Введение

В настоящее время перед современной медициной остро стоит проблема мужского и женского бесплодия. Бесплодие в браке имеет не только клиническое, но и социальное и психологическое значение. По данным ВОЗ, во всем мире более 8 % супружеских пар бесплодны, что при экстраполяции на человечество означает от 50 до 80 миллионов мужчин и женщин, которые не имеют детей, и каждый год их число увеличивается в среднем на 2 млн. пар. Нарушения в женском организме являются причиной невозможности иметь потомство в 40 % случаев. Остальные 60% распределяются так: в 40 % имеется патология со стороны мужчин, еще 20% комбинированные причины. Для решения данной проблемы в настоящее время все шире используется метод экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с последующим переносом эмбрионов (ПЭ) в полость матки. Потребность в нем высока: он назначается 50-60% супружеских пар, обращающихся в специализированные клиники по поводу бесплодия.

ЭКО сопровождается мощным гормональным воздействием на организм женщины. Известно, что половые гормоны оказывают влияние на систему гемостаза. Поскольку в ответ на стимуляцию в яичниках созревает большое количество фолликулов, продуцирующих половые гормоны, главным образом, эстрадиол, концентрация которого в циклах стимуляции во много раз выше, чем в спонтанном, естественном цикле, логично ожидать, что на фоне стимуляции могут возникать выраженные изменения в системе гемостаза.

Целью данной работы является исследование системы гемостаза при ЭКО как единственном методе решения проблемы бесплодия.

Задачи:

1. Исследование сосудисто – тромбоцитарного гемостаза;
2. Исследование коагуляционного гемостаза;
3. Исследование антикоагулянтного звена гемостаза.

**1. Бесплодие**

Лечение бесплодия в условиях катастрофической демографической ситуации - одна из наиважнейших проблем медицины. 9% семейных пар репродуктивного возраста сталкиваются с проблемой бесплодия.

Бесплодие в браке - отсутствие беременности при регулярной половой жизни без применения противозачаточных средств в течение 1 года. Выделяют женское (60%) и мужское (40%) бесплодие.

При лечении бесплодия у женщин различают три типа:

1. Абсолютное бесплодие - возможность беременности полностью исключена (отсутствие матки, яичников, аномалии развития половых органов).

2. Первичное - ни одной беременности у женщины, живущей половой жизнью без контрацепции.

3. Вторичное - отсутствие зачатия после имевшейся в прошлом беременности.

У мужского и женского бесплодия может быть множество причин. Перед лечением необходимо определить их.

Выяснив на основе анализов причину бесплодия, можно приступать к лечению. Сначала обычно применяют медикаментозное лечение, нередко требуется оперативное (хирургическое) вмешательство. К сожалению, эти методы не всегда дают положительные результаты.

В случае неэффективности обычных способов лечения бесплодия, могут быть применены вспомогательные репродуктивные технологии: ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) и ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение.

**1.2** **Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)**

**ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение —** метод преодоления бесплодия, предполагающий взятие яйцеклетки из организма женщины, оплодотворение вне тела, помещение оплодотворенной яйцеклетки в организм женщины.

Метод экстракорпорального оплодотворения или оплодотворения "в пробирке" на сегодняшний день является самым эффективным методом лечения бесплодия, помогающим даже в самых безнадежных ситуациях. Он применяется в случае непроходимости или отсутствия маточных труб, при мужском факторе бесплодия, при эндометриозе, патологии яичников, бесплодии неясной причины и иных заболеваниях.

Одна попытка экстракорпорального оплодотворения дает вероятность зачатия в среднем 20-45%, что даже несколько выше средней частоты наступления беременности обычным путем. Вероятность зачатия в программе ЭКО зависит от возраста супругов, состояния их здоровья, качества применяемых препаратов и материалов, числа и качества полученных эмбрионов, и некоторых других факторов. Неудача в одной попытке ЭКО еще не означает, что данный метод оказался неэффективен. Почти 95% бесплодных пар могут забеременеть при проведении им нескольких попыток ЭКО.

**1.2.1 Этапы программы ЭКО**

**1. Определение программы и тактики лечения после проведения предварительного обследования;**

**2. Подготовка супругов, коррекция гормональных отклонений, лечение инфекций и нарушений сперматогенеза;**

3. **Стимуляция суперовуляции, ультразвуковой мониторинг (10-30 дней);**

**4. Введение гормонов (чХГ) для окончательного созревания яйцеклеток (1 день);**

5. **Пункция фолликулов, забор яйцеклеток, сдача спермы. Оплодотворение яйцеклетки спермой супруга или донора (1 день);**

6. **Культивирование эмбрионов, наблюдение за дроблением эмбрионов (2-5 дней);**

7. **Перенос эмбрионов в полость матки, замораживание оставшихся эмбрионов при необходимости (1 день);**

**8. Гормональная поддержка беременности ранних сроков (до 10-14 недель);**

9. **Тест на беременность по присутствию гормона чХГ в крови (через 2 недели после переноса эмбрионов);**

**10. УЗИ - диагностика беременности (через 3 недели после переноса эмбрионов);**

11. **Ведение беременности.** **Роды (в условиях родильного дома).**

**1.2.2 Стимуляция суперовуляции**

Чтобы вероятность наступления беременности в одной попытке ЭКО была выше, необходимо получить несколько пригодных для оплодотворения яйцеклеток. С этой целью перед процедурой ЭКО проводится так называемая стимуляция суперовуляции, когда женщине назначают лекарства (например, препараты, содержащие ФСГ), вызывающие одновременное созревание нескольких фолликулов.

**1.2.3 Мониторинг**

Во время стимуляции суперовуляции проводится ультразвуковой мониторинг роста фолликулов в яичнике и созревания эндометрия в матке. Это нужно для корректировки дозы вводимых препаратов. С одной стороны, необходимо получить достаточное количество зрелых яйцеклеток, но с другой стороны, избыточная стимуляция может привести к осложнениям. Зрелым считается фолликул, достигший 17-20 мм в диаметре при толщине слизистой матки (эндометрия) больше 7 мм.

