

На правах рукописи

АБДУРАХМАНОВА

Нигора Фаруховна

ДИАГНОСТИКА РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ В
ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВАНИИ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКАНОВ ЭНДОМЕТРИЯ

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
кандидат биологических наук

Долгушина Наталья Витальевна
Зиганшина Марина Михайловна

Официальные оппоненты:

Вартанян Эмма Врамовна - доктор медицинских наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии

Тапильская Наталья Игоревна - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных репродуктивных технологий Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отто

Ведущая организация:

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «28» января 2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Abdurahmanova%20N.F._diss.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) путем дифференцированного подхода к выбору протокола овариальной стимуляции для получения адекватного числа ооцитов и эмбрионов, индивидуализации способов фертилизации ооцитов (применение интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ), вспомогательного хетчинга), внедрения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) и других методов селективного отбора лучших эмбрионов для переноса (ПЭ) в полость матки, частота наступления беременности в расчете на один цикл составляет около 30-40% и не имеет тенденции к увеличению (Регистр Российской ассоциации репродукции человека, 2017 г.).

Для достижения желанной беременности необходимо одновременное присутствие двух признаков: кариотипически нормального эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия с высоким потенциалом имплантации эмбриона. Нарушение рецептивности эндометрия является одним из наиболее значимых факторов, обуславливающих неудачи в программах ВРТ (Mahajan N., Sharma S., 2016; Craciunas L. et al., 2019).

Считается, что рецепция эндометрия зависит от его толщины. Эндометрий недостаточной толщины может быть причиной снижения вероятности наступления беременности (Абдурахманова Н.Ф и соавт., 2019). В 1989 г. Gonen Y, *et al.* впервые предложили использовать пороговую толщину эндометрия как прогностический критерий для возможного наступления и развития беременности (Gonen Y. et al., 1989). С этого времени понятие минимальной толщины эндометрия стало широко использоваться различными исследователями. Считается, что эндометрий толщиной менее 7 мм в период окна имплантации значительно уменьшает шансы на наступление беременности (Oliveira J.B. et al., 1997). Однако данные о

прогностической ценности этого значения в программах ВРТ противоречивы. Ряд исследователей не находят корреляции между толщиной эндометрия и исходами программ ВРТ (Khalifa E. et al., 1992; Serafini P. et al., 1994). Другие исследователи выявили значимую зависимость между толщиной эндометрия и частотой наступления беременности (Sher G. et al., 1991; Check J.H. et al., 1993).

Многочисленные исследования, посвященные изучению рецептивности эндометрия, свидетельствуют о том, что в современной клинической практике нет ни одного маркера, который имел бы высокую диагностическую точность для оценки и коррекции состояния рецепторного аппарата эндометрия. Это подтверждено данными мета-анализа 2019 г., проведенного Крациунас и коллегами, включившего данные 163 исследований и почти 89 000 пациенток (Стасиунас L. et al., 2019).

Одним из наиболее многообещающих подходов к оценке рецептивности эндометрия является изучение состава гликокаликса эндометриального эпителия и бластоцисты (гликотипа), поскольку именно гликаны гликокаликса, составляют молекулярную границу между клетками и отвечают за межклеточные контакты, прикрепление, миграцию и инвазию клеток. Установлено, что: (1) состав гликанов меняется в зависимости от фазы менструального цикла (Aplin J.D., 1991; Clark G.F., 2015); (2) гликаны полилактозаминового типа составляют основную фракцию в гликоконъюгатах эндометриального эпителия (Dutt A. et al., 1987); (3) ключевые гликаны, ответственные за контакт и прикрепление бластоцисты у человека, это дифукозилированные олигосахариды (Le^Y) (Li Y. et al., 2009; Gu J. et al., 2016), а также сульфатированные и сиалированные олигосахариды, представленные в гликокаликсе, в том числе в составе углеводных цепей высокогликозилированного муцина MUC-1, синтезируемом эндометриальным эпителием (Meseguer M. et al., 2001; Horne A.W. et al., 2005); (4) экспрессия MUC-1 носит прогестерон-зависимый характер (Meseguer M. et al., 2001; Horne A.W. et al., 2005). Этот подход

успешно реализуется на клеточных и животных моделях, но относительно человека существуют ограниченные данные. Это, прежде всего, относится к описанию гликотипа (совокупности гликанов, ассоциированных с плазматической мембраной клетки, т.е. гликокаликса) эндометриальной ткани, его связи с рецептивностью эндометрия, и, как следствие, его роли в наступлении беременности, в том числе в программах ВРТ. Оценка гликотипа эндометрия в зависимости от его толщины и исходов программ ВРТ является новой и актуальной клинической задачей.

Степень разработанности темы исследования

Рецепторный статус эндометрия при условии наличия эмбрионов хорошего качества является ключевым фактором, определяющим наступление беременности. Отсутствие точных тест-систем, оценивающих рецептивностью эндометрия, не позволяет определить вероятность наступления беременности и провести необходимую терапию перед ПЭ в программах ВРТ. Оценка рецептивности эндометрия на основе изучения состава гликокаликса эндометриального эпителия является одним из наиболее многообещающих подходов к решению данной актуальной проблемы репродуктологии.

Цель исследования

Разработать новый способ диагностики рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий на основании изучения гликотипа эндометрия.

Задачи исследования

1. Проанализировать клинико-лабораторные данные и оценить параметры гаметогенеза и раннего эмбриогенеза у пациентов в зависимости от наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Определить пороговую толщину эндометрия (по данным УЗИ), влияющую на наступление беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

3. Выявить клинико-лабораторные факторы риска, влияющие на толщину эндометрия, у пациенток в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

4. Изучить состояние рецептивности эндометрия в период окна имплантации с помощью иммуногистохимического исследования (экспрессия ER, PR, LIF) у пациенток с бесплодием в зависимости от толщины эндометрия и исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий.

5. Изучить гликотип эндометрия у пациенток с бесплодием в зависимости от толщины эндометрия и исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий.

6. Разработать новый способ диагностики рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием на основании изучения гликотипа эндометрия.

Научная новизна

Научно обоснован новый подход к оценке состояния репродуктивной системы женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия с учетом толщины эндометрия и комплексного определения гликотипа эндометрия, включающего экспрессию гликанов в гликокаликсе поверхностного эпителия и эпителия желез в цикле, предшествующем переносу эмбриона, что позволяет охарактеризовать функциональное состояние эндометрия у пациенток, вступающих в программы ВРТ.

Выявлены иммуногистохимические критерии нарушения рецептивности эндометрия у больных с бесплодием в зависимости от толщины эндометрия.

