

**Министерство здравоохранения  
Российской Федерации  
федеральное государственное бюджетное учреждение  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ  
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

*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**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Научные руководители:**

**доктор медицинских наук, профессор  
Долгушина Н.В.  
кандидат биологических наук  
Зиганшина М.М.**

**Москва 2019**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	
Современные представления о рецептивности эндометрия.....	12
1.1. Актуальность проблемы бесплодия.....	12
1.2. Понятие тонкого эндометрия и его влияние на репродуктивную функцию женщин.....	13
1.3. Факторы, влияющие на толщину эндометрия.....	14
1.4. Диагностика рецептивности эндометрия.....	16
1.4.1. Гистологическое исследование эндометрия.....	17
1.4.2. Иммуногистохимическое исследование эндометрия.....	18
1.4.3. Молекулярно-генетическое исследование рецептивности эндометрия.....	23
1.4.4. Ультразвуковое исследование эндометрия.....	25
1.4.5. Допплерометрическое исследование матки.....	26
1.5. Гликом и рецептивность эндометрия.....	28
1.6. Терапия тонкого эндометрия и нарушения его рецептивности.....	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Дизайн исследования.....	43
2.2. Критерии включения в исследование.....	46
2.3. Объем выборки.....	47
2.4. Методы исследования.....	48
2.4.1. Общеклинические методы обследования.....	50
2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	51
2.4.3. Гормональное исследование.....	52
2.4.4. Исследование эякулята.....	52
2.4.5. Пайпель-биопсия эндометрия.....	54
2.4.6. Гистологическое исследование эндометрия.....	54
2.4.7. Иммуногистохимическое исследование рецептивности эндометрия ...	54
2.4.8. Иммуноморфологическое исследование гликанов эндометрия.....	56
2.4.9. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов....	58
2.4.10. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение.....	59

2.4.11. Морфологическая оценка эмбрионов .....	60
2.4.12. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода .....	61
2.5. Статистическая обработка полученных данных.....	62
Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ .....	64
3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ .....	64
3.2. Особенности овариальной стимуляции у пациенток в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ .....	69
3.3. Характеристика гаметогенеза и раннего эмбриогенеза у пациентов в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ .....	70
3.4. Пороговая толщина эндометрия, определяющая вероятность наступления беременности в программах ВРТ (многофакторный анализ).....	71
3.5. Клинико-лабораторные факторы, влияющие на толщину эндометрия....	73
3.6. Данные гистологического исследования эндометрия.....	77
3.7. Данные иммуногистохимического исследования рецептивности эндометрия в зависимости от его толщины и наступления беременности в программах ВРТ .....	77
3.8. Иммуно-/гистохимическое исследование гликанов эндометрия.....	86
3.9. Терапия тонкого эндометрия и его нарушенной рецептивности у пациенток в программах ВРТ .....	106
ГЛАВА 4. Обсуждение полученных результатов.....	107
ВЫВОДЫ.....	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
Список сокращений .....	130
Список литературы .....	133

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 [1–4].

Все дело в том, что 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 [5,6]. 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 [7].

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 [8,9]; (2) гликаны полилактозаминового типа составляют основную фракцию в гликоконъюгатах эндометриального эпителия [10]; (3) ключевые гликаны, ответственные за контакт и прикрепление бластоцисты у человека, это дифукозилированные олигосахариды ( $Le^Y$ ) [11,12], а также сульфатированные и сиалированные олигосахариды, представленные в гликокаликсе, в том числе в составе углеводных цепей высоко гликозилированного муцина MUC-1, синтезируемом эндометриальным эпителием [13,14]; (4) экспрессия MUC-1 носит прогестерон-зависимый характер [13,14]. 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.

Считается, что рецепция эндометрия зависит от его толщины. Эндометрий недостаточной толщины может быть причиной снижения вероятности наступления беременности [15]. В 1989 г. Gonen Y, *et al.* впервые предложили использовать пороговую толщину эндометрия как прогностический критерий для возможного наступления и развития беременности [16]. 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 [17]. Однако данные о прогностической ценности этого значения в программах ВРТ противоречивы. Ряд исследователей не находят корреляции между толщиной эндометрия и исходами программ ВРТ [18,19]. Другие исследователи выявили

значимую зависимость между толщиной эндометрия и частотой наступления беременности [20,21]. 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 рецептивность 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 клиничко-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 персонифицировать 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, прогестеронового рецептора, лейкемия-ингибирующего фактора; иммуноморфологического исследования гликанов 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  $\alpha$ 2,6-сиалогликанов, маннозобогатых гликанов и гликана Le<sup>Y</sup> 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 результатов**

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 31<sup>st</sup> European Congress of Pathology (Ницца, 2019), на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП 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 АГП 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 АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты исследования изложены в 10 печатных работах, из которых 3 напечатаны в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК: журналы «Акушерство и гинекология», «Гинекология».

## **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.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.**

### **Современные представления о рецептивности эндометрия**

#### **1.1. Актуальность проблемы бесплодия**

Бесплодие является медицинской проблемой и имеет большую социально-демографическую значимость в системе здравоохранения развитых стран мира. На сегодняшний день в мире насчитывается примерно 186 млн. супружеских пар, страдающих бесплодием [22]. В России доля бесплодных пар в 2016 году составила 16%. Критическим значением распространенности бесплодия, по данным ВОЗ, является показатель 15% [22].

Вспомогательные репродуктивные технологии в большинстве случаев помогают реализовать репродуктивную функцию субфертильным парам. Частота наступления беременности в программах ВРТ достаточно высока и составляет около 30-40% в расчете на один протокол, однако у пар с повторными неудачами имплантации вероятность наступления беременности прогрессивно снижается с каждой последующей попыткой ЭКО [23].

Известно, что для достижения желанной беременности необходимо сочетание двух факторов: кариотипически нормального эмбриона хорошего качества и рецептивного эндометрия с высоким потенциалом имплантации эмбриона. По данным ряда исследователей, доля эмбрионального фактора составляет 1/3 неудач имплантации, в то время как субоптимальная восприимчивость эндометрия и измененный эмбрио-эндометриальный диалог ответственны за оставшиеся 2/3 неудач программ ВРТ [24,25].

## 1.2. Понятие тонкого эндометрия и его влияние на репродуктивную функцию женщин

В 1989 году Gonen Y., *et al.* впервые применил понятие тонкого эндометрия, охарактеризовав им эндометрий толщиной менее 8 мм в конце пролиферативной - начале секреторной фазы менструального цикла [16,26]. В дальнейших исследованиях была отмечена связь толщины эндометрия с бесплодием и невынашиванием беременности, а позже – с эффективностью программ ВРТ [26–31]. Однако, до настоящего времени нет единого мнения о том, какая толщина эндометрия, определяет тонкий эндометрий, и составляет по данным разных исследований от 6 до 8 мм [15,26,31–33]. По данным одного из последних крупных исследований Miwa *et al.* (2009) частота наступления беременности в программах ВРТ у пациенток с эндометрием  $\leq 8$  мм была значительно ниже, чем у пациенток с толщиной эндометрия  $>8$  мм (5,9% по сравнению с 22,4%) [34]. В результате полученных данных толщина эндометрия 8 мм, является пороговой для успешной имплантации эмбриона [26,35–38]. Исходя из этого, эндометрий толщиной менее 8 мм к моменту завершения фолликулярной фазы относят к тонкому эндометрию. Вместе с тем ряд исследователей считает, что для наступления беременности минимальная оптимальная толщина эндометрия должна быть не менее 7 мм [39].

Рост эндометрия, является гормонально-зависимым процессом, требующим соответствующего маточного кровотока [40–43]. Патологические особенности тонкого эндометрия могут быть обусловлены высоким сопротивлением кровотока радиальных маточных артерий [34]. Снижение кровоснабжения способствует снижению роста железистого эпителия, приводя к снижению экспрессии сосудистого эпидермального ростового фактора (VEGF) - ключевого фактора регуляции ангиогенеза эндометрия. Нарушение развития сосудистой сети эндометрия

приводит к нарушению кровотока в эндометрии, результатом которого является его утончение.