Мониторинг проводится на второй-третий день цикла. Тогда же назначаются стимулирующие препараты. Следующее исследование роста фолликулов повторяется приблизительно через пять дней. В дальнейшем исследования проводятся чаще и почти ежедневно до достижения фолликулами размеров, близких к овуляторным. При достижении определенных критериев, обычно на 10-14 день цикла, принимается решение об окончании стимуляции, и назначаются препараты чХГ.

**1.2.4 Введение чХГ**

Препараты человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) вводятся с целью окончательного созревания яйцеклетки. Путь введения - внутримышечный.

Через 35-36 часов после инъекции чХГ проводят пункцию.

**1.2.5 Пункция**

Пункция фолликулов яичника проводится с целью получения яйцеклеток.

В день пункции проводят оплодотворение. Сперму мужа или донора очищают от лишней плазмы и готовят для оплодотворения, проверяя количество, качество и подвижность сперматозоидов.

Полученную после пункции яичников фолликулярную жидкость с яйцеклетками изучают под микроскопом, находят яйцеклетки, отбирают их и отмывают. Каждую яйцеклетку кладут в отдельную луночку специальной чашки с питательной средой.

Затем часть спермы добавляют в чашечки с яйцеклетками, после чего оставляют в инкубаторе приблизительно на 12 часов. На следующий день проверяют, произошло ли оплодотворение. Оплодотворенные яйцеклетки, а точнее, уже эмбрионы, продолжают культивировать в течение от 2 до 5 дней.

**1.2.6 Перенос эмбрионов в полость матки**

Перенос эмбрионов происходит на 2-5 день после пункции. Эмбрионы могут переносить как на стадии нескольких клеток - бластомеров, так и на более поздней стадии - бластоцисты.

В среднем переносится 2-3 эмбриона, поскольку подсадка большего числа эмбрионов нежелательна из-за опасности развития многоплодной беременности. Оставшиеся качественные эмбрионы можно подвергнуть замораживанию и использовать в случае неудачи в следующих попытках.

**1.2.7 14 – день после переноса эмбрионов**

Через две недели после переноса эмбрионов исследуют кровь на бета-субъединицу хорионического гонадотропина (ХГ), который является индикатором беременности.

Беременность, определенная по ХГ, называется "биохимической беременностью". Ее еще нужно подтвердить на УЗИ, которое позволяет увидеть плодное яйцо, только начиная с 3 недели после переноса эмбриона. Поэтому на 3-4 неделе после подсадки проводят УЗИ диагностику беременности.

**1.3 Система гемостаза при лечении бесплодия методом ЭКО**

Мощное гормональное воздействие на организм женщины, осуществляемое в ходе реализации программы ЭКО оказывает огромное влияние на систему гемостаза. Для оценки степени данного влияния исследовали систему гемостаза на основных этапах реализации программы ЭКО.

Для исследования сосудисто - тромбоцитарного гемостаза проводили следующие анализы:

1. Подсчитывают количество тромбоцитов;
2. Определяют концентрацию фактора Виллебранда (ФВ).

Для оценки прокоагулянтной активности плазмы крови определяли:

1. Протромбиновое время;
2. Активированное частичное тромбопластиновое время;
3. Тромбиновое время;
4. Концентрацию фибриногена.

Антикоагулянтное звено гемостаза исследовали, определяя:

1. Активность АТIII;
2. Активность протеина С.

**1.4 Система гемостаза**

Система гемостаза - это совокупность функционально-морфологических и биохимических механизмов, обеспечивающих остановку кровотечения и вместе с тем поддерживающих кровь в жидком состоянии преимущественно внутри сосудов. Система гемостаза обособлена, подобно другим жизненно важным системам организма (сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и др.), и находится с ними в тесной взаимосвязи и во взаимовлиянии. Однако она зависит главным образом от функций паренхиматозных и ретикулярных стволовых клеток костного мозга и печени.

Функционально-морфологическими и биохимическими компонентами системы гемостаза являются: сосудистая стенка, тромбоциты, система свертывания крови, включающая свертывающую и противосвертывающую системы. Компоненты гемостаза выполняют следующие функции: регулируют сосудистую резистентность и препятствуют попаданию избыточного количества плазмы и крови в стенки сосудов и за их пределы; останавливают спонтанные кровотечения и кровоизлияния в ткани и после повреждения сосудов; устраняют последствия постоянного латентного внутрисосудистого свертывания, тромбообразования и геморрагий; поддерживают кровь в жидком состоянии, обеспечивая тем самым многие процессы нормального кровообращения и тканевого метаболизма; активно участвуют в реакциях иммунологической защиты организма.

Различают два основных типа гемостаза. l-й тип - микроциркуляторный, сосудисто-тромбоцитарный, или первичный, гемостаз, так как он начинает все реакции гемостаза в капиллярах, венозных и артериальных сосудах до 100 мкм в диаметре. 2-й тип - макроциркуляторный (вторичный) гемостаз, как правило, начинается на основе первичного и следует за ним. Благодаря вторичному гемостазу образуется красный кровяной тромб, состоящий главным образом из фибрина и форменных элементов крови.

**1.5 Сосудисто – тромбоцитарный (первичный) гемостаз**

Стенка капилляра образована эндотелием, базальной мембраной и адвентицией.

Базальная мембрана капилляра состоит из аморфного вещества, представленного в основном гиалуроновой кислотой и коллагеновыми волокнами.

