточной пролиферации, толерантности и проникновению в ткани [59; 210].

Правильная децидуализация контролирует зачатие и течение беременности и является решающим фактором успеха беременности. Появляется все больше свидетельств того, что биохимические / метаболические факторы важны для децидуализации. Например, некоторые аутокринные / паракринные факторы, включая интерлейкины, такие как IL-1β, IL-11 и фактор ингибирования лейкемии (LIF), а также трансформирующий фактор роста-β (члены суперсемейства TGF-β, такие как активин, TGF-β1, белок морфогенеза (BMP2) и фактор детерминации 2 (LEFTY2), по-видимому, важны для поддержания процесса децидуализации, стимулирования передачи сигналов цАМФ и внеклеточного матрикса (ECM), регуляции ангиогенеза и поддержки имплантации эмбриона [71].

Исследования последних лет доказали факт активации иммунной системы женщины для физиологического течения беременности с реализацией иммуномодулирующего эффекта. Презентация и идентификация индуцированной беременности иммунной системой происходит посредством активации группы генов, которые отвечают за продукцию прогестероновых рецепторов на NK-клетках и лимфоцитах [61; 86; 109; 122; 137; 149].

При нормальном течении гестационного процесса активированы лимфоциты и CD56+ продуцирующие прогестерон-индуцирующий блокирующий фактор (PIBF), который предупреждает чрезмерную активность натуральных киллеров путем образование гранулярных лимфоцитов

субпопуляции CD16+CD56+, которые имеют малый цитотоксический потенциал. Регуляция иммунного ответа матери при этом варианте опосредованная цитокинами IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 и направлена по Th2-пути.

При недостаточном содержании прогестерона или частичном блокировании экспрессии его рецепторов нарушается синтез PIBF. В таком случае иммунный ответ матери на плод характеризуется образованием лимфокинактивированных киллеров, которые несут на своей поверхности маркеры CD16 + CD56+, при этом растет продукция провоспалительных цитокинов IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-18 с реализацией иммунного ответа по Th1-пути. Провоспалительные цитокины берут участие в реакциях клеточно-опосредованной цитотоксичности. При Th1-механизме иммунного ответа провоспалительные цитокины имеют прямой цитотоксический влияние на плод [79].

Латентное и пролонгированное течение иммунного ответа при прогрессировании беременности по Th1 постепенно изменяет эффекторный потенциал клеток иммунной системы в сторону нарушения чувствительности лимфоцитов к вторичным стимулам. Таков феномен получил название Прайм-действие на иммунокомпетентные клетки цитокинов в повышенной концентрации. Прайм создает условия для снижения пороговой чувствительности иммунокомпетентных клеток к эндогенным стимулам. Чаще всего праймирующими агентами выступают провоспалительные медиаторы: цитокины, белки острой фазы, факторы роста [93; 126; 132; 203; 213].

Беременность после ВРТ на фоне повышенной чувствительности клеток иммунной системы к эндогенным стимулам имеет течение на фоне Прайм-эффекта с провоспалительным направлением иммунных реакций и гиперактивацией лимфоцитов. Повреждающее действие защитных механизмов иммунного ответа направлено не только на патогенный фактор, но и на клетки собственной иммунной системы. Итак, в таком случае механизм

иммунной защиты теряет свой защитный эффект и сам становится ведущим звеном патологического процесса, при этом иммунная система, которая по сути является системой интегративной регуляции и защиты, превращается в исполнителя и мишень одновременно для продуцируемых ею самой агрессивных субстанций, синтез которых теряет контроль и становится предиктором невынашивания беременности.

По данным многих авторов [112], иммунологический сдвиг у женщин с восстановленной с помощью ВРТ фертильностью, заключается в формировании недостаточности Th2-ответа при гиперактивации Th1-лимфоцитов с популяцией естественных киллеров. Искажение иммунологической толерантности приводит к фетотоксическому эффекту через систему медиаторов активированных NK-клеток и Th1-лимфоцитов (IL-2, TNF-α, IFN-γ) [96]. При этом возрастает содержание IL-1α, IL- 8, IL-6 и снижается уровень противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4 [88; 177; 188].

Иммуномодулирующее действие проявляется в результате прямого действия блокирующего фактора, индуцированного прогестероном, который подавляет гиперреактивную иммунную ответ Th1-типа и изменяет цитокиновый профиль активированных лимфоцитов. Успешность пролонгирования беременности зависит от баланса основных медиаторов взаимодействия клеток иммунной системы матери и плода – провоспалительных цитокинов (типа Th1) и противовоспалительных (типа Th2). Система цитокинов представляет собой «сеть», в которой постоянно происходит кооперация клеток. От баланса клеточных медиаторов зависит как тип иммунного реагирования и процессы дифференциации иммунокомпетентных единиц [82; 124; 154; 162; 187; 194].

Регуляция синтеза противовоспалительных цитокинов во время физиологической беременности направлена на перестройку межклеточных взаимодействий для создания оптимальных условий функционирования органов и систем материнского организма для вынашивания генетически

чужеродного плода. Во время физиологической беременности децидуа секретирует противовоспалительные цитокины Th2-типа (IL-4, IL-5, IL-10), а избыточная концентрация цитокинов Th1-типа (IL-2, IL-8) приводит к иммунологической атаке материнского организма на фетоплацентарный комплекс, результатом такого «конфликта» двух систем является «катастрофа» одной из них – в частности невынашивание беременности и ранние репродуктивные потери [172].

Анализ полученных результатов подтверждает, что в реализации биологических эффектов цитокинов важным моментом является не только достаточный уровень секреции противовоспалительных агентов, а и баланс лиганд-рецепторных взаимодействий, нарушения которого приводит к высокой цитотоксической активности больших гранулярных лимфоцитов матки и отторжению плода [43; 136; 165; 195; 205; 227].

Децидуализация – сложный биологический процесс, при котором в стромальных клетках эндометрия происходят обширные морфологические, функциональные и генетические изменения, способствующие развитию имплантирующейся бластоцисты. Децидуализация – это процесс пролиферации и дифференцировки стромальных клеток матки в ответ на имплантацию экстраэмбриональной / эмбриональной единицы и необходим для поддержки роста эмбриона до установления плаценты.

Ремоделирование маточной спиральной артерии – это процесс адаптации матери, который имеет решающее значение для создания полностью функциональной плацентарной единицы. Во время ремоделирования спиральной артерии клетки трофобласта плода проникают в децидуальную оболочку и ее кровеносные сосуды, а спиральные артерии матки трансформируются из узких в большие каналы, чтобы увеличить приток материнской крови к местам имплантации и облегчить растущие потребности плода в питании и кислороде. Сбои в этом процессе (например, неглубокая инвазия трофобласта и неполное ремоделирование) вызывают снижение кровотока к фетоплацентарной единице и связаны с распространенными

осложнениями беременности, такими как повторяющиеся выкидыши, задержка роста плода и преэклампсия [36; 47; 63].

Децидуализация координируется стероидными гормонами, факторами роста, а также молекулярными и эпигенетическими механизмами. Передача сигналов суперсемейства трансформирующего фактора роста β (TGFβ) регулирует многогранные репродуктивные процессы. Однако роль передачи сигналов TGFβ в децидуализации матки изучена недостаточно [47].

Дифференцировка эндометрия, примированного эстрадиолом (E2), происходит после постовуляторного повышения прогестерона (P4) во время секреторной фазы менструального цикла. Во время децидуализации происходят клеточные и молекулярные изменения, поскольку клетки стромы эндометрия (ЭСК) трансформируются из фибробластоподобных клеток в большие полигональные клетки, богатые цитоплазматическим гликогеном и липидными каплями. Полиплоидия стромальных клеток – уникальное явление, которое происходит во время дифференцировки децидуальных клеток после имплантации бластоцисты [81; 89; 92; 115; 185; 206; 212]. Факторы, секретируемые децидуальными клетками, включают пролактин (PRL) и белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1), которые являются ключевыми регуляторами децидуализации и широко используются в качестве маркеров децидуализации [70]. Стероидные гормоны яичников, E2 и P4, играют фундаментальную роль в имплантации бластоцист и децидуализации матки. Все чаще признается, что передача сигналов рецептора прогестерона (PGR) имеет первостепенное значение для имплантации бластоцисты, децидуализации матки и поддержания беременности [83].

Факторы роста – это молекулы сигнального белка, стимулирующие рост, пролиферацию, регуляцию и взаимодействие клеток. Факторы роста играют ключевую роль в контроле пролиферации и дифференцировке различных типов клеток, активации специфического иммунитета, регуляции воспаления,

ангиогенезе, функционировании нейронов, регенерации тканей и эмбриональном развитии.

Бета-рецептор I трансформирующего фактора роста / активиноподобная киназа 5 (TGFBR1/ALK5) является рецепторной протеинкиназой, связанной в том числе с дисфункциональным иммунным ответом. CD4 + CD25 + FoxP3 + регуляторные Т-клетки (Tregs), уникальная субпопуляция Т-клеток, играют решающую роль в толерантности и предотвращении аутоиммунитета, а также в успехе трансплантации аллогенных органов [66]. Во время беременности Treg необходимы для толерантности материнской иммунной системы к полуаллогенному эмбриону. Модуляция опосредуется либо посредством межклеточного контакта, либо путем секреции иммуносупрессивных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- β [60; 68; 87; 91; 131; 151; 200].

В первом триместре беременности имплантация эмбриона, децидуализация и модификация сосудов, включая ремоделирование спиральной артерии, являются ключевыми событиями для установления успешной беременности. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является одним из ключевых факторов образования капилляров. VEGFA производится почти во всех тканях и увеличивает проницаемость сосудов и пролиферацию эндотелиальных клеток.

TGFB1 выступает в качестве антагониста VEGF при пролиферации клеток и индукции апоптоза. TGFB способствует процессам заживления ран, подавляет пролиферацию и миграцию гладких мышц и эндотелиальных клеток. Почти каждая клетка в организме производит TGFB и его рецептор. Однако TGFB оказывает ингибирующее действие на иммунную систему, кроветворение, синтез провоспалительных цитокинов, реакцию лимфоцитов на IL2, IL4, IL7 и образование цитотоксических NK и Т-клеток. Исследования показали, что апоптоз увеличивается в эндометрии во время имплантации и регрессии децидуальной ткани. Было показано, что мРНК для TGF-β1 присутствует в матке во время беременности и локализуется в просветных и железистых эпителиальных клетках на ранних и поздних сроках беременности

[118; 214; 225]. TGF-β1 и -β2 мРНК были также обнаружены в матке во время беременности [97; 102; 129; 197; 122]. Эти исследования предполагают, что изоформы TGF-β могут конкретно участвовать в контроле апоптоза эндометрия в матке во время беременности.

Трансформирующий фактор роста β (TGFβ) играет решающую роль в регуляции гомеостаза тканей посредством контроля над различными клеточными процессами, такими как пролиферация, дифференцировка и формирование матрикса. Связываясь с различными рецепторами семейства активин-рецепторных киназ (ALK), TGFβ индуцирует внутриклеточное карбоксиконцевое (C-концевое) фосфорилирование регулируемых рецептором белков Smad (R-Smad). Фосфорилированные R-Smads образуют комплексы с общим медиатором Smad; Smad4, и эти комплексы перемещаются в ядро, где они связываются с ДНК, чтобы регулировать транскрипцию генов посредством рекрутирования факторов транскрипции [135]. Использование разных ALK может привести к активации разных R-Smads; активация ALK5 (TGFβR1) индуцирует фосфорилирование Smad2 и Smad3.

Как ранее было продемонстрировано [7; 26; 65; 111; 150], TGF-β1 индуцирует расщепление ДНК в децидуальных клетках. Результаты ясно продемонстрировали, что TGF-β1 индуцировал апоптоз дозозависимым образом ($p < 0{,}0001$). Апоптоз увеличивался до 20% при 1 нг / мл TGF-β1 и до 30% при 10 нг / мл. Анализ исключения окрашивания трипановым синим использовали для проверки жизнеспособности и гибели клеток; хотя этот тест не является специфическим для апоптоза, он показывает прямое влияние TGF-β1 на выживаемость и жизнеспособность клеток.

Сильная экспрессия TGF-β1 на ранних сроках беременности может быть объяснена тем фактом, что эта изоформа необходима для инициирования процессов имплантации эмбриона в периимплантационный период. Было показано, что TGFBR1 секретируется клетками бластоцисты. Впоследствии децидуальные стромальные клетки и NK-клетки, в свою очередь,

продуцируют TGFBR1, который необходим для роста и развития трофобластов. Первые признаки плацентарного ангиогенеза наблюдаются на третьей неделе беременности. Клетки цитотрофобластов интенсивно экспрессируют хорионический гонадотропин, который положительно влияет на ангиогенез и экспрессию фактора роста эндотелиальных сосудов.

Ремоделирование спиральных артерий имеет решающее значение для нормального роста и развития плода. Нарушение текущих этапов имплантации и кроветворения плода и матери обычно может привести к потере беременности. TGFBR1 считается одним из основных регуляторов для мониторинга регуляторных Т-клеток, которые играют решающую роль в поддержании физиологических иммунных ответов и, кроме того, обеспечивают материнскую толерантность к отцовским антигенам плода [147]. Трансформирующий фактор роста В регулирует пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и гомеостаз клеток. Поэтому нельзя исключать его значительную роль в процессах сохранения беременности.

Передача сигналов суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGFB) играет плейотропную роль в фундаментальных клеточных процессах и процессах развития. Ранее установлено, что сложно разветвленная сеть кровеносных сосудов плода в лабиринте первоначально развивается в результате васкулогенеза, когда ангиобласты, которые определены в аллантоисе, проникают в хорион, образуя сосудистую сеть лабиринта плода. Как указано выше, неудача в хорио-аллантоисном слиянии предотвращает любое такое сосудистое развитие и связана с летальностью в середине гестации. TGFBR1 индуцирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов. Сосуды плода подвергаются обширному разветвлению за счет ангиогенеза, что способствует расширению плаценты для удовлетворения растущих потребностей растущего плода.

Эти процессы регулируются членами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста плаценты (PGF), FGF, WNT и семейств TGF-β и BMP. Нарушение таких ключевых ангиогенных путей в плаценте оказывает

значительное влияние на васкуляризацию плаценты и причинно связано с самопроизвольным абортом поскольку продукты генов взаимосвязаны в метаболических путях, изменение их функционирования может вызвать апоптоз, нарушение формирования кровеносных сосудов и, как следствие, нарушение функционирования синцитиотрофобластов. Следовательно, это может привести к аномальному ангиогенезу и самопроизвольному аборту.

Согласно результатам иммуногистохимического исследования децидуальной ткани абортивного материала в группе женщин при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ при сравнении децидуальной ткани абортивного материала в группе женщин при нормальной беременности выявлено статистически значимое достоверное отличие в степени положительной экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани двух групп пациенток. Иммуногистохимическая положительная экспрессия ALK5 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ составила в децидуальных клетках – от 31,38±11,65 до 39,88±13,8 в поле зрения, при нормальной беременности составила в децидуальных клетках от 48,5±12,4 до 59,77±14,3 в поле зрения (<0.001).

Положительная экспрессия ALK5 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ в клетках синцитиотрофобласта составила – от 35,25±8,55 до 43,69±9,34 в поле зрения, при нормальной беременности составила от 52,13±7,9 до 63,52±10,14 в поле зрения (<0.001). Положительная экспрессия ALK5 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ в эпителии желез эндометрия составила – от 24,31±7,25 до 30,75±7,46 в поле зрения, при нормальной беременности составила от 38,4±5,66 до 41,51±8,14 в поле зрения (<0.001). Положительная экспрессия ALK5 при раннем самопроизвольном аборте после ВРТ в клетках стромы эндометрия составила – от 3,63±2,73 до 6,06±3,19 в поле зрения, при нормальной беременности составила в клетках стромы эндометрия от от 34,31±8,5 до 40,52±10,7 в поле зрения (<0.001).

При анализе продукции TGFBR1 в зависимости от последствий беременности установлено, что в группе женщин, у которых беременность

прервалась самопроизвольно, имеет место значительное снижение площади положительной экспрессии TGFBR1, которое в комбинации с показателями возраста демонстрирует рост риска самопроизвольного выкидыша, что может быть дополнительным фактором, который способствует развитию микроциркуляторных и гемодинамических нарушений и вносит собственный вклад в увеличение коагуляционного потенциала, вызывая в том числе и нарушения процессов плацентации. Поэтому понижение уровня TGFBR1 с ранних сроков беременности может проявляться нарушением инвазии трофобласта, что может в дальнейшем приводить к прогрессированию гестационных осложнений, в том числе таких как угроза прерывания беременности. Нами выявлена тесная корреляционная связь между развитием раннего самопроизвольного аборта и уровнем экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани (r=0,622), в клетках синцитиотрофобласта (r=0,778), в эпителии желез эндометрия (r=0,774) и фибробластах стромы эндометрия (r=0,867).

Итак, гистологически подтвержденная плацентарная дисфункция, вероятно, связана с повышением пролиферативной активности Th1-лимфоцитов по причине критически низкого уровня положительной экспрессии TGFBR1, нарушающих формирование сосудистого русла, повреждающих плацентарную ткань и переориентируют иммунный ответ с Th2-типа на Th1 активации цитотоксического звена, что проявляется в иммунологической агрессии материнского организма по отношению к плоду.

Анализируя полученные результаты и учитывая критический уровень положительной экспрессии TGFBR1, можно уверенно утверждать, что ранние репродуктивные потери у женщин после ВРТ вызваны развитием локализованного воспалительного процесса по типу гиперреактивного Th1-опосредованного гуморального ответа. Отсутствие моделирующей перестройки иммунной системы материнского организма в условиях нарушения динамического равновесия TGFBR1 с превилированием Th1-

опосредованного ответа у женщин с беременностью высокого акушерского риска является предиктором ранних репродуктивных потерь.

Полученные нами результаты исследования демонстрируют, что существуют резервы в терапии и профилактике акушерской патологии, которая приводит к ранним репродуктивным потерям у женщин с индуцированной беременностью, учитывая наличие новых подходов относительно патогенетических механизмов невынашивания. Результаты нашего исследования позволяют переосмыслить существующие взгляды на этиологию и структуру невынашивания, и утверждать, что причинами ранних репродуктивных потерь являются универсальные механизмы, в частности нарушения экспрессии TGFBR1, нарушающих формирование сосудистого русла, повреждающих плацентарную ткань и переориентируют иммунный ответ с Th2-типа на Th1 активации цитотоксического звена, что проявляется в иммунологической агрессии материнского организма по отношению к плоду, которые лежат в основе развития ранних репродуктивных потерь при ВРТ.

ВЫВОДЫ

1. Анализ данных анамнеза показал слабую статистическую связь возникновения ранних репродуктивных потерь с возрастом женщин (r=0,264, p<0,001) и длительностью бесплодия (r=0,247, p<0,001) у женщин основной группы. Значимыми факторами ранних репродуктивных потерь у женщин основной группы являются воспалительные нарушения биоценоза влагалища (36,67% в основной группе и 11,67% в группе контроля, p <0,001), эндометриоз (15% в основной группе и 6,67% в группе контроля, p <0,001), миома матки (11,67% в основной группе и 5% в группе контроля, <0,05) и патология шейки матки (30% в основной группе и 11,67% в группе контроля, p <0,001). Беременности у 58,33% женщин в основной группе наступили после применения лечебной программы ВРТ (ICSI), в группе контроля беременности наступили в результате применения методики ICSI только у 36,67% женщин (p<0,001).

2. Важными факторами развития ранних репродуктивных потерь у женщин после ВРТ являются: метаболический синдром (r=0,438, p<0,001), оперативные вмешательства на органах малого таза (r=0,332, p<0,001), хронические заболевания мочевыделительной системы (r=0,462, p<0,001), вторичное развитие бесплодия (r=0,366, p<0,001), артифициальный аборт (r=0,327, p<0,001), 3 и более неудачных попыток ВРТ (r=0,357, p<0,001), наиболее часто проведенные с помощью метода ICSI (r=0,222, p<0,001). Наиболее значимые сочетания факторов прогноза развития ранних репродуктивных потерь после ВРТ: комбинация длительности бесплодия и сочетания эндокринного и трубно-перитонеального факторов (r=0,459); вторичное бесплодие и артифициальный аборт (r=0,873).

3. Установлено, что экспрессия TGFBR1 в несколько раз выше при нормальной беременности, чем при осложненном ее течении после ВРТ (<0.001). Иммуногистохимическая положительная экспрессия TGFBR1 в децидуальных клетках при осложнённом течении беременности после ВРТ составила 36,3±13,3 % клеток в поле зрения, при нормальной беременности –

54,1±14,4 % клеток в поле зрения (p<0,001); в клетках синцитиотрофобласта при осложнённом течении беременности после ВРТ – 39,6±9,3% клеток в поле зрения, при нормальной беременности – 57,9±10,7 % клеток в поле зрения (p<0,001); в эпителии желез эндометрия при осложнённом течении беременности после ВРТ – 27,5±7,6 % клеток в поле зрения, при нормальной беременности – 39,9±7,3 % клеток в поле зрения (p<0,001), в клетках стромы эндометрия при осложнённом течении беременности после ВРТ – 4,7±2,9 % клеток в поле зрения, при нормальной беременности – 37,4±10,1 % клеток в поле зрения (p<0,001).

4. Выявлена умеренно выраженная статистическая корреляционная связь между развитием раннего самопроизвольного аборта и уровнем экспрессии TGFBR1 в децидуальной ткани (r=0,622), в клетках синцитиотрофобласта (r=0,778), в эпителии желез эндометрия (r=0,774) и фибробластах стромы эндометрия (r=0,867).

5. Минимальная экспрессия TGFBR1 наблюдалась у женщин основной группы в клетках стромы эндометрия достоверно реже (3%), чем в группе контроля (37%) (p<0,001), до 33% в децидуальных клетках (в группе контроля - 52%) (p<0,001), до 38% в клетках синцитиотрофобласта (в группе контроля - 78%) (p<0,001), до 29% в эпителии желез эндометрия (в группе контроля - 41%) (p<0,001), что приводит к ранним репродуктивным потерям.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточности резервов для уменьшения случаев ранних репродуктивных потерь во время беременности после ВРТ:

1) Необходимо формировать группы повышенного риска ранних репродуктивных потерь во время беременности после ВРТ на прегравидарном этапе в соответствии с выявленными факторами риска.

2) Формирование группы риска производится на основании комбинации следующих факторов: микст-инфицирование и воспалительные процессы органов малого таза, оперативные вмешательства на органах малого таза и внутриматочные манипуляции; трубно-перитонеальное бесплодие; три и более неудачных попытки оплодотворения in vitro.

3) Необходимо своевременное проведение лабораторного обследования с включением в прегравидарный диагностический алгоритм показателей цитокинового профиля, а также оценка экспрессии ALK5 в ткани эндометрия или в абортивном материале в случае репродуктивных потерь.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Абрамян Г.Р. Клиническое значение выявления антифосфолипидных антител и генетической тромбофилии у пациенток с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения. Практ. медицина. 201б:(3):113-8.

2 Абрамян Г.Р. Тромбофилии у женщин с бесплодием и неудачами экстракорпорального оплодотворения. Практическая медицина, (2017). (7 (108)), 81-86.

3 Авраменко Н.В. Вспомогательные репродуктивные технологии. Запорож. мед. журн. 2014;(3):95-100.

4 Айламазян Э. К., Кулаков В. И., Радзинский В. Е., Савельева Г. М. Акушерство. Национальное руководство. М.: ГЭОТАРМедиа, 2014. 1200 с.

5 Айламазян Э.К. Роль иммунной системы фетоплацентарного комплекса в механизмах преждевременного прерывания беременности / Э.К. Айламазян, О.В. Павлов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 2. – С. 9-11.

6 Алегина Е. В., Тетруашвили Н. К., Агаджанова А. А., Трофимов Д. Ю., Донников А. Е. Полиморфизм гена интерлейкина-8 у женщин с привычными потерями беременности. Акушерство и гинекология. 2015. № 9. С. 33-37.

7 Алиева С.А., Одаманова М.А., Аллахкулиева С.З., Хашаева Т.Х. Значение циркуляции антифосфолипидных антител у женщин с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы и синдромом потери плода в анамнезе. 2015; 1: 13-18.

8 Амирова АА. Назаренко ТА, Мишиева НГ. Факторы, влияющие на исходы ЭКО (обзор литературы). Пробл. репродукции. 2010;1б(1):34-7.

9 Амирова Ж.С. Система цитокинов у беременных с персистирующей и рецидивирующей угрозой прерывания беременности / Ж.С. Амирова // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 13, № 4. – С. 66-67.

10 Андреева ЕС. Степанькова ЕА. Особенности течения беременности н состояние плода у пациенток с угрозой прерывания в I триместре, осложнившейся отслойкой хориона. Веста. Смол. гос. мед. акад. 2010;(4):11-3.

11 Аполихин О.И., Москалева Н.Г., Комарова В.А. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России. Экспериментальная и клиническая урология 2015; 4: 4-14.

12 Баймурадова С. М., Слуханчук Е.В. Невынашивание беременности у пациенток с «некритериальными» факторами, предрасполагающими к развитию тромбофилии: современный взгляд на проблему. Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, vol. 5, no. 4, 2018, pp. 202-207.

13 Бицадзе В.О, Макацария А.Д., Хизроева Д.Х. и др. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности. Практическая медицина. 2012; 5: 22-29

14 Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Макацария Н.А., Егорова Е.С., Баймурадова С.М., Машкова Т.Я. Антифосфолипидные антитела, их патогенетическое и диагностическое значение при акушерской патологии. Акушерство, гинекология и репродукция. 2014; 8 (2): 39-60.

15 Боровкова Е.И., Мартынова И. В. Самопроизвольный выкидыш: состояние изученности вопроса // Researchn Practical Medicine Journal. 2014. №1(1). С. 52 - 56.

16 Буничева Н. В. Прогнозирование неразвивающейся беременности как основа снижения репродуктивных потерь: дис. …канд. мед. наук / Н.В. Буничева. Пермь, 2016. 4 с.

17 Буштырева И. О., Кузнецова Н.Б., Заманская Т.А., Дмитриева М.П., Левченко М.В., Шмакова К.П. Прогностические маркеры ранних репродуктивных потерь у пациенток с ретрохориальной гематомой / И.О. Буштырева. Акушерство и гинекология. 2016. № 1. С. 28-33

18 Ведищев С.И., Османов Э.М., Пышкина А.С., Жабина У.В.

Медико-социальные аспекты невынашивания беременности // Научные ведомости Белгородского государственного университета. 2011. №16 (111). Вып. 15. С.116 - 120.

19 Веропотвелян Н.П. Привычное невынашивание беременности, ассоциированное с иммунологическими факторами / Н.П. Веропотвелян, Н.П. Веропотвелян // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2015. – № 4. – С. 84-92

20 Жуцзыгули А.,Рухляда Н. Н. Возраст и индекс массы тела как факторы женского бесплодия и отрицательных результатов применения вспомогательных репродуктивных технологий //Акушерство и Гинекология.2021. № 2.С. 21-26.

21 Волков В.Г., Ахильгова З.С. Факторы риска ранних потерь беременности. Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2020. №1. Публикация 1-11. URL: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-1/1-11.pdf (дата обращения: 26.11.2020)

22 Воробьева И. И., Живецкий А. А., Денисова В. Бы. Невынашивание беременности: современные взгляды на проблему (Обзор литературы). Здоровье женщины. 2017. №3 (119). С. 113-117.].

23 ВРТ в России и мире. https://www.mcrm.ru/encyclopedia/articles/ekstrakorporalnoe-oplodotvorenie-eko/vrt-v-rossii-i-mire/

24 Газиева И. А. Прогностическая значимость клинико-анамнестических, микробиологических и биохимических факторов в генезе ранних репродуктивных потерь, не связанных с хромосомными аномалиями плода. Рос. вестник акушера-гинеколога. 2014. № 5. С. 54-59

25 Гайская О. В. Методы диагностики угрозы прерывания беременности в первом триместре. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2017. Т.16, №1. С. 44-48.

26 Гайская О.В. Клинико - диагностическое значение специфических

маркеров при угрожающем выкидыше у беременных в первом триместре: автореф. дис.. к.м.н. Белгород, 2018. 23 с.

27 Дмитриенко Г.В. Показатели врожденного иммунитета как критерий раннего прогнозирования течения гестационного процесса: автореф. дис. … канд. мед. наук / Г.В. Дмитриенко. Волгоград, 2015. 19 с.

28 Доброхотова Ю. Э., Ганковская Л. В., Бахарева И. В., Свитич О. А., Малушенко С. В., Магомедова А. М. Роль иммунных механизмов в патогенезе невынашивания беременности. Акушерство и гинекология. 2016. № 7. С. 5-10

29 Доброхотова Ю.Э. Невынашивание беременности: инфекционные факторы / Ю. Э. Доброхотова // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2013. – № 5. – С. 32-37.

30 Дубоссарская З.М., Дука Ю.М. Место тромбофилии в структуре синдрома потери плода. Таврический медико-биологический вестник. 2011; 14 (3; 1): 75-77

31 Енькова Е. В. Мужской фактор невынашивания беременности. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2017. Т. 16, № 3. С. 555-564

32 Живецкая-Денисова А. А., Воробьева И. И., Ткаченко В. Б., Рудакова Н. В. Невынашивание беременности: современные подходы к диагностике, профилактике и лечению. Перинатология и педиатрия. 2017. № 2(70). С. 91-98.

33 Игитова М.Б., Сафарова Г.А.К., Ремнева О.В., Кравцова Е.С. Перинатальные исходы у женщин с репродуктивными потерями в анамнезе. Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение. 2018. № 2 (20). С. 64-70.

34 Инфекции в акушерстве и гинекологии : практ. руководство / О.Л. Антонова, И.Т. Говоруха, А.А. Железная [и др.]; под ред. проф. В.К. Чайки. – Донецк: ООО «Альматео», 2012. – С. 317-346.

35 Калинина Е.А. Осложнения вспомогательных репродуктивных

технологий / В книге: Гинекология. Абубакиров А.Н., Адамян Л.В., Азиев и др. Национальное руководство. Москва, 2017. С. 883-889.

36 Кривонос М. И., Зайнулина М. С., Сельков С. А. Антифосфолипидный синдром и ранние репродуктивные потери. Акушерство, гинекология и репродукция, (2016). 10 (4), 114-122.

37 Кузьмин В.Н., Машина М.А. Оптимизация специализированной медицинской помощи при бесплодии. Лечащий врач. 2017. № 3. С. 38.

38 Кучер Е. Невынашивание беременности. Современный взгляд на проблему / Е. Кучер // З турботою про жінку. – 2014. – N 7. – С. 8-1

39 Лысенко О.В., Рождественская Т.А., Прусакова О.И. Бесплодие: проблемы на этапе оказания лечебно-диагностической помощи. Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 72-ой научной сессии сотрудников университета. Витебский государственный медицинский университет. 2017. С. 262-263

40 Майсурадзе Л.В., Магаева Ф.Ю., & Алборов Д.К. Влияние бактериального вагиноза на течение беременности, состояние плода и новорожденного. Кубанский научный медицинский вестник, (2014). (6), 58-62.

41 Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Хизроева Д. Х. Тромбопрофилактика у беременных с тромбофилией и тромбозами в анамнезе. Сибирский научный медицинский журнал, vol. 33, no. 6, 2013, с. 99-109

42 Манкевич Я. Б., Аксененко В. А., Нежданов И. Т. Некоторые аспекты привычного невынашивания беременности. Вестник Рос. университета РУДН. 2012. № 5. С. 231-235

43 Назарова В. В., Шипицына Е. В., Шалепо К. В., Савичева А. М. Бактериальные сообщества, формирующие микроэкосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе. Журнал акушерства и женских болезней, (2017). 66 (6), 30-43

44 Олина А.А., Садыкова Г.К., Галинова И.В. Структура репродуктивных потерь Пермский медицинский журнал. 2017. Т. 34. № 6. С.

59-66.

45 Особенности течения беременности и родов у женщин с неразвивающейся беременностью в анамнезе / М. С. Селихова, Г. А. Дмитриенко, О. А. Кузнецова [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – № 5. – С. 64–66.

46 Подгорная А.В., Махмутходжаев А.Ш., Михеенко Г.А., Кох Л.И., Юрьев С.Ю. Ведение беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25771 (дата обращения: 27.11.2020)

47 Радзинский В.Е., Ордиянц И.М., Побединская О.С., Зыков Е.В. Прогестерон и репродуктивные потери. Акушерство и гинекология. 2017. № 8. С. 109-114

48 Репродуктивное здоровье. // https://www.who.int/topics/ reproductive_health/ru/

49 Рогозина М.А. Анализ репродуктивных потерь в ранние сроки беременности и их влияние на демографическую ситуацию. Молодежь и медицинская наука в XXI веке. Материалы XXI Всероссийской научной заочной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Под редакцией Л.М. Железнова, М.П. Разина, Е.С. Прокопьева. 2020. С. 19-20.

50 Жуцзыгули А.,Рухляда Н.Н., Тайц А. Н., Прохорович Т.И., Либова Т.А. Роль ALK5 в профиле ранних репродуктивных потерь при применении вспомогательных репродуктивных технологий//Журнал «Хирург».2021. №3-4.С. 70-76.

51 Жуцзыгули А.,Рухляда Н.Н., Айли И. Роль активин-подобной рецепторной киназы-5 в имплантации бластоцисты и развитии плацент//Современная наука: актуальные проблемы теории и практики Серия: Естественные и Технические Науки.2020. №08.С. 163-167.

52 Садекова О. Н., Князева И. П., Яровая Е. Б. Радзинский В. Е.,

Демидова Е.М., Самоходская Л.М., Ткачук В. А. Роль системных нарушений в формировании гестационных осложнений и их генетическая составляющая. Акушерство и гинекология. 2012; 4/2: 21-28.

53 Селхаджиева М.С. Роль циркулирующих антифосфолипидных антител в развитии синдрома потери плода. Акушерство, гинекология и репродукция. 2014; 8 (1): 31-33.

54 Синякова А. А., Шипицына Е. В., Будиловская О. В. Особенности микрофлоры влагалища в первом триместре у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе. Журнал акушерства и женских болезней, (2018). 67 (5), 32-41.

55 Синякова А.А. Современные представления о микробиоценозе влагалища и его влиянии на исходы беременности. Журнал акушерства и женских болезней, (2017). 66 (6), 89-100.

56 Синякова А.А., Шипицына Е.В., Будиловская О.В., Болотских В.М., Савичева А.М. Клинико-анамнестические и микробиологические предикторы невынашивания беременности. Журнал акушерства и женских болезней, (2019). 68 (2), 59-70

57 Список стран мира по коэффициенту фертильности. По данным ЦРУ. Суммарный коэффициент рождаемости стран мира. // http://merkator.org.ua/ru/spravochnik/spisok-stran-po-koeffitsientu-fertilnosti/

58 Суханова Л.П. Репродуктивный процесс в демографическом развитии России. Социальные аспекты здоровья населения. URL: http://vestnik.mednet.ru/content/view/159/30/lang,ru/.(дата обращения: 02.11.2020)

59 Сухих Г.Т. Иммунные механизмы в физиологии и патологии беременности / Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько // Иммунология. – 2012. – Т. 9, № 2. – С. 103-108.

60 Таланова И.Е. Содержание хемокинов у женщин с угрожающими преждевременными родами / И.Е. Таланова, Н.Ю. Борзова, Н.Ю. Сотникова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – Т. 13, № 3. – С.

32-37.

61 Тетруашвили Н.К. Диагностическая и прогностическая значимость определения цитокинов у больных с привычным невынашиванием беременности: автореф. дис. канд. мед. наук / Н.К. Тутруашвили. – М., 2012. – 24 с.

62 Ткач И. Р., Гулеюк Н. Л., Заставна Д. В., Безкоровайна Г. М., Федишин Т. В. Вклад хромосомных аномалий в генез спорадических и привыкших ранних репродуктивных потерь. Факторы экспериментальной эволюции организмов. 2017. Т. 21. С. 340-344.

63 Ткаченко Ж. С., Денисенко С. В. Оптимизация современной диагностики хромосомных аномалий, выявленных у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Здоровье женщины. 2011. № 3. С. 230-234.].

64 Третьякова О.С., Гаффарова А.С. Динамика репродуктивных потерь в российской федерации и республике Крым за 2015-2017 гг. Дни науки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Сборник трудов V Научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых. 2019. С. 122-125.

65 Тромбогеморрагические осложнения в акушерско-гинекологической клинике. Под ред. А.Д. Макацария. М. 2010; 1056 с.

66 Усова А.В. Оценка основных показателей цитокинового профиля у женщин с угрозой прерывания беременности и на фоне ее лечения: автореф. дис... канд. мед. наук / А.В. Усова. – Омск, 2017. – 25 с.

67 Характеристика системных и локальных иммунных реакций при привычном невынашивании беременности / С.Ю. Юрьев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 10. – С. 39-45.

68 Хонина Н.А. Особенности продукции цитокинов при физиологической и осложненной беременности / Н.А. Хонина, Н.М. Пасман, А.А. Останин // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 2. – С. 11-15.

69 Щеголев А.И., Туманова У.Н., Мишнёв О. Д. Влияние курения на

развитие поражений плаценты // Гинекология. 2018. № 20 (2). С. 34 – 40

70 Abdel-Raoufabdel-Aziz Afifi R., Ali D. K., Talkhan H. M. Pregnancy outcome and the effect of maternal nutritional status. J. Egypt Soc. Parasitol. 2013. Vol. 43, №1. P. 125-132

71 Ahmed S, Bradshaw A D, Gera S, et al. The TGF-βeta/Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance[J]. J Clin Med, 2017,6(1).

72 Alecsandru D., García-Velasco J. A. Immunology and human reproduction. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2015. V. 27(3). P. 231-234

73 Analysis of clinical factors on early pregnancy loss during in vitro fertilization-embryo transfer treatment and natural pregnancy. Fan MJ, Tian C, Chang L, Wang XY, Li R. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2018 Nov 25;53(11):755-760.

74 Anblagan D, et al. Maternal smoking during pregnancy and fetal organ growth: a magnetic resonance imaging study. PLoS One. 2013;8(7):e67223.