### 1.3. Факторы, влияющие на толщину эндометрия

Факторами, оказывающими влияние на толщину эндометрия, могут являться заболевания эндометрия, такие как хронический эндометрит, полипы, гиперпластические процессы эндометрия, эндометриоз. Неудачные попытки в программах ВРТ чаще всего встречаются у женщин с инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), в анамнезе, генитальным инфантилизмом, пороками развития гениталий. В группе риска находятся женщины с высоким паритетом, сопутствующими экстрагенитальными заболеваниями (сахарный диабет). Перенесенные воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), оперативные вмешательства и внутриматочные манипуляции, в том числе внутриматочная контрацепция, диагностические выскабливания, искусственные аборты также негативно влияют на толщину и рецептивность эндометрия.

Хроническое воспаление полости матки, а также механическое повреждение слизистой оболочки матки являются одной из причин развития тонкого эндометрия [44]. Любая процедура, приводящая к травме эндометрия, способствует разрастанию соединительной ткани, которая провоцирует деформирующие/ облитерирующие изменения в полости матки, при которых возможна трансформация нормального эндометрия в атрофичный [45].

В рандомизированном контролируемом исследовании (РКИ) Perez-Medina T. *et al.* продемонстрировали статистически значительное увеличение частоты наступления беременности у женщин после полипэктомии по сравнению с теми, кто этого не сделал (63 против 28%) [46].

Субмукозная лейомиома чаще встречается у женщин, страдающих бесплодием. По данным Matsuzaki S. *et al.*, лейомиомы могут неблагоприятно

влиять на эндометрий и снижать экспрессию НОХА-10 в стромальных клетках эндометрия в период окна имплантации [47].

Внутриматочные спайки способствуют развитию бесплодия, так как препятствуют имплантации эмбриона. У женщин с синдромом Ашермана после рассечения спаек с помощью гистероскопии значительно повышалась частота наступления беременности (468 из 632; 74%) [48].

Гипоэстрогения у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ), является одной из причин развития тонкого эндометрия. Стандартные дозы, разработанные для заместительной гормонотерапии (ЗГТ) являются достаточными для подавления симптомов менопаузы, однако их действие не обеспечивает достижения необходимых параметров в толщине эндометрия, и доплерометрических показателях кровотока маточных артерий. В исследовании O'Donnell RL, *et al.* (2011) увеличение толщины эндометрия до 5 мм наблюдалось после длительной гормонотерапии (12 месяцев) с высоким содержанием гормонов, в то время как при использовании стандартных доз ЗГТ толщина эндометрия увеличивалась до 3 мм [49].

День менструального цикла, схема овариальной стимуляции, а также доза вводимых препаратов в циклах ВРТ влияют на толщину эндометрия. Оценка толщины эндометрия может производиться в разные дни менструального цикла, в “свежем” цикле/программах переноса криоконсервированных эмбрионов, в зависимости от этапа гормональной стимуляции в рамках программы ВРТ, без гормональной стимуляции (в естественном цикле). Получены противоречивые данные о частоте “тонкого” эндометрия в стимулированных циклах с более высокими преовуляторными уровнями эстрадиола по сравнению с программами ВРТ в естественном цикле [50–54].

#### 1.4. Диагностика рецептивности эндометрия

Заболевания полости матки и толщина эндометрия могут влиять на его рецептивность. Под рецептивностью эндометрия подразумевают комплекс структурно-функциональных изменений, определяющих способность эндометрия к имплантации бластоцисты. Имплантация – сложный процесс, находящийся под контролем ряда молекул, в частности гормонов, факторов роста и цитокинов. Процесс имплантации начинается с аппозиции и прикрепления бластоцисты на эпителиальной поверхности эндометрия, сопровождающийся инвазией трофобласта между эпителиальными клетками.

В эндометрии выделяют функциональный и базальный слой. Функциональный слой включает эпителиальные клетки, выстилающие поверхность и покрывающие эпителий желёз, строму, которая состоит из внеклеточного матрикса, фибробластов и иммунных клеток, а также кровеносных сосудов [55]. Именно функциональный слой готовит эндометрий к имплантации эмбриона, в то время как базальный слой ответственен за регенерацию функционального после менструации [56]. Также важной структурой, которая ассоциирована с мембраной покровного эпителия и эпителия желез является гликокаликс, представляющий собой слой высокомолекулярных гликанов, которые являются составной частью гликолипидов и гликопротеинов клеточной мембраны и участвуют в межклеточных контактах при имплантации. Эндометрий претерпевает циклические изменения, которые регулируются действием эндокринных/паракринных сигналов. Также циклические изменения претерпевает гликокаликс: меняется состав и структура функциональных остатков гликанов, которые в разные фазы менструального цикла опосредуют различные процессы. Данные процессы необходимы для успешной имплантации эмбриона [57].

Эндометрий человека восприимчив к имплантации бластоцисты только в течение очень короткого времени лютеиновой фазы, и определяется как окно имплантации [58]. У человека имплантация происходит в среднем через неделю после овуляции или на 7-8-й день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) у женщин с 28-дневным менструальным циклом [59].

#### 1.4.1. Гистологическое исследование эндометрия

Морфологическое исследование эндометрия часто используется для оценки его зрелости. Параметром, изучаемым при гистологическом исследовании, является количество клеток поверхностного эпителия, имеющих **пиноподии** [60]. Пиноподии представляют собой выпячивания мембраны на апикальном полюсе эпителиальных клеток, являются прогестерон-зависимыми структурами и определяются на 19-22-й день менструального цикла методом электронной микроскопии.

В естественном цикле пиноподии появляются на 6-8-й день после овуляции и полностью исчезают на 10-й день после пика ЛГ, сохраняясь на поверхности эпителиальных клеток не более 48 часов [61]. Увеличение числа пиноподий совпадает со снижением прогестероновых рецепторов [62], в то время как назначение антипрогестинов и эстрогенов снижает число пиноподий [63]. Прикрепление бластоцисты *in vitro* происходит на участке экспрессии пиноподий и, возможно, обусловлено тем, что данная структура имеет специфические рецепторы для адгезии молекул, необходимых для процессов имплантации эмбриона [64]. Число и морфология пиноподий коррелирует с исходом имплантации [65].

В стимулированных циклах дата появления зрелых пиноподий в большинстве случаев приходится на 5-й день после овуляции, хотя может варьировать от 4 до 8 дней [61]. Такую вариабельность связывают с различным ответом каждой конкретной пациентки на овариальную стимуляцию. Из полученных данных следует, что созревание эндометрия происходит в

среднем на 1-2 дня раньше, чем в естественных циклах. В исследованиях Nikas G. *et al.* (1999) было показано, что количество пиноподий в стимулированных циклах было меньше по сравнению с естественными циклами у фертильных женщин [66]. В то же время при проведении циклической гормональной терапии эстрогенами и прогестероном для подготовки эндометрия в циклах криопереноса, экспрессия пиноподий отмечена позже [67].

Пиноподии можно рассматривать как потенциальные маркеры рецептивности эндометрия [68], хотя вопрос об их значении в клинической практике до сих пор остается спорным. Согласно мнению Quinn C. *et al.* (2007) пиноподии могут появляться на 15-й день цикла и присутствовать на поверхности клеток в течение всей лютеиновой фазы менструального цикла. Данные, полученные в этом исследовании, показывают, что число клеток, покрытых пиноподиями, составляло от 1 до 50% как у фертильных женщин, так и у пациенток с бесплодием. Кроме того, образование пиноподий может сильно меняться от цикла к циклу у одной женщины [69]. Сходные результаты были получены и в некоторых других исследованиях [70,71].

#### **1.4.2. Иммуногистохимическое исследование эндометрия**

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) эндометрия позволяет обнаружить нарушения экспрессии стероидных рецепторов эндометрия, что позволяет дифференцированно подходить к выбору оптимального гормонального лечения с целью повышения эффективности программ ВРТ.