В синтезе гиалуроновой кислоты принимают активное участие катехоламины (адреналин, норадреналин), витамины С, Р, ионы Са2+, глюкокортикоиды. При достаточном количестве этих веществ создается структурно и функционально полноценная сосудистая стенка. Функциональная полноценность сосудистой стенки и эндотелия проявляется прежде всего в скорости их сокращения в ответ на травму и способности противостоять механическому воздействию. Это - первая и самая быстрая первичная реакция гемостатической системы.

В капиллярах и других сосудах микроциркуляторного русла сосудистый спазм, значительно снижающий объем кровопотери, длится 2-3 минуты, затем наступает дилатация поврежденного сосуда. Вследствие этого должно было бы возобновиться кровотечение. В норме этого не случается, так как сосудистый компонент гемостаза подкрепляется тромбоцитарным.

Уже в первые секунды после травмы происходит адгезия (прилипание) тромбоцитов к краям поврежденного эндотелия и коллагеновым волоконцам. Под влиянием АДФ, которая выделяется из поврежденного сосуда и при гемолизе эритроцитов, тромбоциты склеиваются друг с другом (наступает их агрегация) как у места поврежденного сосуда, так и в кровотоке. В результате адгезии и начальной агрегации тромбоцитов из них выделяются серотонин, адреналин и АДФ (собственная АДФ тромбоцитов). Это - реакция освобождения первого порядка. АДФ способствует агрегации пластинок, а серотонин и адреналин усиливают сокращение поврежденной сосудистой стенки.

Адреналин и АДФ, а также находящиеся в плазме Са2+, Mg2+, фибриноген и другие плазменные факторы усиливают агрегацию тромбоцитов. Однако эта реакция обратима у большинства пластинчатых агрегатов. Прилипая друг к другу и к адгезированным тромбоцитам, они все же могут отрываться и уноситься в кровоток. Таким путем идет дезагрегация, скорость которой также во многом определяет наклонность к кровоточивости или тромбообразованию.

Наряду с процессами адгезии и агрегации тромбоцитов из поврежденных тканей и эндотелия выделяется тканевый тромбопластин (IП фактор свертывания). При его взаимодействии с VП, IV, Х и V факторами, а затем и с протромбином (фактором П) образуется тромбин. Следов тромбина недостаточно для свертывания крови, но благодаря ему начинаются важные реакции первичного гемостаза: тромбин действует на агрегаты тромбоцитов, переводит обратимую агрегацию тромбоцитов в необратимую; необратимая агрегация сопровождается реакцией освобождения второго порядка, вследствие которой возникают гидролазы, АДФ в высокой концентрации и вазоактивные вещества (серотонин, адреналин, норадреналин). Благодаря воздействию этих веществ формируется белый тромбоцитарный, или первичный, тромб. Из-за недостатка VП, V, Х факторов и протромбина будет нарушаться первичный гемостаз. После образования первичного тромба полностью блокируется кровотечение из сосудов микроциркуляции.

Таким образом, гемостаз в сосудах микроциркуляции осуществляется в основном клеточными (эндотелием, тромбоцитами) и сосудистым факторами. Свертывающая система крови не успевает включиться в полном объеме, а следы тромбина, обеспечивающего необратимую агрегацию, появляются вследствие быстрой активации тканевого тромбопластина (тканевый, или внешний, путь образования протромбиназы).

Поэтому первичный гемостаз будет нарушен при: изменениях сосудистой стенки (дистрофические, иммуноаллергические, неопластические и травматические капилляропатии); тромбоцитопении; тромбоцитопатии; сочетании этих факторов.

Сформировавшийся белый тромбоцитарный тромб, который подвергся вязкому метаморфозу и ретракции, надежно стягивает края поврежденного микрососуда, противостоит его дилатации и не пропускает жидкую часть крови.

В сосудах более крупного калибра, чем капилляры (венулах и артериолах), несмотря на их более длительный спазм (до двух часов), образовавшийся тромбоцитарный тромб не в силах противостоять расхождению краев поврежденного сосуда при его дилатации - белый тромб разрывается. Если этого не происходит, то даже неразрушенный пластиночный тромб в сосудах с повышенным кровяным давлением ненадежен, так как пропускает, словно сито, плазму и форменные элементы. И кровотечение хотя и медленно, но будет продолжаться. Поэтому для окончательного надежного гемостаза в поврежденных крупных венах и артериях первичного тромба недостаточно. У здоровых людей в таких случаях на первичном (белом) тромбоцитарном тромбе образуется красный.

**1.4.1 Фактор Виллебранда**

##### ФВ - -плазменный кофактор адгезии тромбоцитов.

Уровень ФВ прогрессивно возрастал с первых дней стимуляции. Это связано с высвобождением ФВ из эндотелиальных клеток вследствие длительного воздействия на них повреждающих факторов - высоких концентраций половых гормонов. Дополнительным условием повышения ФВ является, очевидно, имплантация (наступление беременности), связанная с нарушением целостности сосудов эндометрия. По-видимому, в процессе стимуляции суперовуляции у пациенток программы ЭКО фактор Виллебранда может являться неспецифическим маркером повреждения сосудистого эндотелия вследствие резкого повышения уровня половых гормонов в крови.

В нашем городе исследование фактора Виллебранда не проводится.

**1.5 Коагуляционный гемостаз**

Процесс свертывания крови - многоступенчатая ферментная реакция, в которой принимает участие ряд белков, обозначаемых как факторы свертывания крови (табл. 1).