75 Andraweera P. H., Dekker G. A., Roberts C. T. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. Human Reproduction Update. 2012. Vol. 18, № 4. P. 436-457

76 Arachchillage DR, et al. Diagnosis and management of non-criteria obstetric antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost. 2015;113(1):13–19

77 Association between induced abortion history and later in vitro fertilization outcomes. Wang Y, Sun Y, Di W, Kuang YP, Xu B.Int J Gynaecol Obstet. 2018 Jun;141(3):321-326.

78 Azem F, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod. 2004;19(2):368–370

79 Bao, W; Wang, XP; De Lin, Q .; Wang, WJ; Yin, GJ; Qiu, LH Decidual cd4 + cd25 + cd127dim / - regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. Euro. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2011, 155, 94-98.

80 Basal E, Ayeni T, Zhang Q, Langstraat C, Donahue PK, Pepin D, Yin X, Leo E, Cliby W. Patterns of Mullerian inhibiting substance type II and candidate

type I receptors in epithelial ovarian cancer. Curr Mol Med. 2016;16:222–31.

81 Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. Reprod Biol Endocrinol. 2018;16(1):121. Published 2018 Dec 5. doi:10.1186/s12958-018-0414-2

82 Beighton P. Heterozygous manifestations in the heritable disorders of the skeleton. Pediatr Radiol. 1997;27:397–401.

83 Boks M. A., Kager-Groenland J. R., Haasjes M. S., Zwaginga J. J., van Ham S. M., Brinke A. IL-10 – generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study of human clinical-applicable DC. Clin. Immunol. 2012. Vol. 142, No 3. P. 332-342.

84 Bondestam J, Huotari MA, Morén A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, Kallio J, Horelli-Kuitunen N, Aaltonen J, Fujii M, Moustakas A, ten Dijke P, Otonkoski T, Ritvos O. cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C) Cytogenet Cell Genet. 2001;95:157–62.

85 Bouet PE, et al. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. Fertil Steril. 2016;105(1):106–110.

86 Branch, DW; Gibson, M.; Silver R. M. Clinical Practice. Recurrent miscarriage. N. Engl. J. Med. 2010, 363, 1740-1747.

87 Brkic, J .; Dunk, C .; O'brien, J.; Fu, G .; Nadeem, L .; Wang, YL; Rosman, D .; Salem, M .; Synova, On .; Yougbare, I .; and others. microRNA-218-5p promotes differentiation of endovascular trophoblasts and remodeling of spiral arteries. Ther. 2018 , 26 , 2189–2205.

88 Brndum-Jacobsen P., Benn M., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B. G. 25-Hydroxyvitamin D concentrations and risk of venous thromboembolism in the general population with 18 791 participants. J. Thromb. Haemost. 2013. Vol. 11. No 33. P. 423-431.

89 Buzzaccarini, G.; Vitagliano, A.; Andrisani, A.; Santarsiero, CM; Cicinelli, R.; Nardelli, S.; Ambrosini, G.; Cicinelli, E. Chronic endometritis and implantation of an altered embryo: a unified pathophysiological theory from a systematic review of the literature. J. Assist. Reprod. Genet. 2020 , 37 , 2897–2911

90 Canali S, Core AB, Zumbrennen-Bullough KB, Merkulova M, Wang CY, Schneyer AL, Pietrangelo A, Babitt JL. Activin B Induces Noncanonical SMAD1/5/8 Signaling via BMP Type I Receptors in Hepatocytes: Evidence for a Role in Hepcidin Induction by Inflammation in Male Mice. Endocrinology. 2016;157:1146–62.

91 Carter, AM Comparative studies of placentation and immunology in non-human primates offer a scenario for the evolution of deep trophoblast invasion and an explanation for human pregnancy disorders. Reproduction 2011 , 141 , 391-396

92 Cavalcante, MB; Cavalcante, C.; Sarno, M.; da Silva, ACB; Barini, R. Antinuclear antibodies and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. I am. J. Reprod. Immunol. 2020, 83, e13215

93 Cenksoy P, et al. Hysteroscopic findings in women with recurrent IVF failures and the effect of correction of hysteroscopic findings on subsequent pregnancy rates. Arch Gynecol Obstet. 2013;287(2):357–360

94 Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2017.

95 Chen A, Oster E, Williams H. Why Is Infant Mortality Higher in the United States Than in Europe? // Am Econ J Econ Policy. 2016. Vol. 8(2). P. 89-124.

96 Chen, X.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Cheung, WC; Zhang, T.; Qi, R.; Chang, JPW; Wang, CC; Li, T. S. The relationship between chronic endometritis and the density of natural uterine killer cells in women with recurrent miscarriage: clinical implications. J. Obs. Gynaecol Res. 2020 , 46 , 858–863

97 Chen, X.; Mariee, N.; Jiang, L.; Liu, Y.; Wang, CC; Li, TC; Laird, S. Measuring the percentage of uterine natural killer cells in the peri-implantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishing a control range. I am. J. Obstet. Gynecol. 2017 , 217 , 680.e1–680.e6

98 Cheng Linghui, Cao Yunxia. The relationship between transforming growth factor β1 and its receptor and abortion after in vitro embryo transfer [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005.40 (5): 299-301.

99 Chromosome abnormality rate and related factors of spontaneous abortion in early pregnancy. Shen JD, Sun FX, Qu DY, Xie JZ, Gao L, Qiu Q, Gao C, Wu W, Wu CX, Wang DW, Diao FY, Liu JY. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2019 Dec 25;54(12):797-802.

100 Cicinelli E, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Hum Reprod. 2015;30(2):323–330

101 Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. Nicotine Tob Res. 2004;6(Suppl 2):S125–S140.

102 CONF: Failure: Understanding Art as Process, 1150–1750 (5-6 Nov 20). In: ArtHist.net, Oct 26, 2020 (accessed Nov 27, 2020), https://arthist.net/archive/23803

103 Coricor G, Serra R. TGF-βeta regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms[J]. Sci Rep, 2016,6:38616

104 Correlation of bacterial vaginosis with preterm labour: a case control study / W. Nigeen, A.S. Bhat, K. Gulzar, S. Taing // Int J ReprodContraceptObstet Gynecol. – 2015. – Vol. 4. – P. 1868-74.

105 Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod BioMed Online. 2014;28(1):14–38

106 Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC: Recurrent implantation failure: definition and

management. Reprod Biomed Online. 2014, 28: 14-38

107 Cumulative live birth rates following miscarriage in an initial complete cycle of IVF: a retrospective cohort study of 112 549 women. Cameron NJ, Bhattacharya S, Bhattacharya S, McLernon DJ. Hum Reprod. 2017 Nov 1;32(11):2287-2297

108 Daher S, de Arruda G D K, Blotta M H, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss[J]. J Reprod Immunol, 2004,62(1-2):151-157.

109 Davis, J. E.; Pollheimer, J.; Yong, ON; Kokkinos, Mich.; Kalyonis, B.; Knofler, M.; Murty, P. Epithelial-mesenchymal transition during extra-dorsal trophoblast differentiation. Honeycomb adhesives. Migr. 2016 , 10 , 310-321.

110 di Clemente N, Jamin S P, Lugovskoy A, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-βeta[J]. Mol Endocrinol, 2010,24(11):2193-2206.

111 D'Ippolito, S.; Ticconi, C.; Tersigni, C.; Garofalo, S.; Martino, C.; Lanzone, A .; Scambia, G.; Di Simone, N. The pathogenic role of autoantibodies in recurrent pregnancy loss. I am. J. Reprod. Immunol. 2020, 83 , e13200

112 Dubon M J, Yu J, Choi S, et al. Transforming Growth Factor beta Induces Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Migration via Noncanonical Signals and N-cadherin[J]. J Cell Physiol, 2017

113 Effect of the number of previous spontaneous abortions on the first in vitro fertilization cycle. Zhang YF, Luo HN, Zhang YJ, Shi R, Ma JF, Zhang YS. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2019 Dec 25;54(12):803-807

114 El Tokhy O, Kopeika J, El-Toukhy T. An update on the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. Womens Health (Lond). 2016;12(5):496-503.

115 Eshre's RPL Recommendation Group; Bender Atik, R.; Christiansen, OB; Elson, J.; Colte, AM; Lewis, S.; Middeldorp, S.; Nelen, W.; Peramo, B.; Quenby, S.; and others. Eshre's recommendation: Recurrent miscarriage. Gm. Reprod. Opened 2018, 2018, hoy004

116 Esther Winter, Jim Wang, Michael J. Davies, Robert Norman, Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment, Human

Reproduction, Volume 17, Issue 12, December 2002, Pages 3220–3223

117 Fang L, Chang HM, Cheng JC, Yu Y, Leung PC, Sun YP. Growth Differentiation Factor-8 Decreases StAR Expression Through ALK5-Mediated Smad3 and ERK1/2 Signaling Pathways in Luteinized Human Granulosa Cells. Endocrinology. 2015;156:4684–94.

118 Fedorcsak P, et al. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. Acta Obstet Gynecol Scand. 2000;79(1):43–48

119 Fuentes A, et al. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. Fertil Steril. 2010;93(1):89–95

120 Gao Y, Duran S, Lydon JP, DeMayo FJ, Burghardt RC, Bayless KJ, Bartholin L, Li Q. Constitutive Activation of Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 in the Mouse Uterus Impairs Uterine Morphology and Function. Biol Reprod. 2015;92:34–4

121 Gao Y, Li S, Li Q. Uterine epithelial cell proliferation and endometrial hyperplasia: evidence from a mouse model. Mol Hum Reprod. 2014;20:776–86

122 Gellersen, B.; Brosens, JJ Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. Endocr. Ed. 2014 , 35 , 851-905.

123 Gerbaud P., Pidoux G. Review: an overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. Placenta. 2015. Vol. 36. Suppl. 1. P. 35-42.

124 Global Conference on Primary Health Care. // https://www.who.int/teams/primary-health-care/conference/declaration

125 Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, van den Eijnden-van Raaij J, Donahue PK. The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. Genes Dev. 1998;12:844–57

126 Guerrero, B.; Hassouneh, F.; Delgado, E.; Casado, JG; Tarazona, R. Natural killer cells in recurrent miscarriage: a review. J. Reprod. Immunol. 2020 , 142 , 103209.

127 Gurunath S., Pandian Z., Richard A. Anderson, Siladitya Bhattacharya, Defining infertility a systematic review of prevalence studies, Human Reproduction Update, Volume 17, Issue 5, September-October 2011, Pages 575–588

128 Health-21. Policy framework for achieving health for all in the who European region. // https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/98398/wa540ga 199heeng.pdf

129 Hefler-Frischmuth, K.; Walch, K.; Hefler, L.; Tempfer, C.; Grimm, S. Serological markers of autoimmunity in women with recurrent miscarriage. I am. J. Reprod. Immunol. 2017 , 77

130 Heusser K. Pregnancy-induced sympathetic overactivity: A precursor of preeclampsia. BioScience Trends. 2016. Vol. 10, No 1. P. 34-41

131 Higuette, Arkansas; Buckberry, S.; Mayne, BT; Hoda, CM; Bianco-Miotto, T.; Roberts, CT. First-trimester trophoblasts forming endothelial tubes mimic the expression profile of the "blood vessel development" genes in vitro. Gene Expr. Patterns 2016 , 21 , 103-110

132 Hong Li, Y.; Marren, A. Recurrent miscarriage: A summary of international evidence-based guidelines and practices. Aust J. Gen. Pr. 2018 , 47 , 432–436

133 Hornstein MD, et al. Antiphospholipid antibodies and in vitro fertilization success: a meta-analysis. Fertil Steril. 2000;73(2):330–333

134 Hu L, Du J, Lv H, et al. Influencing factors of pregnancy loss and survival probability of clinical pregnancies conceived through assisted reproductive technology. Reprod Biol Endocrinol. 2018;16(1):74

135 Huang G, Osmulski P A, Bouamar H, et al. TGF-βeta signal rewiring sustains epithelial-mesenchymal transition of circulating tumor cells in prostate cancer xenograft hosts[J]. Oncotarget, 2016,7(47):77124-77137

136 Huang, N.; Chi, H.; Qiao, J. The role of regulatory T cells in regulating fetal and maternal immune tolerance in healthy pregnancy and reproductive diseases. The front. Immunol. 2020, 11, 1023.

137 Huang, Z.; Li, S.; Fan, W.; Ma, B. Transforming growth factor beta1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via the TGF-beta / Smad3 signaling pathway. Oncotarget 2017 , 8 , 33560–33570

138 Huisman G.J. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that undergone three to five days of culture / G.J. Huisman, B.M. Fauser, M.J. Eijkemans // Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 73, № 1. – P. 117-123

139 Hu-Lowe DD, Chen E, Zhang L, Watson KD, Targeting Activin Receptor-Like Kinase 1 Inhibits Angiogenesis and Tumorigenesis through a Mechanism of Action Complementary to Anti-VEGF Therapies. Cancer Res. 2011;71:1362–73

140 Hur K., K.M. Yang, J.Y. Kim, I.O. Song, J.Y. Jun, I.S. Kang, Risk factors associated with preclinical pregnancy loss following ART, 80(3) (2003) 169–170.

141 ICMART preliminary world report 2016. ESHRE. Copenhagen, Denmark July 7, 2020. https://secureservercdn.net/198.71.233.47/3nz.654.myftpupload.com/ wp-content/uploads/ICMART-ESHRE-WR2016-FINAL-20200901.pdf

142 Influence of surgical evacuation on pregnancy outcomes of subsequent embryo transfer cycle following miscarriage in an initial IVF cycle: a retrospective cohort study. Meng J, Zhu M, Shen W, Huang X, Sun H, Zhou J. BMC Pregnancy Childbirth. 2019 Nov 8;19(1):409

143 Itoh F, Itoh S, Carvalho RL, Adachi T, Ema M, Goumans MJ, Larsson J, Karlsson S, Takahashi S, Mummery CL, ten Dijke P, Kato M. Poor vessel formation in embryos from knock-in mice expressing ALK5 with L45 loop mutation defective in Smad activation. Lab Invest. 2009;89:800–10.

144 Jia-Rong Z, Shuang-Di L, Xiao-Ping W: Eutopic or ectopic pregnancy: a competition between signals derived from the endometrium and the fallopian tube for blastocyst implantation. Placenta. 2009, 30: 835-839.

145 Jones-Paris C R, Paria S, Berg T, et al. Embryo implantation triggers dynamic spatiotemporal expression of the basement membrane toolkit during uterine reprogramming[J]. Matrix Biol, 2016.,

146 Jornvall H, Blokzijl A, Dijke PT, Ibanez CF. The Orphan Receptor

Serine/Threonine Kinase ALK7 Signals Arrest of Proliferation and Morphological Differentiation in a Neuronal Cell Line. J Biol Chem. 2001;276:5140–6

147 Jung B, Staudacher J J, Beauchamp D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer[J]. Gastroenterology, 2017,152(1):36-52

148 Kaune H, Peyrache E, Williams S A. Oocyte-derived Smad4 is not required for development of the oocyte or the preimplantation embryo[J]. Theriogenology, 2015,83(5):897-903.

149 Keller CC; Eikmans, M.; van der Hoorn, M. P.; Lashley, L. Recurrent miscarriages and the relationship to regulatory T cells; a systematic review. J. Reprod. Immunol. 2020 , 139 , 103105

150 Kim M R, Park D W, Lee J H, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells[J]. Mol Hum Reprod, 2005,11(11):801-808.

151 Knofler M.; Haider, S.; Saleh, L.; Pollheimer, J.; Gamage, T.; James, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. Cell. Mol. Life Sci. 2019 , 76 , 3479-3496.

152 Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. Curr Opin Obstet Gynecol. 2004;16(3):221–229.

153 Kunzle R, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. Fertil Steril. 2003;79(2):287–291.]

154 Kuon RJ; Muller, F .; Vomstein, K .; Weber, M .; Hudalla, H .; Rosner, S .; Strowitzki, T .; Markert, U .; Daniel, V.; The B. Levels of peripheral natural killer cells before pregnancy as markers of immunomodulatory treatment in patients with recurrent miscarriage. Arch. Immunol. Exp. (Warsz) 2017 , 65 , 339-346.

155 Larsen EC, et al. New insights into mechanisms behind miscarriage. BMC Med. 2013;11:154. doi: 10.1186/1741-7015-11-154.

156 Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with “thin” endometrium - an

ongoing challenge. Gynecol Endocrinol. 2014;30(6):409–414

157 Lee HJ, Kim PH. Further Characterization of Activin A-induced IgA Response in Murine B Lymphocytes. Immune Netw. 2009;9:133.

158 Lessey B.A. Assessment of endometrial receptivity. Fertil Steril 2011; 96: 3: 522-529.

159 Li WY, Dudas M, Kaartinen V. Signaling through Tgf-β type I receptor Alk5 is required for upper lip fusion. Mech Dev. 2008;125:874–82.

160 Li X, Shen C, Liu X, et al. Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy[J]. Environ Pollut, 2017,222:523-531.

161 Li Y, Klxausen C, Zhu H, Leung PC. Activin A Increases Human Trophoblast Invasion by Inducing SNAIL-Mediated MMP2 Up-Regulation Through ALK4. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100:E1415–27.

162 Li, Q. Transformation of growth factor beta signaling in uterine development and function. J. Anim. Sci.Biotechnol. 2014 , 5 , 52.

163 Lin S, Svoboda KK, Feng JQ, Jiang X. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. Bone Res. 2016;4:16005

164 Mahvash Zargar, Nargess Razmkhah, Roshan Nikbakht Evaluating the factors associated with pregnancy loss in pregnant women undergoing assisted reproductive techniques. Middle East Fertility Society Journal. Volume 23, Issue 4, December 2018, Pages 342-345

165 Massague J. The TGF-βeta family of growth and differentiation factors[J]. Cell, 1987,49(4):437-438., Li M O, Flavell R A. TGF-βeta: a master of all T cell trades[J]. Cell, 2008,134(3):392-404.

166 Mathyk B, Adams N, Young S L. Endometrial receptivity: lessons from systems biology and candidate gene studies of endometriosis[J]. Minerva Ginecol, 2017,69(1):41-56

167 Miles DC, Wakeling SI, Stringer JM, van den Bergen JA, Wilhelm D, Sinclair AH, Western PS. Signaling through the TGFβ-Activin Receptors ALK4/5/7 Regulates Testis Formation and Male Germ Cell Development. PLoS One.

2013;8:e54606.

168 Mills J.L., J.L. Simpson, S.G. Driscoll, L. Jovanovic-Peterson, M. Van Allen, J.H. Aarons, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception New Engl. J. Med., 319 (25) (1988), pp. 1617-1623]

169 Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR. Bmpr encodes a type I bone porphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryongenesis. Genes Dev. 1995;9:3027–37.

170 Mitchell D, Pobre EG, Mulivor AW, Grinberg AV, Castonguay R, Monnell TE, Solban N, Ucran JA, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R. ALK1-Fc Inhibits Multiple Mediators of Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. Mol Cancer Ther. 2010;9:379–88.

171 Miwa I, et al. Pathophysiologic features of “thin” endometrium. Fertil Steril. 2009;91(4):998–1004.

172 Monsivais, D., Peng, J., Kang, Y., & Matzuk, M. M. (2019). Activin-like kinase 5 (Alk5) inactivation in the mouse uterus results in metastatic endometrial carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(9), 3883–3892

173 Moragianni VA, Jones SM, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril. 2012;98(1):102–108

174 Moreno I, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. Am J Obstet Gynecol. 2016;215(6):684–703.

175 Moreno I, et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. Am J Obstet Gynecol. 2018;218(6):602.e1–602.e16

176 Mostafa Metwally & William L. Ledger (2011) Long-term complications of assisted reproductive technologies, Human Fertility, 14:2, 77-87

177 Moustakas, A.; Heldin, CH Mechanisms of the TGFbeta-induced

epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Med. 2016 , 5 , 63.

178 Nagashima T, Li Q, Clementi C, et al. BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance[J]. J Clin Invest, 2013,123(6):2539-2550

179 Nakano, N. et al. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)-beta signaling by disrupting TGF-βeta receptor complex formation. J Biol Chem 292, 4099–4112 (2017).

180 Nepomnaschy PA, et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans: Proc Natl Acad Sci U S A; 2006. p. 3938–42.

181 Orvieto R, et al. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. Int J Gynaecol Obstet. 2009;104(1):53–55.

182 Pacifici M, Shore EM. Common mutations in ALK2/ACVR1, a multi-faceted receptor, have roles in distinct pediatric musculoskeletal and neural orphan disorders. Cytokine Growth Factor Rev. 2016;27:93–104

183 Padula, A.M., Rivera-Núñez, Z. & Barrett, E.S. Combined Impacts of Prenatal Environmental Exposures and Psychosocial Stress on Offspring Health: Air Pollution and Metals. Curr Envir Health Rpt 7, 89–100 (2020)

184 Pasch LA, et al. Psychological distress and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril. 2012;98(2):459–464

185 Peng J, Fullerton PT Jr, Monsivais D, Clementi C, Su GH, Matzuk MM. Uterine Activin-Like Kinase 4 Regulates Trophoblast Development During Mouse Placentation. Mol Endocrinol. 2015;29:1684–93

186 Peng J, Monsivais D, You R, Zhong H, Pangas SA, Matzuk MM. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:E5098–107

187 Perricone, C.; de Carolis, C.; Perricone, R. Pregnancy and autoimmunity: a common problem. Best pr. Res. Clin. Rheumatol. 2012 , 26 , 47-60

188 Philippe Tummers, Paul De Sutter, Marc Dhont, Risk of spontaneous abortion in singleton and twin pregnancies after IVF/ICSI, Human Reproduction, Volume 18, Issue 8, August 2003, Pages 1720–1723

189 Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. Fertility and Sterility, 99(1), 63.

190 Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Stanger JD, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A, Almahbobi G. Dysregulation of granulosal bone morphogenetic protein receptor 1B density is associated with reduced ovarian reserve and the age-related decline in human fertility. Mol Cell Endocrinol. 2016;425:84–93

191 Reister, F. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women / F. Reister, H.-G. Frank, J.C.P. Kingdom [et al.] // Lab. Invest. 2001. Vol. 81, N8. P. 1143–1152

192 Revelli A., S. Casano, L.D. Piane, G. Grassi, G. Gennarelli, D. Guidetti, et al. A retrospective study on IVF outcome in euthyroid patients with anti-thyroid antibodies: effects of levothyroxine, acetyl-salicylic acid and prednisolone adjuvant treatments ReprodBiolEndocrinol., 7 (2009), p. 137

193 Richter KKRB, et al. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. Fertil Steril. 2007;87(1):53–59.

194 Rigueur D, Brugger S, Anbarchian T, Kim JK, Lee Y, Lyons KM. The Type I BMP Receptor ACVR1/ALK2 is Required for Chondrogenesis During Development. J Bone Miner Res. 2015;30:733–41

195 Ripamonti U, Parak R, Klar R M, et al. The synergistic induction of bone formation by the osteogenic proteins of the TGF-βeta supergene family[J]. Biomaterials, 2016,104:279-296.

196 Rossant J. (2015). Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. Development 142, 9–12. 10.1242/dev.115451.

197 Rostama B, Turner JE, Seavey GT, Norton CR, Gridley T, Vary CP, Liaw L. DLL4/Notch1 and BMP9 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27KIP1 and Thrombospondin-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35:2626–37

198 Salpingectomy for hydrosalpinx prior to in vitro fertilization. Fertil

Steril. 2008;90(5 Suppl):S66–8.

199 Salumets A, et al. Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. Hum Reprod. 2006;21(9):2368–2374.

200 Seshadri, S.; Sunkara, S. K. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Update 2014 , 20 , 429-438.

201 Shapiro BS, et al. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. Reprod BioMed Online. 2016;33(1):50–55

202 Shooner C, Caron P L, Frechette-Frigon G, et al. TGF-βeta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005,3:20

203 Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis / C. Marconi, G.G. Donders, G. Bellen, D.R. Brown, C.M. Parada, M.G. Silva // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2013. – Vol. 167. – P. 205–209

204 Silveira C O, Rezende C P, Ferreira M C, et al. Implantation Failure Is Associated With Increased alpha-Inhibin and beta-Glycan Gene Expression in Secretory Phase Endometrium: Nested Case-Control Study of Infertile Women Undergoing IVF/Fresh Embryo Transfer[J]. Reprod Sci, 2016.

205 Smith, SD; Dunk, CE; Aplin, JD; Harris, LK; Jones, R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. I am. J. Pathol. 2009 , 174 , 1959–1971.

206 Sokolov D. I. Mikhailova, V. A.; Agnaeva, AO; Bazhenov D. O. Khokhlova E. V. Bespalova, ON; Gzgzyan AM; Selkov S. A. Interaction of Nk and trophoblast cells: Cytotoxic activity in repeated miscarriage. Gynecol. Endocrinol. 2019 , 35 , 5–10

207 Stange K, Désir J, Kakar N, Mueller TD, Budde BS, Gordon CT, Horn D, Seemann P, Borck G. A hypomorphic BMPR1B mutation causes du Pan acromesomelic dysplasia. Orphanet J Rare Dis. 2015:1–6.

208 Stange K, Désir J, Kakar N, Mueller TD, Budde BS, Gordon CT, Horn D, Seemann P, Borck G. A hypomorphic BMPR1B mutation causes du Pan acromesomelic dysplasia. Orphanet J Rare Dis. 2015:1–6.

209 Starc A, Trampuš M, Pavan Jukić D, Rotim C, Jukić T, Polona Mivšek A. Infertility and sexual dysfunctions: a systematic literature review. Acta Clin Croat. 2019 Sep;58(3):508-515.

210 Strobel, L.; Vomstein, K.; Kyvelidou, C.; Hofer-Tollinger, S.; Feil, K.; Kuon, RJ; Ebner, S.; Troppmair, J.; Toth, B. Other background: profiles of natural killer cells in secondary and primary miscarriage. J. Clin. Med. 2021 , 10 , 194.

211 Tang M, Naidu D, Hearing P, et al. LEFTY, a member of the transforming growth factor-beta superfamily, inhibits uterine stromal cell differentiation: a novel autocrine role [J]. Endocrinology, 2010,151(3):1320-1330.

212 Tsubakihara Y.; Moustakas, A. Epithelial-mesenchymal transition and metastasis under the control of transforming growth factor beta. Int. J. Mol. Sci. 2018 , 19 , 3672.

213 van Dijk, MM; Colte, AM; Limpens, J.; Kirk, E.; Quenby, S.; van Velie, M.; Goddin, M. Recurrent miscarriage: diagnostic examination after two or three miscarriages? Systematic review of the literature and meta-analysis. Gm. Reprod. Update 2020 , 26 , 356-367.

214 Wang W J, Liu F J, Qu H M, et al. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage[J]. J Reprod Immunol, 2013,99(1-2):39-45.

215 Wang Y, Nicholls PK, Stanton PG, Harrison CA, Sarraj M, Gilchrist RB, Findlay JK, Farnworth PG. Extra-ovarian expression and activity of growth differentiation factor 9. J Endocrinol. 2009;202:419–30.

216 Wang, WJ; Zhang, H.; Chen, ZQ; Zhang, W.; Liu, XM; Fang, JY; Liu, F. J.; Kwak-Kim, J. Endometrial tgf-beta, il-10, il-17, and autophagy are impaired in women with recurrent implantation failure and chronic endometritis. Reprod. Biol. Endocrinol. 2019 , 17 , 2.

217 Waylen AL, et al. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes

of assisted reproduction: a meta-analysis. Hum Reprod Update. 2009;15(1):31–44., Щеголев А.И., Туманова У.Н., Мишнёв О. Д. Влияние курения на развитие поражений плаценты // Гинекология. 2018. № 20 (2). С. 34 - 40

218 Wolfman N M, Hattersley G, Cox K, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-βeta gene family[J]. J Clin Invest, 1997,100(2):321-330.,

219 Wöltje K, Jabs M, Fischer A. Serum Induces Transcription of Hey1 and Hey2 Genes by Alk1 but Not Notch Signaling in Endothelial Cells. PLoS One. 2015;10:e0120547.

220 Wrana J L, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF-βeta receptor[J]. Nature, 1994,370(6488):341-347.

221 Wu L, Luo L H, Zhang Y X, et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014,12:74.

222 Yin, Y.; Zhong, Y. P.; Zhou, CQ; Xu, YW; Wang, Q.; Li, J.; Shen, XT; Wu, HT Antinuclear antibodies predict poor IVF outcome: impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate. Immunol. Investigation. 2012 , 41 , 458–468.

223 Ying S, Cao H, Hu H, Wang X, Tang Y, Huang C. Alk7 Depleted Mice Exhibit Prolonged Cardiac Repolarization and Are Predisposed to Ventricular Arrhythmia. PLoS One. 2016;11:e0149205

224 Zenclussen A. C. Adaptive immune responses during pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2013. Vol. 69, NO 4. P. 291-303.

225 Zeng, M.; Wen, P.; Duan, J. Association of antinuclear antibodies with the clinical outcome of patients treated with in vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. I am. J. Reprod. Immunol. 2019 , 82 , e13158

226 Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. Semin Reprod Med. 2014 Jul;32(4):297-305

227 Zhao, HJ; Klausen, C .; Zhu, H .; Chang, HM; Li, Y .; Leung, PCK Bone morphogenetic protein 2 promotes invasion of trophoblast cells and the

formation of endothelial tubes by ID1-mediated activation of the IGF-binding protein-3. FASEB J. 2020 , 34 , 3151-3164.

228 Zhong Y., Y. Ying, H. Wu, C. Zhou, Y. Xu, Q. Wang, et al. Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome following in vitro fertilization and embryo transfer Int. J. Med. Sci., 9 (2) (2012), pp. 121-125].

229 Zilversmit Pao L, Harville EW, Wickliffe JK, et al. The cumulative risk of chemical and nonchemical exposures on birth outcomes in healthy women: the fetal growth study. Int J Environ Res Public Health. 2019;16

230 Ruziguli A., Rukhliada N.N., Yiminniyazi A.The effect of previous spontaneous abortions on early loss pregnancy using assisted reproductive technologies.Journal of Critical Reviews.2020.№7(9).p. 1027-1032.

St. Petersburg State Pediatric Medical University

Manuscript copyright

RUZIGULI ABUDUWAILI

ROLE OF ALK5 PROTEIN IN THE PROFILE OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Scientific specialty 3.1.4

Obstetrics and gynecology

Thesis for a Candidate Degree in Medical Sciences

Translation from Russian

Scientific supervisor:

Doctor of Medical Sciences,

Professor

RUKHLIADA N.N

Saint-Petersburg

2023

LIST OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS……... 3
INTRODUCTION……4
CHAPTER I. CURRENT ASPECTS OF THE INFLUENCE OF VARIOUS GENETIC FACTORS ON THE OCCURRENCE OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY (LITERATURE REVIEW)……..12
1.1. A current view of the problem of early reproductive loss……... 12
1.2. The problem of early reproductive loss after ART in the focus of current studies……18
1.3. Risk factors for early reproductive loss in women after ART……22
1.4. A role of ALK5 in the reproductive axis……35
Summary of the literature review……..47
CHAPTER II. MATERIALS AND METHODS……48
2.1. Study design……... 48
2.2. General clinical characteristics of women included in the study……... 49
2.3. Methods of the study……..51
CHAPTER III. ANALYSIS OF FACTORS ASSOCIATED WITH EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY……...54
3.1. Etiological risk factors for early reproductive losses in women after assisted reproductive technology based on clinical and statistical analysis…..54
3.2. Immunohistochemical study of the decidual tissue of aborted material in early reproductive losses for the detection of ALK5 protein expression……..74
3.3. Prognostic and clinical significance of ALK5 protein expression in the profile of early reproductive losses after assisted reproductive technologies...88
Chapter III summary…… 91
CHAPTER IV. ANALYSIS AND SUMMARY OF THE RESULTS…… 93
CONCLUSIONS……... 108
PRACTICAL RECOMMENDATIONS……... 110
REFERENCES…….. 111

LIST OF ABBREVIATIONS

ACVR2B – Activin A receptor type 2B

ACVRL1 – Activin A receptor like type 1

AMHR2 – Anti-Mullerian hormone receptor type 2

BMPR1A – Transforming growth factor alpha receptor 1

BMPR2 – Receptor serine/threonine kinases

DKK – A protein encoded by the DKK gene located in humans on the short arm of the 10th chromosome. Its function is related to developmental proteins. It is involved in such a biological process as the Wnt signaling pathway

ESC – Embryonic stem cells

IVF – *In vitro* fertilization

PGR – Progesterone

PRL – Prolactin

SMAD – A family of structurally similar proteins that are the main signal transducers for the transforming growth factor beta (TGF-β) superfamily receptors)

TGFBR1, ALK5 – Transforming growth factor beta 1 receptor (kinase similar to activin A type II receptor)

TGFBR2 – Transforming growth factor beta 2 receptor

TGF-β – Transforming growth factors beta

uNK – Uterine natural killer cells

WNT – A gene that regulates embryonic development

ART– Assisted reproductive technology

ICSI – Intracytoplasmic sperm injection

BMI – Body mass index

PCR – Polymerase chain reaction

US – Ultrasonography

HCG – Human chorionic gonadotropin

INTRODUCTION

Background. The current state of reproductive health of the population is determined by a complex of social, economic, and medical aspects and is characterized by an increase in the rate of infertility in married couples from 10–15% to 18–20% in different countries of the world [23]. According to domestic authors, one in five married couples in Russia cannot have children [48]. Often, for couples who face the problem of infertility, the only opportunity to become parents is assisted reproductive technology (ART). These methods of infertility therapy are considered the most promising methods. Their active implementation makes it relevant to improve their effectiveness and safety for the health of the mother and unborn child [49].

At the same time, the results of numerous studies highlight the aggravated course of pregnancy after the use of ART, as well as a high level of early reproductive losses, which predetermines the problem of ensuring their minimization [45]. According to the publications, pregnancy after *in vitro* fertilization (IVF), compared with the physiological gestational process, is associated with a high risk of miscarriage (26–66%) [57].

The pathogenesis of early reproductive losses is currently a debatable and unresolved problem, considered to be a consequence of endotheliopathies, immunological, hemostasiological, or hormonal disorders, wherein the risk factors include pelvic inflammatory diseases, dysmenorrhea, intrauterine interventions, previous pregnancy losses, uterine anatomical anomalies, and acquired defects (fibroids, adhesions, polyps), which increase the risk of early reproductive losses in a complex by two-fold or more [39].

The uterine mucosa, called the endometrium, must undergo significant changes in order to become susceptible to the implantation of a blastocyst. The endometrium consists of glandular and luminal epithelium and stroma, and when the endometrium gets receptive, embryos can attach to the endometrial epithelium and invade the stromal compartment.

The stromal cells respond to embryo invasion with a wave of proliferation followed by differentiation; this morphological and functional transformation is called decidualization [71]. These steps are fundamental to the implantation process and depend on the activity of ovarian progesterone transmitting signals through its cognate receptor. The decidual layer is assumed to have several functions: it provides the growing embryo with growth factors and cytokines, regulates the local immune response at the fetal-maternal border, maintains tissue homeostasis during trophoblast invasion, protects blastocysts from inflammation and reactive oxygen intermediates, and supports angiogenic processes necessary to create new vessels for perfusion and embryo feeding.

Implantation requires synchronization of embryonic development and uterine cycles. This synchrony requires complex intercellular crosstalk. Although the role of many factors involved in implantation was described, it is still unclear how these factors act and interact. One group of signaling proteins that is expressed in the uterus during early pregnancy is the transforming growth factor β (TGF-β) superfamily.

Identifying the signaling processes regulated by TGF-β during embryo implantation is important for understanding endometrial health. The ligand-receptor interaction triggers a signal transduction cascade, wherein type II receptors (i.e. TGFBR2, ACVR2, ACVR2B, BMPR2, and AMHR2) activate functionally related type I receptors (i.e. ACVRL1/ALK1, ACVR1/ALK2, BMPR1A/ALK3, ACVR1B/ALK4, TGFBR1/ALK5, BMPR1B/ALK6, and ACVR1C/ALK7) through phosphorylation. Activated TGF-β receptor complexes interact with regulated intracellular SMAD (R-SMAD) receptors, which bind to SMAD4 to access the nuclear transcription apparatus and modulate gene transcription.

Conditional elimination of TGF-β receptor 1 (TGFBR1, known as ALK5) leads to manifested defects in the female genital tract. In the absence of TGFBR1, defects are found in pregnancy-related events, including implantation, trophoblast cell development, uNK recruitment, and uterine vascularization [79]. Further studies

revealed the involvement of SMAD-dependent and SMAD-independent pathways in the TGF-β1 inhibition of PRL and IGFBP-1 expression, respectively [83]. Moreover, TGF-β1 inhibits the expression of progesterone (PGR) and the WNT antagonist Dickkopf-1 (DKK) in differentiated embryonic stem cells (ESCs) through corresponding SMAD-dependent and SMAD-independent mechanisms [79]. In contrast to the inhibitory role of TGF-β1 in decidualization, other researchers demonstrated that TGF-β1 secretion increased during *in vitro* decidualization of human ESCs and that recombinant TGF-β1 promoted the decidualization process [102].

The reason for the contradictory effects of TGF-β1 on ESC decidualization is not known, but may be related to differences in the experimental conditions used in different studies. Thus, further understanding of the cellular, molecular, and epigenetic mechanisms involved in TGF-β superfamily signaling underlying decidualization is required. In particular, understanding the relationship between TGF-β signaling chains and their potential interactions with epigenetic modifications/non-coding RNAs may prove useful in developing new therapeutic strategies for the treatment of uterine diseases associated with decidualization failure.

It should be noted that clarification of the mechanisms of early reproductive losses will allow choosing a pathogenetically sound approach to rehabilitation measures in case of adverse pregnancy outcomes. Thus, the relevance of the present study and its clinical significance are provided by the lack of evidence-based approaches to the identification of predictors of early reproductive losses in women with induced pregnancy.

The study aimed to evaluate the factors and establish the role of ALK5 in the profile of early reproductive losses in assisted reproductive technology.