Процессы имплантации регулируются стероидными гормонами яичников - эстрадиолом (E2) и прогестероном, под действием которых происходит рост фолликулов, овуляция и формирование бластоцисты, а также развитие эндометрия. Гормоны гипофиза (фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ)) стимулируют выработку в яичниках E2 и прогестерона. E2 индуцирует пролиферацию клеток эндометрия преимущественно в первую фазу менструального цикла. В строме эндометрия

под влиянием прогестерона происходит децидуализация, имеющая ключевое значение для имплантации и поддержания беременности. Нарушение данного процесса может послужить причиной таких осложнений как бесплодие, привычный выкидыш, маточно-плацентарные нарушения.

В естественном цикле **эстрогеновые рецепторы  $\alpha$  и  $\beta$  (ER $\alpha$  и ER $\beta$ )** экспрессируются в стромальных и эпителиальных клетках в фазу пролиферации, снижаясь в фазу секреции [72].

**Прогестероновые рецепторы  $\alpha$  (PR $\alpha$ ) и  $\beta$  (PR $\beta$ )** экспрессируются в клетках эпителия и стромы в фазу пролиферации, при этом секреция обеих форм в эпителиальных клетках снижается в секреторную фазу, в то время как в строме остается преимущественно PR $\alpha$ . Было доказано, что увеличение экспрессии PR в строме напрямую связано с развитием рецептивности эндометрия [73].

В стимулированных циклах большинство авторов отмечают раннее снижение экспрессии PR и ER в лютеиновой фазе по сравнению с естественным циклом, что позволяет говорить о смещении окна имплантации вперед. В исследовании D. Kurogi *et al.* (2009), в фолликулярную фазу менструального цикла уровень экспрессии PR повышается, в то время как уровень экспрессии ER не изменяется [74]. В исследовании Hadi *et al.* (1994) установлено снижение экспрессии PR после овариальной стимуляции на 4-й день лютеиновой фазы, что не совпадало с морфологическими изменениями эндометрия [75].

Согласно полученным данным, можно предположить, что высокие преовуляторные уровни E2 в рамках программ ВРТ способствуют изменению экспрессии PR (более ранняя) в период перед проведением трансвагинальной пункции (введение овуляторной дозы ХГЧ) [74].

Еще одним важным параметром, изучаемым при ИГХ исследовании эндометрия, является **лейкемия ингибирующий фактор (LIF)**. LIF принадлежит к семейству интерлейкина – 6 (IL-6) и является одним из наиболее значимых цитокинов, необходимых для успешной имплантации

эмбриона [76]. В естественном цикле уровень LIF повышается после овуляции, достигая максимума на 19-й - 25-й день цикла и сохраняясь на высоком уровне до начала менструации. Максимальная экспрессия LIF и его рецептора соответствует появлению зрелых пиноподий на поверхности клеток эндометрия [61]. Обнаружено, что у женщин с бесплодием уровень рецепторов LIF снижен, что может указывать на важную роль этого цитокина в процессе имплантации [77]. Данные об экспрессии LIF в стимулированных циклах немногочисленны и противоречивы. Van der Gaast, *et al.* (2008) не обнаружили значимых различий в экспрессии LIF в естественном цикле и при овариальной стимуляции [78]. Однако, в исследовании, Chen, *et al.* (2008) в стимулированных циклах зарегистрирована сниженная экспрессия LIF в эндометрии [79]. LIF-рецептор (LIFR) экспрессируется в ооцитах и бластоцисте, что позволяет предположить, что эмбрион может быть одной из мишеней данного цитокина [58]. Экспрессия LIFR принимает участие в формировании пиноподий. Более интенсивная экспрессия LIFR наблюдается в железистом эпителии, как до, так и после появления пиноподий [80]. Таким образом, экспрессия LIF и LIFR является важным фактором в формировании пиноподий и имплантации бластоцисты у женщин [81].

Кроме LIF, факторами, которые, возможно, определяют успешную имплантацию человека через усиление восприимчивости эндометрия, являются интегрины, L-селектин, NOXA10, глутаредоксин, гликоделин, различные факторы роста, металлопротеиназы (ММР) и муцины.

**Интегрины** это трансмембранные клеточные рецепторы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом и передающие различные межклеточные сигналы в период окна имплантации. По средствам интегринов происходит контакт между клетками трофобласта и внеклеточным матриксом, и компонентами базальной мембраны. В эндометрии человека на 20-24-й день менструального цикла экспрессируются три интегрин:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ . Интегрин  $\alpha 1\beta 1$  действует как рецептор для фибронектина и коллагена и вовлечен в процесс инвазии [82]. Интегрин  $\alpha 4\beta 1$  играет роль в процессе

децидуализации [83]. Соединение интегрина  $\alpha\upsilon\beta 3$  с лигандом остеопонтином, секретлируемым железами эндометрия, потенцирует начало инвазии трофобласта [60].

**L-селектин** участвует во взаимодействии между эмбрионом и материнской тканью [84]. Лиганды L-селектина присутствуют в большом количестве на поверхности пиноподий во время лютеиновой фазы у фертильных женщин и создают благоприятные условия для прикрепления бластоцисты [67].

**НОХА10** - фактор транскрипции, который регулирует образование пиноподий [67]. Высокая экспрессия НОХА10 защищает эпителиальные клетки от апоптоза [85]. НОХА10 может также влиять на экспрессию интегринов, эстрогеновых рецепторов, инсулиноподобного фактора роста и рецепторов простагландина [86].

**Глютаредоксин** обладает антиоксидантными свойствами, защищает эндометрий и эмбрион от оксидативного стресса, а также защищает эпителиальные клетки от апоптоза [87]. Его высокая экспрессия отмечена в пиноподиях.

**Гликоделин** является иммунологическим фактором, продукция которого возрастает в период окна имплантации [87]. Данный белок секретруется децидуальными железами, обнаруживается в фаллопиевых трубах, яичниках, везикулярных железах и костном мозге [87]. Создает благоприятные условия для роста пиноподий [88].

**Гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (НВ-EGF)** относится к семейству эпидермальных факторов роста [89] и экспрессируется в эндометрии человека в момент имплантации [90]. Установлено, что экспрессия мРНК данного фактора достигает наивысшей точки экспрессии непосредственно перед окном имплантации [60]. Предполагается, что данный фактор может непосредственно опосредовать имплантацию бластоцисты [89]. Растворимая форма гепарин-связывающего эпидермального фактора роста –

(HB-EGF) увеличивает скорость хетчинга бластоцисты, активирует рост и развитие трофобласта, ингибирует его апоптоз [91].

**Инсулиноподобный фактор роста связывающий протеин-1 (IGFBP-1)** - белок, широко представленный в эндометрии и экспрессируемый стромальными клетками, участвующий в процессах межклеточных взаимодействий клеток трофобласта (миграция, адгезия и инвазия) совместно с  $\alpha 5\beta 1$ -интегрином. IGFBP-1 ограничивает действие IGF-2, способствующего чрезмерной инвазии трофобласта, и таким образом снижает риск развития трофобластической болезни и возникновения патологии плаценты [61].

**Эпидермальный фактор роста (EGF) и тканевой фактор роста (TGF)** также задействованы в процессе имплантации: они стимулируют пролиферацию клеток эндометрия и способствуют адгезии клеток трофобласта к экстрацеллюлярному матриксу [92].

Ключевые регуляторы проницаемости сосудов: матриксные металлопротеиназы (MMP), фактор роста фибробластов (FGF), EGF и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), оксид азота участвуют в регуляции циклического ангиогенеза [93].

**VEGF** в наибольшей степени способствует проницаемости кровеносных сосудов и пролиферативной активности эндотелиальных клеток, подавляет апоптоз, стимулирует высвобождение оксида азота и простациклина из эндотелиальных клеток, что способствует вазодилатации [94]. Процессы дифференцировки, миграции и инвазии трофобласта на ранних стадиях имплантации регулируются VEGF. В исследовании *Miwa et al.* (2009) выявили корреляцию между тонким эндометрием (<8 мм) и снижением уровня экспрессии VEGF, что в свою очередь коррелировало со сниженным эндометриальным кровотоком [34].