Таблица. 1. Международная номенклатура факторов свертывания крови

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Факторы | Синонимы | Содержание в плазме, г/л | Полупериод распада (в часах) |
| I | Фибриноген | 1,8-4,0 | 72-120 |
| II | Протромбин | около 0,1 | 48-96 |
| III | Тканевый тромбопластин | 0 | - |
| IV | Ионы кальция | 0,09-0,10 | - |
| V | Проакселерин | Около 0,01 | 15-18 |
| VII | Проконвертин | Около 0,005 | 4-6 |
| VIII | Антигемофильный фактор А | 0,01-0,02 | 7-8 |
| IX | Кристмас-фактор | Около 0,003 | 15-30 |
| X | Фактор Стюарт-Проуэра | Около 0,01 | 30-70 |
| XI | Антигемофильный фактор С | Около 0,005 | 30-70 |
| XII | Фактор Хагемана | Около 0,03 | 50-70 |
| XIII | Фибриназа | 0,01-0,02 | 72 |
| Дополнительные | | | |
| Фактор Виллебранда | фВ |  | 18-30 |
| Фактор Флетчера | Прекалликреин |  | - |
| Фактор Фитцджеральда | Кининоген |  | - |

Одни из этих белков являются протеазами (факторы II, VII, IX, Х, ХI, XII, XIII), другие - акцелераторами (ускорителями) ферментных реакций (факторы V и VIII), третьи - конечным субстратом процесса (фактор I, или фибриноген). Взаимодействие факторов свертывания крови, их активация, а затем и инактивация почти на всем протяжении процесса происходят на плазменных фосфолипидных мембранах, от количества которых в плазме зависит либо ускорение, либо существенное замедление процесса свертывания.

Синтез ряда наиболее важных факторов свертывания (факторов V, VII, X, IX и II), а также двух основных физиологических антикоагулянов - протеинов С и S - осуществляется паренхиматозными клетками печени - гепатоцитами, причем для того, чтобы они могли участвовать в процессе свертывания крови, все эти факторы, кроме фактора V, должны подвергнуться γ-карбоксилированию витамин-К-зависимой карбоксилазой. Поэтому при дефиците витамина К и нарушении его всасывания из кишечника (при кишечном дисбактериозе, обтурации общего желчного протока), а также под влиянием непрямых антикоагулянтов (кумаринов, фенилина), являющихся функциональными антагонистами витамина К, нарушается синтез всех витамин К-зависимых факторов свертывания, а также протеинов С и S, вследствие чего может возникнуть тяжелая кровоточивость, сочетающаяся в некоторых случаях с микротромбированием сосудов и некрозами тканей из-за недостатка антикоагулянта - протеина С.

Такое же нарушение свертываемости крови наблюдается и при тяжелых заболеваниях печени, но при этом снижается уровень в крови не только всех витамин К-зависимых факторов свертывания, но и фактора V, а также альбумина.

Различают три этапа процесса свертывания крови

Первый этап завершается активацией фактора X в так называемом протромбиназном комплексе, в состав которого входят, наряду с фактором X, фактор V, ионы кальция и фосфолипидные матрицы. Активация факторов в этом комплексе может осуществляться двумя путями: внешним и внутренним. Запуск внешнего реализуется поступлением из тканей в кровь тканевого тромбопластина (или тканевого фактора - ТФ). Свертывание по этому механизму, который в пробирке имитируется добавлением к плазме тканевого тромбопластина, обозначается как протромбиновый (тромбопластиновый) тест. Коагуляция в нем происходит очень быстро, в течение 12-15 с.

Другим механизмом запуска процесса свертывания крови является внутренний путь. Он связан с контактом крови с субэндотелием (коллагеном), а также с разрушенными эритроцитами (при внутрисосудистом гемолизе), а в пробирке - с контактом со стеклом. При этом механизме последовательно активируются в комплексах «фактор XII (фактор Хагемана) + прекалликреин + фактор XI», а затем «фактор XI + фактор IX + фактор VIII», после чего процесс, как и в предыдущем механизме, замыкается на активации фактора X с образованием протромбиназного комплекса. Внутренний механизм первого этапа свертывания протекает намного медленнее, чем внешний. Он определяется общим временем свертывания крови, временем рекальцификации цитратной плазмы и активированным парциальным тромбопластиновым временем (АПТВ).

В отличие от пробирочных опытов в организме оба указанных выше механизма свертывания крови не строго изолированы друг от друга, а взаимодействуют между собой.

Второй этапсвертывания крови заключается в активации протромбиназным комплексом (т. е. фактором Ха в комплексе с фактором Va + Ca2+ + фосфолипидная матрица) протромбина, который, расщепляясь, превращается в активный тромбин (фактор IIa). Таким образом, второй этап процесса свертывания завершается образованием активного тромбина.

На третьем этапепроцесса этот активный тромбин отщепляет от α- и β -цепей фибриногена два пептида А и два пептида В, в результате чего в плазме крови повышается содержание этих пептидов и одновременно - мономеров фибрина (МФ) с четырьмя свободными связями. Вслед за этим начинается процесс полимеризации МФ - образование их димеров, затем тетрамеров и, в конечном счете - волокон и сгустков фибрина.

гемостаз бесплодие экстракорпоральный оплодотворение

**1.5.1 Протромбиновое время**

**Протромбиновое время** (синоним время Квика) - показатель интенсивности процессов свертывания крови на стадии превращения протромбина в тромбин, представляющий собой продолжительность (в секундах) образования сгустка исследуемой плазмы крови в присутствии тромбопластина и солей кальция.

ПВ - скрининг-тест для определения факторов (фибриногена, протромбина, факторов V, VII и X), участвующих в свертывании крови, инициированном высокой концентрацией тканевого фактора.

**1.5.2 Активированное частичное тромбопластиновое время**

Скрининг-тест для определения факторов (фибриногена, протромбина, факторов V, VIII,IX, X, XI, XII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена), участвующих в свертывании крови при контактной активации. Скрининговый фосфолипидзависимый тест, дающий представление о нарушениях, связанных с эффектом волчаночного антикоагулянта – ВА.

**1.5.3 Тромбиновое время**

**Тромбиновое время** - показатель активности антитромбинов крови; определяется по продолжительности свертывания исследуемой плазмы (до образования сгустка) после добавления к ней стандартного раствора тромбина.