Tasks:

1. To perform a retrospective clinical and statistical analysis of data in women with infertility and reproductive losses after IVF.

2. To identify the leading etiology and pathogenetic factors of early

reproductive losses in women after ART and their prognostic significance in the complicated course of the 1st trimester of gestation.

3. To carry out an immunohistochemical study of the decidual tissue of abortive material at the early reproductive losses and to reveal the regular expression levels of ALK5 protein.

4. To clarify the prognostic and clinical significance of ALK5 protein expression in the development of early reproductive losses in IVF cycles.

Object: pregnancy in women enrolled in an IVF program.

Subject: etiological risk factors for early reproductive losses in women and the level of ALK5 protein expression in aborted tissue after ART.

Scientific novelty

The results of the scientific search allowed the author to supplement the pathogenetic concept of the development of disadaptation processes in the fetoplacental system of women with induced pregnancy, which was complicated by reproductive loss in early gestation, and to propose an etiopathogenetic profile of early reproductive loss after ART, considering systemic preconditions (inflammatory factor, activation of proinflammatory cytokines, and endotheliopathy).

For the first time, pregnancy loss in the first trimester was found to be associated with abnormal intercellular interaction processes, hormone production, and specific pregnancy proteins that are indicators of the formation and functioning of the placental complex, endothelial dysfunction, and failure to regulate proinflammatory mechanisms, including low ALK5 expression levels in the decidual tissue.

This study was the first to identify the most significant combinations of major risk factors for early reproductive losses after ART, namely, the combination of age factor, gynecological diseases, and tubal-peritoneal infertility, and the use of a

particular IVF program allowed for the prediction of probable early reproductive losses in women with induced pregnancy. The level of ALK5 expression in the decidual tissue was found to be a predictor of embryonic loss after ART.

For the first time, a factor of a probable increase in the proliferative activity of Th1-lymphocytes was established. It occurred due to a critically low level of TGFBR1 positive expression, which disrupted the formation of the vascular bed, damaged placental tissue, and redirected immune response from Th2-type to Th1 activation of the cytotoxic link. It manifested in maternal immunological aggression toward the fetus as a possible marker predicting negative perinatal consequences.

Theoretical and practical significance

The feasibility of identifying risk factors for early reproductive losses in women with induced pregnancy was substantiated, making it possible to form risk groups for a complicated course of the early gestational period. The proposed algorithm for predicting abnormalities in the development of early reproductive losses after ART permitted the timely identification of criteria for monitoring and prolongation of pregnancy. Predictors for undesirable perinatal outcomes (increased proliferative activity of Th1-lymphocytes due to critically low levels of positive TGFBR1 expression) were proposed.

Based on an assessment of the TGFBR1 expression level in the decidual tissue (which are indicators of latent gestational impairment (increased proliferative activity of Th1-lymphocytes) in combination with clinical and anamnestic characteristics), certain early prognostic criteria for the pathological course of pregnancy were determined. The criteria for early reproductive loss risk groups were justified in women early with infertility treated with IVF, which will further decrease the rate of pregnancy and perinatal complications in this category of patients.

Personal contribution of the author

Together with the scientific supervisor, the author chose the topic of the thesis, determined the goal and objectives, developed the tactics of clinical examination and the formation of the study groups, performed the analysis of scientific publications on the topic of the thesis, conducted a comprehensive clinical and laboratory examination of women, analyzed the results of general clinical and immunological studies, and carried out the statistical processing and summarizing of the results.

Approbation and implementation of the study results into the clinical practice

The results of the study were reported and discussed at the V National Congress with international participants "Healthy Children – the Future of the Country" organized by the Federal State Educational Institution of Higher Professional Education St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (St. Petersburg, 2021).

The results were implemented into practice during the experimental work at the facilities of the Gynecological Department and ART Department of the Perinatal Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint Petersburg State Pediatric Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Publications. Four printed papers were published on the study results, including 3 papers in the list of peer-reviewed journals recommended by the Higher Attestation Commission (VAK RF) at the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; 1 paper in the journal indexed in Scopus.

Main findings

1. Early reproductive losses after ART result from a large number of pathological causes with a variety of pathophysiological pathways, so it is not always possible to identify the dominant etiological factor using the existing diagnostic methods. One of the important etiopathogenetic links in the development of early reproductive losses after ART is the reduced expression of ALK5.

2. The most significant combinations of the leading factors for the likely development of early reproductive loss after ART include: a combination of the infertility period and infertility factor and the number of ART cycles; the type of infertility and the outcome of previous pregnancies; recurrent miscarriage, a high proportion of intrauterine interventions (hysteroscopy, medical and instrumental abortions) and internal endometriosis; high body mass index (BMI) and a history of over three failed ART cycles; the combination of late reproductive age with a duration of infertility of over 10 years; over three failed ART cycles and pelvic surgeries.

3. In the group of women whose pregnancies terminated spontaneously, there is a significant decrease in the level of TGFBR1 positive expression, which, in combination with the parameters of age, increases the risk of spontaneous miscarriage. This may be an additional factor that contributes to microcirculatory and hemodynamic disorders and an increase in coagulation potential, causing disturbances in the implantation process.

4. Histologically confirmed placental dysfunction is associated with increased proliferative activity of Th1-lymphocytes due to a critically low positive expression of TGFBR1, which disrupts the formation of the vascular bed, damages the placental tissue, and redirects the immune response from Th2-type to Th1 cytotoxic activation. This is manifested as immunological aggression of the maternal body in relation to the fetus.

Volume and structure of the thesis

The thesis is presented on 151 pages of printed text. It consists of an introduction, 4 chapters, conclusions, and practical recommendations. The list of references comprises 230 titles, 69 of which are domestic and 161 are foreign. The work is illustrated with 16 tables and 8 figures.

CHAPTER I. CURRENT ASPECTS OF THE INFLUENCE OF VARIOUS GENETIC FACTORS ON THE OCCURRENCE OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY (LITERATURE REVIEW)

1.1. A current view of the problem of early reproductive loss

The 1990s resulted in an unfavorable demographic situation and low indicators of population health. Today, the residents of the CIS countries live on average 14 years less than the residents of Western Europe. Thus, the average life expectancy in Russia is 5 years lower than in the European region and 9 years lower than in the countries of the European Union. The generation of children replaces only 60% of the generation of parents [44; 95]. Healthy life expectancy in Russia in 2019 was 63.7 years, the lowest figure among European countries, while the highest figure of 71.9 years belongs to Iceland. Unfortunately, the natural population growth rate in the Russian Federation remains negative, and the total fertility rate is quite low. Russia is still far from achieving the natural replacement level [58].

Human health, its formation, preservation, and enhancement is a central problem in virtually all countries of the world. The strategy of preserving human health is under the close attention of the UN and WHO and is reflected in such documents as the “World Declaration on Health Protection” [141] and “Health-21. A Policy Framework for Achieving Health for All in the WHO European Region” [128].

Regulatory and legal support for family planning and reproductive health services in the Russian Federation has international origins, because the right to reproductive healthcare was noted at the UN Conference on Population and Development, held in Cairo in September 1994 with the participation of representatives of 188 countries of the world. During that event, the need to strengthen the attention of governments to reproductive health issues was emphasized.

According to the definition of the World Health Organization (WHO),

reproductive health is a state of complete physical, mental, and social well-being, and not just the absence of diseases of the reproductive system or disorders of its functions [48]. A fundamental feature of the reproductive process is its obvious demographic importance as a process forming public health in the present and future [64].

In order to improve public health, it is necessary to reduce the negative trends of the reproductive process by improving the general and reproductive health of women. Nevertheless, the current unfavorable demographic situation in Russia, characterized by natural decrease and deterioration of public health (at the beginning of 2020, fertility decreased by 5.4%, and mortality increased by 3.1%) [49], determines the special social and political importance of the problem of increasing fertility and reducing reproductive losses.

The concept of "reproductive losses" means the loss of products of conception at all stages of fetal development as a result of spontaneous and artificial (for medical and social reasons) termination of pregnancy, stillbirth, as well as the death of children in the first year of life [11; 44].

Pregnancy loss is one of the most common problems in modern reproductive medicine. The rate of this pathology ranges from 10% to 30% and has no decreasing trend [138]. According to the publications, 75–80% of pregnancy losses occur in the first trimester of pregnancy, with 38% of them occurring in the first 7–8 weeks [148].

It is believed that 15–25% of all pregnancies end in spontaneous miscarriage in the first trimester and are early reproductive losses [16].

The problem of early reproductive losses has been acute for many years. Early reproductive loss is polyetiological pathology, respectively with a multifaceted pathogenesis. Despite numerous studies, to date, there is no single concept of its pathogenesis [22].

In general, about 25% of women lost at least one pregnancy. This is described by the concept of sporadic reproductive loss (SRL). Recurrent reproductive loss (RRL) is the loss of three or more pregnancies. RRLs occur in 1–8% of women of

reproductive age [33; 42].

Anatomical abnormalities account for 10% to 15% of RRL cases and, as a rule, those abnormalities that can disrupt endometrial blood supply are considered to cause miscarriage. These include congenital uterine anomalies, intrauterine adhesions, fibroids, or uterine polyps. Although congenital uterine abnormalities are more commonly associated with second-trimester loss or preterm birth, they also play a certain role in RRLs.

Possible causes of reproductive loss include genetic abnormalities in the parents or fetus, antiphospholipid syndrome, anatomic and endocrine factors, inherited thrombophilia, and immune factors [19; 63; 67]. Scientists believe that the contribution of chromosomal abnormalities to the genesis of early reproductive loss is not clear yet. According to some studies, the incidence of chromosomal anomalies is 51–60%; according to others, it is 5–29%.

It is believed that with an increase in the number of pregnancies lost in a woman, the probability of having a chromosomal abnormality in the fetus decreases [31; 62; 70]. The authors also found that the incidence of chromosomal abnormalities in sporadic pregnancy losses was 1.47-fold higher (39.9%) compared to recurrent losses (27.1%).

Luteal phase defect, polycystic ovarian syndrome (PCOS), diabetes mellitus, thyroid disease, and hyperprolactinemia are endocrinological disorders that account for about 17% to 20% of RRLs. One of the main etiological factors of early reproductive losses is a hormonal disorder, and progesterone insufficiency occupies a key place among them [47].

According to the publications, hereditary and acquired abnormalities of hemostasis cause obstetric pathology in 70–75% of cases [88]. In recent years, there have been a significant number of publications devoted to the association between the development of pregnancy loss and thrombophilia, both hereditary and acquired, with over 15% of the white population having hereditary thrombophilic mutations. The most common of these are Factor V Leiden (a mutation in the promoter region

of the prothrombin gene) and mutations in the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). These common mutations are associated with a moderate risk of thrombosis. It remains controversial whether homozygous MTHFR mutations are associated with vascular disease at all. In contrast, more severe thrombophilic deficiencies, such as antithrombin and protein S deficiencies, are much less common in the general population. A possible association between RRLs and hereditary thrombophilias is based on the theory that impaired placental development and function secondary to venous and/or arterial thrombosis can lead to miscarriage. Hereditary thrombophilias, most commonly associated with RRLs, include hyperhomocysteinemia resulting from MTHFR mutations, resistance to activated protein C associated with Leiden factor V mutations, protein C and protein S deficiencies, prothrombin promoter mutations, and antithrombin mutations. Acquired thrombophilias associated with RRLs include hyperhomocysteinemia and resistance to activated protein C. According to some authors, thrombophilia accounts for 40–75% of the causes of fetal loss syndrome [13; 30].

It has been established that hereditary thrombophilia is a genetic predisposition to form venous thrombosis, which is observed in individuals under 45 years of age with a family history of thrombosis and atypical localization of thrombosis. According to the publications, congenital defects of hemostasis are observed in 0.1–0.5% of the population. Normally, the hemostasis system is in equilibrium, which provides weak activation of the coagulation cascade and natural activity of anticoagulant and fibrinolytic systems, which prevents the development of spontaneous thrombosis [14; 53].

Scientists have established that thrombophilia creates conditions for impaired implantation, placentation, and fetal growth, which leads to the development of systemic endothelial dysfunction. In addition, components of the hemostasis system are not only involved in the regulation of blood coagulation but also mediate inflammation. Genetically determined and acquired changes in hemostasis activate

a proinflammatory response, form the procoagulation potential (which is an etiopathogenetic factor contributing to infertility, failed attempts of IVF, and early pre-embryonic losses), and lead to late obstetric complications.

The presence of additional risk factors for thrombosis may potentiate the effects of thrombophilia in pregnant women [12].

According to modern concepts, the most common thrombolytic conditions that lead to reproductive losses include: antiphospholipid syndrome, antithrombin III deficiency, protein C deficiency, protein S deficiency, factor V mutation G1691A (FV Leiden), prothrombin gene G20210A (factor II) and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) mutations [41]. Scientists associate the following obstetric complications with antiphospholipid syndrome, such as RRL, premature delivery, intrauterine fetal death, delayed intrauterine development, preeclampsia, etc. Antiphospholipid syndrome leads to reproductive losses significantly more frequently in the first trimester of pregnancy [36]. The rate of antiphospholipid syndrome in the general population is 5–6%; in pregnancy loss, it is 50–75% [2].

Several infections, including *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, rubella, herpes simplex virus (HSV), measles, cytomegalovirus, and Coxsackie viruses, may play a certain role in sporadic spontaneous miscarriage. The role of infectious agents in RRL is less clear, with an estimated incidence of RRLs of 0.5% ranging from 2 to 5% [56].

According to the publications, a significant role in the etiology of SRLs and RRLs is played by placental abnormalities and genital infections, in particular, vaginal dysbiosis. According to different authors, the rate of dysbiotic disorders in women during pregnancy ranges from 48.6% to 84.3% [55]. It is known that vaginal dysbiosis is a risk factor for sporadic miscarriages and RRLs [56].

According to the publications, bacterial vaginosis is one of the most common diseases of the female genitalia that affect pregnancy. The incidence of bacterial vaginosis is highly dependent on the population of the examined women, ranging from 17–19% among family planning patients, 15–37% among pregnant women,

and 61–87% among patients with abnormal discharge [40]. According to epidemiological studies, the prevalence of bacterial vaginosis among pregnant women worldwide ranges from 10% to 40% [46].

Scientists highlight that the relevance of the problem of the impact of infection on pregnancy in the first trimester is explained by the high level of infectious morbidity of pregnant women, which precedes and leads to the development of various obstetric pathologies. It was found that infectious diseases and disorders of the microbiocenosis of the birth canal led to a 13-fold increase in the rate of spontaneous miscarriages [17]. However, not all pregnant women with urogenital infections have spontaneous miscarriages. Some authors have established an important role in the development of this pathology of immune mechanisms at the level of the mucous membranes of the lower genital tract [24].

There were suggestions of an association between SRLs and/or RRLs and occupational and environmental exposures to organic solvents, drugs, ionizing radiation, and toxins. However, it is difficult to make reliable conclusions from the studies because they tend to be retrospective and the results are affected by alternative or additional environmental exposures [183].

Three specific exposure factors (smoking, alcohol, and caffeine) deserve special attention, given their widespread prevalence. Although maternal alcoholism (or frequent alcohol consumption) is consistently associated with higher rates of spontaneous abortion, the association of reproductive loss with more moderate alcohol intake remains weak. Studies linking moderate alcohol consumption to pregnancy failure showed an increased risk of miscarriage with over 3 servings per week during the first trimester (odds ratio 2.3); with over 5 servings per week, the odds ratio increased to 4.8. It seems logical that cigarette smoking may increase the risk of spontaneous abortion due to nicotine intake, which is known to decrease uterine and placental blood flow.

However, the link between smoking and pregnancy loss remains controversial due to the fact that only a fraction of studies revealed this link. Evidence is emerging

that caffeine, even in low amounts (3 to 5 cups of coffee per day), may increase the risk of spontaneous miscarriage with a dose-dependent response. The association of caffeine, alcohol, and nicotine consumption with RRL is weaker than their association with sporadic pregnancy loss [229]. In 50% of cases, the cause of RRL is unspecified and is defined as "idiopathic recurrent miscarriage" [38].

Regarding the treatment of early pregnancy loss, it should be noted that there are currently no standards for the treatment of this pathology. However, there is sufficient international experience summarized in the relevant recommendations for the management of pregnant women. Advancement of the quality of medical care along with the improvement of the social status of the population, which determines the reproductive health of the population and the level of reproductive losses, is of high priority in the demographic development of Russia.

1.2. The problem of early reproductive loss after ART in the focus of current studies

The unfavorable demographic situation in the Russian Federation, especially the sharp drop in the birth rate, is associated with the aggravation of problems in the functioning of families as a source of reproduction of the country's population, and a decrease in their demographic potential due to infertility. According to the International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies and the World Health Organization, infertility is "a disease in the reproductive system determined by the inability to achieve a clinical pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse" [189]. However, this definition does not recognize the importance of a woman's age and does not take into account the requirement of regular ovulation to optimize the chances of conception.

A more appropriate definition would be "failure to conceive after 12 months of unprotected and frequent sexual intercourse in the context of regular ovulation in a woman younger than 37 years of age". Earlier screening should be considered if a woman is 37 years old or older, has risk factors for infertility (including irregular

ovulation, pelvic organ abnormalities, or a family history of premature menopause), or there is a risk of male infertility. In these circumstances, referral to a specialist after 6 months or even immediately may be appropriate [127].

The rate of infertile marriages increased to 18% in the third millennium and tends to increase further. According to global estimates, almost 72.4 million couples experience fertility problems [209]. As of 2017, Russia ranks 179th out of 224 in the world ranking on the fertility index (1.61), up to 15% of families in Russia cannot have children due to infertility. Thus, the problem of infertility treatment is recognized as a priority direction for state health programs of the Russian Federation [48].

Ways of solving the problem of infertility depend on its type, which is determined by its causes. The field of reproductive medicine as a science is not new, its active development began in the 1970s, when the first drugs for the stimulation of the ovaries were created and tested. The first attempts to transfer human embryos and develop the method of assisted reproductive technology, which resulted in the birth of a child, were made by Edwards and Steptoe in 1978 (England). Since then, the technology began to develop rapidly and was used to treat tubal-peritoneal infertility. The first test-tube baby in the world was born in Great Britain in 1978 (Louise Brown), and in Russia in 1986. By the year 2000, about 900 thousand babies had been successfully born [4].

Achievements of modern science actively use a considerable arsenal of techniques to solve the problem of the low reproductive potential of the nation, including the development of minimally invasive surgical methods of infertility correction, genetic screenings, and high-precision targeting nanosystems in reproductive medicine.

ART techniques are improving day by day, with the sole purpose of achieving a desired and long-awaited pregnancy and the birth of a healthy child for parents who cannot conceive naturally [37]. Today, the number of couples seeking the assistance of ART, such as IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI),

conception and, ultimately, their own birth of a healthy living child, is steadily increasing.

The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) provided statistics on the increase in the demand and results of ART. Experts call IVF technology a breakthrough in medicine and forecast a great future for the development of the entire reproductive technology industry. According to ICMART statistics, IVF treatment of patients under the age of 35 resulted in long-awaited pregnancy in 32% of cases.

If women aged 35 to 37 apply for IVF, the success rate can reach 28%, at 38–39 years – 21%, and at 40–42 years – 14%. Today, the number of IVF cycles worldwide is increasing exponentially. The number of children born through ART as of 2020 exceeded the five million mark [141]. Russia is one of the top ten countries in terms of ART cycles. By 2020, the registry had data on 902,578 cycles of ART performed in Russia and 225,354 children born [23].

However, it should be noted that ARTs are not the only alternative to traditional methods of infertility treatment, but they have certain priorities due to high-precision, targeted mini-invasive technologies, accumulating the advanced achievements of world medicine. The efficacy of conservative treatment of tubal-peritoneal infertility reaches 37% due to the low efficiency, ART treatment programs are indicated in the vast majority of patients [45].

Modern ART techniques include GIFT, ZIFT, ICSI (MESA, TESA, TESE, PESE), IVF, and methods of pharmacological correction of the hormonal background and ovulation induction with a direct effect on germ cells. Numerous combinations of ART techniques led to successful long-awaited pregnancies, and the method itself was classified as a generally accepted standard of infertility treatment [39].

Each ART program consists of important sequential steps, one of which is the induction of ovulation to obtain a sufficient number of mature preovulatory oocytes for further fertilization. This stage is obligatory in all ART cycles. The following

stages differ from each other and depend on the choice of the ART program. The result of the success of an ART cycle is directly proportional to the nature of the patient's ovarian response to ovulation induction. The rate of unsuccessful ART attempts in patients with an insufficient ovarian response is 22% [81]. Regarding special requirements prior to the use of ART techniques, the following key points can be formulated: the pregnancy should not be achieved at the cost of harming the patient's body through continuous cycles of stimulation, provided that previous cycles have failed, because the pregnancy rate is highest at the first attempts of ART and has a clear downward trend with each subsequent procedure [102].

It should be noted that one should not improve the effectiveness of ART by transferring 3–4 embryos to obtain multiple pregnancies, because the risks exceed the benefits of the results obtained and increase the incidence of obstetric complications associated with multiple pregnancies. According to leading reproductive scientists, the optimal tactic for treating infertility is to choose the Single Embryo Transfer Strategy (SETS) [158].

The problem of successful infertility treatment followed by a long-awaited pregnancy is only the first step on the path to happy motherhood, beyond which are the doors to the most difficult stage – ensuring pregnancy and the birth of a healthy child. ART is a therapeutic procedure, which at almost every stage is associated with possible complications that threaten the health and even life of the patient. In the process of controlled ovarian stimulation, the most serious complication is ovarian hyperstimulation syndrome [114]. Psycho-emotional disorders play a major role among the complications of ART [176].

It is known that women with a poor reproductive history have a fairly high percentage of complications during pregnancy. Pregnancies resulting from ART have a higher proportion of miscarriages, polyhydramnios, as well as the formation of placental insufficiency, which affects perinatal well-being and, in the acute clinical form, threatens the life of the mother and child [105]. The proportion of reproductive losses, ectopic pregnancy, and preterm birth is significant. The main

causes of adverse perinatal outcomes are pregnancy loss due to placental dysfunction and premature rupture of membranes [155].

The incidence of miscarriage after ART ranges from 10–27% of the total number of pregnancies among women who are registered at the antenatal clinic. For example, according to a study by Winter *et al*., the overall rate of pregnancy loss that occurred before 6–7 weeks was 16% [116]. According to the study by Tummers *et al*. [188], out of 1200 singleton pregnancies, the overall rate of spontaneous abortion was 21.8% (262 spontaneous abortions). Hu *et al*. [134] conducted a retrospective cohort study on the risk of reproductive loss throughout the pregnancy after ART, which included 5,485 clinical pregnancies resulting from ART. The study results showed that the overall incidence of early reproductive loss was 12.5%. Of the 685 cycles of pregnancy loss, 460 ended in early miscarriage, the rest were recorded at later terms.

So, the breakthrough in the field of ART in the recent history of science allowed couples previously unable to conceive to achieve viable pregnancies, and at the same time, opened a new direction in the study of predictors of early reproductive loss. While ART improved outcomes for couples experiencing difficulty conceiving, a new problem emerged – implantation failure.

1.3. Risk factors for early reproductive loss in women after ART

The leading causes of reproductive losses after ART are infectious, endocrine, anatomical, psychological, and genetic factors that lead to the formation of abnormal embryos or fetal malformations, followed by pathological pregnancy progression.

There are no reliable data to compare the incidence rate of miscarriage in spontaneous pregnancies and after ART, but it is generally accepted that the miscarriage rate is slightly higher after ART. The main reason for the higher risk is the age of the patients, which on average is 3–5 years higher than in the fertile population at the time of the first pregnancy. Indeed, studies on the risk of spontaneous miscarriage show that maternal age is an important risk factor for

reproductive loss after ART. The natural decline in a woman's reproductive potential over time has two major causes: a decrease in the number of oocytes in the ovary and a decrease in their quality. Antimueller hormone, a glycoprotein hormone secreted by the granulosa cells of the preantral and antral ovarian follicles, peaks at the age of 20 and gradually decreases before the onset of menopause. Oocyte donation programs clearly demonstrate that the risk of failure to conceive is related to oocyte aging and not to uterine aging. Moreover, studies of oocytes and embryos using fluorescence in-situ hybridization have shown that the frequency of aneuploidy in human oocytes increases with age, increasing in women aged > 35 years and even more > 40 years [226].

Salumets *et al*. found that the main prognostic factor influencing pregnancy outcome in frozen embryo transfer, especially after ICSI, was maternal age. Patient age at the time of oocyte collection and freezing was the only determinant of the biochemical outcome of pregnancy. Starting at approximately 39 years of age, the frequency of biochemical pregnancies was significantly higher. Maternal age and embryo quality also influenced the rate of delivery [199].

Shapiro *et al*. found that fetal and endometrial asynchrony increased with increasing maternal age. Around 50% of the transfers were asynchronous in women younger than 35 years old compared to 68.1% that were asynchronous in women older than 35 years. In addition, the implantation rate, which was calculated for each blastocyst transfer and therefore considered a numerical value, was significantly lower in IVF cycles in women over 35 years of age (mean 24.5 ± 36.8) compared with women under 35 (mean 41.1 ± 42.1). The biochemical pregnancy rate was significantly higher in women over 35 compared with women under 35 (28.1% versus 14.9%, respectively).

The live birth rate was significantly higher in women younger than 35 years old (50.7%) than in women older than 35 years old (28.5%). A decrease in oocyte yield, blastocyst formation, and endometrial thickness was also observed in patients over

35 years of age [201].

The implantation rate for both fresh and frozen embryos was significantly higher in patients under the age of 35 years (41.3% and 47.1%) than in women over the age of 44 years (1.9% and 16.2%). Interestingly, the implantation rate when using donor oocytes representing all age categories was 53.6% when fresh embryos were transferred and 40.2% when frozen embryos were transferred [94]. This also confirms the idea that embryo quality, including genetic characteristics, decreases with increasing maternal age. Volkov and Akhilgova note that quite high figures of the age of pregnant women make it possible to be convinced of the later realization of reproductive functions by a modern woman. Analysis of the data showed that the leading medical and social factors of spontaneous abortion in the early period after ART could be considered the age of the woman and partner over 35 years, partner smoking, a missed abortion in the history, and gynecological diseases. The risk of pregnancy loss is slightly higher in women with chronic salpingo-oophoritis, menstrual dysfunction, and cervical abnormalities [21].

Winter *et al*. studied pregnancy risk factors including maternal age, BMI, smoking, PCOS, etiology of infertility, response to stimulation, quality and number of embryos replaced, and type of treatment on 1,196 pregnant women receiving ART. They showed that the miscarriage rate was 16% before 6–7 weeks of pregnancy. In addition, smoking and poor embryo transfer quality were associated with increased early reproductive losses. Age, obesity, and other factors did not statistically show an increased risk of early reproductive loss. Although women over 40 years old had an increased risk, this was not significant after adjusting for other factors. The risk for lean (BMI <18.5) and obese (BMI> 35) women was also not significantly higher in the authors' multivariate analysis [116]. Whereas, according to Moragianni *et al*., in patients undergoing ART, obese women of classes I, II, and III (BMI> 30) had the highest chance of implantation failure, demonstrated by the corresponding odds ratios: 0.69 (0.53–0.90), 0.52 (0.36–0.74), and 0.58 (0.35–0.96) compared to normal-weight patients (BMI 18.5–24.99).

Although no differences were reported between different BMI groups with respect to ART, patients with class III obesity (BMI> 40) had the highest overall rates of early reproductive loss [173]. In addition, overweight and obese women (BMI> 25), who had fewer collected oocytes, had a higher risk of implantation failure and miscarriage than women of normal weight and with the same number of collected oocytes during ART [181]. Obese women required more cycles of gonadotropin stimulation but had statistically fewer oocytes to collect (mean of 8 versus 10 in non-obese women, P=0.03). This suggests that obesity may affect oocyte quality and follicle development [118]. Although RRL is different from repeated implantation failure, increased BMI is considered the most important risk factor for miscarriage in RRL patients of increasing age [155].

Spontaneous abortions are literally programmed into a woman's body in a large percentage of cases and only repeated attempts at IVF programs can overcome the failure rate [73]. This fact is supported by the cumulative effect, i.e. once the barrier of recurrent spontaneous miscarriages is overcome, the chances of success in an IVF program increase significantly. This is convincingly proved by the study of Cameron *et al*. [107], where 9,321 (8.3%) women had at least one spontaneous abortion and no births in their first complete cycle; 33,152 (29.5%) had at least one live birth, and 70,076 (62.3%) had no pregnancies.

After two further complete cycles, conservative cumulative live birth rates (CLBRs) (which assume that women, who subsequently discontinued treatment, never had a live birth) were 40.9, 49.0, and 30.1%, whereas optimal CLBRs (which assume, that women who discontinued treatment, had the same chance of live birth as those who were treated) were 49.5, 57.9, and 38.4% in the non-pregnant, live birth, and no pregnancy groups, respectively. The CLBRs for women who had a spontaneous abortion in the first complete cycle were 42% higher than those who had no pregnancy [odds ratio (95% CI) = 1.42 (1.34, 1.50)], and twice as high for live births compared with no pregnancy [2.04 (1.89, 2.20)].

According to a study by Shen *et al*. [99], chromosomal abnormality is the

leading cause of spontaneous abortions in early pregnancy, and the rate of chromosomal abnormalities increases with increasing maternal age. Zhang *et al*. [113] studied the effect of the number of previous spontaneous abortions on the success of the first cycle of IVF or ICSI. The authors revealed that a history of a single spontaneous abortion had no obvious effect on the success of embryo formation, but had a negative effect on the success rate of clinical pregnancies, the rate of early spontaneous abortions, and the rate of live births in the first IVF/ICSI cycle. The risks of failure to conceive increased along with the number of spontaneous abortions.

Meng et al. [142] showed that the uterine endometrium was much thinner in each subsequent embryo transfer cycle in the group of patients with prior surgical evacuation compared with the group without surgical evacuation (9.0±1.6 mm versus 9.4±1.9 mm, P=0.01). However, the authors found no significant differences in the implantation rate, clinical pregnancy rate, rate of live births, or further miscarriages between the surgical evacuation group and the non-surgical evacuation group (P>0.05). Fertility rates were higher in the group with endometrial thickness ≥8 mm compared with the <8 mm group in patients who underwent surgical evacuation (43.0% vs. 17.4%, P<0.05).

Wang et al. [77] studied the relationship between spontaneous abortions and induced abortions in the history of women participating in IVF programs. It was revealed that the incidence of spontaneous abortion was significantly higher (30/170 [17.6%] versus 41/420 [9.8%]; P=0.002), and the endometrium was significantly thinner (8.8±1.8 versus 9.7±1.8 cm; P=0.001) among patients with a history of artificial abortion compared with those who did not have a history of artificial abortion. In a subgroup analysis of patients with a history of artificial abortion, women who had a surgical abortion had a lower rate of live births compared with medication-induced abortion (29/76 [38%] versus 101/378 [27%]; P=0.039). In addition, women with a history of more than two surgical abortions had lower rates of live births and clinical pregnancies (both P<0.05).

Smoking leads to a significantly increased risk of reproductive loss for each pregnancy compared to nonsmoking patients receiving ART [69; 217]. Smoking women undergoing ART were found to have lower estradiol levels during ovarian stimulation. Cigarette toxins may play a role in disrupting corpus luteum formation and embryo implantation [101]. Fuentes *et al*. demonstrated that smoking women with higher levels of cotinine (a metabolite of nicotine) in their serum retrieved significantly fewer eggs during ART cycles, although cotinine levels had no significant effect on implantation rate in cycles [119].

Maternal smoking was more often associated with spontaneous miscarriage with normal fetal karyotype than with abnormal karyotype, suggesting that the toxic effects of carbon monoxide and nicotine may be the main factors causing harm. Carbon monoxide can cause depletion of fetal oxygen stores, and nicotine can lead to vasoconstriction and reduced fetal nutrients due to suppression of the mother's appetite [69; 74]. It was shown that pregnancy rates were generally lower among women who smoked compared to nonsmokers, but differences in conception rates between the two groups were minimal [101].

It is also necessary to consider the effect of smoking on male fertility. Kunzle *et al*. found that male smokers had significantly reduced sperm count ($229.4 \pm 251.5 \times 10^6$ cells vs. $278.1 \pm 264.2 \times 10^6$ cells, P=0.0001), a higher percentage of abnormal morphology (21.2±14.6% of normal forms versus 23.7±15.5% of normal forms, P=0.0007), decreased motility ($105.6 \pm 132.7 \times 10^6$ cells versus $126.6 \pm 136.8 \times 10^6$ cells, P=0.0016), and elevated pH as measured by citrate concentration (86.7±57.3 versus 111.7±303.1, P=0.0072) [153].

Elevated levels of cortisol, also known as the "stress hormone", were shown to increase the likelihood of miscarriage by 2.7 times (95% CI = 1.2–6.2) during the first 3 weeks after conception compared to women with low cortisol levels. Cortisol production in the body increases in response to psychological, immunological, and other stressors, suggesting that it serves as a marker signaling an unfavorable state of a woman's body for conception and pregnancy [180]. This suggests that

preventing or reducing maternal stressors may have a positive effect on pregnancy.

In contrast to this study, Pasch *et al*. found that psychological stress, such as clinical anxiety or depression, did not significantly affect the outcome of ART in women undergoing infertility treatment for the first time. However, it is the failure of ART that can lead to higher levels of anxiety and depression immediately after a negative outcome. Higher rates of depression after ART were observed more frequently in women with reproductive loss than in women who achieved a successful pregnancy (44% vs. 30%, $P<0.001$). Failure of ART was also associated with higher levels of anxiety after IVF compared to women who were able to become pregnant (60% vs. 50%, $P<0.001$) [184]. It is important to keep in mind that this study was only for first-time infertility treatment.

Hur *et al*. showed that female age, elevated basal estradiol levels, elevated basal FSH levels, and thin endometrium were significantly associated with an increased risk of preclinical pregnancy loss after ART [140]. In contrast, the study by Zargar *et al*. did not show any significant correlation between pregnancy loss and female age, diabetes, smoking, and obesity, indicating a probability effect of these variables and not implying their effectiveness on pregnancy success [164]. These results confirm previous studies showing significantly higher rates of pregnancy loss after IVF among patients with TPO-Ab compared to patients without TPO-Ab [192; 228].

According to Tummers, out of 1,200 singleton pregnancies after ART, 938 (78.2%) continued, resulting in an overall spontaneous abortion rate of 21.8% (262 spontaneous abortions). The outcome in terms of survival rate for twin pregnancies was better than for singleton pregnancies. Although women with twin pregnancies were slightly younger than women with singleton pregnancies, this difference cannot be explained by differences in age. Once fetal cardiac activity is established, the risk of abortion in an IVF pregnancy is halved. The probability of survival is significantly higher in twin pregnant women at all stages of the first trimester, indicating a cohort phenomenon [188].

Mills *et al*. demonstrated that the risk of miscarriage increased in patients with poorly controlled insulin-dependent diabetes, while no significant increase in the risk was found in patients with well-controlled diabetes. Moreover, other interstitial diseases may significantly increase the risk of miscarriage, including PCOS, hypothyroidism, certain infectious diseases, and autoimmune diseases [168].

Zargar *et al*. did not find any significant correlation between maternal variables of diabetes, body mass index (BMI>30), male infertility factor, PCOS, and pregnancy outcomes [P value > 0.05]. Moreover, there was no correlation for other risk factors including maternal age, type of ART (ICSI/IVF/FET), endometrioma, maternal smoking, history of IVF failure, uterine anomalies, cervical insufficiency, multiple pregnancy, and the number or quality of embryo transfers [P value> 0.05]. The lack of association between pregnancy success and the ART type means that the use of different types of ART (IUI or IVF and ICSI) had little effect on the pregnancy outcome [164].

A meta-analysis by Hornstein *et al*. demonstrated that data from seven studies showed no statistically significant association between the presence of antiphospholipid antibodies and clinical pregnancy or live birth rates in future ART cycles, although exact levels were not specified [133]. Evidence is accumulating for non-criteria clinical and laboratory manifestations of antiphospholipid syndrome, with two or more unexplained failed IVF cycles being one of the criteria. Besides, some studies showed that standard antiphospholipid syndrome treatment helped these women [76].

There is some evidence suggesting that hereditary thrombophilias may be involved in a subgroup of women with unexplained recurrent implantation failure. Azem *et al*. found that the incidence of inherited thrombophilias such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency, factor V Leiden, prothrombin deficiency, and antithrombin III deficiency was higher in women with early reproductive loss compared to controls (44% versus 18.2%, P=0.012) [78].

After the exclusion of the above factors, immunological abnormalities that

were not diagnosed in a timely manner were the cause of 70% of early reproductive losses in women after ART.

Some studies showed that the normal performance of the reproductive function in women occurred due to the harmonious functioning of immunological mechanisms. Fertilization itself is an antigen-antibody reaction, because the fetus is an allograft, which has 50% of the foreign antigens of the parental origin. The physiological course of pregnancy is ensured by many factors related to the peculiarities of immune reactions of the maternal body, which, on the one hand, maintain tolerance to the allogeneic fetus and, on the other hand, are ready to launch all necessary defense chains against probable foreign agents [27; 32].

According to the published data, the main mechanism of pregnancy preservation is immunosuppression, which is realized with the help of cytokines. The bulk of cytokines are synthesized by lymphocytes. When local defense reactions are found to fail, cytokines act on a systemic level, namely, they affect all organs and systems involved in the maintenance of homeostasis. Their influence on the central nervous system changes the entire complex of behavioral reactions. There are changes in the production of most hormones, protein synthesis, and plasma composition. Cytokines link the endocrine, nervous, circulatory, and immune systems, and involve these systems in the formation of the body's complex defense response [28].

Scientists have established that cytokines regulate almost all stages of the gestational process: implantation of the blastocyst, placenta formation, fetal development, placental hormone production, cell apoptosis, cervical "maturation", and delivery mechanism [75]. It is believed that physiological pregnancy depends on the preference for T-helper type 2 (Th 2) cytokines (interleukin (IL)-4, ILL-5, IL-10, IL-15), which are anti-inflammatory and non-cytotoxic. They promote trophoblast development, control angiogenesis, increase the production of human chorionic gonadotropin, and perform immunosuppression [72; 83; 130].