Выявлены особенности состава гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия, свидетельствующие о наличии патологии рецепторного и секреторного компонента эндометрия, что влияет на эффективность программ ВРТ. Разработаны новые критерии оценки рецептивности эндометрия.

Практическая значимость

Определена пороговая толщина эндометрия, влияющая на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Разработан новый способ диагностики рецептивности эндометрия на основании изучения гликотипа эндометрия, что позволит персонафицировать алгоритм ведения пациенток в программах ВРТ.

Методология и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное обследование супружеских пар, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Пациенты были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Пайпель-биопсия эндометрия проводилась в окно имплантации (на 18-20-й день менструального цикла), предшествующего циклу ВРТ (через 5-7 дней после овуляции) с проведением: гистологического исследования эндометрия; иммуногистохимического исследования эндометрия с определением уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER), прогестеронового рецептора (PR), лейкомиа-ингибирующего фактора (LIF), дифукозилированного гликана Le^Y и α 2,3-сиалогликана МЕСА-79; лектиновая гистохимия эндометрия - изучение паттерна экспрессии углеводных остатков в тканях эндометрия.

Положения, выносимые на защиту

1. Толщина эндометрия менее 8 мм (тонкий эндометрий) оказывает негативное влияние на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий, снижая вероятность наступления беременности в 9,1 раза. Факторами риска, повышающими в 2,6 раз шансы развития тонкого эндометрия, являются хронический эндометрит и повреждения эндометрия при выскабливании полости матки.

2. Экспрессия маркеров рецептивности эндометрия (ER, PR, PR/ER, LIF) в период окна имплантации в цикле, предшествующем переносу

эмбрионов в программах ВРТ, не в полной мере отражает вероятность наступления беременности и не связана с толщиной эндометрия, что свидетельствует о необходимости использования более чувствительных и специфичных тест-систем определения рецептивности эндометрия вне цикла переноса эмбрионов.

3. Комплексный анализ гликотипа эндометрия в цикле, предшествующем переносу эмбриона, позволяет выявить благоприятные прогностические факторы для наступления беременности, которыми являются: более высокий уровень экспрессии гликана МЕСА-79, более низкий уровень экспрессии маннозобогатых гликанов в гликокаликсе поверхностного эпителия эндометрия, более низкий уровень экспрессии гликанов с терминальными остатками N-ацетилгалактозамина в гликокаликсе железистого эпителия эндометрия, а также более низкий уровень экспрессии α 2,6-сиалогликанов, маннозобогатых гликанов и гликана Le^Y в гликокаликсе поверхностного эпителия по сравнению с гликокаликсом эпителия желез эндометрия.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы научной работы, разработке цели и задач исследования, в проведении и интерпретации результатов лабораторных, в том числе гистологического и иммуногистохимического исследований, в обобщении и статистической обработке полученных данных. Автором лично осуществлялось обследование и ведение пар на всех этапах лечения бесплодия методами ВРТ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация работы

Основные положения работы были доложены на 23-м Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья - 2017» в Москве, на 19-м и 20-м Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2018 и 2019» в Москве, на Национальной конференции «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы - 2019» в Москве, на 31st European Congress of Pathology (Ницца, 2019), на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 24 июня 2019 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий д.м.н., профессор Калинина Е.А.), лаборатории клинической иммунологии (заведующий д.м.н. Кречетова Л.В.), патологоанатомического отделения (заведующий д.м.н., профессор Щеголев А.И.) ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.). Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи - в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 155 страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками, 49

таблицами. Библиографический указатель включает 15 работ на русском языке и 201 работу на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В исследование случай-контроль были включены 172 пары, обратившиеся для лечения бесплодия методами ВРТ, которые были стратифицированы на группы в отношении 1:3 в зависимости от наступления беременности. Пары случай-контроль подбирались на основании уравнивания по 2-м признакам: врачу акушеру-гинекологу и врачу-эмбриологу, выполнявших лечение бесплодия в данной программе ВРТ. Пациентки, у которых в дальнейшем были выявлены критерии исключения, а также не предоставившие полной информации о данных анамнеза и лабораторных исследований, были исключены из анализа. Группу 1 составили 49 пациенток с наступившей беременностью, группу 2 – 111 пациенток, у которых беременность не наступила. После определения пороговой толщины эндометрия пациентки дополнительно были разделены еще на 2 группы: группа А - 69 пациенток с нормальной толщиной эндометрия по данным ультразвукового исследования (УЗИ), группа Б - 85 пациенток с тонким эндометрием по данным УЗИ.

Критериями включения в исследование были: нормальный кариотип супругов, возраст пациентки 18-40 лет, индекс массы тела (ИМТ) пациентки 18-29,9 кг/м², протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ), оплодотворение методом ИКСИ, селективный перенос одной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после забора ооцитов, перенос бластоцисты в «свежем» цикле, единый протокол поддержки посттрансферного периода (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки вагинально), информированное согласие на включение в исследование. Критериями не включения в исследование были: наличие противопоказаний к ВРТ, в том числе генитального эндометриоза III-IV степени, миомы матки больших размеров, опухолевых и опухолевидных образований яичников,

тяжелой экстрагенитальной патологии, онкологических заболеваний, аномалии строения внутренних половых органов, синдром поликистозных яичников, преждевременная недостаточность яичников, выраженная патоспермия у партнера. Критериями исключения из исследования были: ПГТ, ВРТ с донорским ооцитом или суррогатной мамой, «бедный» ответ на овариальную стимуляцию, отсутствие бластоцист отличного качества в данном протоколе ИКСИ, осложнения при проведении ВРТ (развитие синдрома гиперстимуляции яичников средней или тяжелой степени, кровотечение в брюшной полости, воспалительные осложнения на фоне овариальной стимуляции в изучаемом цикле ВРТ), отказ от участия в исследовании.

Специальные методы исследования включали пайпель-биопсию эндометрия в окно имплантации с проведением: гистологического исследования эндометрия; иммуногистохимического исследования эндометрия с определением уровня экспрессии ER, PR, LIF, Le^Y и MECA-79; лектиновой гистохимии эндометрия - изучения паттерна экспрессии углеводных остатков в тканях эндометрия по окрашиванию углеводсвязывающими лектинами: *Maackia Amurensis* Lectin II (MALII), *Sambucusnigra lectin* (SNA), *Erythrin Cristagalli* Lectin (ECL), *Ulex Europaeus* Agglutinin I (UEAI), Concanavalin A (ConA), и *Vicia Villosa* Lectin (VVL). Дополнительное УЗИ проводилось в цикле, предшествующему циклу овариальной стимуляции: в I фазу менструального цикла (на 5-8-й день) и в период «окна имплантации» (через 5-7 дней после овуляции).

Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ). В качестве триггера овуляции использовался хорионический гонадотропин в дозе 8 000 - 10 000 МЕ. Все зрелые ооциты были оплодотворены методом ИКСИ. Морфологическая оценка ооцитов проведена эмбриологом на 5-е сутки культивирования. Морфологические характеристики эмбрионов учитывали в

соответствии с классификацией Гарднера. К эмбрионам отличного качества были отнесены бластоцисты 4 или 5 класса с качеством внутриклеточной массы и трофэктодермы категории А. ПЭ, ведение посттрансферного периода и диагностика беременности осуществлялись по стандартизированным методикам.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и статистических программ «Statistica V10» (США), и SPSS Statistics 22 (США).

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе были проанализированы клиничко-лабораторные данные, особенности овариальной стимуляции и эмбриологические характеристики пациенток групп 1 и 2. Не было выявлено значимых отличий за исключением более низкой заболеваемости полипами эндометрия и большего числа полученных бластоцист отличного качества, которое было отмечено в группе пациенток с наступившей беременностью. Также при проведении УЗИ в «окно имплантации» в цикле, предшествующем овариальной стимуляции и ПЭ, у пациенток с наступившей беременностью была значимо большая толщина эндометрия ($9,3 \pm 0,9$) мм по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила ($7,2 \pm 0,9$) мм ($p < 0,0001$) (Рисунок 1).

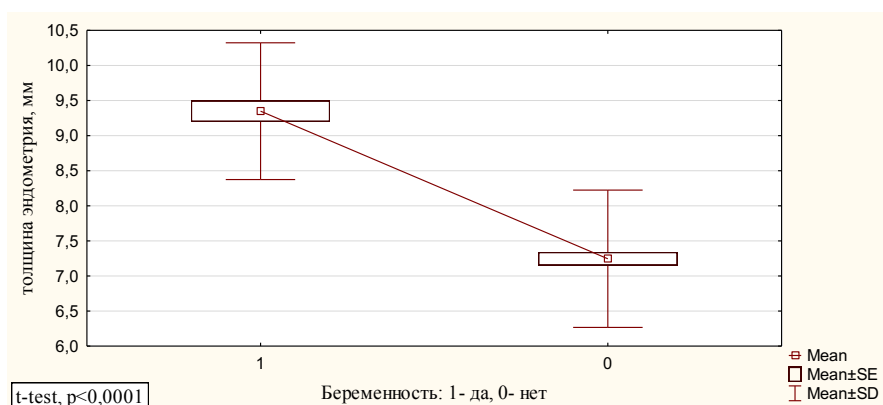


Рисунок 1. Толщина эндометрия по данным УЗИ у пациенток групп 1 и 2.

На втором этапе с помощью метода логистической регрессии был выявлен пороговый уровень толщины эндометрия, при котором вероятность наступления беременности, а также достоверность модели и площадь под кривой (AUC) были максимальными, который составил 8,0 мм (AUC=86,7%, чувствительность (Se)=97,7%, специфичность (Sp)=75,7%). Отношение шансов (ОШ_{кор}) наступления беременности в зависимости от толщины эндометрия с учетом полученных бластоцист отличного качества составило 9,1 (95% ДИ=4,3; 19,3). Была получена следующая формула прогноза наступления беременности в зависимости от толщины эндометрия и числа полученных бластоцист (Формула 1).

$$P(B) = \left(\frac{\text{Exp} [-19,4 + 2,2 * \text{Э} + 0,2 * B]}{1 + \text{Exp} [-19,4 + 2,2 * \text{Э} + 0,2 * B]} \right) * 100\%$$

где P (B) – вероятность наступления беременности, Exp – экспонента, Э – толщина эндометрия в мм, B – число бластоцист отличного качества

Формула 1. Вероятность наступления беременности в зависимости от толщины эндометрия и числа полученных бластоцист отличного качества.

Например, пациентка с М-ЭХО=9 мм и числом полученных бластоцист отличного качества = 5 имеет вероятность наступления беременности 80%. А пациентка с М-ЭХО=5 мм и числом полученных бластоцист отличного качества = 2 имеет вероятность наступления беременности всего 3%.

На третьем этапе были оценены клиничко-лабораторные факторы риска, способствующие развитию тонкого эндометрия. На основании выявленной пороговой толщины эндометрия пациентки были разделены на 2 группы: пациентки с толщиной эндометрия менее 8 мм (с тонким эндометрием, группа Б, n=85) и пациентки с эндометрием равным или более 8 мм (с нормальным эндометрием, группа А, n=69). Выявленными факторами риска тонкого эндометрия были: самопроизвольные выкидыши и полипы эндометрия с полипэктомией в анамнезе. ОШ развития тонкого эндометрия в зависимости от числа самопроизвольных выкидышей в анамнезе составило

2,62 (95% ДИ=1,33; 5,13), в зависимости от наличия полипов эндометрия - 2,59 (95% ДИ=1,18; 5,86).

На четвертом этапе 32 пациенткам была проведена пайпель-биопсия эндометрия в окно имплантации цикла, предшествующего циклу ВРТ с проведением гистологического исследования и ИГХ эндометрия. На основании толщины эндометрия и наступления беременности пациентки были стратифицированы на 3 группы: группа 1А (n=12) - пациентки с нормальным эндометрием, у которых беременность наступила; группа 2А (n=6) - пациентки с нормальным эндометрием, у которых беременность не наступила; группа 2Б (n=14) - пациентки с тонким эндометрием, у которых беременность не наступила. При гистологическом исследовании эндометрий во всех случаях соответствовал средней стадии секреции и не отличался между группами пациенток. При ИГХ не было получено статистически значимой разницы в изучаемых параметрах рецептивности в зависимости от наступления беременности и толщины эндометрия. При наступлении беременности имел место тренд к незначительному повышению экспрессии ER и PR во всех тканях эндометрия, повышению соотношения PR/ER в эпителии и понижению - в строме эндометрия, незначительному повышению экспрессии LIF в поверхностном эпителии и строме эндометрия. При нормальной толщине эндометрия отмечалась повышенная экспрессия ER, и пониженная экспрессия PR во всех тканях эндометрия, что отразилось на соотношении PR/ER, которое было ниже в железах и строме эндометрия (Рисунок 2).