ТВ - скрининг-тест последней стадии свертывания крови – реакции между тромбином и фибриногеном – антикоагулянтной активности антитромбина III

**1.5.4 Фибриноген**

Фибриноген – гликопротеид с молекулярной массой около 340000 дальтон.

Молекула фибриногена представляет собой димер, каждая единица которого содержит три полипептидные цепи –α (А), β (В) и γ с молекулярной массой соответственно 67000, 58000 и 47000 дальтон. Общая формула молекулы фибриногена: (α(А), β(В) γ)2. целостность этой молекулы во многом определяется дисульфидными связями.

Фактор I в том виде, в каком он вырабатывается паренхиматозными клетками печени и поступает в кровь, получил название фибриногена А. Под действием тромбина фибриноген превращается в нерастворимый в крови фибрин, составляющий основу тромба.

**1.6 Противосвертывающие механизмы и система фибринолиза**

В свертывающей системе крови действуют силы как аутокатализа, или самоускорения, так и самоторможения, в силу чего многие факторы свертывания крови и их фрагменты приобретают свойства антикоагулянтов. В частности, сам фибрин и продукты расщепления фибриногена плазмином обладают противосвертывающим действием.

Однако наиболее важны для поддержания крови в жидком состоянии так называемые первичные, т. е. самостоятельно синтезируемые и постоянно находящиеся в крови, антикоагулянты (табл. 2).

Таблица 2. Основные первичные антикоагулянты

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование | Механизмы действия |
| Ингибитор внешнего пути свертывания крови (TFPI)  Тромбомодулин  «Контактные ингибиторы» (фосфолипидный, плацентарный)  Антитромбин III (AT III)  Гепарин и другие кислые мукополисахариды  Протеин С  Протеин S а2-макроглобулин | Синтезируемый в эндотелии белок, инактивирующий комплекс «ТФ+фактор Vila+фактор Ха»  Гликопротеин мембраны эндотелиальной клетки, связывающий и инактивирующий тромбин, в комплексе с которым тромбин сохраняет способность активировать протеин С  Подавляют пусковой механизм внутреннего пути свертывания крови (комплекс факторов XIIa-XIa и калликреина)  Прогрессивно действующий ингибитор тромбина, фактора Ха и в меньшей степени других протеаз*,* участвующих в свертывании крови  В комплексе с AT III действуют как мощные антикоагулянты  Синтезируемый гепатоцитами витамин К-зависимый ингибитор факторов Villa и Va, эндогенный активатор плазминогена. Активируется тромбином и комплексом «тромбин+тромбомодулин»  Синтезируемый гепатоцитами витамин К-зависимый кофактор протеина С; активируется так же, как и протеин С  Слабый ингибитор комплекса «ТФ+фактор Vila», тромбина, плазмина и калликреина |

Помимо перечисленных в табл. 2 важнейших физиологических антикоагулянтов, в патологических условиях в крови могут появляться в высоком титре иммунные ингибиторы факторов свертывания крови - антитела к факторам VIII, IX и другим, а также к фосфолипидным матрицам, на которых взаимодействуют и активируются факторы свертывания крови (антифофолипидный синдром).

Фибринолитическая (плазминовая) система, как и система свертывания крови, активируется как по внешнему, так и по внутреннему механизму.

Наиболее мощным внешним активатором этой системы является продуцируемый в эндотелии, а также в ряде тканей тканевый плазминогеновый активатор (ТПА), на долю которого приходится около 70% всего активаторного эффекта. Еще около 15% внешнего механизма активации приходится на фермент урокиназу, который вырабатывается в почках и в наибольшей своей части выделяется с мочой, а в кровь попадает в значительно меньшем количестве. На остальные активаторы, поступающие в кровь извне, приходится лишь небольшая часть указанной активности, но в патологических условиях она может быть резко усилена тканевыми и лейкоцитарными протеазами, бактериальными активаторами (стрептокиназой, стафилокиназой и др.) и другими экзогенными протеолитическими ферментами (протеазами змеиных ядов и др.).

Внутренний механизм активации фибринолиза осуществляется в основном комплексом «фактор XIIа+калликреин+высокомолекулярный кининоген» (так называемый XIIа - калликреин зависимый фибринолиз), активированными протеинами C+S.

Механизмы активации фибринолиза замыкаются на плазминогене, который трансформируется в активный фермент – плазмин (в прошлом он обозначался как фибринолизин).

Плазминоген и его активаторы фиксируются в основном на сгустках фибрина в тромбах, в связи с чем лизис фибрина преобладает над лизисом растворенного в плазме фибриногена. Кроме того, действию плазмина на фибриноген препятствует содержащийся в плазме мощный ингибитор этого фермента – а2-антиплазмин. Однако при чрезвычайно сильной активации плазминогена происходит истощение а2-антиплазмина, и в плазме крови обнаруживается большое количество продуктов как фибринолиза, так и фибриногенолиза. Эти продукты не идентичны друг другу. В результате расщепления фибриногена в плазме нарастает количество конечного продукта этого процесса - фрагмента D, тогда как при расщеплении фибрина увеличивается концентрация фрагментов D-D (димера) и D-E-D.

Путем раздельного определения концентрации в плазме фрагментов D и D-димеров можно получить представление, в какой степени у больного активированы фибринолиз и фибриногенолиз. Более того, при проведении таких анализов учитывается, что для нарастания в крови продуктов фибринолиза, т. е. D-димера, должно раньше произойти свертывание крови - образование фибрина, а затем его расщепление до фрагмента D-D. Поэтому увеличение концентрации в плазме D-димера служит ценным показателем как интенсивного внутрисосудистого свертывания крови, так и сопряженного с этим процессом фибринолиза. Такое нарастание содержания в крови D-димера является важным маркером массивного тромбоза кровеносных сосудов, тромбоэмболии, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

**1.6.1 Антитромбин III**

Антитромбин III(АТ III) является а2-глобулином с молекулярной массой около 64000. Синтезируется в печени. Выполняет роль основного плазменного кофактора гепарина, под влиянием которого трансформируется из прогрессивного антикоагулянта в ингибитор немедленного действия.