Реформирование соединительной ткани происходит под действием MMP и оказывает значительное воздействие на рецептивность эндометрия. Почти все MMP продуцируются клетками трофобласта и децидуальными клетками, и их экспрессия регулируется половыми гормонами. Сниженная регенерация

эндометрия и соответственно низкая его рецептивность, коррелирует с измененной экспрессией MMP, в частности MMP-2 и MMP-9. Значимое повышение уровня MMP-2 и MMP-9 выявлено в группе пациенток с многократными неудачными попытками программ ВРТ, идиопатическим бесплодием и невынашиванием беременности, по сравнению с данными контрольной группы, которую составили рожавшие женщины [95,96].

**Муцины**, такие как Muc1, Muc16, и Muc15, являются антиадгезивными молекулами и обеспечивают подходящее место для имплантации эмбриона [97]. Муцин MUC1 - высокомолекулярный, высокогликозилированный протеин, синтезируемый эпителиальными клетками репродуктивного тракта, является основным компонентом слизи, локализованной в апикальной поверхности клеток и в секретах эндометриальных желез [98]. Этот гликопротеин служит барьером для имплантации бластоциты и в период окна имплантации регулирует экспрессию интегринов [99]. Снижение экспрессии MUC16 препятствует адгезии клеток трофобласта к поверхности эпителия [100].

### **1.4.3. Молекулярно-генетическое исследование рецептивности эндометрия**

С появлением технологий микрочипов в последние 10 лет активно изучается функциональная геномика эндометрия. Согласно полученным данным, наиболее результативным в настоящее время является анализ транскриптомных показателей, позволяющий оценить роль эндометриального фактора при нарушении имплантации. На основе данных показателей был создан **тест эндометриальной восприимчивости (ERA)**, с помощью которого можно определить время возникновения окна имплантации у каждой конкретной пациентки, а также исследовать эффект различных методов лечения на рецептивность эндометрия. Этот тест содержит 238 генов и сравнивает транскриптомный профиль исследуемого образца с контрольными

образцами, полученными на 7-й день после пика ЛГ в естественном цикле или спустя 5 дней после приема прогестерона в цикле ЗГТ [101]. По мнению разработчиков, ERA-тест позволяет подтвердить нормальную рецептивность эндометрия со специфичностью 88% и чувствительностью 99% [102]. Другие исследователи предлагают для оценки рецептивности эндометрия исследовать экспрессию 179 генов, данная система получила название RAGs.

Определению диагностического и клинического значения ERA у пациенток с повторными неудачами имплантации было посвящено проспективное многоцентровое, клиническое исследование Ruiz-Alonso, *et al.* (2013). Данное исследование показало, что 74,1% пациенток с повторными неудачами имплантации имели рецептивный эндометрий, у 25,9% эндометрий оказался нерцептивным. Другими словами, у каждой четвертой пациентки причиной нарушения имплантации являлся внутриматочный фактор [103].

Таким образом, ERA оказался более точным и последовательным, чем гистологическое исследование эндометрия, однако еще не получил широкого внедрения в клиническую практику.

Исходя из вышеизложенного, взаимодействие эмбриона с эндометрием характеризуется молекулярным диалогом с участием цитокинов, факторов роста, гормонов и молекул клеточной адгезии, которые могут выступать биохимическими маркерами рецептивности эндометрия. Необходимо дальнейшее изучение роли выше указанных молекул, их влияние на рецептивность, а также требуется проведение исследований по выявлению новых маркеров.

#### 1.4.4. Ультразвуковое исследование эндометрия

Ультразвуковое исследование (УЗИ) является неинвазивным диагностическим методом клинической оценки толщины и структуры эндометрия. УЗ-маркеры размещают на границе между эндометрием и миометрием по передней и задней стенкам, используя продольное сечение матки. Толщина эндометрия меняется в зависимости от фазы цикла: в ранней пролиферативной фазе от 1 до 4 мм, от 4 до 8 мм - в середине пролиферативной фазы, от 8 до 14 мм в перiovуляторном периоде и от 8 до 14 мм в секреторную фазу цикла. Помимо толщины с помощью УЗИ оценивают структуру эндометрия и субэндометриальный кровоток.

В течение менструального цикла наблюдаются структурные изменения эндометрия: его эхо-плотность повышается от низкой до высокой, структура меняется от трехслойной до относительно однородной [104]. В стадии секреции толщина эндометрия является максимальной, может достигать 15-16 мм, функциональный слой становится отечным и сливается с базальным слоем.

Влияние структуры эндометрия на успешность наступления беременности подтверждено многими исследованиями. Lindhard, et al. (2006) изучали структуру эндометрия в день введения хорионического гонадотропина (ХГ) и выявили, что пациентки с трехслойной структурой эндометрия имеют большую частоту наступления беременности по сравнению с пациентками с гиперэхогенной структурой эндометрия. При сравнении структуры эндометрия у пациенток, страдающих бесплодием, и у фертильных пациенток в день пика ЛГ было выявлено, что беременность не развивалась при гиперэхогенной структуре эндометрия в день пика ЛГ, который в программе ВРТ может быть сравним с днем введения ХГ [26,105]. По данным Puerto, et al. (2003) успех имплантации ассоциирован с полностью гомогенной гиперэхогенной структурой эндометрия в день ПЭ [106].

В программах овариальной стимуляции толщина эндометрия в день назначения триггера овуляции также является важным прогностическим фактором [107]. Увеличение толщины эндометрия на 6-й день стимуляции в циклах ВРТ положительно коррелирует с успехом имплантации. Установлено, что успех имплантации повышался, если толщина эндометрия в начале овариальной стимуляции составляла 3 мм, на 6-й день - 6 мм и более, а в день введения триггера овуляции 7 мм и более [108]. В то же время, толщина эндометрия более 7 мм не имела положительного прогностического значения для оценки рецептивности эндометрия и, следовательно, не является прогностическим фактором успеха имплантации [109].

Достаточная толщина эндометрия не является гарантом отсутствия нарушений в рецепторном аппарате эндометрия. В связи с этим в оценке рецептивности эндометрия используют эндометриальный паттерн. Данный показатель сравнивает эхогенность эндометрия и миометрия. В течение менструального цикла эндометриальный паттерн претерпевает изменения. По данным ретроспективного исследования 1512 циклов овариальной стимуляции, обнаружена значительно более высокая частота наступления клинической беременности на перенос эмбрионов у женщин с толщиной эндометрия более 8 мм и наличием трехслойного паттерна эндометрия [110].

#### **1.4.5. Допплерометрическое исследование матки**

Еще одним неинвазивным методом оценки рецептивности эндометрия, является доплерометрическое исследование матки. Удовлетворительный кровоток в эндометрии рассматривается как необходимое условие успешной имплантации, выявлена взаимосвязь в снижении частоты наступления беременности у пациенток со сниженным маточным кровотоком [111,112].

При оценке кровоснабжения матки и придатков используют такие показатели, как максимальная систолическая скорость, конечно-диастолическая скорость, индекс резистентности (ИР), пульсационный индекс

(ПИ) и систолодиастолическое отношение (СДО). СДО, ИР и ПИ являются показателями сопротивления периферической части сосудистого русла, увеличение которого отражается главным образом на уменьшении диастолического компонента доплеровского спектра кривой кровотока, что приводит к повышению численных значений вышеперечисленных индексов.

Доказано, что данные показатели меняются в зависимости от фазы менструального цикла. В фазу пролиферации у преобладающего количества женщин в маточных артериях регистрируется небольшой конечный диастолический кровоток, который исчезает сразу после овуляции [26,113]. Повышение сопротивления маточных артерий регистрируется через 3 дня после овуляции [26]. При этом, по данным Sholtes, *et al.* (1989), наиболее высокие значения ПИ в маточных артериях наблюдаются на 16-й день цикла [114]. Увеличение сопротивления может быть связано с повышением сократимости матки и компрессией сосудов, расположенных в толще миометрия, вследствие чего уменьшается диаметр артерий. В секреторной фазе по сравнению с пролиферативной имеется отчетливое повышение скорости диастолического кровотока. Наименьшие показатели резистентности, а, следовательно, и наибольшая скорость кровотока совпадают по времени с максимальной функциональной активностью желтого тела, во время которого имплантация наиболее вероятна. В ановуляторных циклах эти изменения не происходят, и регистрируются постоянно повышенные значения ИР [26].