На пятом этапе, был исследован гликотип эндометриальной ткани у пациенток с тонким (<8 мм) и нормальным (≥ 8 мм) эндометрием, и у пациенток с наступившей и не наступившей беременностью. Подобный подход позволил выявить схожие и различные закономерности в экспрессии функциональных остатков гликанов в ткани эндометрия у пациенток в соответствии с данными аспектами. Также изучалась ассоциация экспрессии гликанов с рецептивным эндометрием, толщина которого превышала 8 мм.

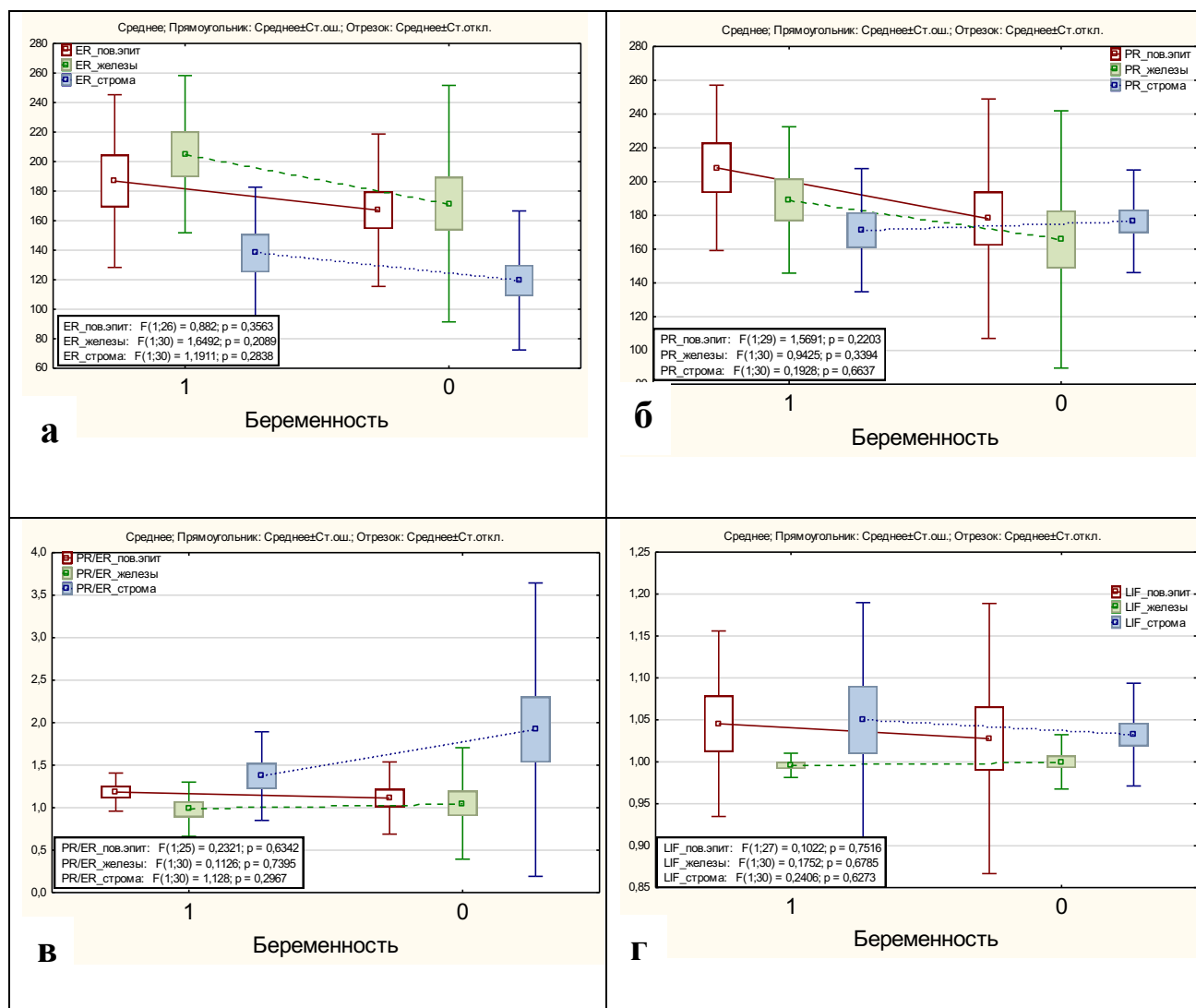


Рисунок 2. Экспрессия ER, PR, LIF и соотношение RP/ER у пациенток в зависимости от толщины эндометрия и наступления беременности в программах ВРТ.

На основании толщины эндометрия 32 пациентки были стратифицированы на 2 группы: группа а (n=18) - пациентки с нормальным эндометрием; группа б (n=14) - пациентки с тонким эндометрием. При исследовании гликотипа эндометрия, окрашивание гликоконъюгатов наблюдалось как в поверхностном эпителии, так и в эпителии желез эндометрия с различной степенью интенсивности. Была установлена повышенная экспрессия исследуемых гликанов и функциональных остатков в составе гликанов в гликокаликсе поверхностного эпителия по сравнению с

гликокаликсом эпителия желез эндометрия. Наиболее выражена эта закономерность у пациенток с тонким эндометрием (Рисунок 3).

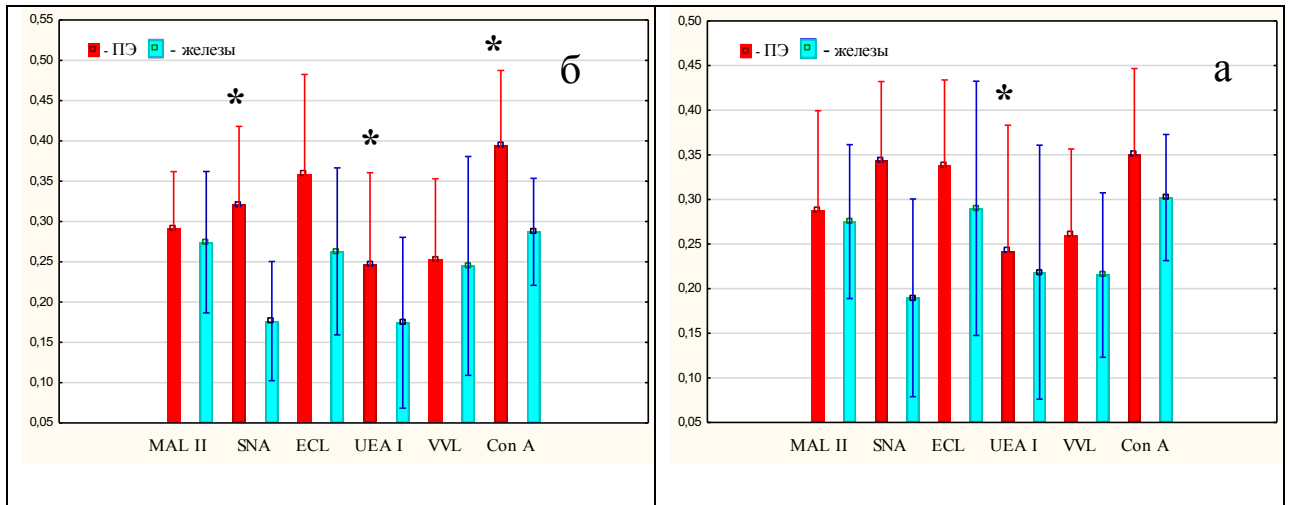


Рисунок 3. Окрашивание лектинами гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия в группе б и в группе а.