Инактивирует тромбин, факторы ХIIа, XIa, Ха, IXa, калликреин и фибринолизин.

**1.6.2 Протеин С**

Физиологический антикоагулянт, в активированном состоянии инактивирует активные V, VII факторы, ингибирует активатор плазминогена (активность проявляется преимущественно в микроциркуляторном русле).

Активность протеина С кратковременно увеличивалась к 5-7 дню стимуляции, что связано с действием половых гормонов.

В нашем городе активность протеина С не определяется.

**1.7 Осложнения**

У определенного процента женщин в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ возникает такое осложнение, как СГЯ (синдром гиперстимуляции яичников). По выраженности симптомов и уровню половых гормонов СГЯ подразделяют на легкую, среднюю и тяжелую формы. Распространенность умеренных и тяжелых форм СГЯ составляет от 1 до 10%. Тяжелые проявления сопровождаются кровотечением, асцитом, гидротораксом, нарушением баланса электролитов, печеночно-почечной недостаточностью, тромбоэмболией и поэтому рассматриваются, как один из основных рисков при реализации программы ЭКО и ПЭ.

Была выявлена прямая зависимость между тяжестью течения СГЯ и выраженностью изменений, свидетельствующих об активации во всех звеньях системы гемостаза.

У пациенток с риском развития СГЯ рекомендуется проводить исследования системы гемостаза несколько раз в период с момента переноса эмбрионов до дня первичной диагностической беременности с целью своевременного назначения противотромботической терапии и контроля за ее проведением.

**2. Материалы и методы исследования**

# 2.1 Материалы исследования

Для исследования системы гемостаза были обследованы 10 пациенток в возрасте 26 – 33 лет на всех основных этапах реализации программы ЭКО и ПЭ (стимуляция, день введения ХГ, день ПЭ, 14-й день после ПЭ). Показатели гемостаза исследовали в плазме крови.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз оценивали по количеству тромбоцитов. Для подсчета тромбоцитов использовали агрегометр АР 2110.

Для оценки изменений прокоагулянтной активности плазмы крови определяли ПВ, АПТВ, ТВ и концентрацию фибриногена на гемокоагулометре CGL 2110.

Антикоагулянтное звено гемостаза оценивали с помощью определения активности АТ III на гемокоагулометре CGL 2110.

Необходимо отметить, что на 14 день после переноса эмбрионов у пациенток проводили определение β-ХГ для выяснения вопроса о наступлении беременности (эффективности программы).

В ходе обследования десяти пациенток был получен следующий результат: у семи женщин наступила беременность (эффективный цикл); у трех женщин – отсутствие беременности (неэффективный цикл).

2.2 Методы исследования сосудисто – тромбоцитарного гемостаза

**2.2.1 Определение количества тромбоцитов**

*Состав набора:*адреналин; растворитель для адреналина, 8,5 мл – во флаконе.

*Оборудование, материалы, реагенты:*пипетки вместимостью 0,05 – 2,0 мл; физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия.

*Приготовление анализируемых образцов:* венознуюкровь центрифугируют при 1000 об/мин (240 g) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об/мин (1200g) в течение 15 мин., в результате получают бедную тромбоцитами плазму.

*Разведение адреналина:*во флакон с адреналином внести 8,0 мл растворителя для адреналина и развести содержимое при комнатной температуре путем встряхивания в течение 10 мин. В результате получают маточный раствор адреналина (500 мкг/мл).

Для приготовления рабочего раствора адреналина из маточного пользуются следующей схемой:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Номер раствора с адреналином | Физиологический(0,9%)  раствор хлорида натрия | Разведение маточного раствора | Конечная концентрация при агрегометрии (0,45 мл плазмы + 0,05 мл раствора адреналина) |
| 1 | 4,9 мл + 0,1 мл маточн. раствора | 1:50 | 10 мкг/мл |
| 2 | 1,0 мл + 1,0 мл из раствора 1 | 1:100 | 5 мкг/мл |
| 3 | 1,0 мл + 1,0 мл из раствора 2 | 1:200 | 2,5 мкг/мл |

Запись агретограммпроводят в соответствии с инструкцией к агрегометру. С помощью растворов адреналина разной концентрации получают запись кривых агрегации тромбоцитов. Наряду с кривыми агрегации на экране отображается количество тромбоцитов в исследуемой плазме. В норме количество тромбоцитов составляет 140 – 400\*109/л

**2.3 Методы исследования коагуляционного гемостаза**

**2.3.1 Определение протромбинового времени (Техпластин – тест)**

*Принцип метода:*тромбопластин (фактор III, тромбокиназа) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время – время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тканевого тромбопластина (растворимого экстракта из мозга человека).

*Состав набора:*техпластин – лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь, на 5,0 мл суспензии – 4 фл. МИЧ Техпластина в разных сериях составляет 1.1 или 1.2.; контрольная плазма – лиофильно высушенный пул плазмы крови не менее, чем от 20 здоровых людей, на 0,5 мл – 1фл.

*Оборудование, материалы, реагенты:*коагулометр; пипетки вместимостью 0,1; 0,2; 0,5; 5,0 мл; вода дистиллированная.

*Приготовление анализируемых образцов:*венозную кровь центрифугируют при 3000 – 4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. Получают бедную тромбоцитами плазму.

*Подготовка реагентов к работе:*

*Разведение Техпластина*: в один флакон с Техпластином внести 5,0 мл дистиллированной воды. Флакон встряхнуть и выдержать при +370С в течение 20 мин.