It was found that cytokines T-helper type 1 (Th1) (tumor necrosis factor alpha,

IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), pro-inflammatory, cytotoxic, and embryotoxic, could destroy trophoblast cells, stimulate natural killer activity and activate the coagulation cascade. An excessive amount of proinflammatory cytokines leads to prothrombinase activation, which causes thrombosis, trophoblast infarcts, its detachment, and, finally, miscarriage in the first trimester [83].

The complex process of trophoblast implantation and invasion is crucial for the successful establishment of pregnancy. Usually, the embryo implants into the endometrium during the implantation window, and the receptivity of the uterus to implantation during this period is maximal. Endometrial receptivity involves the expression of molecular factors that control the maternal-fetal dialogue and initiate endometrial stromal decidualization [106]. Candidate molecules, including cytokines and growth factors, are secreted by endometrial and tubal epithelial cells and were previously described as the main regulators of blastocyst implantation [144].

Such complications as spontaneous abortion and pregnancy termination are associated with infection during pregnancy. Urogenital infections (chlamydia, mycoplasmosis, ureaplasmosis) and TORCH infections are considered the most dangerous among infections with respect to early termination of pregnancy. According to the publications, the invasion of the trophoblast into the uterine decidua and the inner third of the myometrium is crucial to the successful formation of the placenta. One of those responsible for this process is IL-8, which affects the induction of angiogenesis at the site of embryo attachment. The increased secretion of IL-8 in the mother-placenta-fetus system indicates its role in maintaining immunological tolerance during pregnancy [6; 72].

The ability of the cytokine to induce cell migration and enhance cells' adhesive properties determines it as a mediator in the formation of an acute inflammatory response. IL-8, which is produced by placental cells, potentiates the immune competence of placental cells against bacteria attacking the fetoplacental complex [224].

To date, the role of endogenous progesterone in preventing fetal rejection reactions was proven; namely, endogenous progesterone can suppress Th1-cytokine production and shift the Th1/Th2 balance toward Th2 [224]. Even before fertilization, progesterone determines the secretory transformation of the endometrium, prepares it for implantation, promotes growth, development, and vascularization of the myometrium, neutralizes the effect of oxytocin, and reduces prostaglandin synthesis. Indirectly, with the help of T-lymphocytes, progesterone inhibits the fetal rejection reaction. During the interaction of progesterone with T-cell receptors, progesterone-induced blocking factor is produced, which affects the natural killers. It directs the immune response of the mother to the embryo toward the less active natural killers.

The maternal immune response is realized by Th2, which synthesize regulatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13). If the concentration of progesterone in the serum is insufficient or if its receptors are damaged, progesterone-induced blocking factor will be insufficiently produced. In these conditions, the maternal immune response to the trophoblast is associated with Th1, which produce proinflammatory cytokines (TNF alpha, IL-1, IL-6). Endogenous progesterone also stimulates the local production of proteins binding natural killers, causing their apoptosis [83]. Underdevelopment of glands, stroma, vessels, insufficient accumulation of glycogen, proteins, growth factors, and an excessive amount of pro-inflammatory cytokines are observed in the endometrium, which leads to inadequate response of the fetal egg and miscarriage [123].

Many women who experienced early reproductive loss after ART were also found to have chronic endometritis (CE) as a result of bacterial colonization, often with little or no clinical evidence of infection [100]. Bouet *et al*. confirmed the prevalence of CE in 14% by histological examination in women with early reproductive losses. In addition, hysteroscopy showed a 40% sensitivity for detecting CE by visualizing mucosal edema, endometrial hyperemia, and the

presence of micropolyps [85].

Cicinelli *et al*. found that 66% of women were diagnosed with CE by hysteroscopy, 57.5% by histological study, and 45% were also positive by culturing test. Most of the detected pathogens consisted of common bacteria such as group B *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, or *Mycoplasma*.

In some cases, sexually transmitted infections such as chlamydia may be the cause [100]. The molecular method of diagnosing CE showed promising results presented by Moreno *et al*. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) can identify bacterial DNA with an accuracy of 76.92% when samples showed a match in hysteroscopy, histological, and culturing tests. RT-PCR showed 75% sensitivity and 100% specificity. This allows for the detection of cultured and uncultured bacteria colonizing the endometrium, even without histological signs of infection [175].

Bacteria present in the endometrium lead to an abnormal number of lymphocytes and, consequently, to an environment that disrupts the normal receptivity of the endometrium. The implantation rate among those treated for infection was 37%, compared with 17% among those not treated, but these rates did not reach statistical significance. Nevertheless, the rate of live births in the next IVF cycle after curing the infection was significant: 61% compared with 13% among those who could not be cured [100].

In some cases, chronic infection does not necessarily lead to a lower implantation rate, but rather the components of the bacterial flora present in the endometrium. Although the endometrium was once thought to be a sterile environment, it is now accepted that *Lactobacillus* colonize this area in addition to the vagina [174].

There are several types of uterine abnormalities, including polyps, fibroids, and adhesions, that can affect implantation rates in patients after ART. In most cases, patients are asymptomatic, and sometimes, these problems may even go undetected by transvaginal ultrasound, suggesting that another method of uterine cavity

evaluation, such as hysteroscopy, is required [93]. Fibroids can cause deformation of the endometrial cavity, and adhesions, which often develop after surgery or infection, can prevent the embryo from attaching to the lumen surface. Kodaman *et al*. report that hydrosalpinges may also have a negative effect on implantation in women undergoing IVF. Although this is not entirely clear, some mechanisms were considered, such as deprivation of normal embryo development due to a lack of nutrients and energy in the fluid [152]. In addition, fluid can adversely affect endometrial receptivity and can also physically flush out the embryo, preventing implantation [198].

Mullerian abnormalities such as uterine septum and bicornuate uterus should also be taken into consideration in patients with early reproductive loss. A uterine septum can contribute to miscarriage, as patients with untreated septum after IVF have worse outcomes than those who have undergone hysteroscopic metroplasty. However, implantation is usually normal in women with a bilobed uterus, but these patients have a higher risk of mid-trimester pregnancy loss [105].

The endometrium itself can also be a source of implantation failure. Previous endometrial trauma, prolonged use of birth control pills, and impaired uterine blood flow are all potential causes of a thin endometrium [156].

Assessment of blood flow in the uterine radial arteries is useful to evaluate the degree of blood flow to the endometrium. When there is a decrease in blood flow, epithelial cell growth and vascular endothelial growth factor (VEGF) production may be reduced, which ultimately deprives the endometrium of necessary angiogenesis and growth factors to achieve the necessary thickness for successful implantation. Miwa *et al*. performed a transvaginal Doppler ultrasound study, which showed that the uterine radial artery resistance index was significantly higher in patients with thin endometrium <8 mm than with normal thickness endometrium >8 mm (0.852 (0.826–0.955) versus 0.751 (0.549–0.840), P<.05) [171]. Endometrial thickness was found to affect the implantation rate. With a thickness of 9 mm to 16 mm, the probability of pregnancy increases from 53% to 77%, showing that there is

a significant difference in implantation rate [193].

Thus, the establishment of risk factors for early reproductive loss is of great clinical importance to improve the effectiveness of ART, as well as to better understand the possible mechanisms of early reproductive loss.

1.4. A role of ALK5 in the reproductive axis

In humans and other primates, the process of embryo implantation comprises the development of the fertilized egg to the blastocyst stage and its subsequent implantation into the uterine endometrium. Embryo implantation involves both the interaction between the embryo and the mother and the participation of a group of cytokines in this process [145; 166]. Thus, after a number of developmental stages, such as fragmentation, morula, and blastocyst formation, the fertilized egg reaches the uterine cavity. Endometrial epithelial cells outside the oocyte implantation site begin to undergo apoptosis, ready to accept the adhesion and invasion of blastocyst trophectodermal cells, which promotes close contact between the embryo and the mother. This process is very similar to the phenomenon of metastasis and spread of tumor cells, but one of the biggest differences in the process of endometrial cell apoptosis is that the process of embryo implantation into the endometrium is not unlimited. It is simultaneously affected by the decidualization of endometrial stromal cells to achieve a further balanced state.

According to research data, the normal fulfillment of reproductive function in women is due to the harmonious functioning of immunological mechanisms. Fertilization itself is an antigen-antibody reaction, because the fetus is an allograft that has 50% of the foreign antigens of the parental origin. The physiological course of pregnancy is provided by many factors associated with the peculiarities of immune reactions of the maternal body, which, on the one hand, maintain tolerance to the allogeneic fetus and, on the other hand, are ready to launch all necessary chains of defense against likely foreign agents [27; 32].

During normal pregnancy, proliferation and constant apoptosis of endometrial

decidual cells are always in a balanced state. Between the maternal-fetal interface, a microenvironment is gradually formed in which the maternal body can not only accept and support the continuous development of the embryo, but also control and avoid the endless invasion of the trophoblasts. This makes it possible for the mother's body to accept foreign transplants, including embryo transfer with the fertilization of a donor egg. In addition to the well-known steroid hormones such as progesterone and estrogen and their receptors, a large number of cytokines, immune factors, cell adhesion molecules, glycoconjugates, etc. are involved in maintaining the balance of the microenvironment (microenvironment) [204].

According to the publications, the main mechanism of pregnancy preservation is immunosuppression, which is realized with the help of cytokines. The bulk of cytokines are synthesized by lymphocytes. When local defense reactions are found to fail, cytokines act on a systemic level, namely affecting all organs and systems involved in homeostasis maintenance. Their influence on the central nervous system changes the entire complex of behavioral reactions. There are changes in the production of most hormones, protein synthesis, and plasma composition. Cytokines link the endocrine, nervous, circulatory, and immune systems, involving these systems in the formation of a complex protective reaction of the body [28].

Scientists have revealed that cytokines regulate almost all stages of the gestational process: blastocyst implantation, placenta formation, fetal development, placental hormone production, cell apoptosis, cervical “maturation”, and the delivery mechanism [75]. It is believed that physiological pregnancy depends on the preference for T-helper type 2 (Th 2) cytokines (interleukin (IL)-4, ILL-5, IL-10, IL-15), which are anti-inflammatory and non-cytotoxic. They promote trophoblast development, control angiogenesis, increase the production of human chorionic gonadotropin, and perform immunosuppression [72; 83; 130]. It is established that cytokines of T-helper type 1 (Th1) (tumor necrosis factor alpha, IL-2, -6, -8, -12) are proinflammatory, cytotoxic, embryotoxic, and able to destroy trophoblast cells, stimulate the activity of natural killers and activate the coagulation cascade. An

excessive amount of proinflammatory cytokines leads to prothrombinase activation, which causes thrombosis, trophoblast infarcts, its detachment, and, finally, miscarriage in the first trimester [83].

The complex process of trophoblast implantation and invasion is crucial for the successful establishment of pregnancy. Usually, the embryo implants into the endometrium during the implantation window, and the receptivity of the uterus to implantation during this period is maximal. Endometrial receptivity involves the expression of molecular factors that control the maternal-fetal dialogue and initiate endometrial stromal decidualization [106]. Candidate molecules, including cytokines and growth factors, are secreted by endometrial and tubal epithelial cells. They were previously described as the major regulators of blastocyst implantation [144]. An abnormality in any part of this huge chain of events can provoke the development of factors that will eventually lead to spontaneous abortion [178].

In addition, maintaining the balance between the mother and the embryo also requires an active immune response. Some scientists suggested that spontaneous abortion, especially early spontaneous abortion and biochemical pregnancy, could be seen as a result of immune rejection. When this particular and complex immune regulatory network between the mother and fetus becomes abnormal, the imbalanced state can lead to a pathological pregnancy [160].

In recent years, studies have shown that the occurrence of spontaneous abortion is associated with abnormal endometrial decidualization. Thus, in the natural state, there are many biological cytokines associated with the decidualization of human endometrial stromal cells, including many members of the transforming growth factor-β family, such as TGF-β, growth differentiation factors (growth differentiation factors, GDFs, activin, etc.). These factors play an important role in regulating cell proliferation and differentiation [150; 202].

The family of transforming growth factor beta is a newly discovered growth factor, and its main function is to regulate cell growth and differentiation [195]. The TGF-β ligand superfamily represents a large group (>60) of proteins that are

polyfunctional growth factors. This superfamily includes three TGF-β isoforms (TGF-β 1, TGF-β 2, and TGF-β 3), five activin isoforms, bone morphogenetic proteins (BMP-1/tolloid, BMP-2, BMP-3/osteogenin, BMP-3 b/growth and differentiation factor 10, BMP-5, BMP-6/VG 1-related sequence, BMP-7/osteogenin-1, BMP-8/osteogenin-1, BMP-8 b/osteogenin-3, BMP-9/growth and differentiation factor-2, BMP-10, BMP-11/growth and differentiation factor-11, BMP-15/ growth and differentiation factor-9 b) and mycostatin. TGF-β isoforms and some BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, and BMP-7) are expressed by endotheliocytes and vascular smooth muscle cells [202].

As early as 1985, researchers succeeded in cloning the TGF-β gene, which can be well expressed in *E. coli*. TGF-β is a cytokine with multiple functions and has a wide spectrum of biological activity [159; 220]. The present study shows that there are five subtypes of TGF-β. In mammals, including humans, only TGF-β1, TGF-β2, and TGF-β3 were detected, and TGF-β1 expression was the highest. In general, TGF-β is mainly expressed in tissues with active cell differentiation in the body, namely the liver, bone marrow, and osteoblasts [103]. Among them, TGF-β1 is mainly expressed in human bone platelets and human bones, whereas TGF-β2 is mainly expressed in mammalian bones and in porcine platelets; TGF-β3 is mainly produced by cells of mesenchymal origin [112].

Many cells in the human body have the ability to secrete TGF-β, but these TGF-β are in an inactive state. Still, in certain conditions, inactive TGF-β can be activated. TGF-β can have a significant biological effect on various tissues, and is expressed in proliferation, cell differentiation, and immune regulation, in the autocrine or paracrine form [110; 218]. The TGF-β receptor (TGF-β receptor, TβR) is a high-affinity TGF-β binding protein on the cell membrane surface comprising several amino acids [148]. In all mammals, including humans, TGF-β can be synthesized and secreted by almost all normal tissue cells. Its existence is of great importance for the maintenance of the gestational period. During normal pregnancy, Th2-type cytokines (such as IL-4, IL-5, IL-10, etc.) have a protective effect on pregnancy,

whereas Th1-type cytokines have the opposite effect [108; 216]. Th1/Th2 are two types of cytokines that interact to provide a maternal-placental immune balance in the microenvironment, and the occurrence of spontaneous abortion is closely related to the destruction of this balance [221].

In most cases, TGF-β1 can be regarded as a cell growth inhibitor, and it can also inhibit the lysis of various killer cells on the embryo, prevent immune rejection of the embryo in the mother, and avoid miscarriage. Therefore, some scientists believe that TGF-β belongs to one of the Th2 cytokine members. In recent years, TGF-β expression in fetal abortion patients has been studied by many scientists. For example, Linghui *et al*. investigated the expression of TGF-β1 and its type I and type II receptors in the chorionic and decidual tissues of 20 patients with early spontaneous abortion. It was found that, compared with the decidual and chorionic tissues of normal pregnancy, the expression of TGF-β1 and its receptors in the chorionic and decidual tissues of patients with spontaneous abortion was reduced [98].

In addition, studies showed that being a member of the TGF-β superfamily, one of the few inhibitors, the Lefty gene could induce the secretion and expression of matrix metalloproteinases in proliferative endometrial cells, and it was expressed in human menstruating endometrium. However, Lefty gene expression was not detected in the endometrium during embryo implantation [211]. Similarly, studies of the decidual tissue of patients with early spontaneous abortion showed that their relative levels of mRNA and Lefty protein expression were significantly higher than those with normal pregnancies.

TGF-β superfamily proteins interact with two types of specific transmembrane receptor serine/threonine kinases. There are 7 types of type I receptors (activin-like receptor kinases/ALK) and 5 types of type II receptors (TbR – II: BMPR 2, AMHR 2, TGFR 2, ActR 2 A, ActR 2 B). Dimeric ligands of the TGF-β superfamily bind to both types of receptors. TGF-β isotypes bind to type I receptors (ALK-1 and ALK-5) and type II receptors, BMP proteins bind to type I receptors (ALK-1, ALK-2,

ALK-3, ALK-6) and type II receptors (BMPR-II, ActR-II A, ActR-II B), activins bind to type IIA (ActRIIA) and type IIB (ALK4). The interaction of the ligand with the receptors leads to the organization of the receptor tetramer.

The TGF-β receptor (TβR) is a high-affinity binding protein on the surface of the TGF-β cell membrane and exists in three main types, namely, TβR I, TβR II, and TβR III. Among these, TβR III is not directly involved in the signal transduction process and is responsible only for presenting TGF-β to the receptor molecules [71]. Both TβR I and TβR II are families of transmembrane glycoprotein serine-threonine kinase receptors that are widely expressed in cells and tissues. When bound to TGF-β, they form a heteromeric complex and play a major role in signal transduction. The interaction of the ligand with the receptors leads to the organization of the receptor tetramer.

Formation of the receptor tetramer results in phosphorylation of type I receptor by type II receptor, which leads to induction of type I receptor kinase activity. Smad proteins are involved in further intracellular signal transduction. Seven subtypes of TβR I (ALK1-ALK7) were identified and validated in mammals with different biological properties, specific ligands, and signaling pathways, respectively. Species constantly evolve over time, but many important roles of the TGF-β superfamily and its signaling pathways, such as cell growth and differentiation, remain unchanged.

Molecules of the TGF-β family bind to specific receptors on the surface of the host cell and combine them. This allows the receptors to activate the so-called SMAD proteins inside the cell. The activated SMADs travel to the cell nucleus, where they regulate the activity of the target genes. This changes the behavior of the cell. Transforming growth factor-β (TGF-β) is a multifunctional secreted cytokine that plays a crucial role in cell proliferation, differentiation, and apoptosis [179].

Activin receptor-like kinases (ALKs) are a group of seven type I receptors responsible for TGF-β family signaling and are used by many ligands within the superfamily. Let us briefly review the functions of each of them and focus in more

detail on ALK5.

ALK1 (ACVL1) is well-studied because of its role in vasculogenesis. During wound healing, ALK1 expression increases, causing the branching of blood vessels, and its expression decreases after wound closure [170; 179].

Inhibition of endothelial ALK1 signaling through the use of the neutralizing antibody ALK1 significantly inhibits vasculogenesis and angiogenesis, even when growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are present [139]. Interestingly, some studies showed that ALK1/Smad1/5/9 worked synergistically with the Notch pathway to regulate angiogenesis. Rostama *et al*. found that delta-like ligand 4 (Dll4)/Notch with BMP9/ALK1 activation induced cell rest via p21 and thrombospondin-1 and induced Hey gene expression in lung endothelial cells. In addition, after the loss of Dll4, ALK1/Smad1/5/9 becomes upregulated, thereby, compensating for the loss of Notch signaling [196].

Similarly, exposure of human primary endothelial cells to BMP9 induces the Hey1 and Hey2 genes through cooperation with Notch. Exposure of soluble ALK1 to BMP9 inhibits expression, demonstrating a close relationship between the two pathways [219]. Loss of ALK1 function is a major cause of the autosomal dominant vascular dysplasia syndrome known as hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 (HHT2) [139].

ALK2 (ACVR1) is a bone BMP receptor. Various TGF-β, Activin, and BMP ligands, such as BMP9 and Activin B, were found to induce ALK2 signaling [90]. Its role is primarily studied in osteogenesis and chondrogenesis; ALK2 is essential for chondrocyte proliferation and differentiation [194]. The importance of ALK2 in osteogenesis is fully realized in the development of fibrodysplasia ossificans progressiva, which is characterized by progressive ossification of muscles, tendons, ligaments, and connective tissues [182].

Although some functions of ALK3 (BMPR1A) suggest similarities with ALK2, this protein has significant sequence similarities with another member of the ALK

family – ALK6 [157]. A global defect in ALK3 is fatal for embryos [169]. ALK3 is expressed in osteoline and bone marrow cells and is required for postnatal bone formation. Therefore, it is assumed that the main function of ALK3 is osteogenesis [163].

ALK4 (ACVR1B) is a universal receptor that plays a crucial role in development. In mouse models, global knockout of ALK4 (ACVR1B) is embryo lethal due to disruption of epiblast and extraembryonic ectoderm development, leading to abnormal gastrulation [125].

Activin A signaling mediated through ALK4 plays an important role in reproduction [161]. A conditional defect of ALK4 in utero leads to decreased fertility due to defects in placental development [186]. Signal transduction through ALK4/ALK7 in the male genital tract is necessary for germ cell development and Sertoli cell proliferation [167].

ALK6 (BMPRIB) acts primarily as a BMP receptor with primary binding to BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP15, and GDF5. However, binding of the Mullerian inhibitory substance ligand is also observed [80]. In vertebrate development, ALK6 expression is strictly controlled and primarily found in mesenchymal precartilage, chondrocytes, and osteoblasts. During osteoblast differentiation, ALK6 expression increases, indicating the role of this protein in bone formation [163]. This is also proved by the association of ALK6 mutations in the development of type A1 and type A2 brachydactyly.

Additional evidence for the involvement of ALK6 in bone formation is the development of skeletal disorders, Grebe dysplasia, and du Pan acromesomelic dysplasia [208]. Various mutations affecting ALK6 kinase domain activity are associated with these disorders [207]. ALK6 expression is highest in the brain, lungs, and ovaries in mature tissues [169]. In the ovaries, ALK6 is required for folliculogenesis. Its expression fluctuates at all stages, but decreased or impaired expression of ALK6 on the surface of granulosa cells is associated with decreased follicular growth [190].

Little is known about ALK7 (ACVR1C). Until recently, the type II receptor and ligands interacting with ALK7 were unknown [146]. To date, several ligands have been identified, including GDF3, Activin B, and Activin AB [223]. ALK7 shows high sequence similarity with ALK4 and ALK5, but the structure of the extracellular domain differs from other type I receptors [146]. In postnatal development and adulthood, ALK7 is mainly expressed in the central nervous system, where the signaling pathway is thought to be involved in neuronal proliferation and differentiation, as well as in the pancreas and colon [84].

Similar to the previously discussed receptors, ALK5 (TGFBR1) plays a crucial role in development and reproduction. ALK5 is best characterized as the primary receptor for TGF-β ligands (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), but it is additionally reported that GDF8 and GDF9 also transmit a signal through this receptor . GDF8 can transmit a signal through ALK5 to activate Smad3, ERK1/2 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cells. This effect can be blocked by ALK5 inhibition [117]. GDF9 transduces signals through BMPRII and ALK5, encoding Smad2 and Smad3 to activate adrenal cortex cells and Sertoli cells [215]. Both are required for folliculogenesis [117]. ALK5 plays a key role in the canonical TGF-β signaling pathway. ALK5 can catalyze the phosphorylation of receptor-regulated Smad proteins (Smad2 and Smad3), which form a heteromeric complex with shared mediated Smad4 and translocation to the nucleus, where they regulate transcription [179].

ALK5 is essential for reproductive function. Mice with conditional ALK5 knockout in utero are infertile. Even ALK5 mutant mice with a D266A knock-in mutation in the L45 loop (not allowing ALK5 to phosphorylate Smad2) survive only to E10.5 because of defects in vascular network formation [143]. Targeted deletion of ALK5 in the nerve trunk compartment is fatal for the embryo due to the inability to close the upper lip and palate [159].

Deletion of ALK5 disrupts the development of the oviductal diverticula and myometrium. In addition, these mice have hyperproliferative uteri and irregular

glands [121]. This phenotype is demonstrated during implantation as trophoblasts lack organization. The population of natural uterine killer cells is decreased and arterial remodeling is reduced [186]. These results suggest that ALK5 is not only required for the transduction of TGF-β family signaling, but is also necessary for mediating part of the uterine immune response.

Although the loss of ALK5 expression in the uterus leads to defective processes, constitutive expression of the receptor is also problematic. A conditional increase in uterine ALK5 function led to an increase in myometrial thickness, resulting in uterine hypermuscularization. In the endometrium, constitutive ALK5 activity promotes fibroblast differentiation and smooth muscle gene signature. Interestingly, ALK5 deletion in utero had significant epithelial effects, whereas constitutive activation strongly altered the uterine microenvironment [120].

In a study by Monsivais *et al*. [172], the authors artificially blocked ALK5 biomolecular pathways in the uterus using progesterone receptor mice to determine the physiological role of ALK5 in the reproductive process.

Despite normal ovarian function and artificial decidualization in conditionally knockout mice (cKO), the absence of ALK5 in utero resulted in significantly reduced reproductive capacity due to abnormalities observed at different stages of pregnancy, including blastocyst defects, implantation, trophoblast cell disorganization, fewer uterine natural killer (uNK) cells, and disruption of spiral artery remodeling.

TGF-β acts on the decidual cells through ALK5, causing the expression of other growth factors and cytokines, which are key regulators of epithelial lumen proliferation, trophoblast development, and uNK maturation during pregnancy. The authors note a decrease in the invasiveness of the trophoblast associated with an increased level of its apoptotic death. The researchers believe that the induction of trophoblast apoptosis can be performed by macrophages in two ways: the secretion of TNFα and its action on ALK5 expressed by the trophoblast, and the creation of tryptophan deficiency under the action of indolamine-2,3-dioxygenase expressed by

macrophages [191].

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from a pre-existing vascular network by sprouting, splitting, and remodeling of the primitive vasculature. Both vasculogenesis and angiogenesis are involved in the development of functional vasculature in the embryo and contribute to the formation of postnatal blood vessels. In adults, the neovascular response occurs under a variety of physiological and pathological conditions, including wound healing, recovery from myocardial infarction, inflammation-related disease, solid tumor growth, and tumor metastasis. Vasculogenesis and angiogenesis are strictly regulated by growth factors. These factors include vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), platelet-derived growth factor (PDGF), and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) [211].

During the embryonic formation of the human body, the embryo depends on a blood supply for development and growth. Since blood is supplied through blood vessels, blood vessel formation is an important process both during human embryonic development and during the postnatal stages of life. Endothelial cells line the inside of blood vessels, and they are essential for blood vessel formation as they proliferate, migrate, and invade the extracellular matrix (ECM) to form vascular structures throughout the human body. As a major TGF-β type I receptor subtype, ALK5 plays an important role in vascular formation during embryonic development.

Endothelial cell-specific ALK1 increases the proliferation and migration of endothelial cells, whereas the ubiquitously expressed ALK5 inhibits both of these processes. Since ALK1 requires ALK5 kinase activity for optimal activation, the absence of ALK5 in endothelial cells leads to defective phosphorylation of both Smad pathways during TGF-beta stimulation [220].

To understand why TGF-beta signaling through ALK1 and ALK5 has an opposite effect on endothelial cells and whether this occurs *in vivo*, Itoh *et al*. [143] compared the phenotype of ALK5 (ALK5 (KI/KI)) knockout mice, in which asparagic acid residue 266 in the L45 loop of ALK5 was replaced with an alanine

residue, with the phenotypes of ALK5 (ALK5 (-/-)) knockout and wild-type mice. ALK5 (KI/KI) mice showed angiogenic defects with embryonic lethality at E10.5-11.5. Although the phenotype of ALK5 (KI/KI) mice was very similar to that of ALK5 (-/-) mice, the hierarchical structure of blood vessels formed in ALK5 (KI/KI) embryos was more developed than in ALK5 (KI/KI) mice. ALK5 (-/-) mutants. Thus, the L45 loop mutation in ALK5 partially rescued the earliest vascular defects in ALK5 (-/-) embryos. This study confirms the author's earlier observations that the TGF-beta/ALK1/BMP-Smad and TGF-beta/ALK5/actin-Smad pathways are required for vascular maturation *in vivo* for normal vascular development.

The study by Rossant on conditional knockout of ALK5 revealed the development of estrogen-dependent endometrial adenocarcinoma with distant lung metastases. However, the understanding of the role of ALK5 in implantation processes is complicated by the fact that the morphology of the human preimplantation embryo is not identical to that of the mouse embryo, which is most frequently used as the experimental model in the context of this topic research. After fertilization, both embryos undergo mitotic cell divisions, compaction and cavitation to form a blastocyst consisting of a trophectoderm layer and an inner cell mass. Despite these similarities, there are a number of significant differences, such as the time of division, split, blastocyst formation, and implantation [196].

Summary of the literature review

Women constitute a growing segment of patients seeking infertility services such as ART. However, the miscarriage rate among pregnancies after ART, like after spontaneous conception, increases with age. The specific cause of subfertility can also affect miscarriage rates: for example, women with bad habits, overweight or underweight, with a history of infectious diseases, with some congenital uterine abnormalities, fibroids, and endocrine disorders have higher rates of early reproductive losses.

In the female reproductive tract, TGF-β, ALK5, and its downstream signaling factors, SMAD2 and SMAD3, are critical to the structural integrity of the myometrium and oviduct. In fact, conditional ablation of TGFBR1/ALK5 in uterine muscles and uterine stromal compartments with the Amhr2-cre receptor leads to abnormal smooth muscle development, resulting in oviduct diverticula and impaired embryo transport. Alternatively, the knockout of TGFBR1/ALK5 from uterine muscle, stroma, and epithelium by the progesterone receptor leads to endometrial and placental defects, resulting in abnormal embryo development and infertility. Modulation of receptor activity is a critical step for the regulation of TGF-β signaling.

Members of the TGF-β superfamily were shown to play a role in blood vessel formation. In most cell types, TGF-β transmits signals through activin-like kinase 5 (ALK5) of the TGF-β type I receptor, but endothelial cells express the endothelium-specific TGF-β type I receptor ALK1. Thus, TGF-β can transmit signals through the ALK1 and ALK5 receptors in endothelial cells.

Although much effort was made to understand the regulatory mechanisms of ALK5 receptor activity and stability, its importance in embryonic vascular development to ensure the maintenance of pregnancy, and many other issues remain unresolved.

CHAPTER II. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study design

The study was performed at the facilities of the Department of Assisted Reproductive Technologies of the Perinatal Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint Petersburg State Pediatric Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation. The sampling of decidual tissue was performed at outpatient facilities at the Department of Obstetrics and Gynecology, St. Petersburg State Pediatric Medical University. The immunohistochemical studies were performed at the Department of Pathological Anatomy with a Course of Forensic Medicine, St. Petersburg State Pediatric Medical University.

The study was approved by the Bioethics Commission at St. Petersburg State Pediatric Medical University (Minutes No. 1/6 of January 21, 2019). The approval states that the work complies with the principles of the Declaration of Helsinki adopted by the General Assembly of the World Medical Association, the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, relevant provisions of the WHO, the International Council of Medical Scientific Societies, the International Code of Medical Ethics, and the laws of the Russian Federation, completely excludes the impairment of patients' interests and harm to their health.

In accordance with the goal and objectives of the study, the scientific search was carried out in several stages.

In the first stage, the publications on the topic of the study were analyzed. The goal, hypothesis, objectives, object, and subject of the study were formulated, and research methods adequate to the objectives of the study were selected.

The second stage of the study involved a retrospective clinical and statistical analysis of 120 medical records of pregnant women after ART, selected during the period from 2018 to 2020. The materials were analyzed using the Microsoft Excel 2016 program, which contained documented data from medical records. The outcomes of the study were processed by calculating the sample mean (M) and

estimate of the standard deviation of the sample mean (m). The obtained data were analyzed using nonparametric tests. The Mann-Whitney test (U-test) was used to calculate statistically significant differences between the groups.

In the third stage of the study, an immunohistochemical examination of the decidual tissue of abortive material in early reproductive losses was performed to detect ALK5 expression. Decidual tissue samples were collected from January 2018 to December 2020 at the Gynecological Department of St. Petersburg State Pediatric Medical University; tissues from 40 patients aged 25–40 years, with a menstrual cycle of 28–30 days, with a normal chromosomal karyotype of the couple were included in the study. In addition, the prognostic and clinical significance of ALK5 expression in the profile of early reproductive losses after ART was evaluated.

In the fourth stage, the obtained data were processed and analyzed, conclusions and recommendations on the study were formulated, the text was prepared, and the thesis was designed.

2.2. General clinical characteristics of women included in the study

A retrospective clinical and statistical analysis was performed, including the selection of 344 medical charts of pregnant women, which contained data on early spontaneous abortion from 1,274 medical charts of perinatal center patients, 60 of them aged 25 to 45 years had induced pregnancy after ART and registered early spontaneous abortion at the gestational age of 6–8 weeks (or 4–6 weeks after embryo transfer). The comparison group comprised 60 medical records of patients aged 25 to 45 years after ART who had a pregnancy without any complications.

The etiological risk factors for early reproductive losses after ART were evaluated among the two groups of patients after ART based on a clinical and statistical analysis. As part of the analysis, social anamnesis was assessed (age, weight, type of activity, education, influence of harmful factors, and bad habits). Gynecological anamnesis included past inflammatory-infectious, extragenital diseases, surgical interventions, menstrual cycle regularity, duration, and nature of

menstruation. The author also evaluated reproductive history (abortions, miscarriages, premature births), the duration of infertility, the number of ART attempts, the type of infertility, the controlled ovarian hyperstimulation protocol, the fertilization method, the total gonadotropin dose, and the serum hCG level 14 days after transfer (IU/L).

Early spontaneous abortion after IVF at 6–8 weeks of gestational age (or 4–6 weeks after embryo transfer) was the criterion for inclusion in the immunohistochemical study of decidual tissue of aborted material for early reproductive losses to detect ALK5 expression (20 patients of the Reproductive Medicine Center). The patients of the Center for Reproductive Medicine underwent an abdominal ultrasound examination after the embryo transfer procedure 3–4 weeks after the transfer to verify the presence of an intrauterine pregnancy. If there were no signs of progression within 7 days (hCG growth, fetal heartbeat at ultrasound), a surgical abortion was performed (20 patients). After intravenous anesthesia, vacuum aspiration was performed and the obtained material was sent for examination.

The criterion for inclusion in the control group (20 healthy women) was a planned surgical abortion of a singleton progressive pregnancy that occurred in the natural cycle at their request at 6–8 weeks gestational age without a threat of pathological pregnancy termination.

To obtain reliable data in determining ALK5 expression, the study and comparison groups were selected with regard to their identity according to the following key parameters: age (25–45 years), socioeconomic and marital status, specific features of obstetric and gynecological history, extragenital pathology, etc. The research team obtained women’s informed consent to the use of biological material for scientific purposes.

Exclusion criteria for immunohistochemical studies were the presence of somatic, autoimmune, hereditary genetic, and endocrine diseases, multiple pregnancies, cases of detected congenital anomalies, and women's refusal to use their biological material for scientific purposes.

2.3. Methods of the study

To obtain objective results, a comprehensive approach was applied using a number of previously selected research methods.

A retrospective clinical and statistical analysis of medical records of perinatal center patients was performed. An analytical study of the assessment of etiological risk factors for early reproductive losses after ART was conducted to identify the causes and prevalence of the latter. The main objective of this study is to identify the cause-effect relationships between the hypothetical cause and effect. A comparison of the incidence of certain factors in the main and control groups made it possible to calculate the odds ratio (OR), the value of which was used to estimate the presence of a cause-effect relationship.

In the clinical study stage, abdominal ultrasonography was performed in pregnant women during the embryo transfer procedure 3–4 weeks after transplantation to confirm the presence of an intrauterine pregnancy. A series of longitudinal and transverse scans were performed on a Philips Clear Vue ultrasound machine (Germany) using software packages.

Peripheral blood levels of selected hormones, including HCG, were studied in all examined women. Hormonal serum tests were performed by enzyme immunoassay on an Immulite 2000 analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) using the Immulite 2000 HCG test system for the determination of human chorionic gonadotropin. High-sensitivity antibodies were used during the study.

All patients were examined for urogenital infections. IgM and IgG in blood plasma to pathogens *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Toxoplasma gondii*, rubella, *Cytomegalovirus*, and Herpes simplex (type 1/2) were determined by solid-phase enzyme immunoassay. Patients underwent surgical termination of pregnancy by electric vacuum aspiration after intravenous anesthesia. The decidual tissues of the aborted material were sliced and fixed in 10% formalin with a neutral buffer for 24 hours and embedded in wax. Waxed sections

were dewaxed, rehydrated, and boiled for antigen extraction using standard procedures. After blocking with 3% (weight/volume) BSA for 1 hour, the sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Immunoreactive signals were obtained using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate set.

In the last step, the prognostic and clinical significance of ALK5 expression in the profile of early reproductive loss after ART was evaluated. Differentially expressed genes were determined using a two-tailed t-test ($p<0.05$) and multiplicity <0.5 and >2, and mapped on a heat map using GenePattern. Gene set enrichment analysis was performed on the KEGG gene sets, and gene sets that met a false discovery rate criterion of <0.25 were selected for further extraction of advanced subsets.

To quantify the results, the micropreparations were photographed in as many non-overlapping fields of view as possible. The pictures were obtained using an x20 lens with a resolution of 1600×1200 pixels, using a Leica microscope and a Leica 425C digital camera. The expression of markers was quantified using the computer program Aperio Image Scope_v9.1.19.1567. The program was calibrated, and after that, the results of immunohistochemical reactions were evaluated based on the indicator "positivity" (in the program interface "positivity"). For each case, the average positivity value of all images was calculated according to the rules of finding the average.

An electronic database of primary data was created using Microsoft Excel 2016 spreadsheets. Statistical data were processed and analyzed using the SPSS Statistics 17.0 software package (Statistical Package for the Social Science).

A descriptive analysis of the results of the study was based on the methods of variance statistics. The study analyzed frequency characteristics (in %) for qualitative parameters. For quantitative parameters, the average levels of indicators were determined, and their variability and statistical significance by means of the arithmetic mean (M) and standard deviation (m) were assessed.

Comparative analysis and assessment of the significance of the difference between the study groups when comparing frequency characteristics (qualitative parameters) were performed using the Chi-square test. When rarely detected features in the study groups (5 cases or less), Fisher's exact test was used to assess the significance of the intergroup difference. A comparative analysis of quantitative parameters was performed using the nonparametric Mann-Whitney test for comparison between groups.