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в группах а и б в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия представлены в таблице 1. Единственным выявленным отличием было значимое снижение содержания гликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии у пациенток с тонким эндометрием (Рисунок 4). В эпителии желез не было выявлено значимой разницы в окрашивании лектинами гликоконъюгатов, образующих гликокаликс, между пациентками с тонким и нормальным эндометрием.

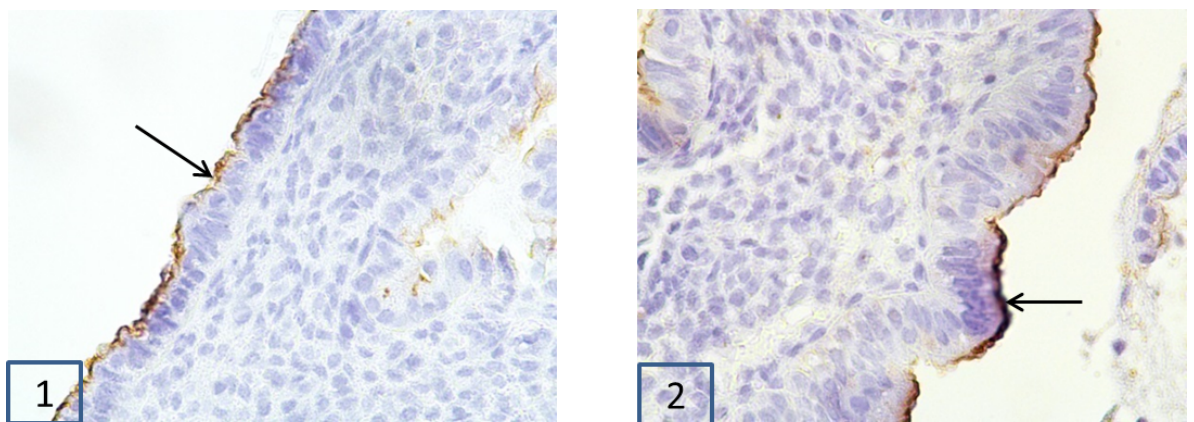


Рисунок 4. Окрашивание сульфатированного $\alpha 2,3$ -сиалогликана МЕСА-79 анти-МЕСА-79 антителами в поверхностном эпителии пациенток группы а (2) и группы б (1).

Окрашивание лектинами и антителами гликокаликса эндометрия
в группах а и б в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия

	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	p-уровень
Поверхностный эпителий эндометрия			
Лектины			
MAL II	0,29±0,07 (0,18-0,41)	0,28±0,11 (0,14-0,52)	0,9110
UEA I	0,24±0,11 (0,06-0,50)	0,24±0,14 (0,07-0,59)	0,9325
SNA	0,32±0,09 (0,14-0,44)	0,34±0,08 (0,21-0,52)	0,4953
ECL	0,35±0,12 (0,11-0,51)	0,33±0,09 (0,15-0,52)	0,5973
ECL + НМД	0,51±0,11 (0,24-0,68)	0,57±0,09 (0,39-0,78)	0,1357
VVL	0,25±0,10 (0,15-0,46)	0,26±0,09 (0,10-0,43)	0,8300
Con A	0,39±0,09 (0,26-0,53)	0,35±0,09 (0,15-0,54)	0,2182
Антитела			
Анти-МЕСА-79	0,33±0,07 (0,25-0,48)	0,42±0,11 (0,19-0,65)	0,0332
Анти-Le ^Y	0,25±0,06 (0,15-0,39)	0,22±0,06 (0,12-0,35)	0,1789
Эпителий желез эндометрия			
Лектины			
MAL II	0,27±0,08 (0,15-0,45)	0,27±0,08 (0,15-0,45)	0,9789
UEA I	0,17±0,10 (0,08-0,41)	0,22±0,14 (0,05-0,49)	0,3412
SNA	0,17±0,07 (0,07-0,29)	0,19±0,11 (0,06-0,46)	0,7020
ECL	0,26±0,10 (0,10-0,42)	0,29±0,14 (0,08-0,62)	0,5533
ECL + НМД	0,57±0,28 (0,27-1,49)	0,55±0,10 (0,39-0,72)	0,8289
VVL	0,24±0,13 (0,07-0,53)	0,21±0,09 (0,09-0,38)	0,4688
Con A	0,28±0,06 (0,17-0,44)	0,30±0,07 (0,17-0,40)	0,5462
Антитела			
Анти-МЕСА-79	0,19±0,07 (0,03-0,29)	0,20±0,06 (0,10-0,31)	0,6373
Анти-Le ^Y	0,14±0,06 (0,08-0,34)	0,14±0,06 (0,05-0,27)	0,9659

*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, минимум-максимум, t-тест

Таким образом, пациентки с тонким эндометрием имеют особенности молекулярной и структурно-функциональной организации эндометрия, которые проявляются в измененном паттерне гликозилирования эндометриальной ткани: повышенной экспрессии α 2,6-сиалогликанов (окраска лектином SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и фукозилированных гликанов (Le^Y) в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия. Также для пациенток с тонким эндометрием характерна сниженная в 1,3 раза экспрессия сульфатированного α 2,3-сиалогликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии эндометрия, что может оказывать негативное влияние на имплантацию, поскольку МЕСА-79 опосредует межклеточные взаимодействия.

Далее, на основании факта наступления беременности 32 пациентки были стратифицированы на 2 группы: группа 1 (n=12) - пациентки с наступившей беременностью; группа 2 (n=20) - пациентки с не наступившей беременностью.

Окрашивание гликанов наблюдалось как в поверхностном эпителии, так и в эпителии желез эндометрия с различной степенью интенсивности. В обеих группах отмечалась повышенная экспрессия исследуемых гликанов и функциональных остатков гликанов в составе гликоконъюгатов в гликокаликсе поверхностного эпителия по сравнению с гликокаликсом эпителия желез эндометрия. Наиболее выражена, эта закономерность отмечалась у пациенток с не наступившей беременностью (Рисунок 5).