Однако прогностическая ценность данного метода для оценки качества эндометрия является спорной. В исследовании Ng, *et al.* (2006) с целью определения качества эндометрия и исхода в программах переноса витрифицированных эмбрионов изучалась возможная диагностическую значимость измерения субэндометриального венозного кровотока. Изучался индекс маточной пульсации и индекс резистентности маточных сосудов. Не найдя статистически значимой разницы доплерографических параметров у забеременевших и незабеременевших пациенток, авторы пришли ко мнению о

неэффективности использования индексов сосудистого сопротивления в предикции наступления беременности в программах ВРТ [115].

### **1.5. Гликом и рецептивность эндометрия**

Для описания изменений функционального слоя эндометрия в нормальном цикле, а также при развитии нарушений, в англоязычной литературе встречается термин «эндометриальный паттерн» (endometrial pattern), который отражает шаблон или образец визуализации эндометрия, соответствующий определенной фазе (стадии) менструального цикла, описанный с помощью ультразвукового исследования [6,116].

Термин «эндометриальный паттерн» позволяет также описывать морфологические, гистохимические изменения эндометриальных клеток и изменения в экспрессии генов и молекулярных маркеров, что позволяет использовать его и в этом контексте. На рисунке 1 представлен эндометриальный паттерн, характеризующий пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла и демонстрирующий участие гормональных, генетических и иммунологических факторов в дифференцировке эндометрия [116,117]. Постовуляторные изменения гликозилирования эндометриальных и секреторных белков мало изучены в репродуктивной медицине, но могут быть важной составляющей эндометриального паттерна, поскольку гликаны (углеводы) являются функциональной частью рецепторов, опосредующих межклеточные контакты, адгезию и процессы инвазии [116,118,119].

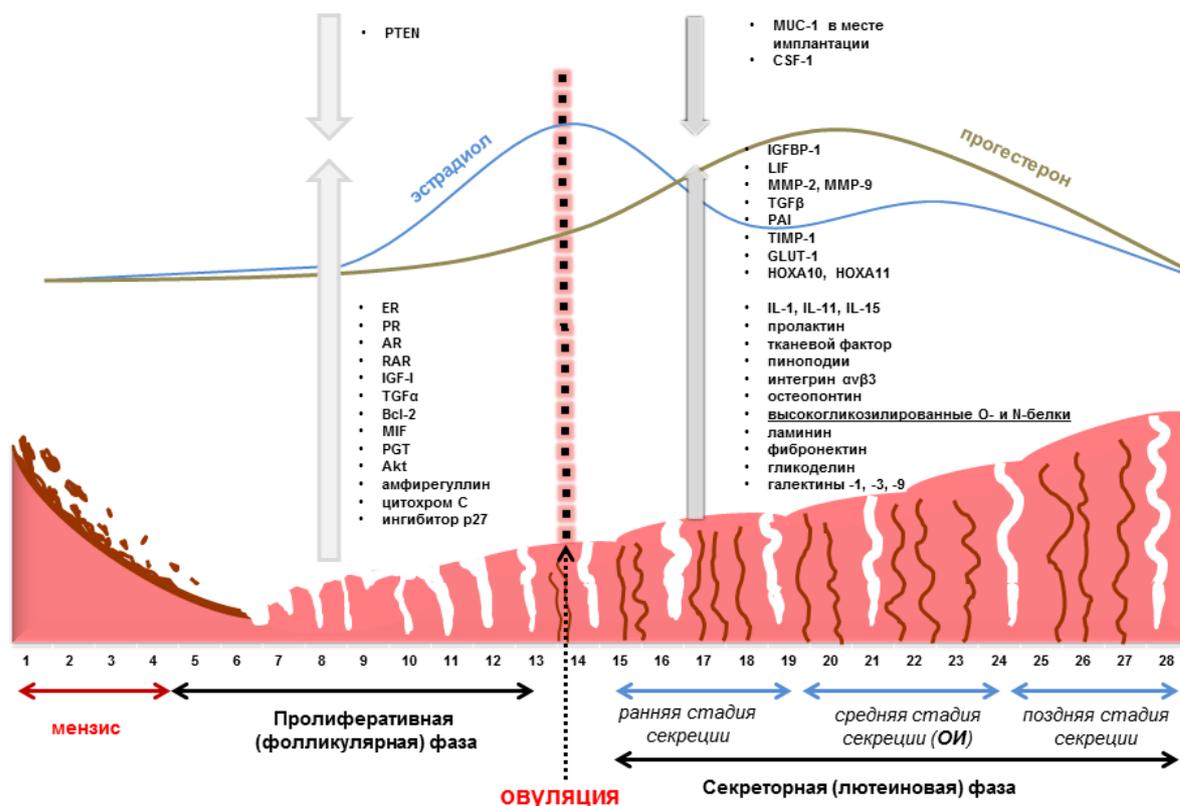


Рисунок 1. Эндометриальный паттерн пролиферативной и секреторной фаз менструального цикла, отражающий молекулярные изменения эндометриальной ткани между фазами цикла.

Кроме эндометриального паттерна, в литературе используется также термин «паттерн гликозилирования» или гликом, характеризующий совокупность гликанов органа, клетки и растворимых белков биологических жидкостей организма [116,120,121]. Особый интерес, в настоящее время вызывают данные, основанные на изучении межвидового скрещивания, свидетельствующие, что клетки репродуктивных органов, гаметы и эмбрионы близкородственных видов млекопитающих имеют определенный паттерн (гликотип) гликозилирования [116,122]. Возможность контакта (оплодотворения, имплантации и плацентации) определяется комплементарностью гликозилированных поверхностей контактирующих клеток, что позволяет предположить наличие углеводного кода (гликокода) [116,123], значение которого может быть решающим для имплантации и

развития беременности (Рисунок 2) [116]. Согласно теории гликокода, молекулярные основы имплантации основаны на углевод-белковом и углевод-углеводном взаимодействиях между клетками эндометрия и бластоцисты [116,118,124].

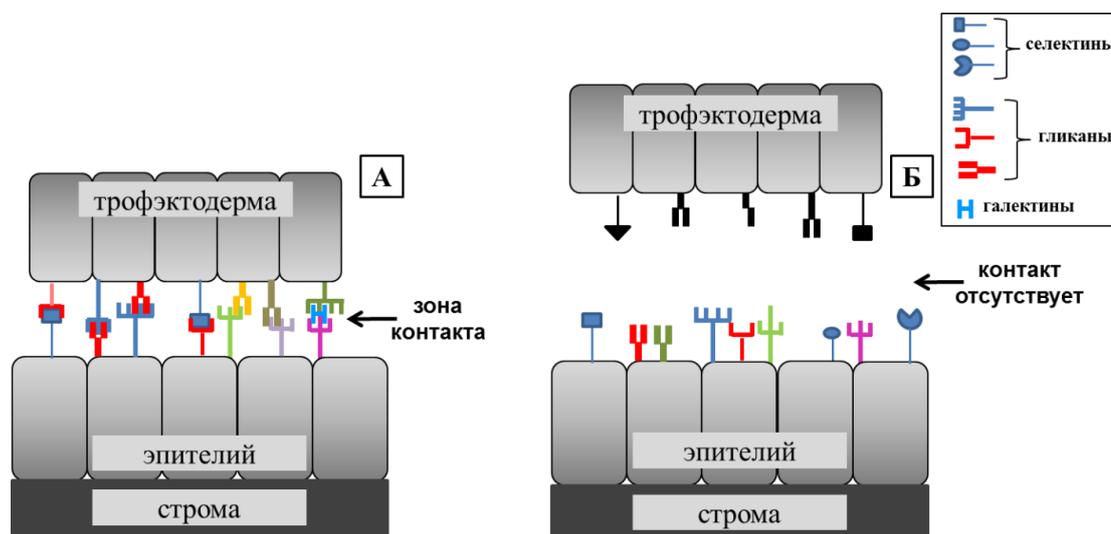


Рисунок 2. Схематическое представление паттерна гликозилирования контактирующих клеток при имплантации у млекопитающих. А – комплементарный гликокод, успешная адгезия; Б – некомплементарный гликокод, адгезия не осуществляется.