In all stages of statistical analysis, the statistical significance of the results was checked (evaluated) at the level not lower than 95% (risk of error not exceeding 5% – $p<0.05$).

To assess the prognostic impact of individual factor characteristics on the probability of reproductive losses after ART, the odds ratio (OR) and 95% confidence interval with an estimate of statistical significance (p) were calculated. Assessment of the relationship between the studied clinical parameters was based on correlation and regression analysis. The correlation theory used the Chaddock scale of English statistics to assess the strength of the relationship: weak – 0.1 to 0.3; moderate – 0.3 to 0.5; marked – 0.5 to 0.7; high – 0.7 to 0.9; very high (strong) – 0.9 to 1.0.

CHAPTER III. ANALYSIS OF FACTORS ASSOCIATED WITH EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

3.1. Etiological risk factors for early reproductive losses in women after assisted reproductive technology based on clinical and statistical analysis

Nowadays, some people who used to struggle with infertility have more therapeutic chances. In recent years, many scientific and technical advances have appeared in the field of infertility treatment. However, the success rates of such methods have shown little progress, despite their use over the past decade. Meanwhile, a significant difference was revealed between a high success rate of ovulation after treatment and a low pregnancy rate. The clinical course of pregnancy in women after ART is the subject of many scientific studies. Pregnancy with high obstetric risk is an understudied issue, and existing publications on this topic do not provide an unequivocal answer regarding the role of various etiological risk factors for early reproductive loss in women after ART. The author studied pregnancy risk factors, including maternal age, BMI, gynecological and somatic diseases, etiology of infertility, response to stimulation, quality and number of embryos replaced, and the type of treatment.

The ages of the women included in the study ranged from 25 to 40 years old (Table 1), with 5% in the study group (SG) and 15% in the control group (CG) aged 25–29 years old. There were 55% of women aged 30 to 34 years old in the SG and 68.33% in the CG. There were 23.3% of women aged 35 to 40 in the SG and 15% in the CG. There were 16.67% of women aged 41 to 45 years old in the SG and 1.67% in the CG.

Table 1

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by their age

Age	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
25–29 years old	12	10.0	3	5.00	9	15.00
30–34 years old	74	61.7	33	55.00	41	68.33
35–40 years old	23	19.2	14	23.33	9	15.00
41–45 years old	11	9.2	10	16.67	1	1.67
M±m			35.3±4.6		32.8±3.2	
P			<0.05			

The mean age of patients in the SG was 35.3±4.6 years old, and in the CG, it was 32.8±3.2 years old. Analysis of anamnesis data showed a direct association between the risk of early reproductive losses and the age of women in the SG ($p < 0.05$), whose pregnancies occurred after the use of ART treatment programs, as compared to women whose pregnancies were without any complications.

The SG patients were, on average, several years older than the CG women. Thus, a fairly large percentage of SG women were over 40 years of age. It is suggested that this fact is associated with a higher rate of extragenital pathology and the highest percentage of surgical interventions for reproductive system diseases in this age group [20].

When determining the weight of the studied pregnant women by BMI, no significant differences between the main group and the control group ($p>0.05$) were revealed among the women with different BMI values (Table 2).

Table 2

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by their BMI

BMI, kg/m^2	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
<20	9	7.5	4	6.67	5	8.33
20–26	65	54.2	32	53.33	33	55.00
26–30	40	33.3	20	33.33	20	33.33
30–40	3	2.5	2	3.33**	1	1.67
40 and more	3	2.5	2	3.33**	1	1.67
M±m			25.6±4.4		25.2±4.1	
P			>0.05			

Analysis of the data showed that in most of the women included in the study, BMI was normal (18.5–24.9 kg/m^2). Every 10th woman was underweight (less than 18.5 kg/m^2), and every 3rd woman was overweight (25–29.9 kg/m^2). There were cases of first- and second-degree obesity (30.0–34.9 and 35.0–39.9 kg/m^2, respectively).

Thus, BMI <20 kg/m^2 was recorded in 7.5% of the women who participated in the study, of which 6.67% were in the SG and 8.33% were in the CG. BMI 20–26 kg/m^2 was observed in 54.2% of the studied women, 53.3% of them were in the SG and 55% were in the CG. BMI 26–30 kg/m^2 was revealed in 40% of the studied

women, 33.3% of them were in the SG and 33.3% were in the CG. BMI 30–40 kg/m^2 was found in 2.5% of the studied women, 3.3% of them were in the SG and 1.67% were in the CG. BMI 40 or more kg/m^2 was registered in 2.5% of the studied women, 3.3% were in the SG and 1.67% were in the CG.

The mean age of women in the SG was 25.6±4.4 years old, and in the CG, BMI was 25.2±4.1 kg/m^2. Analysis of anamnesis data did not reveal any association between the risk of early reproductive losses and BMI in the SG women compared to the CG women ($p>0.05$). Nevertheless, some SG women had an excessive body weight of 30 kg/m^2 or more in comparison with the CG ($p<0.05$), which might affect the development of early reproductive losses after ART in some cases [20].

The vast majority of the women included in the study lived in the city and were in a registered marriage. The groups of women were homogeneous according to their place of residence and marital status.

The professional affiliation and type of labor activity of the patients of the study groups are presented in Table 3.

Table 3

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by their occupation

Occupation	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Press worker	4	3.33	1	1.67	3	5.00
Tutor	12	10.00	5	8.33	7	11.67
Doctor	16	13.33	7	11.67	9	15.00
Housewife	25	20.83	12	20.00	13	21.67

Occupation	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Work that involves physical labor	28	23.33	15	25.00	13	21.67
Employee of a public institution	28	23.33	16	26.67	12	20.00
Research scientist	7	5.83	4	6.67	3	5.00

The author could not find any statistically significant differences in the direction of professional affiliation and type of labor activity between the SG and CG. It should be noted that the larger share of patients in both groups were engaged in intellectual work (employees, doctors, researchers, and employees of state institutions). There is also a trend towards a larger share of women who were engaged in physical work among SG patients, a statistically significant level of indicators between the main and control groups was not reached.

It was impossible to analyze the presence of bad habits, because this information was not available in the medical records of the studied women.

The analysis of the menstrual cycle of the patients of the study groups showed that the mean age of menarche was 12.7±1.1 years old in the women of the SG as compared to 11.8±1.3 years in the CG ($p>0.05$). The menstrual cycle was established immediately in the vast majority of the women included in the study ($p>0.05$). The study of the functional features of the menstrual cycle did not reveal a direct correlation between the nature of its disorders and the occurrence of early reproductive losses after the use of the therapeutic programs of ART.

Painful menstruation was observed in 35 (58.33%) SG patients and 28 (46.67%) control group patients (p>0.05). The results of the study are presented in Table 4.

Table 4

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the type of their menstrual cycle

Type of menstrual cycle	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Oligomenorrhea	21	17.50	10	16.67	11	18.33
Metrorrhagia	9	7.50	4	6.67	5	8.33
Algodismenorrhea	63	52.50	35	58.33	28	46.67
Menorrhagia	27	22.50	11	18.33	16	26.67

Menstrual cycle disorders were noted in 10 (16.67%) SG patients and 11 (18.33%) CG patients (p>0.05). The presence of metrorrhagia was noted in 4 (6.67%) SG patients and 5 (8.33%) CG patients (p>0.05). Heavy and prolonged bleeding during menstruation was noted in 11 (18.3%) SG patients and 16 (26.7%) CG patients (p>0.05).

The average duration of the menstrual cycle before infertility treatment with ART methods was 28±2.5 days in SG patients and 27.6±2.5 days in CG patients (p>0.05) (Table 5).

Sixty (50%) studied women started early sexual life (before 18 years of age), 32 (53.3%) in the SG and 28 (46.7%) in the CG women examined (p>0.05).

Table 5

The length of the menstrual cycle in women from the studied groups before ART

Menstrual cycle length	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
21–24 days	9	7.50	4	6.67	5	8.33
25–27 days	45	37.50	18	30.00*	27	45.00
28–30 days	55	45.83	34	56.67**	21	35.00
31–33 days	9	7.50	4	6.67	5	8.33
M±m			28±2.5		27.6±2.5	
P			>0.05			

Note: * – significance of values at p<0.05, ** – significance of values at p<0.001.

The presence of gynecological pathology in the vast majority of pregnant women with early reproductive losses after ART showed no direct correlation with such diseases as congenital malformations of the female genitalia (3.33% in the SG and 8.33% in the CG, p>0.05) (Table 6).

Table 6

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the structure of their gynecological pathology

Gynecological anamnesis data	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
No	23	19.17	0	0.00	23	38.3
Uterine fibroid	10	8.33	7	11.67**	3	5.00
Vaginal inflammatory process	29	24.17	22	36.67*	7	11.67
Cervical pathology	25	20.83	18	30.00*	7	11.67
Congenital malformations of the female reproductive organs	7	5.83	2	3.33	5	8.33
Surgical interventions on pelvic organs, abdominal cavity	28	15.00	17	28.33**	11	18.33
Endometriosis	13	10.83	9	15.00*	4	6.67

Note: * – significance of values at p<0.001, ** – significance of values at p<0.05.

The obtained data showed that statistically significant factors of early reproductive losses in SG women included vaginal inflammatory processes (36.67% in the SG and 11.67% in the CG, $p < 0.001$), endometriosis (15% in the SG and 6.67% in the CG, $p < 0.001$), uterine myoma (11.67% in the SG and 5% in the CG, < 0.05) and cervical pathology (30% in the SG and 11.67% in the CG, $p < 0.001$).

The combination of these adverse factors has a negative effect on the realization of reproductive function and significantly increases the risks of such serious complications as placental dysfunction, delayed intrauterine development of the fetus, and postpartum hemorrhage [5]. It is likely that the presence of latent foci of chronic infections associated with inflammatory processes of the female genitalia and untreated cervical pathology significantly increases the risk of immune

imbalance [9], as one of the predictors of early reproductive losses in patients after ART.

A significant proportion of hyperproliferative diseases was detected: the rate of uterine fibroid in the gynecological history was recorded in 7 (11.67%) medical records of patients with early reproductive losses after ART, which was more than 2-fold higher than in the CG women ($p<0.05$). It should be noted that genital endometriosis was diagnosed in every 6 SG patients ($p<0.05$). Surgical interventions for gynecological diseases were observed in 17 (28.33%) cases in the SG and in 11 (18.33%) cases in the CG ($p<0.05$), which confirms the leading role of a long persistence of infectious factors in the cause of infertility of infectious genesis with possible autoimmune damage and endometrial cyclic transformation and receptivity disorder.

Cystectomy (5%) and fallopian tube surgery (5.83%), including ectopic pregnancy, hydrosalpinx, and pyosalpinx, were the most common surgical interventions in the history of the examined patients of both groups (Table 7).

Table 7

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the structure of their gynecological pathology

Gynecological anamnesis data	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Surgical interventions on pelvic organs, abdominal cavity, including	28	23.3	17	28.33**	11	18.33
Cystectomy, in particular ovary resection	6	5.00	3	5.00	3	5.00
Separation of adhesions	13	10.83	10	16.67*	3	5.00

Gynecological anamnesis data	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Tubal surgeries, including for ectopic pregnancies	7	5.83	3	5.00	4	6.67
Myomectomy	2	1.67	1	1.67	1	1.67

Note: * – significance of values at p<0.001, ** – significance of values at p<0.05.

According to medical records, surgeries for pelvic adhesions were 3 times more common in the SG versus the CG (p<0.001). It is worth noting that surgical interventions were twice as frequent in older women as in younger patients and only sporadic cases were observed in the control group (p<0.05).

It is obvious that adhesion disease, disturbance of blood supply to the appendages after the fallopian tubes operations, as well as surgical trauma of the ovarian tissue, undoubtedly, have their damaging effect on the parameters of ovarian reserve and steroidogenesis, which indirectly changed the hormonal background and conditions for the physiological formation of endometrial implantation potential in some SG women.

During the analysis of anamnestic data on somatic pathology, attention was paid to the diseases that may have a direct and indirect effect on the formation and functioning of the reproductive system. Analysis of the nature and pattern of extragenital pathology in post-ART women provided an opportunity to identify a group of chronic inflammatory diseases of the urinary system with a latent course, which significantly influences the increased risk of early reproductive losses (Table 8).

Table 8

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the structure and rate of extragenital pathology

Extragenital pathology	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
No	27	22.50	0	0.00	27	45.00*
Gastrointestinal disease	12	10.00	7	11.67	5	8.33
Respiratory diseases (chronic)	32	26.67	18	30.00	14	23.33
Urinary system diseases (chronic)	23	19.17	20	33.33*	3	5.00
Cardiovascular diseases	11	9.17	6	10.00	5	8.33
Hematopoietic diseases	7	5.83	4	6.67	3	5.00
Endocrine diseases	8	6.67	5	8.33	3	5.00
Metabolic syndrome	11	16.67	7	11.67**	4	5.00

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at $p<0.001$, ** – significance of values in the study group in comparison with the control group at $p<0.05$.

Patients with diseases of the urogenital tract and respiratory tract predominated in the medical records of pregnant women with a history of a somatic disorder. These figures confirm the significant role of infectious pathology in the etiopathogenesis of pregnancy failure. The share of endocrine system diseases, cardiovascular diseases, and gastrointestinal diseases is noteworthy.

Analysis of the prenatal medical cards of pregnant women showed that the most common forms of diseases of the urinary system were asymptomatic bacteriuria, chronic pyelonephritis, and recurrent cystitis.

All forms of the above extragenital pathology had a subclinical course, and pregnant women had no complaints at the time of admission to the obstetric hospital.

The presence of concomitant extragenital pathology was confirmed by the examinations performed by related specialists during routine counseling of pregnant women, and the patients reported their existence during anamnestic data collection.

To clarify the nature of extragenital pathology, additional methods of investigation were used, depending on the pathology profile of each patient.

The peculiarity of the last years is the increase in the share of combined somatic pathology and the increasing spread of extragenital disease, the so-called metabolic syndrome with clinical signs of a well-defined symptom complex.

It is worth noting that a disorder of fat metabolism, which is manifested by excessive or insufficient body weight in women enrolled in the ART program, was found in 16.67% of cases. The revealed data undoubtedly indicate a significant influence of a burdened gynecological and somatic anamnesis on the indicators of reproductive losses.

The analysis of the data from the prenatal medical records revealed the leading factors of infertility in the population of women included in the study. Table 9 presents the absolute and percentage numbers of the leading infertility factors in the patients who underwent effective treatment with the latest ART technologies, which resulted in clinical pregnancy.

Thus, the statistical analysis of the primary records of the patients revealed the fact that the main reason for using ART in the examined women was the combined factor of infertility – 44.2% (45% in SG women and 43.3% in CG women), the second place among the causes of fertility loss belongs to the tubal-peritoneal factor – 30.8% (33.3% in SG women and 28.3% in CG women) and 25% (21.67% in SG women and 28.3% in CG women) is endocrine infertility.

Table 9

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the leading infertility factor

Leading infertility factors	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Endocrine factor	30	25.0	13	21.67	17	28.33
Tubal-peritoneal factor	37	30.8	20	33.33	17	28.33
Combined factor	53	44.2	27	45.00	26	43.33

The duration of infertility in the women of the study groups is presented in Table 10. The data obtained indicate a significant percentage of infertility lasting from 3 to 5 years among the patients of all studied groups.

The highest proportion of infertility duration of 3–5 years was in the SG (46.67%), while in the CG, the duration of infertility 3–5 years was detected in 43.3%.

Table 10

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the duration of infertility

Duration of infertility	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
< 2 years	9	7.5	2	3.3	7	11.67
3–5 years	54	45.0	28	46.67	26	43.3
6–9 years	38	31.7	18	30.0	20	33.3
> 10 years	19	15.8	12	20.0*	7	11.67
M±m			6.8±3.5		6.0±2.9	
P			>0.05			

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at p<0.001.

The proportion of infertility up to 2 years was 3.3% in the SG group, whereas in the CG, infertility up to 2 years was detected in 11.67%. The proportion of infertility period of 6–9 years was 30% in the SG, whereas in the CG, an infertility period of 6–9 years was detected in 33.3%. The proportion of the infertility period of more than 10 years was 20% in the SG group, whereas in the CG, an infertility period of more than 10 years was detected in 11.67%.

The average statistical value of the infertility period in the SG was 6.8±3.5 years, in the CG – 6.0±2.9 years. The analysis of anamnesis data showed a correlation between the risk of early reproductive losses and the duration of infertility in women in the SG ($p < 0.05$) whose pregnancies occurred after ART treatment programs, as compared to women whose pregnancies occurred without any complications. At the same time, the higher was the duration of infertility, the higher was the probability of the risk of early reproductive losses.

The author also analyzed the statistics and types of infertility in the patients of the SG before the ART treatment. The data are shown in Table 11.

Table 11

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the type of infertility

Type of infertility	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Primary infertility	64	53.3	23	38.3	41	68.3*
Secondary infertility	56	46.67	37	61.67*	19	31.67

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at p<0.001.

Primary infertility prevailed among the studied women and was detected in 53.3% (38.3% of SG women and 68.3% of CG women). Secondary infertility was detected in 46.7% of women (61.7% of SG women and 31.7% of CG women). According to the obtained data, the predominance of secondary infertility over primary was identified among the causes of the probability of early reproductive loss risk in women who became pregnant after therapeutic ART programs.

Analysis of the consequences of previous pregnancies in the examined women with secondary infertility revealed a significant risk of obstetric and perinatal complications (Table 12). It should be noted that SG women, as compared to CG women, had a high percentage of early reproductive losses in the form of spontaneous miscarriage in the history (18.3% in the SG versus 5% in the CG, p<0.001), which can be explained by a large number of surgical interventions on the pelvic organs and cervical surgical manipulations.

Table 12

Pregnancy outcome in women with secondary infertility

Pregnancy outcome	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
Artificial abortion	9	7.50	7	11.67*	2	3.33
Spontaneous abortion	14	11.67	11	18.33*	3	5.00
Missed abortion	17	14.17	8	13.33	9	15.00
Preterm delivery in the anamnesis	9	7.50	6	10.00	3	5.00
Term birth	7	5.83	5	8.33	2	3.33

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at $p<0.001$.

The share of artificially induced abortions (11.67% in the SG versus 3.33% in the CG, $p<0.001$) was larger in women with a poor reproductive history in the SG.

It is likely that the risk of early reproductive loss also depends to some extent on the method of ART (Table 13) that was chosen to treat infertility and the number of previous ineffective treatment cycles in the protocols.

Table 13

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the method of ART

ART method	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
IVF (in vitro fertilization)	47	39.12	16	26.67	31	51.67*
ICSI (intracytoplasmic sperm injection)	57	47.5	35	58.33*	22	36.67
IUI (intrauterine insemination)	11	9.17	7	11.67	4	6.67
Blastocyst vs. early cleavage stage (blastocyst transfer to the uterine cavity)	5	4.17	2	3.33	3	5.00

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at $p<0.001$.

The retrospective analysis of the therapeutic techniques to restore fertility in the women who were included in the study revealed a probable link between the risk of early reproductive losses and the ICSI technique. The data showed that 58.33% of SG women who had early reproductive losses became pregnant after the

therapeutic ART program in the form of the ICSI technique, whereas among the CG women, only 36.67% of women became pregnant after the ICSI technique (p<0.001). Pregnancy in 26.67% of SG women with early reproductive loss occurred after the IVF technique. Among CG women, pregnancy occurred after the IVF technique in 51.67% of women (p<0.001) .

In 11.67% of SG women with early reproductive loss, pregnancy was achieved by IVF; among CG women, pregnancy was achieved by IVF in 6.67% of women. The remaining 3.33% of SG women who had cases of early reproductive losses became pregnant after the technique of blastocyst transfer into the uterine cavity; among CG women, pregnancy occurred after this technique in 5% of women.

According to international publications, the effectiveness of infertility treatment ranges from 23% to 47% [138]. Therefore, patients with a history of infertility, especially when it lasts for over 5 years, are repeatedly forced to undergo repeated cycles of ART (Table 14).

Table 14

Distribution of women who were included in the retrospective clinical and statistical analysis by the number of ART cycles

ART cycle	Total (n=120)		Study group (n=60)		Control group (n=60)	
	N	%	N	%	N	%
1 cycle	32	26.67	8	13.33	24	40.00*
2 cycles	37	30.83	18	30.00	19	31.67
3 cycles	43	35.83	28	46.67*	15	25.00
4 and more cycles	8	6.67	6	10.00*	2	3.33

Note: * – significance of values in the study group in comparison with the control group at p<0.001.

Table 14 shows that 8 (13.3%) SG women had a history of one cycle of ART, while 18 (30%) patients had two previous unsuccessful cycles, 28 (46.67%) had three cycles, and 6 (10%) women had over four unsuccessful cycles. It is noteworthy that more than half of the women diagnosed with early reproductive losses had a history of three or more ART cycles. Among SG pregnant women, 24 (40%) women had one cycle of ART in medical history, while 19 (31.67%) patients had two previous unsuccessful cycles, 15 (25%) had three cycles, and 2 (3.3%) women had over four unsuccessful cycles. [230].

The obtained clinical and anamnestic data were used to assess the significance of the leading factors and predict the risk of early reproductive losses in women after ART (Table 15).

The clinical and anamnestic analysis in the group of women with early reproductive losses after ART revealed several medical factors that might have provoked pregnancy failure and allowed predicting the risk of a complicated course of the first trimester of gestation.

Table 15

Prognostic assessment of the history and course of induced pregnancy in women with early reproductive losses

Factors	r	P
Age older than 35 years old	0.264	$p<0.001$
Excessive body weight 30 kg/m^2 and more	0.213	$p<0.05$
Disorders of the ovarian-menstrual cycle as a duration of over 28 days	0.238	$p<0.05$
Uterine fibrosis	0.233	$p<0.05$

Factors	r	P
Vaginal inflammatory process	0.433	p<0.001
Cervical pathology	0.344	p<0.001
Surgical interventions on pelvic organs, including:	0.332	p<0.05
Separation of adhesions		p<0.001
Endometriosis		p<0.001
Urinary system diseases (chronic)	0.462	p<0.001
Metabolic syndrome	0.438	p<0.05
Duration of infertility > 10 years	0.247	p<0.001
Secondary infertility	0.366	p<0.001
History of artificial abortion	0.327	p<0.001
History of spontaneous abortion	0.217	p<0.001
ICSI (intracytoplasmic sperm injection)	0.222	p<0.001
3 and more unsuccessful ART cycles	0.357	p<0.001

The data from the retrospective analysis suggested that important factors in the development of early reproductive losses in women after ART might be: women's age (r=0.264, p<0.001), excessive body weight (r=0.213, p<0.05) and metabolic syndrome (r=0.438, p<0.001), ovariomenstrual cycle disorders (r=0.238, p<0.05), surgical interventions on pelvic organs (r=0.332, p<0.001), chronic diseases of the urinary system (r=0.462, p<0.001), long-term infertility (r=0.247, p<0.001), its

secondary development (r=0.366, p<0.001), artificial abortion (r=0.327, p<0.001) and a history of spontaneous abortion (r=0.217, p<0.001), and 3 or more unsuccessful ART cycles (r=0.357, p<0.001), most frequently performed with ICSI (r=0.222, p<0.001) .

The mentioned factors suggest that early reproductive losses after ART are a consequence of a large number of pathological causes with the realization of a variety of often crossing pathophysiological pathways, so it is not always possible to identify a dominant etiological factor by existing diagnostic methods. In most cases, it is a combination of several causes that may act simultaneously or sequentially.

The most significant combinations of the leading factors for the probable development of early reproductive losses after ART were established in this category of patients. They included the combination of infertility duration and infertility factor (r=0.459), as well as the number of ART cycles (r=0.297); the type of infertility and the outcome of previous pregnancies (r=0.873).

In addition, RRL, a large share of intrauterine interventions (hysteroscopy, medical and instrumental abortions), and internal endometriosis increased the risk of early reproductive losses. A high body mass index and a history of over three unsuccessful ART cycles increased the risk of early reproductive losses. A combination of late reproductive age with over 10 years of infertility, over three unsuccessful ART cycles, and pelvic surgeries increased the risk of early reproductive loss.

3.2. Immunohistochemical study of the decidual tissue of aborted material in early reproductive losses for the detection of ALK5 protein expression

We were the first to perform an immunohistochemical study of the decidual tissue of aborted material in early reproductive losses to detect ALK5 protein expression. Decidual tissue obtained after an induced abortion during a normal pregnancy was used as a control. Tissue samples were obtained from medication-

induced abortion in women with a physiological course of pregnancy (20 samples) and from spontaneous abortion after ART (20 samples) in the first trimester of pregnancy.

Figs. 1–3 show samples of TGFBR1 in the decidual tissue of the abortive material from women with early reproductive losses.

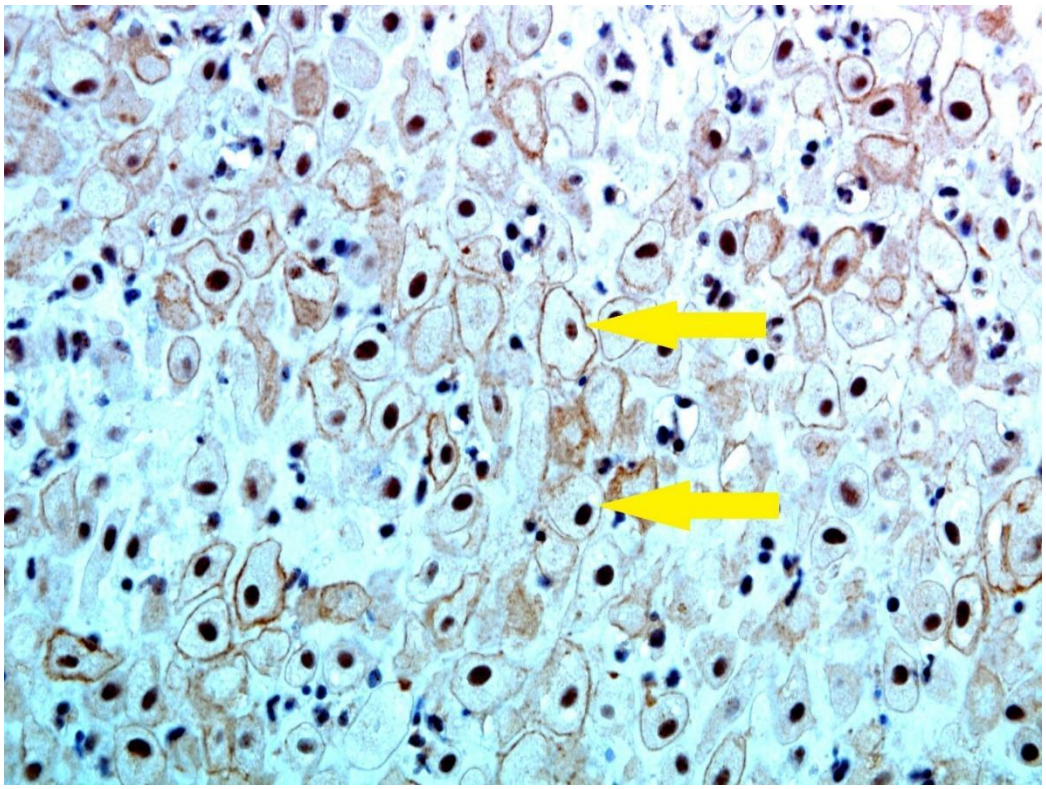


Fig. 1 TGFBR1 in decidual cells, x400

The results of the immunohistochemical study of the decidual tissue of the aborted material in the group of women with early spontaneous abortion after ART showed a statistically significant difference in the degree of positive expression of ALK5 protein in the decidual tissue of the two groups of patients compared to the decidual tissue of the aborted material in the group of women with normal pregnancies.

Small endometrial fragments with lymphoplasmacytic stromal infiltration with an admixture of neutrophilic leukocytes and a moderate number of glands with

an Arias-Stella reaction were observed in the uterine cavity scrapings. The Arias-Stella reaction is a hormone-related atypical endometrial change characterized by hypertrophy and vacuolization of glandular epithelial cells associated with expressed nuclear pleomorphism, enlargement, and hyperchromasia.

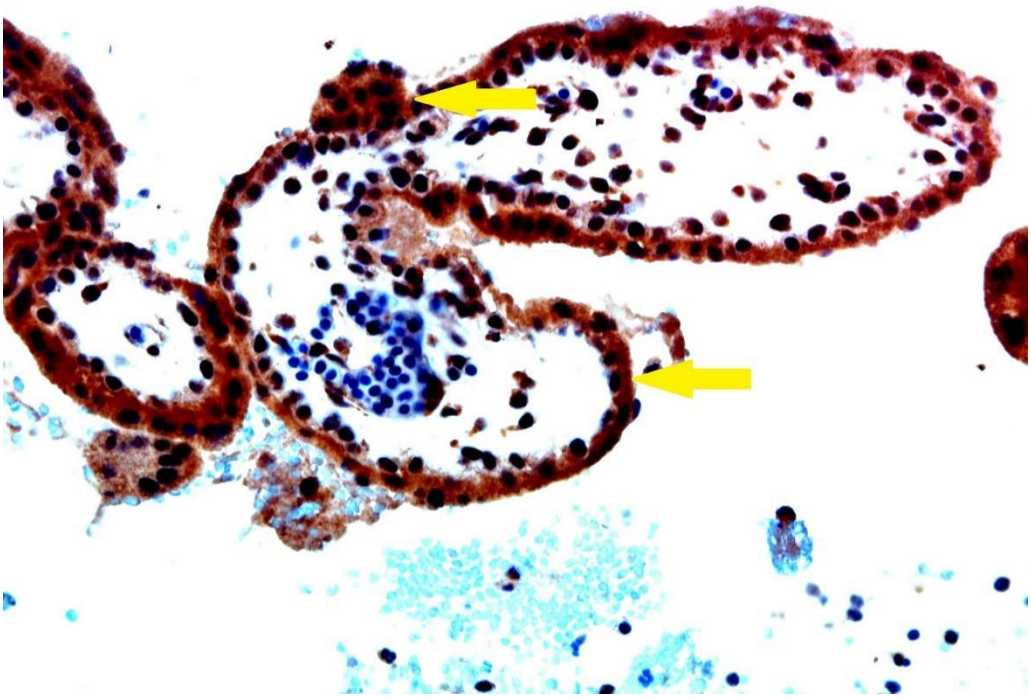


Fig. 2 Manifested expression of TGFBR1 in a trophoblast of chorionic villi, x400

Characteristic histological features of the Arias-Stella reaction include large cells with abundant eosinophilic or vacuolized cytoplasm, nuclear enlargement, and hyperchromasia. The appearance of hypertrophic nuclei can vary widely from round or ovoid nuclei with a vesicular chromatin pattern to irregular nuclei with a compact pycnotic pattern. Some variants show prominent intranuclear cytoplasmic invaginations or pseudoinclusions. The nuclei may protrude into the lumen of the gland, creating a “spike” appearance. Loss of cell polarity with the appearance of papillary protrusions and swellings of epithelium is possible. Mitotic activity is usually absent [50; 51].

At the same time, in the studied volume of material, there were multiple fragments of placental tissue represented by chorionic villi covered with trophoblast with division into syncytio- and cytotrophoblast.

In addition, numerous fragments of decidual tissue with pronounced dystrophic changes of decidual cells and focal infiltration by lymphocytes and macrophages with an admixture of neutrophilic leukocytes with foci of small-globular decay were determined.

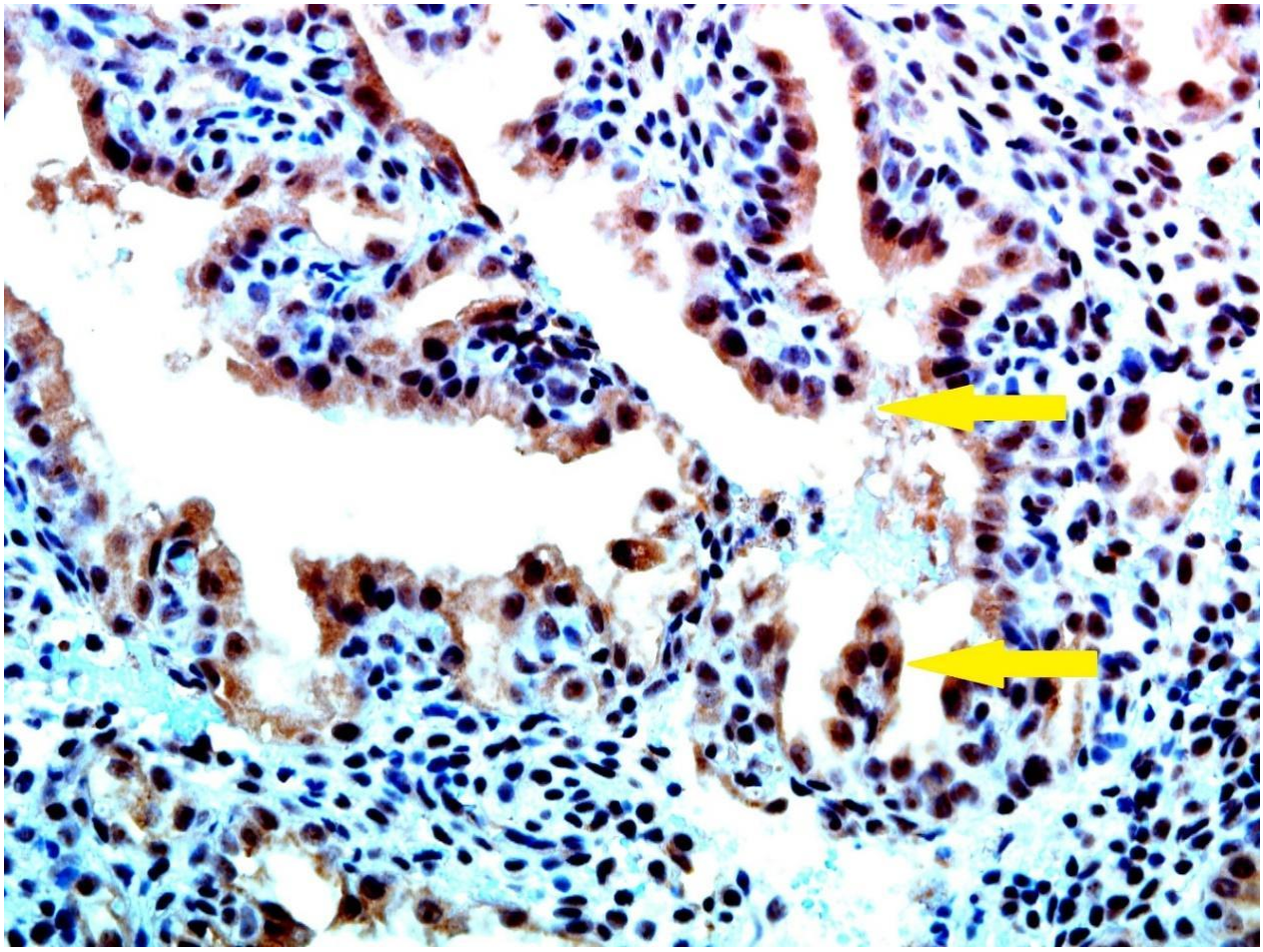


Fig. 3 TGFBR1 in the endometrial gland epithelium, x400

Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in early spontaneous abortion after ART was 31.38±11.65 to 39.88±13.8 per field of view (FOV) in decidual cells; in syncytiotrophoblast cells, from 35.25±8.55 to 43.69±9.34 per FOV;

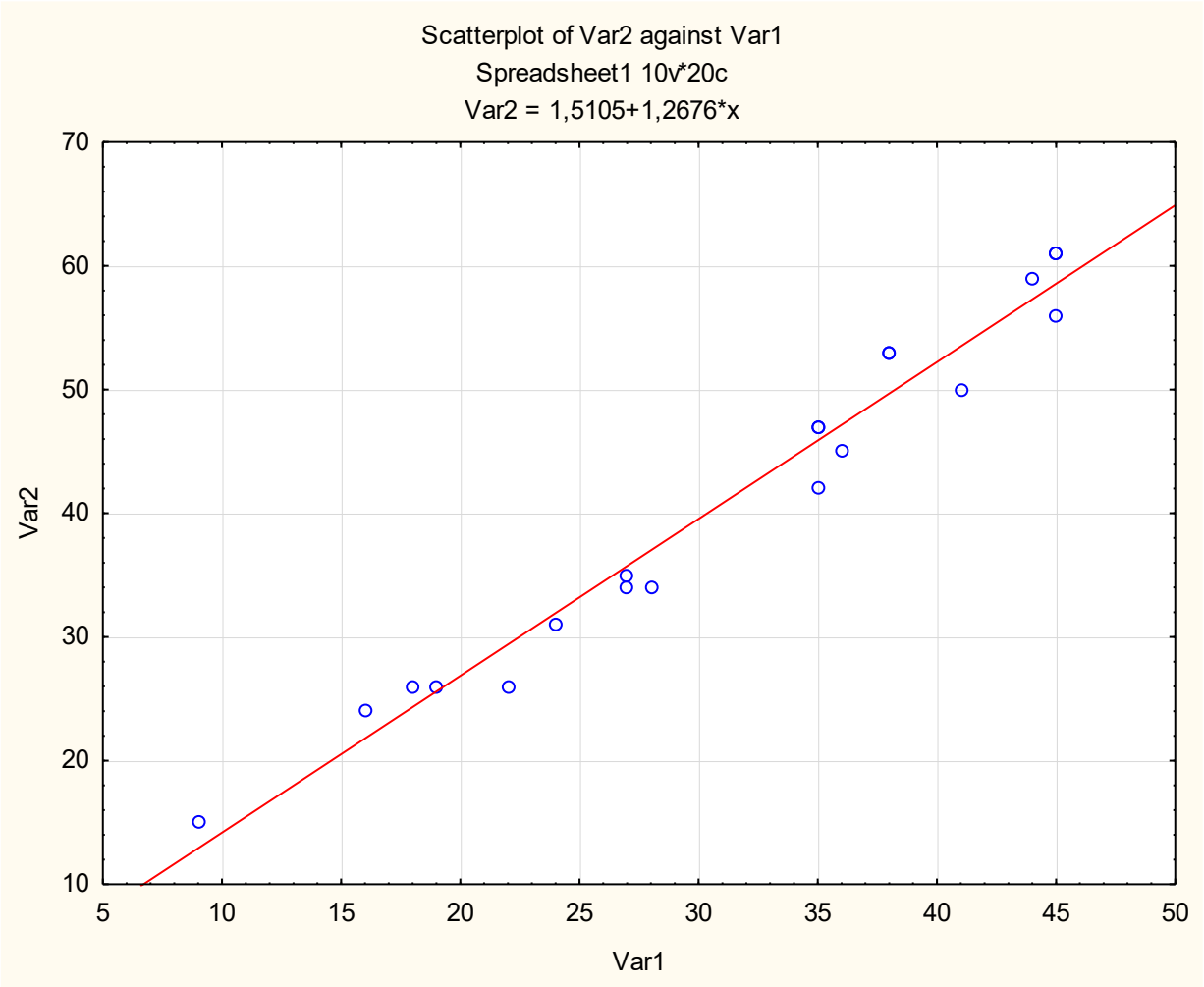
in the epithelium of endometrial glands, from 24.31±7.25 to 30.75±7.46 per FOV; and in endometrial stromal cells, from 3.63±2.73 to 6.06±3.19 per FOV (Table 16).