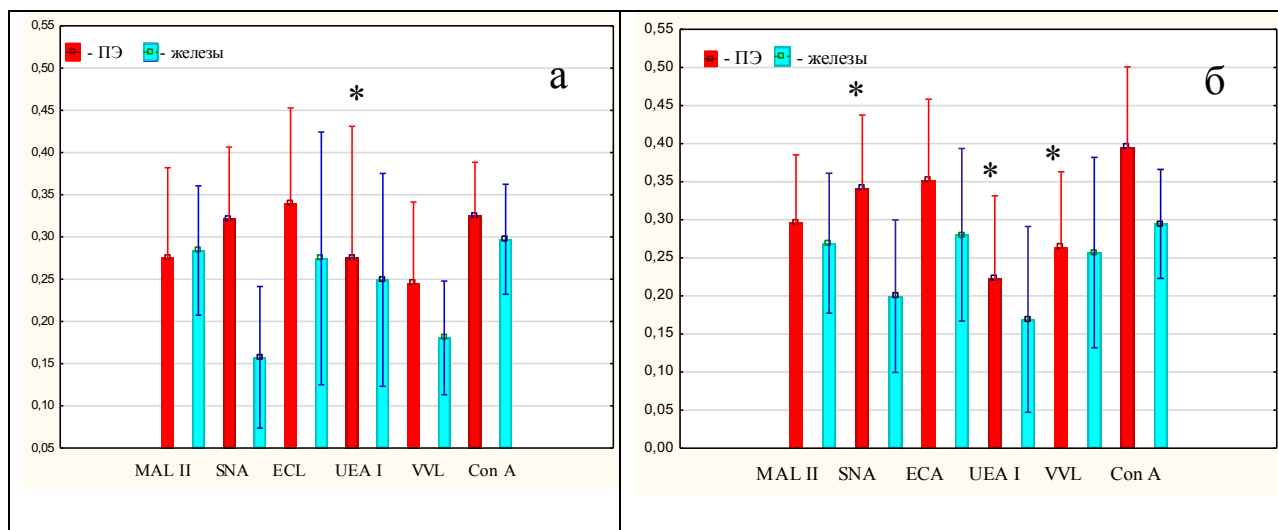


Рисунок 5. Окрашивание лектинами гликокаликса в ПЭ и эпителии желез эндометрия в группе 1 (а) и в группе 2 (б).

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в группах 1 и 2 в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия представлены в таблице 2. У пациенток с наступившей беременностью было выявлено значимо сниженное содержание маннозобогатых гликанов (Con A) в поверхностном эпителии и гликанов с терминальными остатками α -N-ацетилгалактозамина (VVL) в эпителии желез. При этом, в целом, выявлена тенденция отражающая менее

интенсивное окрашивание гликоконъюгатов лектинами в обеих структурах эндометрия.

Таблица 2

Окрашивание лектинами и антителами структур гликокаликса эндометрия в группах 1 и 2 в поверхностном эпителии и железах эндометрия

	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	p-уровень
Поверхностный эпителий эндометрия			
Лектины			
MAL II	0,27±0,10 (0,14-0,52)	0,29±0,08 (0,18-0,47)	0,5606
UEA I	0,27±0,15 (0,08-0,59)	0,22±0,10 (0,06-0,50)	0,2729
SNA	0,32±0,08 (0,21-0,52)	0,34±0,09 (0,14-0,47)	0,5761
ECL	0,34±0,11 (0,15-0,52)	0,35±0,10 (0,11-0,51)	0,7645
ECL + НМД	0,57±0,10 (0,39-0,78)	0,54±0,11 (0,24-0,76)	0,4455
VVL	0,24±0,09 (0,10-0,38)	0,26±0,09 (0,15-0,46)	0,6060
Con A	0,32±0,06 (0,21-0,42)	0,39±0,10 (0,15-0,54)	0,0474
Антитела			
Анти-МЕСА-79	0,41±0,11 (0,19-0,65)	0,37±0,10 (0,25-0,59)	0,3552
Le ^Y	0,23±0,07 (0,12-0,35)	0,24±0,06 (0,15-0,39)	0,8442
Эпителий желез эндометрия			
Лектины			
MAL II	0,28±0,07 (0,19-0,43)	0,27±0,09 (0,15-0,45)	0,6413
UEA I	0,22±0,12 (0,10-0,47)	0,17±0,12 (0,05-0,49)	0,0863
SNA	0,16±0,08 (0,06-0,34)	0,19±0,10 (0,07-0,46)	0,2303
ECL	0,27±0,15 (0,11-0,62)	0,28±0,11 (0,08-0,42)	0,9047
ECL + НМД	0,56±0,09 (0,39-0,71)	0,56±0,24 (0,27-1,49)	0,9541
VVL	0,18±0,06 (0,09-0,32)	0,25±0,12 (0,07-0,53)	0,0610
Con A	0,29±0,06 (0,17-0,40)	0,29±0,07 (0,17-0,44)	0,9108
Антитела			
Анти-МЕСА-79	0,20±0,07 (0,10-0,31)	0,19±0,06 (0,03-0,29)	0,5527
Анти-Le ^Y	0,14±0,07 (0,05-0,27)	0,14±0,06 (0,08-0,34)	0,8442

*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, минимум-максимум, t-тест

Таким образом, пациентки с не наступившей беременностью имеют измененный паттерн гликозилирования эндометриальной ткани: повышенную экспрессию α 2,6-сиалогликанов (SNA) и гликанов с терминальными остатками N-ацетилгалактозамина (VVL) в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия; значимо более высокий (в 1,2 раза) уровень экспрессии маннозобогатых гликанов (Con A) в поверхностном эпителии эндометрия и в 1,4 раза – гликанов, содержащих остатки N-ацетилгалактозамина (VVL) в эпителии эндометриальных желез. Установленные особенности молекулярного состава гликокаликса в

структурах эндометрия у пациенток с неудачами имплантации, могут свидетельствовать о вероятном наличии изменений гликанов рецепторного аппарата эндометрия, который характерен для пациенток с воспалительными изменениями эндометрия и в постменопаузе. Поскольку данные гликаны способны взаимодействовать с рецепторами иммунных клеток и инициировать эффекторные реакции, вероятно негативное влияние выявленных изменений на рецептивность эндометрия.