*Разведение контрольной плазмы:* во флакон с контрольной плазмой внести 0,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин. Разведенную плазму перед исследованием выдержать 25-30 мин. при комнатной температуре.

*Проведение анализа:*

*Определение контрольных (нормальных) показателей:*

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл контрольной плазмы.

2. Инкубировать при температуре + 370С 1 мин.

3. Добавить 0,2 мл разведенного Техпластина, имеющего температуру +370С и начать отсчет времени свертывания до образования фибрина.

Аналогично определить протромбиновое время в образцах плазмы больных.

В норме протромбиновое время, измеренное на коагулометре, составляет 12-15 с.

Рассчитывают протромбиновый индекс по следующей формуле:

## ПТИ = (ПВ контрольной нормальной плазмы /ПВ больного) x 100%

В норме ПТИ составляет 85 – 105%.

**2.3.2 Методы определения АЧТВ ((АПТВ/АЧТВ) – тест)**

*Принцип метода:*определяется время свертывания плазмы крови в условиях стандартизированной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии ионов кальция.

*Состав набора:*кефалин (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент) – 2 фл.; каолин (концентрированная суспензия 200:1 в дистиллированной воде), 1 мл – 1 фл.; буфер трис НСl (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл – 1 фл.; кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5 М), 10 мл – 1 фл.

*Оборудование, материалы, реагенты:* коагулометр; пипетки вместимостью 0,1; 5,0 мл; вода дистиллированная; цилиндр мерный вместимостью 200 мл.

*Приготовление анализируемых образцов:*венознуюкровь центрифугируют при 1000 об/мин (240 g) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об/мин (1200g) в течение 15 мин., в результате получают бедную тромбоцитами плазму.

*Подготовка реагентов к работе:*

*Разведение кефалина:* в один флакон с кефалином внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и энергичном покачивании в течение 2 мин. В результате получают раствор кефалина, который до использования должен быть выдержан при комнатной температуре в течение 60 мин.

*Приготовление АПТВ – реагента:* концентрированный буфер трис НСl и концентрированную суспензию каолина количественно перенести из флаконов в мерный цилиндр и общий объем довести дистиллированной водой до 200 мл. В результате получают рабочую суспензию каолина. Для приготовления AЧТВ - реагента смешать в пробирке 0,1 мл раствора кефалина с 3,0 мл рабочей суспензии каолина.

*Приготовление рабочего раствора хлорида кальция:* в день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор хлорида кальция развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды).

*Проведение анализа:*

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл исследуемой плазмы и прогреть ее при +370С в течение 1 мин.

2. В кювету добавить 0,1 мл AЧТВ - peaгeнтa, имеющего комнатную температуру.

3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция и зарегистрировать время свертывания.

AЧТВ в нормальной плазме составляет 28-38 с.

**2.3.3 Определение тромбинового времени (Тромбо – тест)**

*Принцип метода:*заключается в определении времени свертывания плазмы крови под влиянием тромбина стандартной активности.

*Состав набора:* тромбин (лиофильно высушенный, 6-8 ед NIH во фл.) - 4 фл.; контрольная плазма (лиофильно высушенная) - 1 фл.

*Оборудование, материалы, реагенты:*коагулометр; пипетки вместимостью 0,1 - 1,0, 10,0 мл; вода дистиллированная;

*Приготовление анализируемых образцов:*венозную кровь центрифугируют при 3000 – 4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. получают бедную тромбоцитами плазму.

*Подготовка реагентов к работе:*

*Разведение тромбина:* в один из флаконов с тромбином внести необходимое количество дистиллированной воды (см. таблицу) и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 2-3 мин.

Ориентировочные значения нормы тромбинового времени свертывания

|  |  |
| --- | --- |
| Объем дистиллированной воды на флакон с тромбином, мл | Время свертывания, сек.,  при коагулометрическом  определении |
| 2,0 | 11-14 |
| 3,0 | 15-19 |
| 5,0 | 20-29 |

*Разведение контрольной плазмы:*во флакон с контрольной плазмой внести 0,5 млдистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин.

*Проведение анализа*:

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл контрольной плазмы и прогреть ее при +370С в течение 1 мин.

2. В ту же кювету добавить 0,1 мл раствора тромбина и зарегистрировать время свертывания.

Исследование плазмы больного выполняется аналогично.

*Чтение результатов:*результат выражают в секундах, сравнивают время свертывания контрольной и исследуемой плазмы. В норме ТВ составляет 14 – 17 с.

**2.3.4 Определения концентрации фибриногена (Квик – Фг – тест)**

*Принцип метода:*образовавшийся после свёртывания плазмы крови фибрин быстро высушивается и по его весу определяется содержание фибриногена в плазме.

*Состав набора:*тромбопластин, 1 г – 2 фл.; хлорид кальция (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%), 10 мл – 6 фл.; буфер трис – НСl (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл – 2 фл.

*Оборудование, материалы, реагенты:* термобаня на 370; весы торсионные; центрифуга лабораторная; пробирки стеклянные; цилиндр мерный вместимостью 200 мл; ступка фарфоровая с пестиком; вода дистиллированная; бумага фильтровальная.

*Приготовление анализируемых образцов:* кровь центрифугируют при 3000 – 4000 об/мин (1200g) в течение 15 мин. Получают бедную тромбоцитами плазму.

*Приготовление реагентов:*

*Приготовление суспензии тромбопластина***:** навеску сухого тромбопластина (50 мг) поместить в фарфоровую ступку, добавить 1,0 мл физиологического (0,9 %) раствора хлорида натрия или раствора трис – буфера (0,05 М, pH 7,4) и тщательно растирать в течение 2 мин. Затем дополнительно добавить в ступку 4,0 мл выбранного раствора, перемешать с помощью пестика и взвесь центрифугировать при 1000 об/мин (240 g) в течение 5-6 мин. Надосадочную жидкость слить в другую пробирку и использовать для анализа.