Table 16

Comparison of TGFBR1 positive expression levels in decidual tissue in normal pregnancy and early spontaneous abortion

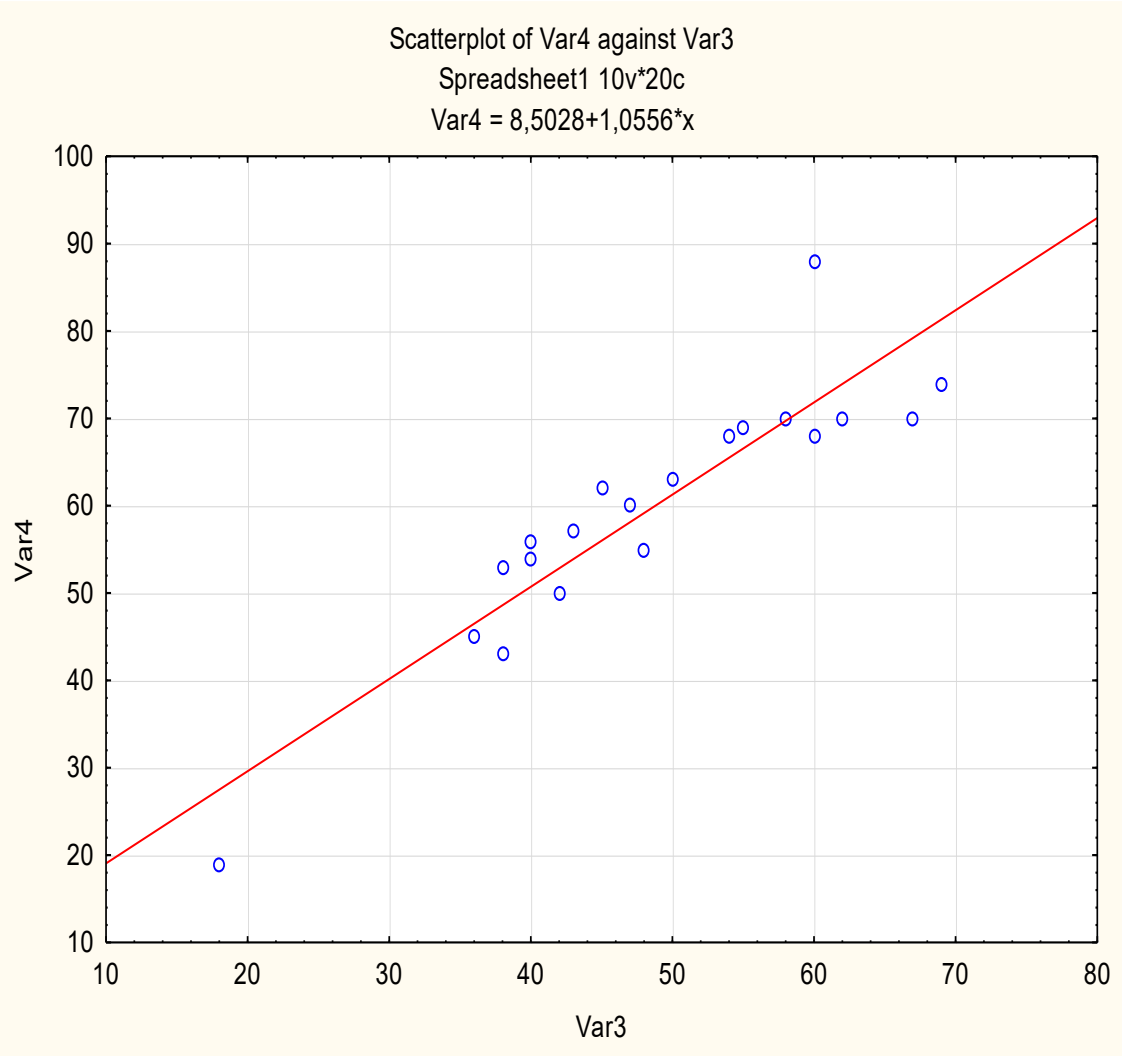
Tissue	Group				P
	SG (n=20)		CG (n=20)		
	min	Max	min	Max	
Decidual cells	31.38±11.65	39.88±13.8	48.5±12.4	59.77±14.3	<0.001
Syncytiotrophoblasts	35.25±8.55	43.69±9.34	52.13±7.9	63.52±10.14	<0.001
Endometrial gland epithelium	24.31±7.25	30.75±7.46	38.4±5.66	41.51±8.14	<0.001
Endometrial stromal fibroblasts	3.63±2.73	6.06±3.19	34.31±8.5	40.52±10.7	<0.001

Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in normal pregnancy was 48.5±12.4 to 59.77±14.3 per FOV in decidual cells; 52±12.4 to 59.77±14.3 in syncytiotrophoblast cells; 13±7.9 to 63.52±10.14 per FOV; in endometrial gland epithelium from 38.4±5.66 to 41.51±8.14 per FOV; and in endometrial stromal cells from 34.31±8.5 to 40.52±10.7 per FOV (Figs. 4–7).



Study group

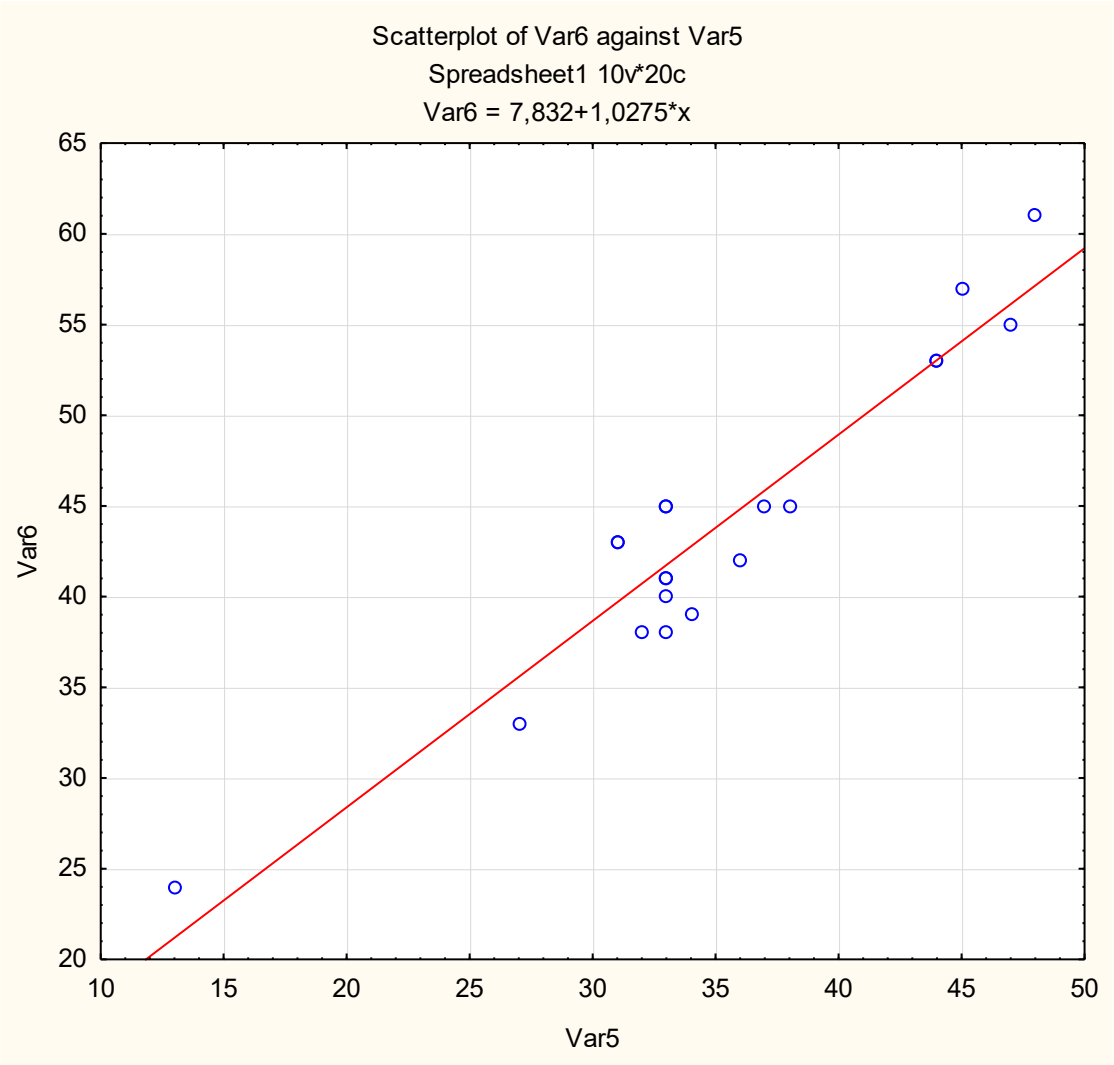
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in decidual cells of women with early spontaneous abortion after ART was 31.38 to 39.88 per FOV.



Control group

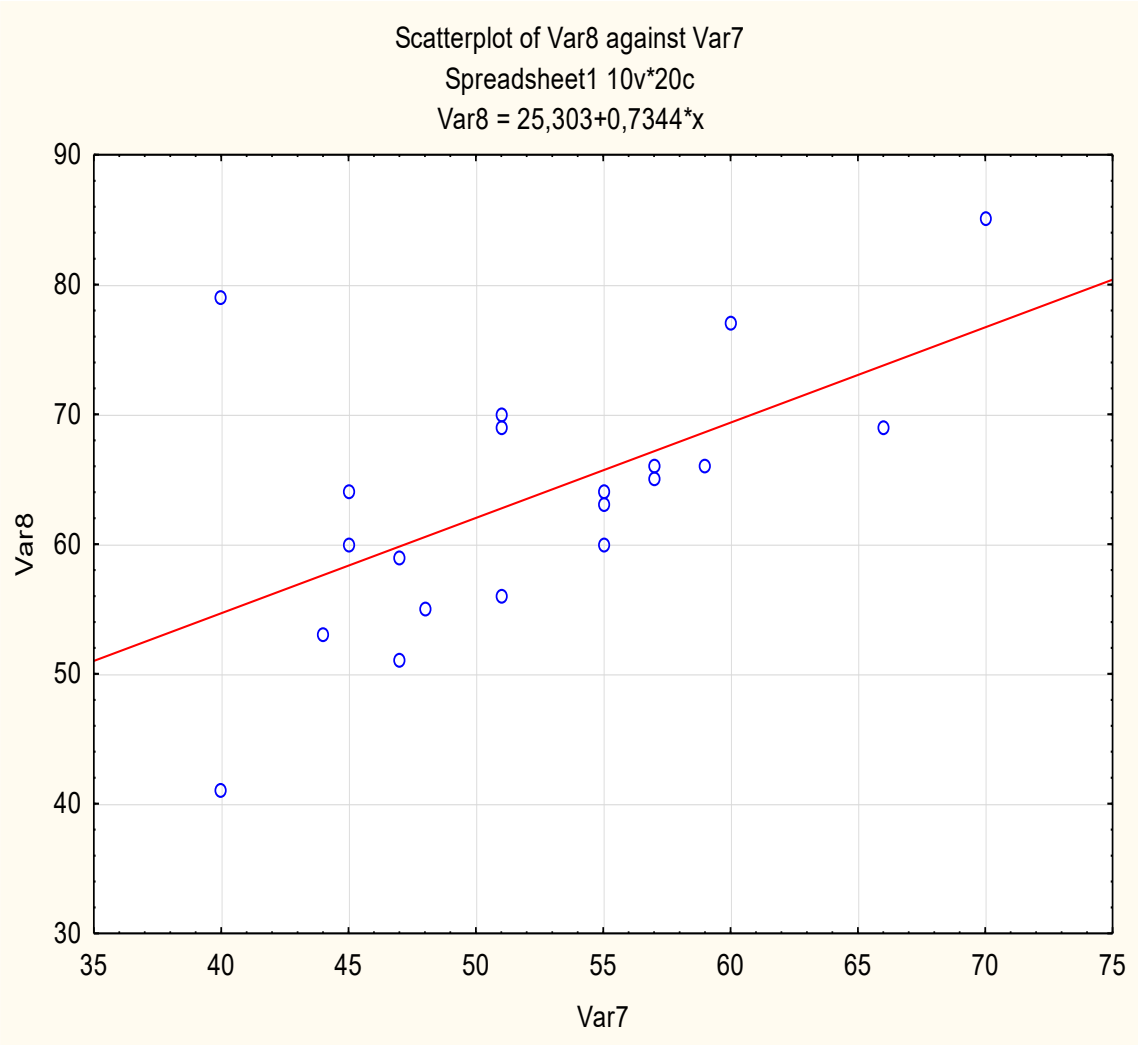
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in decidual cells of women with normal pregnancy was 48.5 to 59.77 per FOV.

Fig. 4. Comparison of TGFBR1 positive expression levels in decidual tissue of women with normal pregnancy and early spontaneous abortion (decidual cells)



Study group

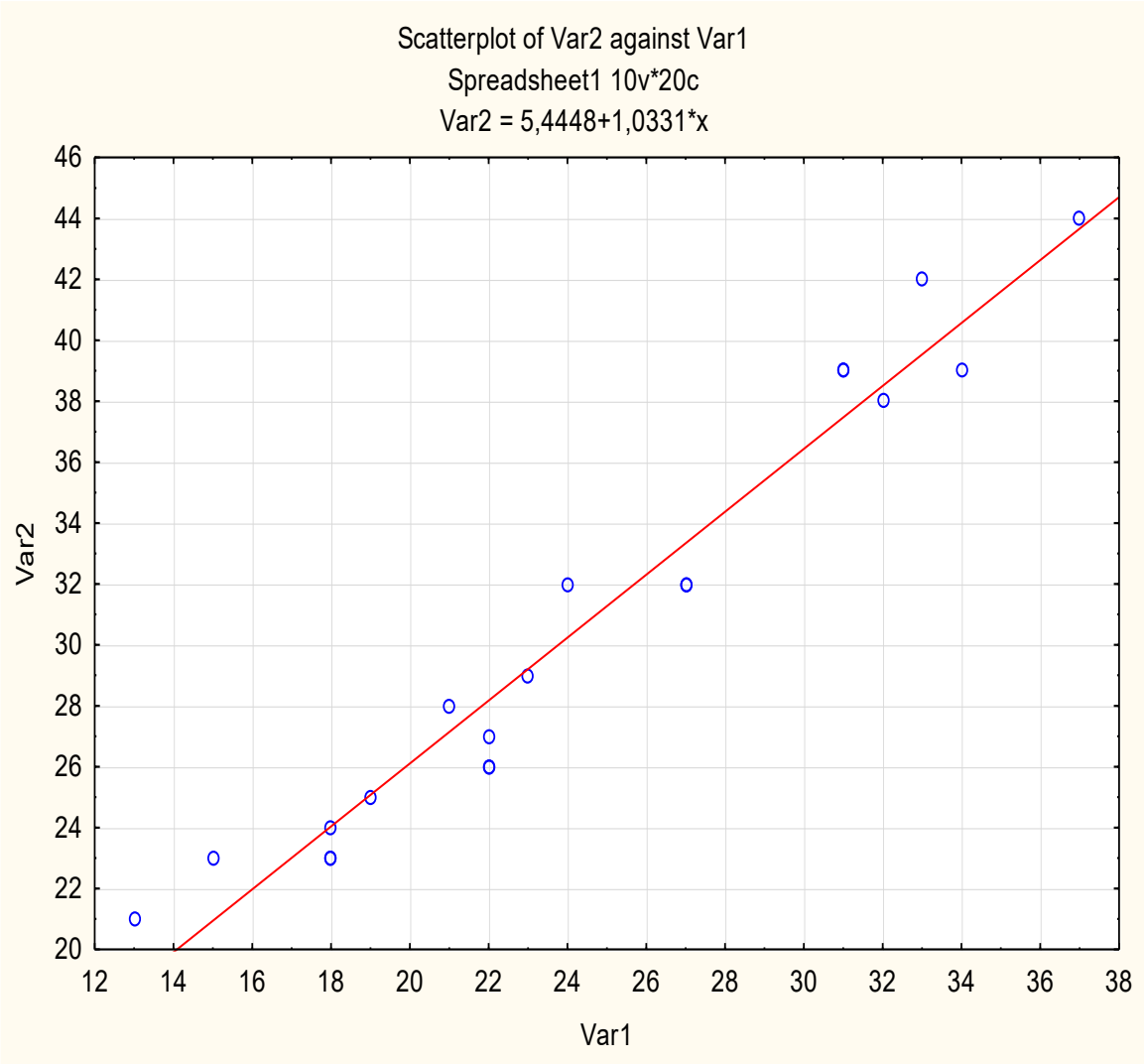
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in syncytiotrophoblast cells of women with early spontaneous abortion after ART was 35.25 to 43.69 per FOV



Control group

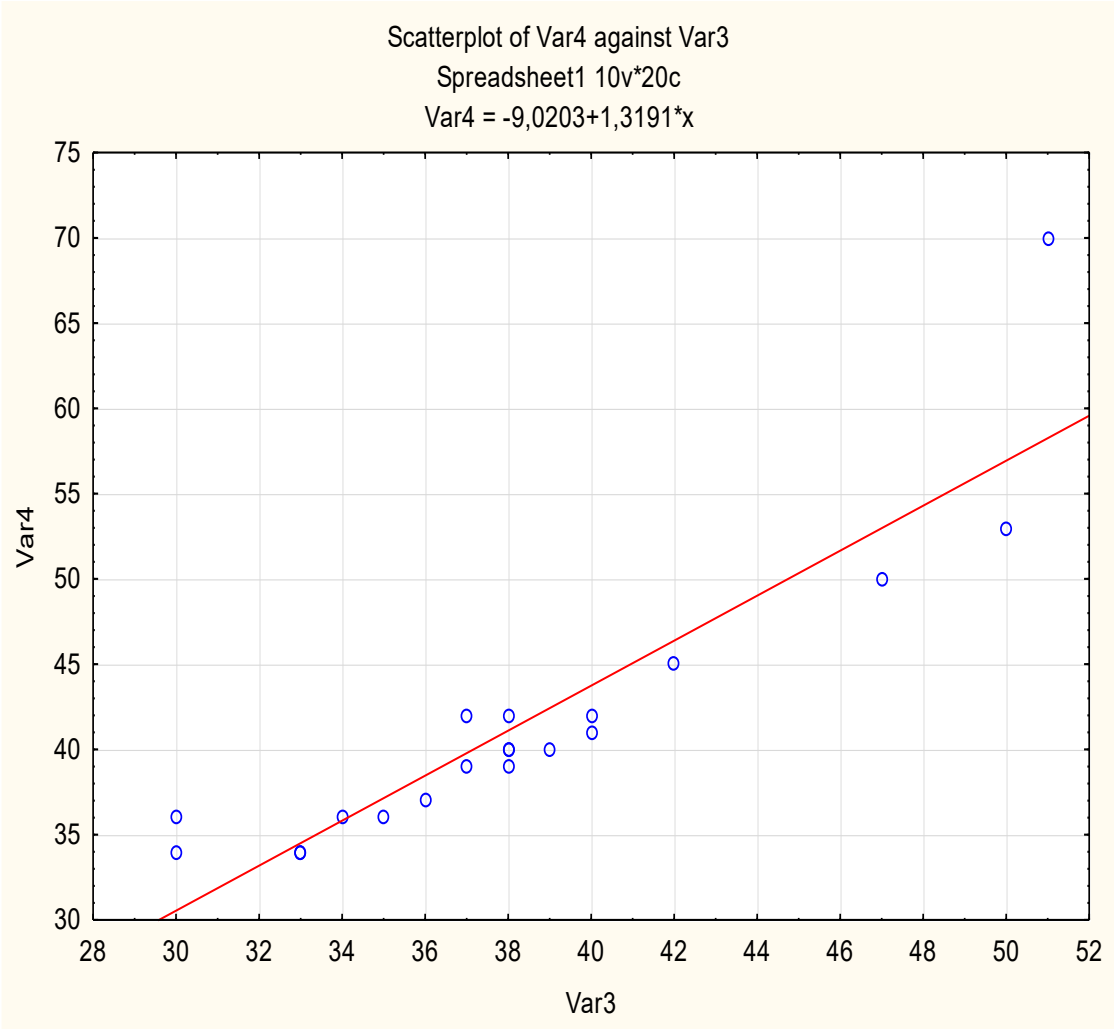
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in syncytiotrophoblast cells of women with normal pregnancy was 52.13 to 63.52 per FOV

Fig. 5. Comparison of TGFBR1-positive expression levels in decidual tissue of women with normal pregnancy and early spontaneous abortion (syncytiotrophoblast cells)



Study group

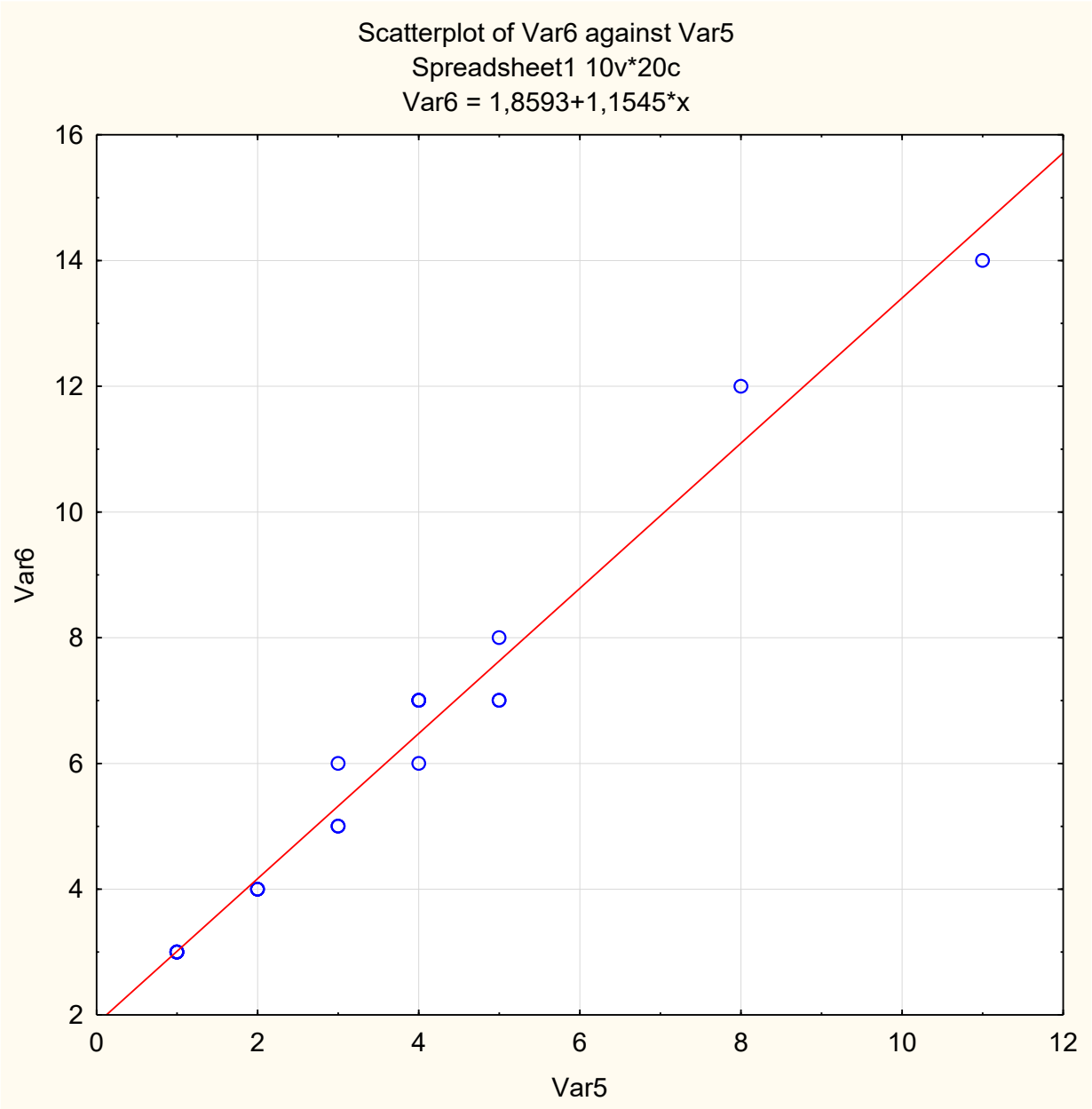
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in the epithelium of endometrial glands of women with early spontaneous abortion after ART was 24.31 to 30.75 per FOV



Control group

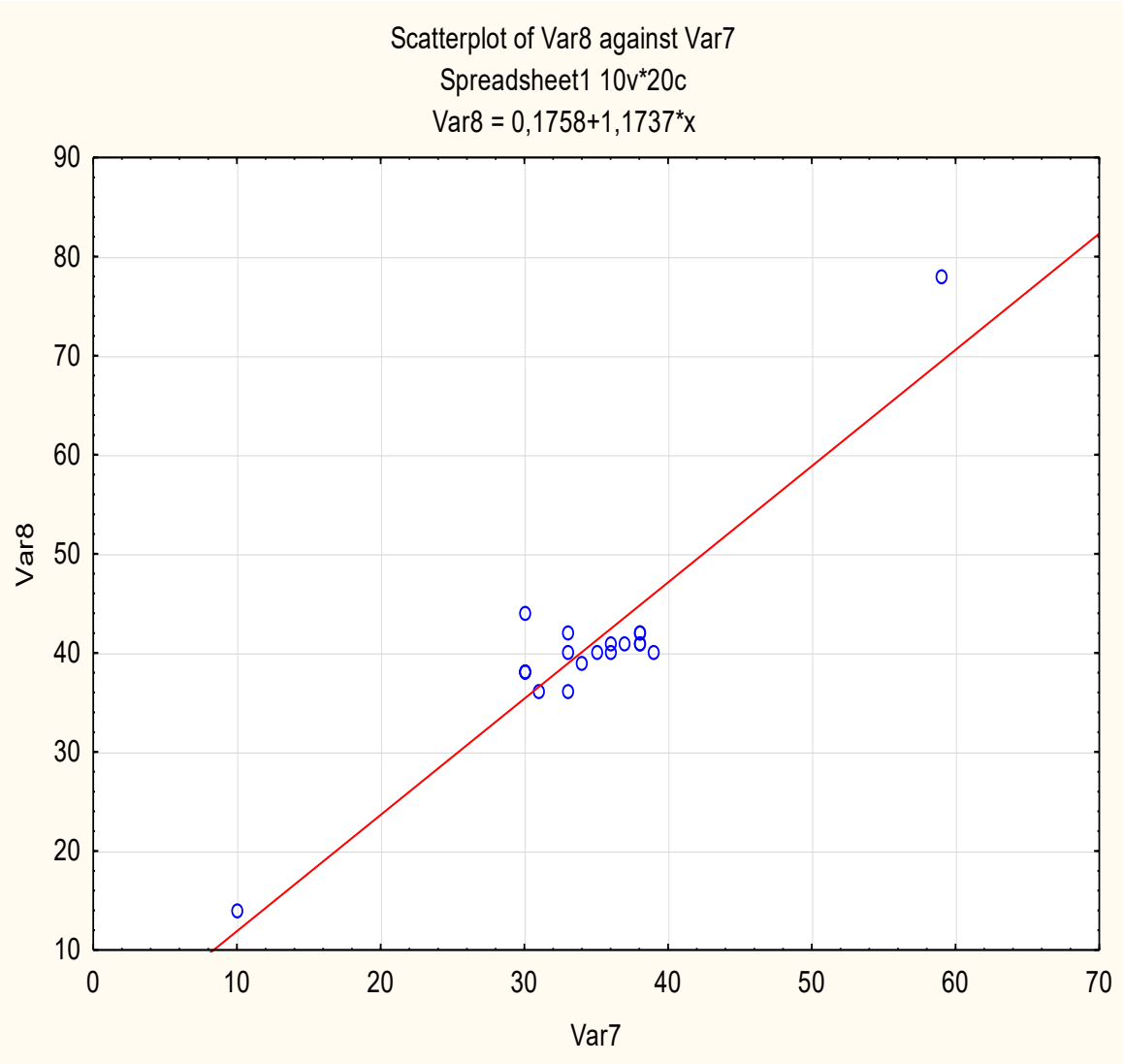
Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in endometrial gland epithelium of women with normal pregnancy was 38.4 to 41.51 per FOV

Fig. 6. Comparison of TGFBR1-positive expression levels in decidual tissue in normal pregnancy and early spontaneous abortion (endometrial gland epithelium)



Study group

Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in endometrial stromal cells of women with early spontaneous abortion after ART was 3.63 to 6.06 per FOV.



Control group

Immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in endometrial stromal cells of women with normal pregnancy was 34.31 to 40.52 per FOV.

Fig. 7. Comparison of TGFBR1-positive expression levels in decidual tissue during normal pregnancy and early spontaneous abortion (endometrial stromal fibroblasts)

In all parameters, immunohistochemical positive expression of TGFBR1 was several times higher in normal pregnancy than in early spontaneous abortion after ART (<0.001).

The obtained results were used to compare the expression level of TGFBR1 in the study group and the control group (Fig. 8).

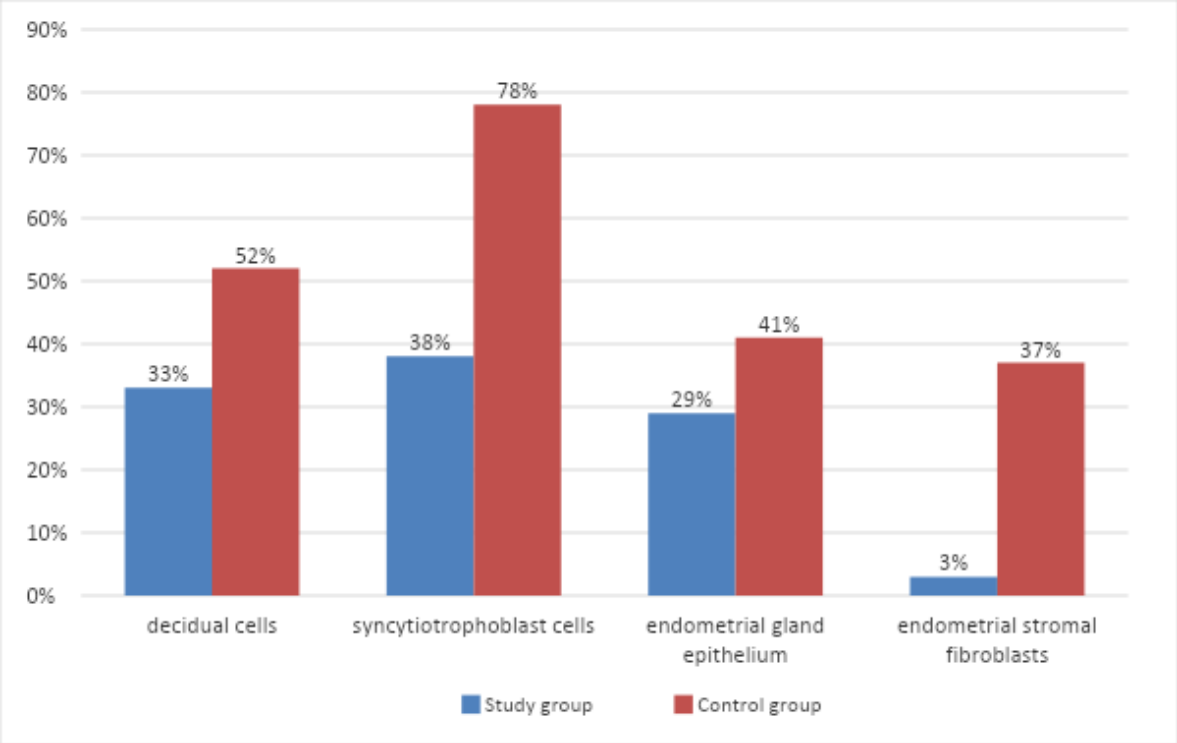


Fig. 8. Estimation of TGFBR1 positive expression area in the cells of the studied abortive tissue

The analysis of the study data showed that TGFBR1 expression in SG women with early spontaneous abortion after ART was significantly lower compared to CG patients with normal pregnancy (p<0.001).

The minimal TGFBR1 expression area was observed in endometrial stromal cells in the SG women (3%), whereas in the CG, this parameter was 37% (p<0.001). Somewhat higher rates were obtained in endometrial gland epithelium (29%); in the CG, the rate was 41% (p<0.001). The average rates of TGFBR1 positive expression were found in decidual cells (33%); in the CG, this parameter was 52% (p<0.001).

The maximum ability to express TGFBR1 was noted among the SG women in syncytiotrophoblast cells (38%); in the CG, this parameter was 78% ($p<0.001$).

Analysis of the obtained data of the immunohistochemical study of abortive material provided reliable evidence that the decreased TGFBR1 expression area in the SG women compared with CG women indicated a skew of Th1/Th2, which affected the content of natural killer cells, leading to early fetal lethality because of severe vascular defects. Endothelial chemical compounds ensure the interaction of endotheliocytes with blood-forming elements and plasma components [52].

Chronic hypoxia significantly affects endotheliocyte metabolism causing ischemia. At the first signs of hypoxia, the synthesis of active oxygen-containing metabolites, which inhibit vasodilatory mechanisms, begins to increase. In conditions of permanent ischemia, there is a decrease in the synthesis of vasodilatory factors, which leads to vasoconstriction. This makes successful implantation in women with induced pregnancy impossible.

3.3. Prognostic and clinical significance of ALK5 protein expression in the profile of early reproductive losses after assisted reproductive technologies

For a long time, it was believed that the endometrium played a passive role during implantation, allowing it to “attack” the invading embryo. In fact, recent studies have shown that the endometrium and its decidual cells play a much more active role, encapsulating the early embryo to determine its potential for development and a healthy pregnancy. In turn, the decidual cells can adapt and support a slightly “weaker” embryo, allowing implantation .

Although many studies provided terrific insight into the role of TGF-β superfamily signaling pathways in physiological and pathophysiological processes, the role of TGF-β signaling pathways in many aspects of reproduction remains largely unknown. To address these functions in women, the author of this study compared aborted tissue from women with spontaneous abortion after ART with

aborted tissue from normal pregnancies to assess the effect of TGF-β receptor type 1 (TGFBR1) positive expression on the probability of early reproductive loss. It was demonstrated that the lack of TGF-β signaling through TGFBR1 in decidual tissues (low percentage of positive expression) led to abnormal pregnancies. TGFBR1 null tissues are embryonically lethal because of severe vascular defects [220].

A study on the detection of TGFBR1 localization and expression in the decidual tissue of normal pregnancy and early spontaneous abortion by immunohistochemistry showed that TGFBR1 had different degrees of positive expression in the decidual tissue of two groups of patients, stained brown-yellow or brown, mainly localized in the cytoplasm of decidual cells. It was found that the level of positive TGFBR1 expression was lower in the decidual tissue from women with early spontaneous abortion, whereas in normal pregnancy, the level of positive TGFBR1 expression in the decidual tissue was significantly higher ($p<0.001$).

A strong correlation was revealed between the development of early spontaneous abortion and TGFBR1 expression levels in decidual tissue ($r=0.622$), syncytiotrophoblast cells ($r=0.778$), endometrial gland epithelium ($r=0.774$), and endometrial stromal fibroblasts ($r=0.867$) .

Thus, the obtained data suggest that TGFBR1 (ALK5) is probably important for the activation of NK cell progenitors and differentiation of uNK cells at implantation sites. TGFBR1 is important for TGF β/ALK1 signaling. Endothelial cells devoid of ALK5 are deficient in TGF β/TGFBR1-induced responses.

ALK5 mediates TGF-β-dependent recruitment of ALK1 to the TGFbeta receptor complex; and ALK5 kinase activity is required for optimal ALK1 activation. The TGFbeta type II receptor is also required for TGF-β-mediated activation of ALK1. Reduced levels of ALK5 protein expression in the decidual tissue are associated with an imbalance of Th1/Th2 and affect natural killer cells, resulting in early embryonic lethality due to severe vascular development defects.

Increased TGFBR1 in the basal decidua may play an important role in the induction of immune tolerance; and pregnancy loss may be caused by decreased TGFBR1 at the implantation site. This makes successful implantation impossible.

Chapter III summary

The study results showed that there was a direct correlation between early reproductive losses and the age of over 35 years in pregnant women in the main group, which is explained by the high rate of extragenital pathology and a significant percentage of intrauterine manipulations of diagnostic and therapeutic nature before planning an ART program, which result in endometrial receptor dysfunction.

The leading cause of infertility among the examined women was the combined factor of infertility (44.2%), the second place among the causes of fertility loss was taken by the tubal-peritoneal factor (30.8%), and endocrine infertility accounted for 25%. The parameter with the most specific weight was 3–5 years of infertility (45%), in the SG – 46.7%; in the CG – 43.3%. The SG women were diagnosed with secondary infertility in 61.67% of cases; the CG women – primary infertility (68.3%) ($p<0.001$).