На основании выявленных гликомаркеров рецептивности были найдены пороги экспрессии гликанов и составлена шкала рецептивности эндометрия. Были оценены следующие гликомаркеры: α 2,6-сиалогликаны (окраска лектином SNA), маннозобогатые гликаны (ConA), N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны (VVL) и сульфатированные α 2,3-сиалогликаны МЕСА-79, а также дифукозилированный гликан Le^Y. Пороговым уровнем экспрессии маннозобогатых гликанов (ConA) в поверхностном эпителии, отличающим пациенток с наступившей беременностью и отсутствием беременности, было значение 0,39. При уровне экспрессии маннозобогатых гликанов <0,39, шансы наступления беременности увеличивались в 7,5 раз (ОШ=7,50; 95% ДИ=1,29; 57,92). Чувствительность модели = 83,3%, специфичность = 60,0%, AUC=75,0%. Пороговым уровнем экспрессии сульфатированного α 2,3-сиалогликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии, отличающим пациенток с наступившей беременностью и отсутствием беременности, было 0,42. При уровне МЕСА-79 \geq 0,42, шансы наступления беременности увеличивались в 8,3 раза (ОШ=8,27; 95% ДИ=1,32; 99,17). Чувствительность модели = 92,8%, специфичность = 61,1%, AUC=78,0%. Пороговым уровнем экспрессии N-ацетилгалактозамин-терминированных гликанов (VVL) в железистом эпителии, отличающим пациенток с наступившей беременностью и отсутствием беременности, было 0,18. При уровне экспрессии N-ацетилгалактозамин-терминированных гликоконъюгатов <0,18, шансы наступления беременности увеличивались в 5,6 раз (ОШ=5,57; 95% ДИ=1,09; 31,18). Чувствительность модели = 75%,

специфичность = 65%, AUC=73,0%. Пороговым уровнем разницы между поверхностным и железистым эпителием в экспрессии α 2,6-сиалогликанов (SNA) установлено значение 0,17. При разнице между поверхностным и железистым эпителием в экспрессии α 2,6-сиалогликанов $<0,17$, шансы наступления беременности увеличивались в 3,7 раз (ОШ=3,67; 95% ДИ=1,04; 14,94). Чувствительность модели = 75%, специфичность = 55%, AUC=68,0%. Пороговым уровнем разницы между поверхностным и железистым эпителием в экспрессии маннозобогатых гликанов (ConA) было значение 0,06. При разнице между поверхностным и железистым эпителием по экспрессии этих гликоконъюгатов $<0,06$, шансы наступления беременности увеличивались в 5,6 раз (ОШ=5,57; 95% ДИ=1,09; 31,18). Чувствительность модели = 75%, специфичность = 65%, AUC=73,0%. Пороговым уровнем разницы между поверхностным и железистым эпителием по экспрессии гликана Le^Y установлено 0,12. При разнице между поверхностным и железистым эпителием $<0,12$, шансы наступления беременности увеличивались в 6,3 раза (ОШ=6,30; 95% ДИ=1,27; 31,90). Чувствительность модели = 64,3%, специфичность = 59,4%, AUC=70,0%.

На основании полученных ОШ наступления беременности в зависимости от выявленных гликомаркеров рецептивности была разработана шкала рецептивности эндометрия. Для этого рассчитанные ОШ были округлены и ранжированы в порядке их возрастания: гликоэпитоп МЕСА-79 в поверхностном эпителии = 8,5; маннозобогатые гликаны в поверхностном эпителии = 7,5; гликан Le^Y между поверхностным и железистым эпителием = 6,5; N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны в железистом эпителии = 5,5; маннозобогатые гликаны между поверхностным и железистым эпителием = 5,5; α 2,6-сиалогликаны между поверхностным и железистым эпителием = 3,5. Далее каждому из ОШ был предан относительный вес, начиная с ОШ α 2,6-сиалогликанов, приняв его за единицу: α 2,6-сиалогликаны=1, N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны =1,5, маннозобогатые гликаны между поверхностным и железистым

эпителием =1,5, гликан Le^Y =2, маннозобогатые гликаны в поверхностном эпителии =2, гликоэпитоп МЕСА-79 =2,5. Максимальный балл согласно разработанной шкале, составил 10,5. Поэтому, мы допустили, что высокая рецептивность эндометрия будет определяться значением большим или равным медиане распределения, т.е. 5,5. Число баллов менее 5,5 свидетельствует о низкой рецептивности эндометрия.

ВЫВОДЫ

1. В программах ВРТ вероятность наступления беременности снижается в 9,1 раза у пациенток с толщиной эндометрия менее 8 мм (тонким эндометрием). Средняя толщина эндометрия у пациенток с наступившей в результате переноса эмбрионов беременностью составляет (9,3±0,9) мм по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила - (7,2±0,9) мм (p<0,0001).

2. Шансы развития тонкого эндометрия увеличиваются в 2,62 раза (95% ДИ=1,33; 5,13) при выскабливании полости матки вследствие самопроизвольных выкидышей, и в 2,59 раза (95% ДИ=1,18; 5,86) при наличии полипов эндометрия в анамнезе.

3. Толщина эндометрия, измеренная в окно имплантации не в цикле переноса эмбрионов, не является точным прогностическим критерием эффективности программ ВРТ, что подтверждается отсутствием разницы в экспрессии маркеров рецептивности эндометрия (ER, PR, PR/ER, LIF).

4. Пациентки программ ВРТ с тонким эндометрием и неудачами имплантации имеют измененный паттерн гликозилирования эндометриальной ткани, который проявляется повышенной экспрессией α2,6-сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и гликана Le^Y в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия.

5. Для пациенток с тонким эндометрием характерна сниженная в 1,3 раза экспрессия α2,3-сиалогликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии эндометрия, что может оказывать негативное влияние на имплантацию,

поскольку МЕСА-79 является лигандом L-селектина и опосредует межклеточные взаимодействия.

6. У пациенток с не наступившей беременностью эндометрий окна имплантации в цикле, предшествующем циклу овариальной стимуляции и переноса эмбрионов, характеризуется значимо более высоким (в 1,2 раза) уровнем экспрессии маннозобогатых гликанов (ConA) в поверхностном эпителии эндометрия и в 1,4 раза функциональных остатков N-ацетилгалактозамина (VVL) в эпителии эндометриальных желез, что свидетельствует о формировании активированного фенотипа эндометрия, поскольку данные гликаны являются лигандами лектинов С-типа, которые входят в систему распознавания паттернов врожденного иммунитета и инициируют развитие эффекторных реакций, что негативно влияет на рецептивность эндометрия.