Установлено, что молекулярные основы ранних взаимодействий при имплантации аналогичны таковым при воспалении между лейкоцитами и эндотелием и базируются на углевод-опосредованной адгезии [116,125]. Селективные взаимодействия осуществляются как между гликанами, так и гликанами и эндогенными лектинами: лектинами С-типа и галектинами, которые широко представлены на иммунных клетках и клетках репродуктивной системы [9,116,126]. Доказано, что на поверхности трофэктодермы (ТФЭ) экспрессируются углевод-связывающие белки: галектины - специфически взаимодействующие с гликанами, которые имеют в составе остатки N-ацетиллактозамина и селектины – основным лигандом которых является олигосахарид sialyl Le<sup>x</sup> [116,125].

Галектин-1 и -3 выявляются на ТФЭ бластоцисты мыши после хетчинга, но отсутствуют во внутренней клеточной массе (ВКМ) [116]. Известно, что галектины-1 и -3 способны специфически связываться с олигосахаридом Н тип 1, экспрессия которого выявлена на люминальном эпителии эндометрия [116]. Также, показано связывание галектинов с адгезивным гликопротеином ламинином, углеводная часть которого представлена сложными N-цепями с терминальными остатками галактозы и лактозамина [116,127]. У человека показано повышение экспрессии лиганда галектинов, дисахарида Gal $\beta$ 1-3GalNAc (антигена Томсена-Фриденрайха, TF) в раннюю секреторную фазу цикла, с максимумом экспрессии в окно имплантации; экспрессия галектина-1 выявлена на ТФЭ бластоцисты свиньи и неоплодотворенных ооцитах человека [116,128]. Установлено, что в преимплантационный период в ТФЭ эмбриона человека выявляется L-селектин, а в ТФЭ мыши - L- и E- селектины [116]. Экспрессия основного лиганда селектинов - олигосахарида sialyl Le<sup>X</sup> выявлена как в ТФЭ мыши, так и в люминальном эпителии человека и мыши, причем максимум экспрессии выявлен в окно имплантации [116]. Олигосахарид Le<sup>Y</sup> представлен на поверхностях бластоцисты и эндометриального эпителия мыши; у человека – только на люминальном эпителии [116]. Кроме вышеописанных углевод-белковых взаимодействий продемонстрированы углевод-углеводные взаимодействия между олигосахаридом Le<sup>Y</sup>, который входит в состав углеводных цепей гликолипидов бластоцисты и Н тип 1 и Н тип 2 терминированными гликолипидами люминального эпителия [116,125]. Молекулярные углевод-опосредованные взаимодействия инициируют активацию клеточных сигнальных систем, результатом которой являются межклеточные контакты трофобласт-эндометрий/stroma при имплантации и инвазия трофобласта [116].

Многочисленные исследования паттерна гликозилирования эндометрия позволили выявить общую тенденцию, свидетельствующую, что экспрессия высоко гликозилированных продуктов повышается в секреторную фазу цикла

под воздействием прогестерона [116]. При этом структуры гликанов с терминальными остатками маннозы и лактозамина, детектируемые иммуногистохимическими методами с помощью панели моноклональных антител и растительных лектинов с тонкой углеводной специфичностью, конститутивно присутствуют в эндометриальной ткани во всех фазах цикла и повышаются в секретах эндометриальных желез в пост-овуляторный период [116,129]. Одновременно отмечается сокращение толщины апикальной части покровного эпителия (гликокаликса) и уменьшение общего отрицательного заряда клеточной поверхности, обусловленного анионными полимерами в структурах эндометрия [116,130].

Экспрессия терминальных и субтерминальных остатков фукозы и сиаловой кислоты в составе сложных гликанов также подвержена циклической регуляции [116]. Изучение распределения терминальных остатков сиаловой кислоты в тканях матки мышей лектиновой гистохимией показало, что  $\alpha$ 2,3-связанная сиаловая кислота не выявляется в эпителии в пролиферативную фазу, но высокий уровень обнаруживается в строме [116]. В люминальном эпителии количество  $\alpha$ 2,3-связанной сиаловой кислоты увеличивается с преимплантационного периода до фазы поздней секреции и зависит от прогестерона [116]. Напротив, уровень  $\alpha$ 2,6-связанной сиаловой кислоты максимален в 1-й день после имплантации [116]. Экспрессия в люминальном эпителии мыши гликана Н тип 1, несущего терминальный остаток фукозы, регулируется эстрогенами: максимальный уровень детектируется в овуляцию, но падает до минимума после имплантации [116]. Ингибирование Н тип 1-содержащими гликанами межклеточного взаимодействия в мышинной имплантационной модели *in vitro* свидетельствует об участии Н тип 1 в прикреплении бластоцисты [116,131]. У крысы экспрессия двух терминально фукозилированных гликанов - Н тип 1 и Н тип 2 регулируется прогестероном: максимальный уровень гликана Н тип 1 детектируется на 4-5-й день беременности, а гликана Н тип 2 - в рецептивный период и не выявляется после имплантации [116,132].

Изменение экспрессии  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамин ( $\alpha$ -GalNAc) - содержащих гликанов в составе гликокаликса эндометрия в динамике менструального цикла исследовалось у человека с помощью панели биотинилированных растительных лектинов, специфически связывающих различные вариации терминальных остатков  $\alpha$ -GalNAc [116]. Установлено, что у человека экспрессия гликанов, несущих терминальные остатки  $\alpha$ -GalNAc и имеющих простую неразветвленную структуру существенно не меняется во всех исследованных структурах: цитоплазме, железах, люминальном эпителии и гликокаликсе во все фазы цикла [116]. Напротив, экспрессия разветвленного фукозилированного сахара, который является фрагментом антигена группы крови А (II), и имеет два терминальных заместителя (GalNAc $\alpha$ 1,3 и Fuc $\alpha$ 1,2), отсутствует в пролиферативную и раннюю секреторную фазы цикла, но возрастает в окно имплантации в гликокаликсе и железах и сохраняется до менструации [116,133].

Отмечается линейное возрастание экспрессии олигосахарида Le<sup>Y</sup> в эндометриальном эпителии у макак-резус (*Macaca mulatta*) в пролиферативную, перiovуляторную и постовуляторную стадии цикла [116]. Максимум экспрессии гликана выявлен в окно имплантации, но экспрессия снижается к менструации [116]. При этом в области эндометриальных желез повышение уровня экспрессии отмечено только в окно имплантации [116]. Экспрессия гликана позитивно регулируется прогестероном и негативно - мифепристоном [116,134]. Блокирование экспрессии фермента FUT1 (участвующего в биосинтезе Le<sup>Y</sup>) эпителиальными клетками эндометрия мыши, сокращает, а обработка клеток LIF, напротив, усиливает адгезию мышинной бластоцисты в *in vitro* модели имплантации [12,116]. Имеются данные о том, что кроме опосредования межклеточной адгезии при имплантации, гликан Le<sup>Y</sup> может выступать в качестве сигнальной молекулы, модулирующей DAG/PKC сигнальный путь, регулирующий рост, деление и дифференцировку клеток, что также влияет на имплантацию [11,116].