The retrospective analysis of the therapeutic techniques to restore fertility indicated a probable association of the risk of early reproductive losses with the ICSI technique.

Analysis of the nature and pattern of extragenital pathology in women after ART revealed a group of inflammatory diseases of the urinary system with a subclinical course, which were most frequently found in patients with early reproductive losses after ART (33.3%).

The statistically significant factors of early reproductive losses in women after ART were uterine fibroids, vaginal inflammatory processes and cervical pathology, surgical interventions on the pelvic organs, abdominal cavity, and endometriosis. The presence of chronic infections foci, which have a latent course and are associated with inflammatory processes of the female genitalia (36.7%) and untreated cervix pathology (30%), significantly affects the risk of early reproductive losses in women after ART.

Histologically verified placental dysfunction is probably associated with the increased proliferative activity of Th1-lymphocytes due to the critically low positive

expression of TGFBR1, which disrupt vascular bed formation, damage placental tissue, and redirect the immune response from Th2-type to Th1 cytotoxic activation, which is manifested as immunological aggression of the maternal body toward the fetus.

CHAPTER IV. ANALYSIS AND SUMMARY OF THE RESULTS

In recent years, a significant number of publications on the association between spontaneous abortions in early pregnancy and endotheliopathy, immunological, immunogenetic, hemostasiological, and hormonal disorders have appeared [29]. The experience of numerous studies conducted on this subject in recent decades allowed for a significant increase in the understanding of the etiology of this condition.

It is believed that the following factors play a significant role in the development of early reproductive losses: immunological causes (predominance of T1 response), maternal clotting system disorders, persistence of bacterial and viral infection, chronic endometritis, and others [38; 25]. Despite a wide discussion of clinical significance, the features of etiopathogenesis of early reproductive losses in women with induced pregnancy are described in sporadic papers, and there is no common opinion on this issue among researchers. Numerous aspects of pregnancy failure and early reproductive losses after ART are controversial and require further study.

Therefore, given the above, the author believes that a detailed study of this condition will make it possible to provide a more rational approach to the diagnosis, prevention, and pharmacotherapy of conditions that contribute to early reproductive losses, which will prevent reproductive losses and increase the effectiveness of the ART program.

According to the current publications [19], pregnancies after ART are classified as high obstetric risk, which has several characteristic features of the gestational process. The phenomenon of the “coexistence of genetically non-identical” maternal and fetal organisms is realized through the mechanism of immunological tolerance, which is maintained by a constant cytokine balance [35].

When the balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with restored fertility is disturbed, the mechanism of pregnancy failure with the induction of early reproductive losses is realized. The studies' results

demonstrate a direct correlation between early reproductive losses and the age of over 35 years in the main group of pregnant women ($p<0.05$), which is explained by the high rate of extragenital pathology and a significant rate of diagnostic-therapeutic intrauterine manipulations before planning an ART program, which result in endometrial receptor dysfunction. The vast majority of patients in the present study were 30–40 years old (47–78.3%), whose pregnancies occurred after the therapeutic ART programs. The average age difference was about 3 years, the SG patients were on average 5 years older than the CG women.

The analysis of the primary documents showed that the leading cause of the use of ART among the examined women was the combined factor of infertility (44.2%), the second place among the causes of fertility loss was taken by the tubal-peritoneal factor (30.8%), and endocrine infertility was registered in 25%. The most significant factor was 3–5 years of infertility (45%), in SG – 46.7%; in CG – 43.3%. The SG women were diagnosed with secondary infertility in 61.67% of cases, while in the CG, primary infertility was observed in 68.3% ($p<0.001$).

A retrospective analysis of the therapeutic techniques to restore fertility revealed a probable association of the risk of early reproductive losses with the ICSI technique. The number of patients who had ICSI was 47.5% (58.3% in the SG and 36.7% in the CG), IVF – 39.12% (26.7% in the SG and 51.67% in the CG), IUI – 9.17% (11.7% in the SG and 6.7% in the CG), blastocyst transfer into the uterine cavity – 4.17% (3.3% in the SG and 5% in the CG). A retrospective analysis of the therapeutic techniques to restore fertility in the women who were included in the study revealed a probable association of the risk of early reproductive losses with the ICSI technique.

According to international publications, the effectiveness of infertility treatment ranges from 23% to 47% [138], so women with a history of infertility, especially when it lasts over 5 years, have to undergo repeated cycles of ART. In the main group, the total number of ineffective ART cycles was 16.9%, while in the control group, it was 2.4%. Most authors who deal with this topic are convinced that

each subsequent unsuccessful attempt to use ART reduces the chance of achieving the desired pregnancy in the next cycle by 16.3% [66].

Analysis of the professional affiliation and occupation of pregnant women did not reveal statistically significant differences between the groups, but the larger share of patients who were engaged in intellectual work draws attention. There is also a tendency for a higher percentage of women who were engaged in physical labor among SG patients, but no statistically significant level between the main and control groups was achieved.

It was impossible to analyze the presence of bad habits, because this information was not available in the medical records of the studied women.

The evaluation of the weight of pregnant women according to the BMI revealed no significant differences between the main group and the control group ($p>0.05$) among women with different BMI values.

Analysis of the nature of the menstrual cycle revealed that the mean age of menarche in women in the SG was 12.7±1.1 years old compared to 11.8±1.3 years in the CG ($p>0.05$). The menstrual cycle was established immediately in the vast majority of women ($p>0.05$).

The study of the functional features of the menstrual cycle did not reveal a direct correlation between the character of its disorders and the occurrence of early reproductive losses after the therapeutic programs of ART. Painful menstruation was observed in 35 (58.33%) SG patients and 28 (46.67%) CG patients ($p>0.05$). The average duration of the menstrual cycle before infertility treatment with the ART methods was 28±2.5 days in SG patients, 27.6±2.5 days in CG patients ($p>0.05$).

The presence of gynecological pathology in the vast majority of women with early reproductive losses revealed no direct correlation with such conditions as congenital malformations of the female genitalia. Statistically significant factors of early reproductive losses in women after ART were uterine fibroids, vaginal inflammatory processes and cervical uterine pathology, surgical interventions on the pelvic organs, abdominal cavity, and endometriosis. The presence of foci of chronic

infections that are latent and associated with inflammatory processes in the female genitalia (36.7%) and untreated cervix pathology (30%) considerably influenced the risk of early reproductive losses in women after ART.

Analysis of the nature and pattern of extragenital pathology in women after ART allowed identifying a group of inflammatory diseases of the urinary system with a subclinical course, which were most frequently found in patients with early reproductive losses after ART (33.3%): asymptomatic bacteriuria, chronic pyelonephritis, and recurrent cystitis in the anamnesis.

The consequences of previous pregnancies in women with secondary infertility indicate the presence of significant risks of obstetric and perinatal complications in SG patients compared to the CG. The statistics of the rates of pregnancy loss (SG – 13.3%, CG – 15%) speak in favor of a burdened reproductive history in the women of the study groups. It should be mentioned that there was a high rate of spontaneous abortions in the SG (18.3%) ($p<0.01$).

The obtained clinical and anamnestic data allowed evaluating the significance of the leading factors and predicting the risk of early reproductive losses in women after ART:

1. Age over 35 years old.
2. An excessive body weight of 30 kg/m^2 or more.
3. Disorders of the ovario-menstrual cycle in the form of a duration of over 28 days.
4. Uterine fibroids.
5. Inflammatory processes of the vagina.
6. Pathology of the cervix.
7. Separations of adhesions.
8. Endometriosis.
9. Diseases of the urinary system (chronic).
10. Metabolic syndrome.
11. Period of infertility over 10 years.

12. Secondary infertility.
13. Artificial abortion in the anamnesis.
14. Spontaneous abortion in the anamnesis.
15. ICSI (intracytoplasmic sperm injection) method of ART.
16. Three or more unsuccessful ART cycles.

All of the above suggests that early reproductive losses after ART are a consequence of a large number of pathological causes, often involving a variety of pathophysiological pathways, so it is not always possible to identify a dominant etiological factor using existing diagnostic methods.

The next stage of this study was to determine the significance of ALK5 protein expression in the decidual tissue of abortive material in early reproductive losses after ART. For this purpose, the author compared the abortive material of SG women (20 patients) who had early reproductive loss after ART and CG women (20 patients) after an artificial abortion performed during a normal pregnancy.

Progress in immunology over the last decade has formed the basis for a new branch of medicine, reproductive immunology, which studies the role of immunological factors and mechanisms during pregnancy, as well as immune-mediated complications of the gestational process.

The use of the latest diagnostic tools and techniques in routine medical practice may be the key to addressing the issue of priority gynecological tactics for early reproductive losses in women with the “immunological paradox” (induced pregnancy). Besides, it provides an opportunity to obtain an answer regarding the features of the immunological status of patients with early reproductive losses after ART.

There is no systematized information on the pathogenetic relationship between immunological balance and cytokine profile disorders and early reproductive losses after ART, and there is no possibility of their prognosis based on monitoring serum immunological homeostasis indices.

Pregnancy failure is a polyetiological complication of the gestational process, the important factors in the emergence of which are immune regulation disorders implemented in the imbalance of biologically active mediators of immune and intercellular cytokine interactions [1; 3; 8; 10; 15; 18; 20; 34; 42; 54; 79].

The immunological relationship between the maternal body and the fetus is characterized by a dynamic equilibrium, with the fetus receiving its own immune competence and passive immunity from the mother. The intensity of immune reactions during pregnancy has a wide range and depends on the individual, genetically determined, and immunological resistance of the woman [73].

The studies of the pathogenetic relationship between cytokine profile disorders and cellular-humoral immunoreactivity in the mechanism of early reproductive losses in induced pregnancy are of particular interest to researchers. Undoubtedly, the modified immunoreactivity of the maternal body is reflected in the impaired cytokine balance.

The endometrium is a complex multicellular tissue that undergoes dynamic remodeling to create a microenvironment suitable for maintaining pregnancy. Pregnancy is a complex process that involves separate events, including decidualization, implantation, and placentation. The endometrium/decidua is rich in immune cells, particularly uNK (natural killer) cells and macrophages, which originate in the bone marrow and selectively pass through the bloodstream to the uterine mucosa.

During the first 20 weeks of pregnancy, uNK cells and macrophages play a crucial role in mediating the transformation of the spiral artery, causing initial structural changes and secreting a number of cytokines and chemokines. Another distinct and functionally important group of cells includes decidual stromal fibroblasts (DSCs), which represent 10–30% of the decidual cells in the first trimester and up to 60–70% of the decidual sheath cells.

Decidualization refers to the functional and morphological changes that occur in the endometrium, with the formation of a decidual layer, which the blastocyst is

implanted into. These changes include the involvement of leukocytes and, importantly, the differentiation of endometrial stromal cells into decidual stromal cells.

It is the ability of endometrial stromal cells to differentiate into this alternative state that seems to be the key element of the decidual transformation. Decidual stromal cells are a distinct cell type resulting from terminal differentiation and genetic reprogramming of endometrial stromal cells. This reprogramming involves the suppression of genes involved in the proinflammatory response and resistance to tissue invasion, along with increased expression of genes that promote cell proliferation, tolerance, and tissue invasion [59; 210].

Proper decidualization controls conception and the course of pregnancy and is crucial to a successful pregnancy. There is increasing evidence that biochemical/metabolic factors are important for decidualization. For example, several autocrine/paracrine factors, including interleukins such as IL-1β, IL-11, and leukemia inhibitory factor (LIF), and transforming growth factor-β (members of the TGF-β superfamily, such as activin, TGF-β1, morphogenesis protein (BMP2), and determination factor 2 (LEFTY2) appear to be important for maintaining the decidualization process, stimulating the transmission of cAMP and ECM signals, regulating angiogenesis, and supporting embryo implantation [71].

Recent studies proved the activation of the female immune system for the physiological course of pregnancy with the realization of an immunomodulatory effect. The presentation and identification of induced pregnancy by the immune system occur through the activation of a group of genes that are responsible for the production of progesterone receptors on NK cells and lymphocytes [61; 86; 109; 122; 137; 149].

In the normal course of the gestational process, lymphocytes and CD56+-producing progesterone-inducing blocking factor (PIBF) are activated, which prevents excessive natural killer activity by the formation of granular CD16+CD56+ subpopulation lymphocytes that have little cytotoxic potential. Maternal immune

response regulation in this variant is mediated by cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and is directed by the Th2 pathway.

When progesterone is insufficient or its receptor expression is partially blocked, PIBF synthesis gets impaired. In such a case, the maternal immune response to the fetus is characterized by the formation of lymphokine-activated killer cells, which carry CD16+CD56+ markers on their surface, while the production of proinflammatory cytokines IFN-γ, IL-2, IL-12, and IL-18 with a Th1 pathway immune response increases. Proinflammatory cytokines take part in cell-mediated cytotoxicity reactions. In the Th1 mechanism of the immune response, proinflammatory cytokines have a direct cytotoxic effect on the fetus [79].

A latent and prolonged course of the immune response during Th1 pregnancy progression gradually changes the effector potential of the immune system cells toward impaired sensitivity of lymphocytes to secondary stimuli. This phenomenon is called the Prime effect on immunocompetent cytokine cells in increased concentration. The Prime effect creates conditions for decreasing the threshold sensitivity of immunocompetent cells to endogenous stimuli. Most often, such proinflammatory mediators as cytokines, acute phase proteins, and growth factors act as priming agents [93; 126; 132; 203; 213].

Pregnancy after ART in women with hypersensitivity of the immune system cells to endogenous stimuli has a Prime effect with the proinflammatory direction of immune reactions and hyperactivation of lymphocytes. The damaging effect of the protective mechanisms of immune response affects not only the pathogenic factor but also the cells of the own immune system. So, in this case, the immune defense mechanism loses its protective effect and becomes the leading link in the pathological process. The immune system, which is essentially a system of integrative regulation and protection, turns into a performer and a target simultaneously for the aggressive substances produced by the system itself. The synthesis of these substances goes out of control and becomes a predictor of pregnancy loss.

Many authors believe that [112] the immunological shift in women with restored fertility after ART comprises the formation of an insufficient Th2-response and hyperactivation of Th1-lymphocytes with a population of natural killers. Distortion of immunological tolerance leads to a fetotoxic effect through the system of mediators of activated NK cells and Th1-lymphocytes (IL-2, TNF-α, IFN-γ) [96]. At the same time, the content of IL-1α, IL-8, and IL-6 increases and the level of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 decreases [88; 177; 188].

The immunomodulatory effect results from the direct action of progesterone-induced blocking factor, which suppresses the Th1-type hyperreactive immune response and changes the cytokine profile of activated lymphocytes. The success of pregnancy prolongation depends on the balance of the major mediators of maternal-fetal immune system cell interactions, proinflammatory cytokines (Th1-type), and anti-inflammatory cytokines (Th2-type). The cytokine system is a “network” in which cells are constantly cooperating. Both the type of immune response and the processes of differentiation of immunocompetent units depend on the balance of cell mediators [82; 124; 154; 162; 187; 194].

The regulation of anti-inflammatory cytokine synthesis during physiological pregnancy is aimed at restructuring intercellular interactions to create optimal conditions for the functioning of maternal organs and systems to carry a genetically alien fetus. During physiological pregnancy, decidua secretes anti-inflammatory cytokines of Th2-type (IL-4, IL-5, IL-10), and the excessive concentration of Th1-type cytokines (IL-2, IL-8) leads to an immunological attack of the maternal body on the fetoplacental complex. Such “conflict” of the two systems results in a “disaster” of one of them, namely, pregnancy failure and early reproductive losses [172].

Analysis of the results has confirmed that the realization of the biological effects of cytokines is based not only on a sufficient level of secretion of anti-inflammatory agents, but also on the balance of ligand-receptor interactions,

violations of which lead to high cytotoxic activity of large granular uterine lymphocytes and fetal rejection [43; 136; 165; 195; 205; 227].

Decidualization is a complex biological process in which extensive morphological, functional, and genetic changes occur in endometrial stromal cells that contribute to the development of the implanting blastocyst. Decidualization is the process of proliferation and differentiation of uterine stromal cells in response to the implantation of the extraembryonic/embryonic unit and is necessary to support embryonic growth until the placenta is established.

Uterine spiral artery remodeling is a maternal adaptation process that is crucial for the creation of a fully functional placental unit. During spiral artery remodeling, fetal trophoblast cells infiltrate the decidua and its blood vessels, and the uterine spiral arteries are transformed from narrow to large channels to increase maternal blood flow to the implantation sites and facilitate the growing fetal nutrition and oxygen requirements. Failures in this process (e.g., shallow invasion of the trophoblast and incomplete remodeling) cause decreased blood flow to the fetoplacental unit and are associated with common pregnancy complications such as recurrent miscarriage, fetal growth retardation, and preeclampsia [36; 47; 63].

Decidualization is coordinated by steroid hormones, growth factors, and molecular and epigenetic mechanisms. Transmission of signals of the TGF-β superfamily regulates various reproductive processes. However, the role of TGF-β signaling in uterine decidualization is understudied [47].

Endometrial differentiation primed with estradiol (E2) occurs after a postovulatory increase in progesterone (P4) during the secretory phase of the menstrual cycle. During decidualization, cellular and molecular changes occur as endometrial stromal cells transform from fibroblast-like cells into large polygonal cells rich in cytoplasmic glycogen and lipid droplets. Stromal cell polyploidy is a unique phenomenon that occurs during the differentiation of decidual cells after blastocyst implantation [81; 89; 92; 115; 185; 206; 212]. Factors secreted by decidual cells include prolactin (PRL) and insulin-like growth factor binding

protein-1 (IGFBP-1), which are key regulators of decidualization and are widely used as markers of decidualization [70]. The ovarian steroid hormones (E2 and P4) play a fundamental role in blastocyst implantation and uterine decidualization. It is increasingly recognized that PGR receptor signaling is of primary importance for blastocyst implantation, uterine decidualization, and pregnancy maintenance [83].

Growth factors are signaling protein molecules that stimulate cell growth, proliferation, regulation, and interaction. Growth factors play a key role in the control of proliferation and differentiation of various cell types, specific immunity activation, inflammation regulation, angiogenesis, neuronal function, tissue regeneration and embryonic development.

Transforming growth factor beta receptor I/actin-like kinase 5 (TGFBR1/ALK5) is a receptor protein kinase associated with a dysfunctional immune response. CD4 + CD25 + FoxP3 + regulatory T cells (Tregs), a unique subpopulation of T cells, play a crucial role in tolerance and prevention of autoimmune reactions and in the success of allogeneic organ transplantation [66]. During pregnancy, Tregs are essential for the tolerance of the maternal immune system to the semi-allogeneic embryo. Modulation is mediated either through intercellular contact or through the secretion of immunosuppressive cytokines such as IL-10 and TGF- β [60; 68; 87; 91; 131; 151; 200].

In the first trimester of pregnancy, embryo implantation, decidualization, and vascular modification, including spiral artery remodeling, are key events in establishing a successful pregnancy. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the key factors in capillary formation. VEGFA is produced in almost all tissues and increases vascular permeability and endothelial cell proliferation.

TGFB1 acts as an antagonist of VEGF in cell proliferation and induction of apoptosis. TGFB promotes wound healing processes and suppresses the proliferation and migration of smooth muscle and endothelial cells. Almost every cell in the body produces TGFB and its receptors. However, TGFB has an inhibitory effect on the immune system, hematopoiesis, synthesis of pro-inflammatory

cytokines, lymphocyte response to IL2, IL4, IL7, and formation of cytotoxic NK and T-cells. Studies showed that apoptosis increased in the endometrium during implantation and decidual tissue regression. It was shown that mRNA for TGF-β1 was present in the uterus during pregnancy and was localized in lumenal and glandular epithelial cells in early and late pregnancy [118; 214; 225]. TGF-β1 and TGF-β2 mRNA were also detected in the uterus during pregnancy [97; 102; 129; 197; 122]. These studies suggest that TGF-β isoforms may be specifically involved in the control of endometrial apoptosis in the uterus during pregnancy.

TGF-β plays a crucial role in the regulation of tissue homeostasis by controlling various cellular processes such as proliferation, differentiation, and matrix formation. By binding to various receptors of the activin-receptor kinase (ALK) family, TGF-β induces intracellular carboxy-terminal (C-terminal) phosphorylation of receptor-regulated Smad proteins (R-Smad). Phosphorylated R-Smads form complexes with the common mediator Smad. Smad4 and these complexes travel to the nucleus, where they bind to DNA to regulate gene transcription by recruiting transcription factors [135]. The use of different ALKs can lead to the activation of different R-Smads; activation of ALK5 (TGFβR1) induces phosphorylation of Smad2 and Smad3.

As it was shown earlier [7; 26; 65; 111; 150], TGF-β1 induces DNA splitting in decidual cells. The results clearly demonstrated that TGF-β1 induced apoptosis in a dose-dependent manner ($p<0.0001$). Apoptosis increased up to 20% at 1 ng/mL of TGF-β1 and up to 30% at 10 ng/mL. Trypan blue staining exclusion assay was used to check cell viability and death; although this test is not specific for apoptosis, it shows a direct effect of TGF-β1 on cell survival and viability.

The strong expression of TGF-β1 in early pregnancy may be explained by the fact that this isoform is necessary for the initiation of embryo implantation processes in the peri-implantation period. TGFBR1 was shown to be secreted by blastocyst cells. Subsequently, the decidual stromal cells and NK cells produce TGFBR1, which is necessary for the growth and development of trophoblasts. The first signs

of placental angiogenesis are observed in the third week of pregnancy. Cytotrophoblast cells intensively express chorionic gonadotropin, which positively affects angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor.

Remodeling of the spiral arteries is crucial for normal fetal growth and development. Disruption of the current stages of implantation and hematopoiesis in the fetus and mother can usually lead to pregnancy loss. TGFBR1 is considered one of the main regulators to monitor regulatory T-cells, which play a crucial role in the maintenance of physiological immune responses and, in addition, provide maternal tolerance to fetal paternal antigens [147]. TGF-β regulates cell proliferation, differentiation, apoptosis, and homeostasis. Therefore, its significant role in the processes of pregnancy preservation cannot be excluded.

TGF-β superfamily signal transduction plays a pleiotropic role in fundamental cellular and developmental processes. It was previously established that a complexly branched network of fetal blood vessels in the labyrinth initially developed as a result of vasculogenesis, when angioblasts, which were defined in the allantois, penetrated the chorion to form the fetal labyrinthine vascular network. As indicated above, failure of chorioallantoic fusion prevents any such vascular development and is associated with lethality in midgestation. TGFBR1 induces the expression of vascular endothelial growth factor. Fetal vessels undergo extensive branching through angiogenesis, which promotes placental expansion to meet the growing needs of the growing fetus.

These processes are regulated by members of vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PGF), FGF, WNT, and the TGF-β and BMP families. Disruption of such key angiogenic pathways in the placenta has a significant impact on placental vascularization and is causally associated with spontaneous abortion because the products of the genes are interrelated in metabolic pathways. Altering their functioning can cause apoptosis, disruption of blood vessel formation, and thus, a disruption of syncytiotrophoblast function. Consequently, it can lead to abnormal angiogenesis and spontaneous abortion.

According to the results of the immunohistochemical study of the decidual tissue of abortion material in the group of women with early spontaneous abortion after ART, the comparison of the decidual tissue of abortion material in the group of women with normal pregnancy revealed a statistically significant difference in the degree of TGFBR1 positive expression in the decidual tissue of the two groups of patients. The immunohistochemical positive expression of ALK5 in decidual cells of women with early spontaneous abortion after ART was 31.38±11.65 to 39.88±13.8 per FOV; while in normal pregnancy, it was 48.5±12.4 to 59.77±14.3 per FOV (<0.001).

Positive ALK5 expression in syncytiotrophoblast cells of women with early spontaneous abortion after ART was 35.25±8.55 to 43.69±9.34 per FOV; in normal pregnancy, it was 52.13±7.9 to 63.52±10.14 per FOV (<0.001). Positive ALK5 expression in endometrial gland epithelium of women with early spontaneous abortion after ART was 24.31±7.25 to 30.75±7.46 per FOV; in normal pregnancy, it was 38.4±5.66 to 41.51±8.14 per FOV (<0.001). Positive ALK5 expression in endometrial stromal cells of women with early spontaneous abortion after ART was 3.63±2.73 to 6.06±3.19 per FOV; in normal pregnancy, it was 34.31±8.5 to 40.52±10.7 per FOV (<0.001).

An analysis of TGFBR1 production depending on the pregnancy outcome showed that in the group of women with spontaneously terminated pregnancy, there was a significant decrease in the area of TGFBR1 positive expression. In combination with indicators of age, it demonstrated an increased risk of spontaneous abortion, which may be an additional factor that contributes to microcirculatory and hemodynamic disorders. Besides, it contributes to an increase in coagulation potential, causing disorders in the placentation process. Therefore, a decrease in TGFBR1 levels from early gestation may manifest as impaired trophoblast invasion, which may further lead to the progression of gestational complications, including a threat of pregnancy termination. The author of this study found a strong correlation between the development of early spontaneous abortion and TGFBR1 expression

levels in decidual tissue (r=0.622), syncytiotrophoblast cells (r=0.778), endometrial gland epithelium (r=0.774), and endometrial stromal fibroblasts (r=0.867).

Thus, histologically verified placental dysfunction is probably associated with increased proliferative activity of Th1-lymphocytes due to critically low positive expression of TGFBR1, which disrupts vascular bed formation, damages placental tissue, and redirects immune response from Th2-type to Th1 activation of cytotoxic link. This manifests as immunological aggression of the maternal body toward the fetus.

The analysis of the obtained results considering the critical level of positive TGFBR1 expression shows that one can confidently state that early reproductive losses in women after ART are caused by the development of a localized inflammatory process of hyperreactive Th1-mediated humoral response. The absence of a modeling restructuring of the maternal immune system in the conditions of a disrupted dynamic equilibrium of TGFBR1 with a prevalent Th1-mediated response in women with high obstetric risk pregnancies is a predictor of early reproductive losses.

The findings of this study demonstrate that there are reserves for therapy and prevention of obstetric pathology leading to early reproductive losses in women with induced pregnancy, given the availability of new approaches regarding the pathogenetic mechanisms of pregnancy loss. The results of this study make it possible to reconsider the existing views on the etiology and structure of miscarriage, and argue that the causes of early reproductive losses are universal mechanisms, in particular, disorders of TGFBR1 expression, which disrupt vascular bed formation, damage the placental tissue, and reorient the immune response from Th2-type to Th1 cytotoxic activation. This is manifested in maternal immunological aggression against the fetus, which underlies the development of early reproductive losses.

CONCLUSIONS

1. The analysis of the anamnesis data showed a weak statistical association between the occurrence of early reproductive losses and the age of women (r=0.264, p<0.001) and the duration of infertility (r=0.247, p<0.001) in women in the study group. Significant factors of early reproductive losses in women in the main group were inflammatory disorders of vaginal biocenosis (36.67% in the main group and 11.67% in the control group, p<0.001), endometriosis (15% in the main group and 6.67% in the control group, p<0.001), uterine fibroids (11.67% in the main group and 5% in the control group, <0.05), and cervical pathology (30% in the main group and 11.67% in the control group, p<0.001). Pregnancies occurred in 58.33% of the women in the study group after the ICSI treatment program, while only 36.67% of the women in the control group (p<0.001) got pregnant as a result of the ICSI technique.

2. Important factors in the development of early reproductive losses in women after ART are: metabolic syndrome (r=0.438, p<0.001), pelvic surgery (r=0.332, p<0.001), chronic diseases of the urinary tract (r=0.462, p<0.001), secondary development of infertility (r=0.366, p<0.001), artificial abortion (r=0.327, p<0.001), 3 or more unsuccessful ART cycles (r=0.357, p<0.001), most frequently performed with ICSI (r=0.222, p<0.001). The most significant combinations of prognostic factors for the development of early reproductive losses after ART: a combination of the duration of infertility and a combination of endocrine and tubal-peritoneal factors (r=0.459); secondary infertility and artificial abortion (r=0.873).

3. TGFBR1 expression was found to be several-fold higher in normal pregnancies than in complicated pregnancies after ART (<0.001). The immunohistochemical positive expression of TGFBR1 in decidual cells in complicated pregnancy after ART was 36.3±13.3% of cells per FOV, and 54.1±14.4% of cells per FOV in normal pregnancy (p<0.001); in syncytiotrophoblast cells in a complicated course of pregnancy after ART – 39.6±9.3% of cells per FOV; in a

normal pregnancy – 57.9±10.7% of cells per FOV ($p<0.001$); in the epithelium of endometrial glands at complicated pregnancy after ART – 27.5±7.6% cells per FOV, at normal pregnancy – 39.9±7.3% cells per FOV ($p<0.001$), in endometrial stromal cells at complicated pregnancy after ART – 4.7±2.9% cells per FOV, at normal pregnancy – 37.4±10.1% cells per FOV ($p<0.001$).

4. There was a moderate statistical correlation between the development of early spontaneous abortion and TGFBR1 expression levels in decidual tissue ($r=0.622$), syncytiotrophoblast cells ($r=0.778$), endometrial gland epithelium ($r=0.774$), and endometrial stromal fibroblasts ($r=0.867$).

5. Minimal TGFBR1 expression was significantly less frequently observed (3%) in endometrial stromal cells in women of the study group than in the control group (37%) ($p<0.001$), up to 33% in decidual cells (52% in the control group) ($p<0.001$), up to 38% in syncytiotrophoblast cells (78% in the control group) ($p<0.001$), and up to 29% in endometrial gland epithelium (41% in the control group) ($p<0.001$), resulting in early reproductive loss.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

The results suggest that there are sufficient reserves for reducing the rate of early reproductive losses during pregnancy after ART:

1) It is necessary to form high-risk groups for early reproductive losses during pregnancy after ART at the pre-pregnancy stage according to the identified risk factors.

2) Risk group should be formed based on the combination of the following factors: pelvic inflammatory processes and mixed infections, pelvic surgeries and intrauterine manipulations; tubal-peritoneal sterility; three or more unsuccessful IVF cycles.

3) Timely laboratory examination is necessary to include cytokine profile indices in the preconception diagnostic algorithm, as well as the assessment of ALK5 expression in endometrial tissue or in abortive material in cases of reproductive losses.

REFERENCES

1 Abramyan G.R. Clinical significance of detecting antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilia in patients with failed in vitro fertilization attempts. Practical Medicine 201b:(3):113-8.

2 Abramyan G.R. Thrombophilias in women with infertility and in vitro fertilization failures. Practical Medicine, (2017). (7 (108)), 81-86.

3 Avramenko N.V. Assisted reproductive technologies. Zaporozh. Med. Journal. 2014;(3):95-100.

4 Ailamazyan E.K., Kulakov V.I., Radzinsky V.E.., Savelieva G.M. Obstetrics. National Guidelines. Moscow: GEOTARMedia, 2014. p. 1200.

5 Ailamazyan E.K. The role of the immune system of the feto-placental complex in the mechanisms of premature termination of pregnancy / E.K. Ailamazyan, O.V. Pavlov, S.A. Selkov // Obstetrics and gynecology. - 2012. - № 2. - p. 9-11.

6 Alegina E.V., Tetruashvili N.K., Agajanova A.A., Trofimov D.Y., Donnikov A.E. Interleukin-8 gene polymorphism in women with recurrent reproductive loss. Obstetrics and Gynecology. 2015. № 9. p. 33-37.

7 Alieva S.A., Odamanova M.A., Allakhkulieva S.Z., Khashayeva T.Kh. The significance of circulating antiphospholipid antibodies in women with autoimmune thyroid disease and fetal loss syndrome in the anamnesis. 2015; 1: 13-18.

8 Amirova A.A., Nazarenko T.A., Mishieva N.G. Factors influencing the outcomes of IVF (literature review). Problems of Reproduction. 2010;16(1):34-7.

9 Amirova Zh.S. Cytokine system in pregnant women with persistent and recurrent threat of abortion / Zh.S. Amirova // Bulletin of New Medical Technologies. - 2013. - v. 13, № 4. - p. 66-67.

10 Andreeva E.S., Stepankova E.A. Peculiarities of the course of pregnancy and state of the fetus in patients with threatened pregnancy termination in the first trimester, complicated by chorionic detachment. Vest. Smol. gos. med.

acad. 2010;(4):11-3.

11 Apolikhin O.I., Moskaleva N.G., Komarova V.A. Modern demographic situation and the problems of improving the reproductive health of the Russian population. Experimental and Clinical Urology 2015; 4: 4-14.

12 Baimuradova S.M., Slukhanchuk E.V. Non-pregnancy in patients with “non-critical” factors predisposing to the development of thrombophilia: a modern view of the problem. Obstetrics and Gynecology Archives. V.F. Snegireva, vol. 5, no. 4, 2018, pp. 202-207.

13 Bitsadze V.O., Makatsaria A.D., Khizroeva D.Kh. et al. Thrombophilia as the most important link in the pathogenesis of pregnancy complications. Practical Medicine. 2012; 5: 22-29.

14 Bitsadze V.O., Khizroeva D.Kh., Makatsariya N.A., Egorova E.S., Baimuradova S.M., Mashkova T.Y. Antiphospholipid antibodies, their pathogenetic and diagnostic significance in obstetric pathology. Obstetrics, gynecology and reproduction. 2014; 8 (2): 39-60.

15 Borovkova E.I., Martynova I.V. Spontaneous miscarriage: issue awareness // Research Practical Medicine Journal. 2014. №1(1). p. 52 - 56.

16 Bunicheva N.V. Prognosis of a missed abortion as a basis for reducing reproductive losses: Ph. Candidate of medical sciences / N.V. Bunicheva. Perm, 2016. p. 4.

17 Bushtyreva I.O., Kuznetsova N.B., Zamanskaya T.A., Dmitrieva M.P., Levchenko M.V., Shmakova K.P. Prognostic markers of early reproductive losses in patients with retrochorial hematoma / I.O. Bushtyreva. Obstetrics and gynecology. 2016. № 1. p. 28-33.

18 Vedischev S.I., Osmanov E.M., Pyshkina A.S., Zhabina U.V. Medico-social aspects of pregnancy failure // Scientific Journal of Belgorod State University. 2011. №16 (111). Vol. 15. p.116 - 120.

19 Veropotvelyan N.P. Recurrent reproductive loss associated with immunological factors / N.P. Veropotvelyan // Reproductive Health. Eastern

Europe. - 2015. - № 4. - p. 84-92

20 Ruziguli A., Rukhliada N.N. Age and body mass index as factors of female infertility and negative results of assisted reproductive technologies //Obstetrics and Gynecology.2021. № 2.p. 21-26.

21 Volkov V.G., Akhilgova Z.S. Risk factors for early pregnancy losses. Bulletin of new medical technologies. Electronic edition. 2020. №1. Publication 1-11. URL: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-1/1-11.pdf (date of reference: 26.11.2020)

22 Vorobyeva I.I., Zhivetsky A.A., Denisova V.B. Miscarriage: current views of the problem (Review of the literature). Women's Health. 2017. №3 (119). p. 113-117.

23 ART in Russia and the world. https://www.mcrm.ru/encyclopedia/articles/ekstrakorporalnoe-oplodotvorenie-eko/vrt-v-rossii-i-mire/

24 Gazieva I.A. Prognostic significance of clinical and anamnestic, microbiological and biochemical factors in the genesis of early reproductive losses unrelated to fetal chromosomal abnormalities. Ros. vestnik of Obstetrics and Gynecology. 2014. № 5. p 54-59.

25 Gayskaya O. V. Diagnostic methods of threatening pregnancy termination in the first trimester. System analysis and management in biomedical systems. 2017. v. 16, №1, p. 44-48.

26 Gayskaya O.V. Clinical and diagnostic value of specific markers in threatening miscarriage in pregnant women in the first trimester: abstract, Belgorod, 2018. p. 23.

27 Dmitrienko G.V. Indicators of innate immunity as a criterion for early prognosis of the course of the gestational process: Ph. D. in medical sciences / G.V. Dmitrienko. Volgograd, 2015. p. 19.

28 Dobrohotova Y.E., Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Svitich O.A., Malushenko S.V., Magomedova A.M. The role of immune mechanisms in the

pathogenesis of miscarriage. Obstetrics and gynecology. 2016. № 7. p. 5-10.

29 Dobrokhotova Y.E. Non-pregnancy: infectious factors / Y.E. Dobrokhotova // Medical aspects of women's health. - 2013. - № 5. - p. 32-37.

30 Dubossarskaya Z.M., Duka Y.M. The place of thrombophilia in the structure of fetal loss syndrome. Taurian Medical and Biological Bulletin. 2011; 14 (3; 1): 75-77

31 Enkova E.V. Male factor in miscarriage. System analysis and management in biomedical systems. 2017. v. 16, № 3. p. 555-564

32 Zhivetskaya-Denisova A.A., Vorobieva A.I., Tkachenko V.B., Rudakova N.V. Miscarriage: modern approaches to diagnosis, prevention and treatment. Perinatology and Pediatrics. 2017. № 2(70). p. 91-98.

33 Igitova M.B., Safarova G.A., Remneva O.V., Kravtsova E.S. Perinatal outcomes in women with reproductive losses in the anamnesis. Obstetrics and Gynecology. News. Opinions. Education. 2018. № 2 (20). p. 64-70.

34 Infections in obstetrics and gynecology: a practical guide / O.L. Antonova, I.T. Govorukha, A.A. Zheleznaya [et al]; ed. by Prof. V.K. Chayka. - Donetsk: LLC “Almateo”, 2012. - P. 317-346.

35 Kalinina E.A. Complications after Assisted Reproductive Technologies / In the book: Gynecology. Abubakirov A.N., Adamyan L.V., Aziev et al. National guide. Moscow, 2017. p. 883-889.

36 Krivonos M.I., Zainulina M.S., Selkov S.A. Antiphospholipid syndrome and early reproductive losses. Obstetrics, Gynecology and Reproduction, (2016). 10 (4), 114-122.

37 Kuzmin V.N., Mashina M.A. Optimization of specialized medical care in infertility. Treating Physician. 2017. № 3. p. 38.