*Разведение концентрированного буфера:* содержимое одного флакона с концентрированным буфером трис – НСl перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до 200 мл. Получаем рабочий раствор буфера.

*Проведение анализа:*

1. В пробирке последовательно смешать 1,0 мл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы крови, 0,1 мл суспензии тромбопластина и 0,1 мл 5, 54 % раствора хлорида кальция.
2. Пробирку встряхнуть и поместить на водяную баню при +37оС на 10 мин.
3. Образовавшийся в результате инкубации сгусток перенести на фильтровальную бумагу и высушивают путём сжатия и перемещения сгустка по фильтру.
4. Сгусток фибрина выдержать на открытом воздухе при комнатной температуре в течение 15 – 20 мин и взвесить на торсионных весах.

В норме масса сгустка, полученного из 1 мл плазмы крови, составляет 10 – 20 мг. Содержание фибриногена в г/л находят при умножении массы сухого фибрина на коэффициент 0,2. В норме содержание фибриногена в плазме составляет 2,0 – 4,0 г/л.

**2.4 Методы исследования антикоагулянтного гемостаза**

**2.4.1 Определение активности антитромбина III**

*Принцип метода:*исследуемую плазму обрабатывают сорбентом гепарина, подвергают тепловой дефибрикации и смешивают со стандартным количеством тромбина. После инкубации смеси в ней определяют остаточную коагуляционную активность тромбина. По уровню снижения активности тромбина оценивают активность АТ III в исследуемой плазме.

*Оборудование и материалы:* коагулометр; набор реагентов для определения активности антитромбина III ООО Технология – Стандарт.

*Проведение анализа:*в пробирку вносят 0,4 мл раствора тромбина и прогревают на водяной бане (37оС) в течение 2 мин. Параллельно в кювету коагулометра вводят 0,15 мл разведённой плазмы (или раствора фибриногена) и инкубируют при t 37оС не менее 1 мин.

К раствору тромбина в пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой адсорбированной и дефибринированной плазмы, включают секундомер. Через 2 минуты (точно!) инкубируют при той же температуре 0,1 мл смеси, вносят в кювету коагулометра, содержащую разведённую контрольную плазму и начинают отсчёт времени свёртывания. По калибровочной кривой, построенной с применением коагулометра, определяют активность АТ III в процентах. В норме активность АТ III составляет 80 – 120%.

# 3. Результаты и их обсуждение

## 3.1 Исследование сосудисто–тромбоцитарного гемостаза

Результаты исследования сосудисто – тромбоцитарного гемостаза представлены на рис. 1.

Общее количество тромбоцитов не менялось на протяжении всей стимуляции, достоверно увеличиваясь только к 14 дню после переноса эмбрионов.



Рис. 1. Количество тромбоцитов в эффективных и неэффективных циклах. Здесь и на рис. 2-6 1- стимуляция суперовуляции, 2- день введения хорионического гонадотропина, 3- день переноса эмбриона в полость матки, 4- 14–ый день после переноса эмбриона. Достоверность отличий:

**3.2 Исследование коагуляционного гемостаза**

Результаты исследования коагуляционного гемостаза представлены на рис. 2-5.

Концентрация фибриногена постепенно возрастала, начиная с 5-7 дня стимуляции до дня ПЭ, и сохранялась на уровне в 1,4 раза превосходящем исходный до 14 дня после ПЭ.



Рис. 2. Протромбиновый индекс в эффективных и неэффективных циклах.

Также, начиная с 5-7 дня стимуляции, было отмечено достоверное укорочение тромбинового времени. Увеличение протромбинового индекса и укорочение АЧТВ, свидетельствующие о повышении активности факторов внешнего и внутреннего пути свертывания, происходило только к 14 дню. Можно предположить, что полученные изменения являются результатом длительного воздействия высоких концентраций половых гормонов.



Рис. 3. АЧТВ в эффективных и неэффективных циклах.



Рис 4. Тромбиновое время в эффективных и неэффективных циклах.



Рис. 5. Концентрация фибриногена в эффективных и неэффективных циклах.

Таким образом, в результате проведения стимуляции суперовуляции происходит усиление коагуляционного потенциала крови за счет увеличения концентрации основного субстрата свертывания крови – фибриногена и повышения суммарной активности факторов, составляющих как внешний, так и внутренний путь активации гемостаза.

**3.2 Исследование антикоагулянтного звена гемостаза**

Результаты исследования антикоагуляционного гемостаза представлены на рис. 6.

АТ III практически не изменялся на всем протяжении исследования. Отмечалось лишь достоверное снижение активности АТ III (на 5,1%) ко дню введения овуляторной дозы ХГ (пик стимуляции и уровня эстрадиола).



Рис. 6. АТ III в эффективных и неэффективных циклах.

На фоне наступившей беременности и высокого уровня половых гормонов поддерживаются более значимые изменения гемостазиологических показателей, что может неблагоприятно влиять на развивающуюся беременность. При увеличении коагулятивной активности крови можно наблюдать нарушение (снижение) кровотока в матке, что затрудняет нормальное развитие эмбриона. По-видимому, у пациенток с наступившей беременностью в циклах ЭКО и ПЭ на 14 день после переноса эмбрионов развивается состояние, потенциально опасное для развития тромботических осложнений и ДВС-синдрома. Тем не менее, и в случае отсутствия беременности при ЭКО и ПЭ большинство параметров значительно отличались от исходного уровня.

**Выводы**

В результате исследования были отмечены следующие изменения в системе гемостаза:

1. Усиление прокоагулянтных свойств сосудистого эндотелия,

2. Наиболее выраженные изменения претерпевают такие лабораторные параметры гемостаза, как:

а. повышение уровня фибриногена,

б. укорочение тромбинового времени.

3. У данных больных развитие беременности сопряжено с повышенным риском.