Изменение паттерна гликозилирования в динамике менструального цикла у человека отражается не только в изменении представленности отдельных функциональных групп гликанов, которые являются составной частью сложных, разветвленных, комплексных структур, но и в изменении экспрессии конкретных высоко гликозилированных белков, например, синдеканов [116]. Так, изучение распределения синдеканов – мембранных гепарансульфатпротеогликанов (семейство состоит из четырех членов: синдекан-1, синдекан-2, синдекан-3, синдекан-4) в эндометрии показало, что экспрессия синдеканов-1, 3 и 4 не меняется в зависимости от фазы менструального цикла, а экспрессия синдекана-2 возрастает в периовуляторную фазу цикла и позитивно коррелирует с морфологическими и функциональными изменениями в эндометрии, что предполагает его участие в имплантации бластоцисты [116,135]. По данным других авторов, экспрессия синдекана-1 значимо возрастает на люминальной поверхности эпителия в окно имплантации, и, напротив, снижается в строме в секреторную фазу, достигая минимума в окно имплантации [116,136]. Поскольку синдеканы: опосредуют межклеточные взаимодействия и организацию внеклеточного матрикса; являются лигандами для множества биологически активных молекул (сосудисто-эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов); способны взаимодействовать с астин-ассоциированными белками, участвуя, таким образом, в проведении внутриклеточных сигналов [116,135,136], то их участие в циклическом ремоделировании эндометрия и имплантации может быть недооценено [116].

Также частью эндометриального паттерна окна имплантации являются гиалуроновая кислота (высокомолекулярный гликозаминогликан, структурной единицей которого является повторяющийся дисахарид, состоящий из остатков *D*-глюкуроновой кислоты и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина) и ее рецептор CD44 [116]. Изучение экспрессии гиалуроновой кислоты и CD44 в динамике менструального цикла у человека показало, что экспрессия гиалуроновой кислоты выявляется в строме во всех фазах цикла, но имеет пик

экспрессии в окно имплантации; также более интенсивное ИГХ окрашивание на гиалуроновой кислоте выявляется в периваскулярной зоне спиральных артерий в секреторной фазе [116]. При выявлении рецептора CD44 было установлено, что в секреторной фазе в эндометриальных железах экспрессируется только CD44v6 - варибельная форма, а в строме - только стандартная форма CD44s [116]. Причем в пролиферативную фазу обе формы рецептора отсутствуют в структурах эндометрия [116,137].

Одно из ключевых исследований, посвященных молекулярным основам имплантации, основывающееся на углевод-белковом взаимодействии было проведено ИГХ методом с использованием моноклональных антител к углеводным детерминантам, которые являются лигандами L-селектина [116]. Была использована панель антител: MECA-79 (эпитоп: SO<sub>3</sub>→6N-ацетилглюкозамин); HECA-452 (углеводный эпитопs sialyl Le<sup>x</sup> и родственные структуры: 6-sulfo sialyl Le<sup>x</sup>, 6'-sulfo sialyl Le<sup>x</sup> и 6',6-disulfo sialyl Le<sup>x</sup>); PEN4 (эпитоп кератан сульфат-подобный лактозамин) [116]. Установлено, что максимальная экспрессия гликанов, детектируемых указанными антителами, выявлена в период окна имплантации [116]. Одновременно было показано, что на поверхности бластоцисты после стадии хетчинга детектируется интенсивное окрашивание антителами против L-селектина; примечательно, что до хетчинга окрашивание практически не наблюдалось, что свидетельствует об экспрессии L-селектина клетками трофобласта исключительно в преимплантационный период [116,138].

Изучение дифференциальной экспрессии сульфатированных олигосахаридов - лигандов L-селектина, в эндометрии в течение менструального цикла показало, что минимальная экспрессия лигандов выявлена в пролиферативную фазу цикла [116]. В люминальном эпителии эндометрия пик экспрессии сульфоолигосахаридов выявлен в овуляцию и продолжается до поздней стадии секреции [116]. В железистом эпителии максимальная экспрессия лигандов выявлена в окно имплантации [116,139]. Установлено, что экспрессия сульфотрансферазы GlcNAc6ST-2 и лигандов

L- селектина, детектируемых антителами МЕСА-79 и НЕСА-452, которые являются продуктами активности этого фермента, различна у фертильных и бесплодных женщин в секреторной фазе естественного цикла [116]. Так, уровень экспрессии МЕСА-79 – эпитопа в люминальном эпителии у фертильных женщин был значимо выше, чем у бесплодных [116]. Повышенная экспрессия эпитопов НЕСА-452 в эндометриальных железах выявлялась у пациенток с эндометриозом и синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) [116]. Экспрессия GlcNAc6ST-2 была снижена у пациенток с бесплодием и коррелировала с экспрессией эпитопа МЕСА-79 [116,140].

В пилотном исследовании установлено, что у пациенток программ ВРТ с использованием длинного протокола с а-ГнРГ частота наступления беременности и частота имплантации были выше при высоком уровне экспрессии гликанов – лигандов L-селектина в железах и люминальном эпителии, чем при низком (53,6% против 25,0% и 27,1% против 12,1%, соответственно;  $p < 0,05$ ) [116,141]. Аналогично, частота наступления беременности у пациенток программ ВРТ с донацией яйцеклетки была выше, в случае высокого уровня экспрессии лигандов L-селектина [116,142]. Изучение прогностической значимости эпитопа МЕСА-79, выявляемого в эндометрии в период окна имплантации у пациенток с повторными неудачами имплантации показало, что у пациенток с низким уровнем экспрессии эпитопа МЕСА-79 предсказательная ценность отрицательного результата составляла 100% с чувствительностью 50% и специфичностью 100%, а предсказательная ценность положительного результата у пациенток с высокой экспрессией - 87% [116]. Результаты свидетельствуют о перспективах использования эпитопа МЕСА-79 в качестве маркера рецептивности эндометрия, и указывают на возможность исключения неудачи имплантации в данной группе пациенток [116,143].

Муцин MUC1 – высокомолекулярный, высоко гликозилированный протеин, синтезируемый эпителиальными клетками репродуктивного тракта, является основным компонентом слизи, локализованной в апикальной

поверхности клеток и в секретах эндометриальных желез [116,144]. В настоящее время роль MUC1 в имплантации рассматривается в двух аспектах [116]. Первый, MUC1, возможно, участвует в молекулярном узнавании и контакте бластоцисты с эндометрием, опосредуя стадии аппозиции и адгезии [116]. В пользу этого предположения выступают: факты, свидетельствующие, что экспрессия MUC1 регулируется гормонами [116,145], а также данные об идентификации в составе углеводной части MUC1 гликанов, участвующих в углевод-белковом взаимодействии [116]. Так, изучение углеводных цепей MUC1 продемонстрировало, что в составе O- и N-связанных гликанов муцина присутствуют гликаны sialyl-Tn, sialyl-LewisX, sialyl-LewisA, кератан-сульфат и антиген Томсена-Фриденрайха (TF-антиген) [14,116,128,145,146], которые являются лигандами для эндогенных лектинов – селектинов и галектинов, и способны опосредовать межклеточные взаимодействия и участвовать в иммунорегуляции [116,126,147]. В исследованиях *in vitro* при сокультивировании первичной культуры эпителиальных клеток эндометрия человека с аутологичной бластоцистой было установлено, что экспрессия MUC1 и mRNA MUC1 увеличивается в рецептивном эндометрии по сравнению с нерепцептивным [116]. Также было показано, что на стадии аппозиции MUC1 выявляется, как в эндометриальных клетках, так и в ТФЭ бластоцисты [116]. Однако на стадии адгезии MUC1 локально удаляется с эндометрия в месте имплантации [13,14,116], вероятно вследствие паракринной регуляции факторами бластоцисты [116]. Этот факт определяет второй аспект роли MUC1 в имплантации – MUC1 может выполнять функцию антиадгезивной молекулы в эндометриальном эпителии [116]. На основании описанных данных, однозначное заключение о роли MUC1 в имплантации пока дать не удастся [116]. Обнаруженные различные гликоформы MUC1 у фертильных и бесплодных женщин [116,128], вероятно, обуславливают также различные функциональные свойства MUC1 и объясняют его двойственную роль в

имплантации [116]. Эти разноречивые факты указывают на необходимость дальнейшего изучения роли MUC1 в имплантации [116].

### **1.6. Терапия тонкого эндометрия и нарушения его рецептивности**

На сегодняшний день окончательно не изучена взаимосвязь между толщиной эндометрия и вероятностью наступления беременности. Также пока еще не установлен порог нормальной толщины эндометрия. В связи с этим, вопрос о необходимости и способах подготовки пациенток с тонким эндометрием представляет большой интерес для врачей репродуктологов.