38 Kucher E. Miscarriage. Modern view of the problem / E. Kucher // Z turbotoyu pro zhynku. - 2014. - N 7. - p. 8-1

39 Lysenko O.V., Rozhdestvenskaya T.A., Prusakova O.I. Infertility: problems at the stage of treatment and diagnostic care. Achievements of

Fundamental and Clinical Medicine and Pharmacy. Materials of the 72nd scientific session of the university staff. Vitebsk state medical university. 2017. p. 262-263

40 Maysuradze L.V., Magaeva F.Y., Alborov D.K. The influence of bacterial vaginosis on the course of pregnancy, fetal and neonatal condition. Kuban Scientific Medical Bulletin, (2014). (6), 58-62.

41 Makatsaria A.D., Bitsadze V.O., Khizroeva D.Kh. Thromboprophylaxis in pregnant women with thrombophilia and thrombosis in the history. Siberian Scientific Medical Journal, vol. 33, no. 6, 2013, p. 99-109

42 Mankevich Ya.B., Aksenenko V.A., Nezhdanov I.T. Some aspects of recurrent miscarriage. Vestnik of the Russian University of the Peoples' Friendship University of Russia. 2012. № 5. p. 231-235

43 Nazarova V.V., Shipitsyna E.V., Shalepo K.B., Savicheva A.M. Bacterial communities that form the vaginal microecosystem in the normal and bacterial vaginosis. Journal of Obstetrics and Women's Diseases, (2017). 66 (6), 30-43

44 Olina A.A., Sadykova G.K., Galinova I.V. Structure of reproductive losses. Perm Medical Journal. 2017. v. 34. № 6. p. 59-66.

45 Peculiarities of pregnancy and childbirth in women with a missed abortion in the anamnesis / M.S. Selikhova, G.A. Dmitrenko, O.A. Kuznetsova [et al] // Russian bulletin of obstetrician-gynecologist. - 2012. - № 5. - p. 64-66.

46 Podgornaya A.V., Makhmutkhodzhaev A.Sh., Mikheenko G.A., Kokh L.I., Yuryev S.Y. Management of pregnant women with recurrent bacterial vaginosis // Modern problems of science and education. - 2016. - № 6. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25771 (accessed 27.11.2020)

47 Radzinsky V.E., Ordiyants I.M., Pobedinskaya O.S., Zykov E.V. Progesterone and reproductive losses. Obstetrics and gynecology. 2017. № 8. p. 109-114

48 Reproductive Health. // https://www.who.int/topics/ reproductive_health/ru/

49 Rogozina M.A. Analysis of reproductive losses in early pregnancy and their impact on the demographic situation. Youth and medical science in the XXI century. Proceedings of the XXI All-Russian Scientific Correspondence Conference of Students and Young Scientists with International Participation. Edited by L.M. Zheleznov, M.P. Razin, E.S. Prokopyev. 2020. p. 19-20.

50 Ruziguli A., Rukhliada N.N., Taits A.N.,Prohorovich T. I.,LIBOVA T. A.Role of ALK5 in the profile of early reproductive losses in the use of assisted reproductive technologies //Journal «Surgeon» .2021. №3-4.p. 70-76.

51 Ruziguli A., Rukhliada N.N., Yiminniyazi A.Role of activin-like receptor kinase-5 in blastocyst implantation and placental development //Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice
Series: Natural and Technical Sciences. 2020. №08.p. 163-167.

52 Sadekova O.N., Knyazeva I.P., Yarovaya E.B. Radzinsky V.E., Demidova E.M., Samokhodskaya L.M., Tkachuk V.A. The role of systemic disorders in the formation of gestational complications and their genetic component. Obstetrics and Gynecology. 2012; 4/2: 21-28.

53 Selhadzhieva M.S. The role of circulating antiphospholipid antibodies in the development of fetal loss syndrome. Obstetrics, gynecology and reproduction. 2014; 8 (1): 31-33.

54 Sinyakova A.A., Shipitsyna E.V., Budilovskaya O.V. Peculiarities of the vaginal microflora in the first trimester in women with a history of pregnancy failure. Journal of Obstetrics and Women's Diseases, (2018). 67 (5), 32-41.

55 Sinyakova A.A. Modern ideas about the vaginal microbiocenosis and its influence on pregnancy outcomes. Journal of Obstetrics and Women's Diseases, (2017). 66 (6), 89-100.

56 Sinyakova A.A., Shipitsyna E.V., Budilovskaya O.V., Bolotskikh V.M., Savicheva A.M. Clinical-anamnestic and microbiological predictors of miscarriage. Journal of Obstetrics and Women's Diseases, (2019). 68 (2), 59-70.

57 List of countries according to fertility rate. CIA data. Total fertility rate

of countries of the world. // http://merkator.org.ua/ru/spravochnik/spisok-stran-po-koeffitsientu-fertilnosti/

58 Sukhanova L.P. Reproductive process in the demographic development of Russia. Social aspects of the health of the population. URL: http://vestnik.mednet.ru/content/view/159/30/lang,ru/. (date of access: 02.11.2020)

59 Sukhikh G.T. Immune mechanisms in physiology and pathology of pregnancy / G.T. Sukhikh, L.V. Vanko // Immunology. - 2012. - v. 9, № 2. - p. 103-108.

60 Talanova I.E. Chemokine content in women with threatening preterm labor / I.E. Talanova, N.Yu. Borzova, N.Yu. Sotnikova // Problems of gynecology, obstetrics and perinatology. - 2014. - v. 13, № 3. - p. 32-37.

61 Tetruashvili N.K. Diagnostic and prognostic significance of cytokine determination in patients with recurrent reproductive loss: abstract of Ph.D. in medicine / N.K. Tutruashvili. - M., 2012. - p. 24.

62 Tkach I.R., Guleyuk N.L., Zastavna D.V., Bezkorovaina G.M., Fedyshyn T.V. Contribution of chromosomal anomalies to genesis of sporadic and habitual early reproductive losses. Factors in the experimental evolution of organisms. 2017. v. 21. p. 340-344.

63 Tkachenko Zh.S., Denisenko S.V. Optimization of modern diagnosis of chromosomal abnormalities detected in married couples with reproductive dysfunction. Women's Health. 2011. № 3. p. 230-234.

64 Tretyakova O.S., Gaffarova A.S. Dynamics of reproductive losses in the Russian Federation and the Republic of Crimea in 2015-2017. Days of Science of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Proceedings of the V Scientific and Practical Conference of faculty, graduate students, students and young scientists. 2019. p. 122-125.

65 Thrombohemorrhagic complications in obstetric and gynecological clinic. Edited by A.D. Makatsaria. M. 2010; 1056 p.

66 Usova A.V. Evaluation of the main indices of the cytokine profile in

women with threatened termination of pregnancy and associated treatment: abstract of Ph. D. in medical sciences / A.V. Usova. - Omsk, 2017. - 25 p.

67 Characteristics of systemic and local immune reactions in recurrent miscarriage / S.Y. Yuriev [et al.] // Clinical Laboratory Diagnostics. - 2015. - № 10. - p. 39-45.

68 Khonina N.A. Features of cytokine production in physiological and complicated pregnancy / N.A. Khonina, N.M. Pasman, A.A. Ostanin // Obstetrics and gynecology. - 2012. - № 2. - p. 11-15.

69 Shchegolev A.I., Tumanova U.N., Mishnev O.D. Effect of smoking on the development of placental lesions // Gynecology. 2018. № 20 (2). p. 34 – 40.

70 Abdel-Raoufabdel-Aziz Afifi R., Ali D.K., Talkhan H.M. Pregnancy outcome and the effect of maternal nutritional status. J. Egypt Soc. Parasitol. 2013. Vol. 43, №1. P. 125-132

71 Ahmed S, Bradshaw A.D., Gera S., et al. The TGF-βeta/Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance[J]. J Clin Med, 2017,6(1).

72 Alecsandru D., García-Velasco J. A. Immunology and human reproduction. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2015. V. 27(3). P. 231-234

73 Analysis of clinical factors on early pregnancy loss during in vitro fertilization-embryo transfer treatment and natural pregnancy. Fan MJ, Tian C, Chang L, Wang XY, Li R. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2018 Nov 25;53(11):755-760.

74 Anblagan D, et al. Maternal smoking during pregnancy and fetal organ growth: a magnetic resonance imaging study. PLoS One. 2013;8(7):e67223.

75 Andraweera P. H., Dekker G. A., Roberts C. T. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. Human Reproduction Update. 2012. Vol. 18, № 4. P. 436-457

76 Arachchillage DR, et al. Diagnosis and management of non-criteria obstetric antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost. 2015;113(1):13–19

77 Association between induced abortion history and later in vitro fertilization outcomes. Wang Y, Sun Y, Di W, Kuang YP, Xu B.Int J Gynaecol Obstet. 2018 Jun;141(3):321-326.

78 Azem F, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod. 2004;19(2):368–370

79 Bao, W; Wang, XP; De Lin, Q .; Wang, WJ; Yin, GJ; Qiu, LH Decidual cd4 + cd25 + cd127dim / - regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. Euro. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2011, 155, 94-98.

80 Basal E, Ayeni T, Zhang Q, Langstraat C, Donahue PK, Pepin D, Yin X, Leo E, Cliby W. Patterns of Mullerian inhibiting substance type II and candidate type I receptors in epithelial ovarian cancer. Curr Mol Med. 2016;16:222–31.

81 Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. Reprod Biol Endocrinol. 2018;16(1):121. Published 2018 Dec 5. doi:10.1186/s12958-018-0414-2

82 Beighton P. Heterozygous manifestations in the heritable disorders of the skeleton. Pediatr Radiol. 1997;27:397–401.

83 Boks M. A., Kager-Groenland J. R., Haasjes M. S., Zwaginga J. J., van Ham S. M., Brinke A. IL-10 – generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study of human clinical-applicable DC. Clin. Immunol. 2012. Vol. 142, No 3. P. 332-342.

84 Bondestam J, Huotari MA, Morén A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, Kallio J, Horelli-Kuitunen N, Aaltonen J, Fujii M, Moustakas A, ten Dijke P, Otonkoski T, Ritvos O. cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C) Cytogenet Cell Genet. 2001;95:157–62.

85 Bouet PE, et al. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. Fertil Steril.

2016;105(1):106–110.

86 Branch, DW; Gibson, M.; Silver R. M. Clinical Practice. Recurrent miscarriage. N. Engl. J. Med. 2010, 363, 1740-1747.

87 Brkic, J .; Dunk, C .; O'brien, J.; Fu, G .; Nadeem, L .; Wang, YL; Rosman, D .; Salem, M .; Synova, On .; Yougbare, I .; and others. microRNA-218-5p promotes differentiation of endovascular trophoblasts and remodeling of spiral arteries. Ther. 2018 , 26 , 2189–2205.

88 Brndum-Jacobsen P., Benn M., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B. G. 25-Hydroxyvitamin D concentrations and risk of venous thromboembolism in the general population with 18 791 participants. J. Thromb. Haemost. 2013. Vol. 11. No 33. P. 423-431.

89 Buzzaccarini, G.; Vitagliano, A.; Andrisani, A.; Santarsiero, CM; Cicinelli, R.; Nardelli, S.; Ambrosini, G.; Cicinelli, E. Chronic endometritis and implantation of an altered embryo: a unified pathophysiological theory from a systematic review of the literature. J. Assist. Reprod. Genet. 2020 , 37 , 2897–2911

90 Canali S, Core AB, Zumbrennen-Bullough KB, Merkulova M, Wang CY, Schneyer AL, Pietrangelo A, Babitt JL. Activin B Induces Noncanonical SMAD1/5/8 Signaling via BMP Type I Receptors in Hepatocytes: Evidence for a Role in Hepcidin Induction by Inflammation in Male Mice. Endocrinology. 2016;157:1146–62.

91 Carter, AM Comparative studies of placentation and immunology in non-human primates offer a scenario for the evolution of deep trophoblast invasion and an explanation for human pregnancy disorders. Reproduction 2011 , 141 , 391-396

92 Cavalcante, MB; Cavalcante, C.; Sarno, M.; da Silva, ACB; Barini, R. Antinuclear antibodies and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. I am. J. Reprod. Immunol. 2020, 83, e13215

93 Cenksoy P, et al. Hysteroscopic findings in women with recurrent IVF failures and the effect of correction of hysteroscopic findings on subsequent

pregnancy rates. Arch Gynecol Obstet. 2013;287(2):357–360

94 Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2017.

95 Chen A, Oster E, Williams H. Why Is Infant Mortality Higher in the United States Than in Europe? // Am Econ J Econ Policy. 2016. Vol. 8(2). P. 89-124.

96 Chen, X.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Cheung, WC; Zhang, T.; Qi, R.; Chang, JPW; Wang, CC; Li, T. S. The relationship between chronic endometritis and the density of natural uterine killer cells in women with recurrent miscarriage: clinical implications. J. Obs. Gynaecol Res. 2020 , 46 , 858–863

97 Chen, X.; Mariee, N.; Jiang, L.; Liu, Y.; Wang, CC; Li, TC; Laird, S. Measuring the percentage of uterine natural killer cells in the peri-implantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishing a control range. I am. J. Obstet. Gynecol. 2017 , 217 , 680.e1–680.e6

98 Cheng Linghui, Cao Yunxia. The relationship between transforming growth factor β1 and its receptor and abortion after in vitro embryo transfer [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005.40 (5): 299-301.

99 Chromosome abnormality rate and related factors of spontaneous abortion in early pregnancy. Shen JD, Sun FX, Qu DY, Xie JZ, Gao L, Qiu Q, Gao C, Wu W, Wu CX, Wang DW, Diao FY, Liu JY. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2019 Dec 25;54(12):797-802.

100 Cicinelli E, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Hum Reprod. 2015;30(2):323–330

101 Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. Nicotine Tob Res. 2004;6(Suppl 2):S125–S140.

102 CONF: Failure: Understanding Art as Process, 1150–1750 (5-6 Nov 20). In: ArtHist.net, Oct 26, 2020 (accessed Nov 27, 2020), https://arthist.net/archive/23803

103 Coricor G, Serra R. TGF-βeta regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms[J]. Sci Rep, 2016,6:38616

104 Correlation of bacterial vaginosis with preterm labour: a case control study / W. Nigeen, A.S. Bhat, K. Gulzar, S. Taing // Int J ReprodContraceptObstet Gynecol. – 2015. – Vol. 4. – P. 1868-74.

105 Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod BioMed Online. 2014;28(1):14–38

106 Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC: Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod Biomed Online. 2014, 28: 14-38

107 Cumulative live birth rates following miscarriage in an initial complete cycle of IVF: a retrospective cohort study of 112 549 women. Cameron NJ, Bhattacharya S, Bhattacharya S, McLernon DJ. Hum Reprod. 2017 Nov 1;32(11):2287-2297

108 Daher S, de Arruda G D K, Blotta M H, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss[J]. J Reprod Immunol, 2004,62(1-2):151-157.

109 Davis, J. E.; Pollheimer, J.; Yong, ON; Kokkinos, Mich.; Kalyonis, B.; Knofler, M.; Murty, P. Epithelial-mesenchymal transition during extra-dorsal trophoblast differentiation. Honeycomb adhesives. Migr. 2016 , 10 , 310-321.

110 di Clemente N, Jamin S P, Lugovskoy A, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-βeta[J]. Mol Endocrinol, 2010,24(11):2193-2206.

111 D'Ippolito, S.; Ticconi, C.; Tersigni, C.; Garofalo, S.; Martino, C.; Lanzone, A .; Scambia, G.; Di Simone, N. The pathogenic role of autoantibodies in recurrent pregnancy loss. I am. J. Reprod. Immunol. 2020, 83 , e13200

112 Dubon M J, Yu J, Choi S, et al. Transforming Growth Factor beta Induces Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Migration via Noncanonical Signals and N-cadherin[J]. J Cell Physiol, 2017

113 Effect of the number of previous spontaneous abortions on the first in vitro fertilization cycle. Zhang YF, Luo HN, Zhang YJ, Shi R, Ma JF, Zhang YS. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2019 Dec 25;54(12):803-807

114 El Tokhy O, Kopeika J, El-Toukhy T. An update on the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. Womens Health (Lond). 2016;12(5):496-503.

115 Eshre's RPL Recommendation Group; Bender Atik, R.; Christiansen, OB; Elson, J.; Colte, AM; Lewis, S.; Middeldorp, S.; Nelen, W.; Peramo, B.; Quenby, S.; and others. Eshre's recommendation: Recurrent miscarriage. Gm. Reprod. Opened 2018, 2018, hoy004

116 Esther Winter, Jim Wang, Michael J. Davies, Robert Norman, Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment, Human Reproduction, Volume 17, Issue 12, December 2002, Pages 3220–3223

117 Fang L, Chang HM, Cheng JC, Yu Y, Leung PC, Sun YP. Growth Differentiation Factor-8 Decreases StAR Expression Through ALK5-Mediated Smad3 and ERK1/2 Signaling Pathways in Luteinized Human Granulosa Cells. Endocrinology. 2015;156:4684–94.

118 Fedorcsak P, et al. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. Acta Obstet Gynecol Scand. 2000;79(1):43–48

119 Fuentes A, et al. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. Fertil Steril. 2010;93(1):89–95

120 Gao Y, Duran S, Lydon JP, DeMayo FJ, Burghardt RC, Bayless KJ, Bartholin L, Li Q. Constitutive Activation of Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 in the Mouse Uterus Impairs Uterine Morphology and Function. Biol Reprod. 2015;92:34–4

121 Gao Y, Li S, Li Q. Uterine epithelial cell proliferation and endometrial hyperplasia: evidence from a mouse model. Mol Hum Reprod. 2014;20:776–86

122 Gellersen, B.; Brosens, JJ Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. Endocr. Ed. 2014 , 35 , 851-905.

123 Gerbaud P., Pidoux G. Review: an overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. Placenta. 2015. Vol. 36. Suppl. 1. P. 35-42.

124 Global Conference on Primary Health Care. // https://www.who.int/teams/primary-health-care/conference/declaration

125 Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, van den Eijnden-van Raaij J, Donahue PK. The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. Genes Dev. 1998;12:844–57

126 Guerrero, B.; Hassouneh, F.; Delgado, E.; Casado, JG; Tarazona, R. Natural killer cells in recurrent miscarriage: a review. J. Reprod. Immunol. 2020 , 142 , 103209.

127 Gurunath S., Pandian Z., Richard A. Anderson, Siladitya Bhattacharya, Defining infertility a systematic review of prevalence studies, Human Reproduction Update, Volume 17, Issue 5, September-October 2011, Pages 575–588

128 Health-21. Policy framework for achieving health for all in the who European region. // https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/98398/wa540ga 199heeng.pdf

129 Hefler-Frischmuth, K.; Walch, K.; Hefler, L.; Tempfer, C.; Grimm, S. Serological markers of autoimmunity in women with recurrent miscarriage. I am. J. Reprod. Immunol. 2017 , 77

130 Heusser K. Pregnancy-induced sympathetic overactivity: A precursor of preeclampsia. BioScience Trends. 2016. Vol. 10, No 1. P. 34-41

131 Higuette, Arkansas; Buckberry, S.; Mayne, BT; Hoda, CM; Bianco-Miotto, T.; Roberts, CT. First-trimester trophoblasts forming endothelial tubes mimic the expression profile of the "blood vessel development" genes in vitro. Gene Expr. Patterns 2016 , 21 , 103-110

132 Hong Li, Y.; Marren, A. Recurrent miscarriage: A summary of

international evidence-based guidelines and practices. Aust J. Gen. Pr. 2018 , 47 , 432–436

133 Hornstein MD, et al. Antiphospholipid antibodies and in vitro fertilization success: a meta-analysis. Fertil Steril. 2000;73(2):330–333

134 Hu L, Du J, Lv H, et al. Influencing factors of pregnancy loss and survival probability of clinical pregnancies conceived through assisted reproductive technology. Reprod Biol Endocrinol. 2018;16(1):74

135 Huang G, Osmulski P A, Bouamar H, et al. TGF-βeta signal rewiring sustains epithelial-mesenchymal transition of circulating tumor cells in prostate cancer xenograft hosts[J]. Oncotarget, 2016,7(47):77124-77137

136 Huang, N.; Chi, H.; Qiao, J. The role of regulatory T cells in regulating fetal and maternal immune tolerance in healthy pregnancy and reproductive diseases. The front. Immunol. 2020, 11, 1023.

137 Huang, Z.; Li, S.; Fan, W.; Ma, B. Transforming growth factor beta1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via the TGF-beta / Smad3 signaling pathway. Oncotarget 2017 , 8 , 33560–33570

138 Huisman G.J. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that undergone three to five days of culture / G.J. Huisman, B.M. Fauser, M.J. Eijkemans // Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 73, № 1. – P. 117-123

139 Hu-Lowe DD, Chen E, Zhang L, Watson KD, Targeting Activin Receptor-Like Kinase 1 Inhibits Angiogenesis and Tumorigenesis through a Mechanism of Action Complementary to Anti-VEGF Therapies. Cancer Res. 2011;71:1362–73

140 Hur K., K.M. Yang, J.Y. Kim, I.O. Song, J.Y. Jun, I.S. Kang, Risk factors associated with preclinical pregnancy loss following ART, 80(3) (2003) 169–170.

141 ICMART preliminary world report 2016. ESHRE. Copenhagen, Denmark July 7, 2020.

https://secureservercdn.net/198.71.233.47/3nz.654.myftpupload.com/ wp-content/uploads/ICMART-ESHRE-WR2016-FINAL-20200901.pdf

142 Influence of surgical evacuation on pregnancy outcomes of subsequent embryo transfer cycle following miscarriage in an initial IVF cycle: a retrospective cohort study. Meng J, Zhu M, Shen W, Huang X, Sun H, Zhou J. BMC Pregnancy Childbirth. 2019 Nov 8;19(1):409

143 Itoh F, Itoh S, Carvalho RL, Adachi T, Ema M, Goumans MJ, Larsson J, Karlsson S, Takahashi S, Mummery CL, ten Dijke P, Kato M. Poor vessel formation in embryos from knock-in mice expressing ALK5 with L45 loop mutation defective in Smad activation. Lab Invest. 2009;89:800–10.

144 Jia-Rong Z, Shuang-Di L, Xiao-Ping W: Eutopic or ectopic pregnancy: a competition between signals derived from the endometrium and the fallopian tube for blastocyst implantation. Placenta. 2009, 30: 835-839.

145 Jones-Paris C R, Paria S, Berg T, et al. Embryo implantation triggers dynamic spatiotemporal expression of the basement membrane toolkit during uterine reprogramming[J]. Matrix Biol, 2016.,

146 Jornvall H, Blokzijl A, Dijke PT, Ibanez CF. The Orphan Receptor Serine/Threonine Kinase ALK7 Signals Arrest of Proliferation and Morphological Differentiation in a Neuronal Cell Line. J Biol Chem. 2001;276:5140–6

147 Jung B, Staudacher J J, Beauchamp D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer[J]. Gastroenterology, 2017,152(1):36-52

148 Kaune H, Peyrache E, Williams S A. Oocyte-derived Smad4 is not required for development of the oocyte or the preimplantation embryo[J]. Theriogenology, 2015,83(5):897-903.

149 Keller CC; Eikmans, M.; van der Hoorn, M. P.; Lashley, L. Recurrent miscarriages and the relationship to regulatory T cells; a systematic review. J. Reprod. Immunol. 2020 , 139 , 103105

150 Kim M R, Park D W, Lee J H, et al. Progesterone-dependent release of

transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells[J]. Mol Hum Reprod, 2005,11(11):801-808.

151 Knofler M.; Haider, S.; Saleh, L.; Pollheimer, J.; Gamage, T.; James, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. Cell. Mol. Life Sci. 2019 , 76 , 3479-3496.

152 Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. Curr Opin Obstet Gynecol. 2004;16(3):221–229.

153 Kunzle R, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. Fertil Steril. 2003;79(2):287–291.]

154 Kuon RJ; Muller, F .; Vomstein, K .; Weber, M .; Hudalla, H .; Rosner, S .; Strowitzki, T .; Markert, U .; Daniel, V.; The B. Levels of peripheral natural killer cells before pregnancy as markers of immunomodulatory treatment in patients with recurrent miscarriage. Arch. Immunol. Exp. (Warsz) 2017 , 65 , 339-346.

155 Larsen EC, et al. New insights into mechanisms behind miscarriage. BMC Med. 2013;11:154. doi: 10.1186/1741-7015-11-154.

156 Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with “thin” endometrium - an ongoing challenge. Gynecol Endocrinol. 2014;30(6):409–414

157 Lee HJ, Kim PH. Further Characterization of Activin A-induced IgA Response in Murine B Lymphocytes. Immune Netw. 2009;9:133.

158 Lessey B.A. Assessment of endometrial receptivity. Fertil Steril 2011; 96: 3: 522-529.

159 Li WY, Dudas M, Kaartinen V. Signaling through Tgf-β type I receptor Alk5 is required for upper lip fusion. Mech Dev. 2008;125:874–82.

160 Li X, Shen C, Liu X, et al. Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy[J]. Environ Pollut, 2017,222:523-531.

161 Li Y, Klxausen C, Zhu H, Leung PC. Activin A Increases Human

Trophoblast Invasion by Inducing SNAIL-Mediated MMP2 Up-Regulation Through ALK4. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100:E1415–27.

162 Li, Q. Transformation of growth factor beta signaling in uterine development and function. J. Anim. Sci.Biotechnol. 2014 , 5 , 52.

163 Lin S, Svoboda KK, Feng JQ, Jiang X. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. Bone Res. 2016;4:16005

164 Mahvash Zargar, Nargess Razmkhah, Roshan Nikbakht Evaluating the factors associated with pregnancy loss in pregnant women undergoing assisted reproductive techniques. Middle East Fertility Society Journal. Volume 23, Issue 4, December 2018, Pages 342-345

165 Massague J. The TGF-βeta family of growth and differentiation factors[J]. Cell, 1987,49(4):437-438., Li M O, Flavell R A. TGF-βeta: a master of all T cell trades[J]. Cell, 2008,134(3):392-404.

166 Mathyk B, Adams N, Young S L. Endometrial receptivity: lessons from systems biology and candidate gene studies of endometriosis[J]. Minerva Ginecol, 2017,69(1):41-56

167 Miles DC, Wakeling SI, Stringer JM, van den Bergen JA, Wilhelm D, Sinclair AH, Western PS. Signaling through the TGFβ-Activin Receptors ALK4/5/7 Regulates Testis Formation and Male Germ Cell Development. PLoS One. 2013;8:e54606.

168 Mills J.L., J.L. Simpson, S.G. Driscoll, L. Jovanovic-Peterson, M. Van Allen, J.H. Aarons, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception New Engl. J. Med., 319 (25) (1988), pp. 1617-1623]

169 Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR. Bmpr encodes a type I bone porphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryongenesis. Genes Dev. 1995;9:3027–37.

170 Mitchell D, Pobre EG, Mulivor AW, Grinberg AV, Castonguay R, Monnell TE, Solban N, Ucran JA, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar

R. ALK1-Fc Inhibits Multiple Mediators of Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. Mol Cancer Ther. 2010;9:379–88.

171 Miwa I, et al. Pathophysiologic features of “thin” endometrium. Fertil Steril. 2009;91(4):998–1004.

172 Monsivais, D., Peng, J., Kang, Y., & Matzuk, M. M. (2019). Activin-like kinase 5 (Alk5) inactivation in the mouse uterus results in metastatic endometrial carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(9), 3883–3892

173 Moragianni VA, Jones SM, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril. 2012;98(1):102–108

174 Moreno I, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. Am J Obstet Gynecol. 2016;215(6):684–703.

175 Moreno I, et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. Am J Obstet Gynecol. 2018;218(6):602.e1–602.e16

176 Mostafa Metwally & William L. Ledger (2011) Long-term complications of assisted reproductive technologies, Human Fertility, 14:2, 77-87

177 Moustakas, A.; Heldin, CH Mechanisms of the TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Med. 2016 , 5 , 63.

178 Nagashima T, Li Q, Clementi C, et al. BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance[J]. J Clin Invest, 2013,123(6):2539-2550

179 Nakano, N. et al. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)-beta signaling by disrupting TGF-βeta receptor complex formation. J Biol Chem 292, 4099–4112 (2017).

180 Nepomnaschy PA, et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans: Proc Natl Acad Sci U S A; 2006. p. 3938–42.

181 Orvieto R, et al. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. Int J Gynaecol Obstet. 2009;104(1):53–55.

182 Pacifici M, Shore EM. Common mutations in ALK2/ACVR1, a multi-faceted receptor, have roles in distinct pediatric musculoskeletal and neural orphan disorders. Cytokine Growth Factor Rev. 2016;27:93–104

183 Padula, A.M., Rivera-Núñez, Z. & Barrett, E.S. Combined Impacts of Prenatal Environmental Exposures and Psychosocial Stress on Offspring Health: Air Pollution and Metals. Curr Envir Health Rpt 7, 89–100 (2020)

184 Pasch LA, et al. Psychological distress and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril. 2012;98(2):459–464

185 Peng J, Fullerton PT Jr, Monsivais D, Clementi C, Su GH, Matzuk MM. Uterine Activin-Like Kinase 4 Regulates Trophoblast Development During Mouse Placentation. Mol Endocrinol. 2015;29:1684–93

186 Peng J, Monsivais D, You R, Zhong H, Pangas SA, Matzuk MM. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:E5098–107

187 Perricone, C.; de Carolis, C.; Perricone, R. Pregnancy and autoimmunity: a common problem. Best pr. Res. Clin. Rheumatol. 2012 , 26 , 47-60

188 Philippe Tummers, Paul De Sutter, Marc Dhont, Risk of spontaneous abortion in singleton and twin pregnancies after IVF/ICSI, Human Reproduction, Volume 18, Issue 8, August 2003, Pages 1720–1723

189 Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. Fertility and Sterility, 99(1), 63.

190 Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Stanger JD, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A, Almahbobi G. Dysregulation of granulosal bone morphogenetic protein receptor 1B density is associated with reduced ovarian reserve and the age-related decline in human fertility. Mol Cell Endocrinol. 2016;425:84–93

191 Reister, F. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular

trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women / F. Reister, H.-G. Frank, J.C.P. Kingdom [et al.] // Lab. Invest. 2001. Vol. 81, N8. P. 1143–1152

192 Revelli A., S. Casano, L.D. Piane, G. Grassi, G. Gennarelli, D. Guidetti, et al. A retrospective study on IVF outcome in euthyroid patients with anti-thyroid antibodies: effects of levothyroxine, acetyl-salicylic acid and prednisolone adjuvant treatments ReprodBiolEndocrinol., 7 (2009), p. 137

193 Richter KKRB, et al. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. Fertil Steril. 2007;87(1):53–59.

194 Rigueur D, Brugger S, Anbarchian T, Kim JK, Lee Y, Lyons KM. The Type I BMP Receptor ACVR1/ALK2 is Required for Chondrogenesis During Development. J Bone Miner Res. 2015;30:733–41

195 Ripamonti U, Parak R, Klar R M, et al. The synergistic induction of bone formation by the osteogenic proteins of the TGF-βeta supergene family[J]. Biomaterials, 2016,104:279-296.

196 Rossant J. (2015). Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. Development 142, 9–12. 10.1242/dev.115451.

197 Rostama B, Turner JE, Seavey GT, Norton CR, Gridley T, Vary CP, Liaw L. DLL4/Notch1 and BMP9 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27KIP1 and Thrombospondin-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35:2626–37

198 Salpingectomy for hydrosalpinx prior to in vitro fertilization. Fertil Steril. 2008;90(5 Suppl):S66–8.

199 Salumets A, et al. Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. Hum Reprod. 2006;21(9):2368–2374.

200 Seshadri, S.; Sunkara, S. K. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Update 2014 , 20 , 429-438.

201 Shapiro BS, et al. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. Reprod BioMed Online. 2016;33(1):50–55

202 Shooner C, Caron P L, Frechette-Frigon G, et al. TGF-βeta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005,3:20

203 Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis / C. Marconi, G.G. Donders, G. Bellen, D.R. Brown, C.M. Parada, M.G. Silva // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2013. – Vol. 167. – P. 205–209

204 Silveira C O, Rezende C P, Ferreira M C, et al. Implantation Failure Is Associated With Increased alpha-Inhibin and beta-Glycan Gene Expression in Secretory Phase Endometrium: Nested Case-Control Study of Infertile Women Undergoing IVF/Fresh Embryo Transfer[J]. Reprod Sci, 2016.

205 Smith, SD; Dunk, CE; Aplin, JD; Harris, LK; Jones, R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. I am. J. Pathol. 2009 , 174 , 1959–1971.

206 Sokolov D. I. Mikhailova, V. A.; Agnaeva, AO; Bazhenov D. O. Khokhlova E. V. Bespalova, ON; Gzgzyan AM; Selkov S. A. Interaction of Nk and trophoblast cells: Cytotoxic activity in repeated miscarriage. Gynecol. Endocrinol. 2019 , 35 , 5–10

207 Stange K, Désir J, Kakar N, Mueller TD, Budde BS, Gordon CT, Horn D, Seemann P, Borck G. A hypomorphic BMPR1B mutation causes du Pan acromesomelic dysplasia. Orphanet J Rare Dis. 2015:1–6.

208 Stange K, Désir J, Kakar N, Mueller TD, Budde BS, Gordon CT, Horn D, Seemann P, Borck G. A hypomorphic BMPR1B mutation causes du Pan acromesomelic dysplasia. Orphanet J Rare Dis. 2015:1–6.

209 Starc A, Trampuš M, Pavan Jukić D, Rotim C, Jukić T, Polona Mivšek A. Infertility and sexual dysfunctions: a systematic literature review. Acta Clin Croat. 2019 Sep;58(3):508-515.

210 Strobel, L.; Vomstein, K.; Kyvelidou, C.; Hofer-Tollinger, S.; Feil, K.; Kuon, RJ; Ebner, S.; Troppmair, J.; Toth, B. Other background: profiles of natural killer cells in secondary and primary miscarriage. J. Clin. Med. 2021 , 10 , 194.

211 Tang M, Naidu D, Hearing P, et al. LEFTY, a member of the transforming growth factor-beta superfamily, inhibits uterine stromal cell differentiation: a novel autocrine role [J]. Endocrinology, 2010,151(3):1320-1330.

212 Tsubakihara Y.; Moustakas, A. Epithelial-mesenchymal transition and metastasis under the control of transforming growth factor beta. Int. J. Mol. Sci. 2018 , 19 , 3672.

213 van Dijk, MM; Colte, AM; Limpens, J.; Kirk, E.; Quenby, S.; van Velie, M.; Goddin, M. Recurrent miscarriage: diagnostic examination after two or three miscarriages? Systematic review of the literature and meta-analysis. Gm. Reprod. Update 2020 , 26 , 356-367.

214 Wang W J, Liu F J, Qu H M, et al. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage[J]. J Reprod Immunol, 2013,99(1-2):39-45.

215 Wang Y, Nicholls PK, Stanton PG, Harrison CA, Sarraj M, Gilchrist RB, Findlay JK, Farnworth PG. Extra-ovarian expression and activity of growth differentiation factor 9. J Endocrinol. 2009;202:419–30.

216 Wang, WJ; Zhang, H.; Chen, ZQ; Zhang, W.; Liu, XM; Fang, JY; Liu, F. J.; Kwak-Kim, J. Endometrial tgf-beta, il-10, il-17, and autophagy are impaired in women with recurrent implantation failure and chronic endometritis. Reprod. Biol. Endocrinol. 2019 , 17 , 2.

217 Waylen AL, et al. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. Hum Reprod Update. 2009;15(1):31–44., Щеголев А.И., Туманова У.Н., Мишнёв О. Д. Влияние курения на развитие поражений плаценты // Гинекология. 2018. № 20 (2). С. 34 - 40

218 Wolfman N M, Hattersley G, Cox K, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of

the TGF-βeta gene family[J]. J Clin Invest, 1997,100(2):321-330.,

219 Wöltje K, Jabs M, Fischer A. Serum Induces Transcription of Hey1 and Hey2 Genes by Alk1 but Not Notch Signaling in Endothelial Cells. PLoS One. 2015;10:e0120547.

220 Wrana J L, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF-βeta receptor[J]. Nature, 1994,370(6488):341-347.

221 Wu L, Luo L H, Zhang Y X, et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014,12:74.

222 Yin, Y.; Zhong, Y. P.; Zhou, CQ; Xu, YW; Wang, Q.; Li, J.; Shen, XT; Wu, HT Antinuclear antibodies predict poor IVF outcome: impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate. Immunol. Investigation. 2012 , 41 , 458–468.

223 Ying S, Cao H, Hu H, Wang X, Tang Y, Huang C. Alk7 Depleted Mice Exhibit Prolonged Cardiac Repolarization and Are Predisposed to Ventricular Arrhythmia. PLoS One. 2016;11:e0149205

224 Zenclussen A. C. Adaptive immune responses during pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2013. Vol. 69, NO 4. P. 291-303.

225 Zeng, M.; Wen, P.; Duan, J. Association of antinuclear antibodies with the clinical outcome of patients treated with in vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. I am. J. Reprod. Immunol. 2019 , 82 , e13158

226 Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. Semin Reprod Med. 2014 Jul;32(4):297-305

227 Zhao, HJ; Klausen, C.; Zhu, H.; Chang, HM; Li, Y.; Leung, PCK Bone morphogenetic protein 2 promotes invasion of trophoblast cells and the formation of endothelial tubes by ID1-mediated activation of the IGF-binding protein-3. FASEB J. 2020, 34, 3151-3164.

228 Zhong Y., Y. Ying, H. Wu, C. Zhou, Y. Xu, Q. Wang, et al. Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome following in

vitro fertilization and embryo transfer Int. J. Med. Sci., 9 (2) (2012), pp. 121-125].

229 Zilversmit Pao L, Harville EW, Wickliffe JK, et al. The cumulative risk of chemical and nonchemical exposures on birth outcomes in healthy women: the fetal growth study. Int J Environ Res Public Health. 2019;16.

230 Ruziguli A., Rukhliada N.N., Yiminniyazi A.The effect of previous spontaneous abortions on early loss pregnancy using assisted reproductive technologies.Journal of Critical Reviews.2020.№7(9).p. 1027-1032.