7. Благоприятным фактором для наступления беременности в циклах ВРТ является более низкий (в 1,2 раза) уровень экспрессии маннозобогатых гликанов (ConA) и более высокий уровень экспрессии (в 1,3 раза) α 2,3-сиалогликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии эндометрия, более низкий (в 1,4 раза) уровень экспрессии функциональных остатков N-ацетилгалактозамина (VVL) в железистом эпителии эндометрия, а также более низкий уровень экспрессии α 2,6-сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и α 1,2-фукозилированного гликана Le^Y в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для расчета вероятности наступления беременности в программах ВРТ можно использовать формулу, основанную на 2-х основных составляющих успеха программ ВРТ - толщины эндометрия и числа полученных blastocysts отличного качества.

$$P(B) = \left(\frac{\text{Exp} [-19,4+2,2*\Theta+0,2*B]}{1+\text{Exp} [-19,4+2,2*\Theta+0,2*B]} \right) * 100\%$$

где P (B) – вероятность наступления беременности, Exp – экспонента, Θ – толщина эндометрия в мм, B – число бластоцист отличного качества

2. Измерение толщины эндометрия, и его пайпель-биопсия для оценки рецептивности на основании иммуногистохимического исследования (экспрессии ER, PR, PR/ER, LIF) не в цикле переноса эмбрионов являются мало информативными методами диагностики состояния эндометрия и прогноза наступления беременности в программах ВРТ.

3. Рецептивность эндометрия может быть оценена с помощью пайпель-биопсии эндометрия с проведением лектиновой гистохимии и иммуногистохимии с определением уровня экспрессии $\alpha 2,3$ -сиалогликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии эндометрия, функциональных остатков N-ацетилгалактозамина (VVL) в железистом эпителии, а также $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и гликана Le^Y в поверхностном и железистом эпителии. Более высокий уровень МЕСА-79 и низкий уровень маннозобогатых гликанов (ConA) в поверхностном эпителии и функциональных остатков N-ацетилгалактозамина (VVL) в железистом эпителии являются хорошим прогностическим признаком наступления беременности. Также благоприятным фактором является более низкая разница в уровнях экспрессии в поверхностном эпителии по сравнению с железистым эпителием $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и гликана Le^Y.

4. На основании выявленных гликомаркеров рецептивности была разработана шкала рецептивности эндометрия и определены критерии высокой и низкой рецептивности. Разработанная шкала позволяет идентифицировать пациенток группы высокого риска неудач имплантации на этапе подготовке к программам ВРТ, что позволит лечащим врачам выбирать оптимальную тактику ведения таких пациенток.

Гликомаркер рецептивности	Результат	Баллы
МЕСА-79 в поверхностном эпителии	$\geq 0,42$	2,5
	$< 0,42$	0
маннозобогатые гликаны в поверхностном эпителии	$< 0,39$	2
	$\geq 0,39$	0
Le^Y - дельта между поверхностным и железистым эпителием	$< 0,12$	2
	$\geq 0,12$	0
N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны в железистом эпителии	$< 0,18$	1,5
	$\geq 0,18$	0
маннозобогатые гликаны - дельта между поверхностным и железистым эпителием	$< 0,06$	1,5
	$\geq 0,06$	0
$\alpha 2,6$-сиалогликаны – дельта между поверхностным и железистым эпителием	$< 0,17$	1
	$\geq 0,17$	0

высокая рецептивности эндометрия $\geq 5,5$ баллов,
низкая рецептивность эндометрия - $< 5,5$ баллов

5. У пациенток с низкой рецептивностью эндометрия на основании полученных данных лектиновой гистохимии рекомендована подготовка эндометрия перед программой переноса эмбриона в полость матки для увеличения вероятности наступления беременности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия / Зиганшина М.М., **Абдурахманова Н.Ф.**, Павлович С.В., Гвоздева А.Д., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** – 2017. – № 12. – С. 17-24.
2. Результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с «тонким» эндометрием / **Абдурахманова Н.Ф.**, Гвоздева А.Д., Зиганшина М.М., Долгушина Н.В. // **Гинекология.** – 2019. – Т.21, № 1. – С. 23-27.
3. Рецептивность «тонкого» эндометрия у пациенток в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Куликова Г.В., **Абдурахманова Н.Ф.**, Файзуллина Н.М., Асатурова А.В., Щеголев А.И., Зиганшина М.М., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. –

№ 10 – С. 100-107.

4. Исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с тонким эндометрием / Гвоздева А.Д., Долгушина Н.В., Афян А.И., Абдурахманова Н.Ф., Романов А.Ю. // Материалы XXIII Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы»: Москва, 4-6 апреля, 2017. - С.15-16.

5. Зависимость толщины эндометрия от уровня стероидных гормонов у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий / Гвоздева А.Д., Афян А.И., Абдурахманова Н.Ф., Долгушина Н.В. // Материалы X Юбилейного Регионального научно-образовательного форума «Мать и Дитя» Геленджик, 28–30 июня, 2017.

6. Оценка рецептивности эндометрия с помощью панели биотинилированных лективных с известной углеводной специфичностью / Зиганшина М.М., Файзуллина Н.М., Асатунова А.В., Абдурахманова Н.Ф., Долгушина Н.В. // Мать и дитя: материалы XIX Юбилейный Всероссийского научно-образовательного форума: Москва, 26-28 сентября, 2018. – С.111-112.

7. Перспективы использования гликанов в качестве маркеров для оценки рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием / Абдурахманова Н.Ф., Зиганшина М.М., Файзуллина Н.М., Асатунова А.В., Долгушина Н.В. // Материалы национальной конференции “Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы: Москва, 28 февраля – 1 марта, 2019. - Т.16, № 1., Часть 2.- С.5-7.

8. Новые подходы к оценке рецептивности «тонкого» эндометрия в программах ВРТ / Куликова Г.В., Абдурахманова Н.Ф., Зиганшина М.М., Файзуллина Н.М., Щеголев А.И., Долгушина Н.В. // Материалы XX Всероссийского научного форума «Мать-и-Дитя» Москва, 25 - 27 сентября 2019. - С.149.

9. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия на основе использования шкалы

рецептивности / Куликова Г.В., Абдурахманова Н.Ф., Зиганшина М.М., Файзуллина Н.М., Щеголев А.И., Долгушина Н.В. // Материалы XX Всероссийского научного форума «Мать-и-Дитя» Москва, 25 - 27 сентября 2019. – С.150.

10. Glycans expression in endometrium of infertile patients / Asaturova A., Abdurakhmanova N., Kulikova G., Ziganshina M., Faizullina N., Shchegolev A., Sukhikh G. // Abstracts of 31st European Congress of Pathology Nice, 7-11 September 2019. – S81.