Существует множество спорных исследований относительно воздействия низких доз аспирина на частоту имплантаций. По данным некоторых исследований аспирин в низких дозах (75-150 мг/сутки) повышает частоту наступления беременности, не влияя на толщину эндометрия. Данный благоприятный эффект объясняется улучшением эндометриального кровотока при доплерографическом исследовании. В исследовании Hsieh, *et al.* (2000) статистически значимое увеличение частоты выявления трехслойного эндометрия (46,5%) и частоты наступления беременности (18,4%) наблюдалось после применения низких доз (100 мг) аспирина [148]. На сегодняшний день, терапия тонкого эндометрия низкими дозами аспирина остается под вопросом, так как не имеется однозначных данных, показывающих его благоприятное влияние на частоту наступления беременности в циклах ВРТ [149]. По данным Кокрановского обзора применение низких доз аспирина не влияло на толщину эндометрия [150,151].

Применение **эстрогенов** является еще одним методом терапии тонкого эндометрия. В исследовании Chen, *et al.* (2006) проводилась длительная терапия (14-82 дня) эстрадиол валератом в циклах стимуляция овуляции. В результате лечения толщина эндометрия увеличилась с 6,7 мм до 8,6 мм. Частота наступления беременности в группе, получавшей эстрогены, была выше по сравнению с группой, не получавшей эстрогены (38,5% по сравнению

с 4,3%) [48]. По данным исследователей из Франции вагинальное введение эстрадиола в большей мере увеличивает толщину эндометрия по сравнению с пероральным [152]. В других исследованиях не было выявлено разницы между путем введения E2 и частотой наступления беременности [153,154]. Большой пул работ с применением E2 у пациентов с тонким эндометрием, проведены в циклах с переносом витрифицированных эмбрионов.

**Силденафил цитрат**, ингибитор фосфодиэстеразы-5 применяется для лечения пациенток с тонким эндометрием, благодаря его способности усиливать сосудорасширяющее действие оксида азота. Sher, *et al.* (2000) продемонстрировали улучшение кровотока в маточных артериях и рост эндометрия, а также более высокую частоту имплантаций после вагинального введения силденафил цитрата [42].

В исследовании Ledee-Bataille, *et al.* (2002) для терапии тонкого эндометрия применялась комбинация пентоксифиллина и токоферола (**витамин E**). Отмечен положительный эффект на толщину эндометрия, функцию яичников, а также увеличилась частота наступления беременности [155]. Такие же результаты получила группа исследователей из Англии у 20 пациенток с тонким эндометрием (менее 6 мм) на фоне комбинированного лечения пентоксифиллина и токоферола. У 14 пациенток зарегистрировано увеличение толщины эндометрия, а у 8 наступила беременность [156].

В настоящий момент изучается влияние трансвагинальной перфузии эндометрия **гранулоцитарным колониестимулирующим фактором роста (G-CSF)**. Воздействие G-CSF на эндометрий до конца не изучен, возможно G-CSF является ингибитором активности NK-клеток. У пациенток резистентных к стандартной терапии эстрогенами и вазодилататорами, после перфузии G-CSF примерно через 48 часов толщина эндометрия составила 7 мм. У всех пациенток ПЭ закончился успешной имплантацией [157]. По данным другого исследования не было выявлено влияния G-CSF на наступление беременности [158].

Применение **а-ГнРГ** в лютеиновую фазу менструального цикла повышают частоту наступления беременности. Qublan, *et al.* (2008) провели РКИ, в котором изучили воздействие а-ГнРГ, введенных в лютеиновую фазу цикла, на имплантацию и частоту наступления беременности у пациенток с тонким эндометрием (менее 7 мм) в день проведения трансвагинальной пункции яичников. Частота имплантаций и беременности была значительно выше в группе, получавшей а-ГнРГ по сравнению с контрольной группой. Кроме того, было отмечено увеличение уровня эстрадиола, прогестерона, и толщины эндометрия у женщин, принимавших а-ГнРГ. А-ГнРГ индуцируют значительное повышение уровня ЛГ в сыворотке крови, который способствует активации эндокринно-паракринных путей, продукции ангиогенных факторов роста, цитокинов и молекул адгезии, которые участвуют в процессе имплантации [159].

По данным ряда исследований **механическое повреждение эндометрия** оказывает благоприятное влияние на рецептивность эндометрия. В РКИ, которое включало 100 пациенток с повторными неудачами программ ВРТ, проводили биопсию эндометрия в фолликулярной и лютеиновой фазах цикла, предшествующего циклу ПЭ. В группе пациентов, где проводилась биопсия эндометрия, наблюдалось повышение частоты наступления клинической беременности (32,7% по сравнению с 13,7%) и живорождения (22,4% по сравнению с 9,8%), по сравнению с пациентами без биопсии. Механизм положительного влияния незначительного повреждения эндометрия до конца не известен [55]. В исследовании Razieli *et al* проводилась биопсия эндометрия в лютеиновую фазу цикла (21 и 26 день менструального цикла) у 60 женщин с неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе (в среднем 7) [160]. Контрольную группу составило 57 пациентов. Частота имплантации и наступления беременности в группе, где эндометрий повреждался, составила 11% и 30%, а в контрольной группе 4% и 8% соответственно. В систематическом обзоре подтверждено влияние повреждения эндометрия в результате проведения биопсии, скретчинга или

гистероскопии в цикле, предшествующему циклу овариальной стимуляции, на рецептивность эндометрия [161]. По результатам мета-анализа на 70% чаще отмечено наступление клинической беременности у 2062 женщин с неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе, которым проводился скретчинг, по сравнению с группой, где отсутствовало вмешательство на эндометрий [161]. В то же время по данным Werner *et al.* не было выявлено статистически значимых различий в частоте имплантации между группами с повреждением эндометрия и контрольной группой (43,6 % и 55,0 %,  $p=0,13$ ), а также в частоте выкидышей (5,1 % и 12,4 %,  $p=0,60$ ) [162]. Возможная роль повреждения эндометрия в улучшении процессов имплантации была объяснена в исследовании Varash, *et al.* Полученные данные показали, что повреждение эндометрия в цикле, предшествующему овариальной стимуляции у женщин с неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе, значительно улучшало их исход вследствие того, что повреждение эндометрия способствовало процессам децидуализации, а также имплантации [163].

Рецептивность эндометрия - важная составляющая успешной имплантации. Клиническая значимость поиска новых маркеров и усовершенствование уже изученных способов оценки рецептивности эндометрия не оставляет сомнений. Несмотря на предложенные методы лечения с целью увеличения толщины и рецептивности эндометрия, реальная эффективность этих вмешательств остается пока недоказанной. Таким образом, дальнейшие исследования в этом направлении являются актуальной задачей современной репродуктологии.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование проводилось в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия института репродуктивной медицины (заведующий - д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии (заведующий - д.м.н. Л.В. Кречетова) и патологоанатомическом отделении (заведующий - д.м.н., профессор А.И. Щеголев).

В исследование были включены 154 пары, обратившиеся для лечения бесплодия методами ВРТ. Супружеские пары 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".

На первом этапе были проанализированы клиничко-лабораторные и эмбриологические факторы, определяющие эффективность программ ВРТ, и определена пороговая толщина эндометрия, влияющая на наступление беременности в программах ВРТ. На втором этапе было проведено разделение пациентов на группы в зависимости от выявленной пороговой толщины эндометрия и выявлены клиничко-лабораторные факторы, влияющие на толщину эндометрия. На третьем этапе проводилось гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование эндометрия с определением его рецептивности. На четвертом этапе проводилось иммуноморфологическое исследование гликанов эндометрия и изучение связи выявленного паттерна гликанов с толщиной эндометрия и исходами программ ВРТ.

## 2.1. Дизайн исследования

Для решения поставленных задач было проведено проспективное (для клинических и лабораторных исследований) и ретроспективное (для определения факторов риска) исследование случай-контроль (Рисунок 3).

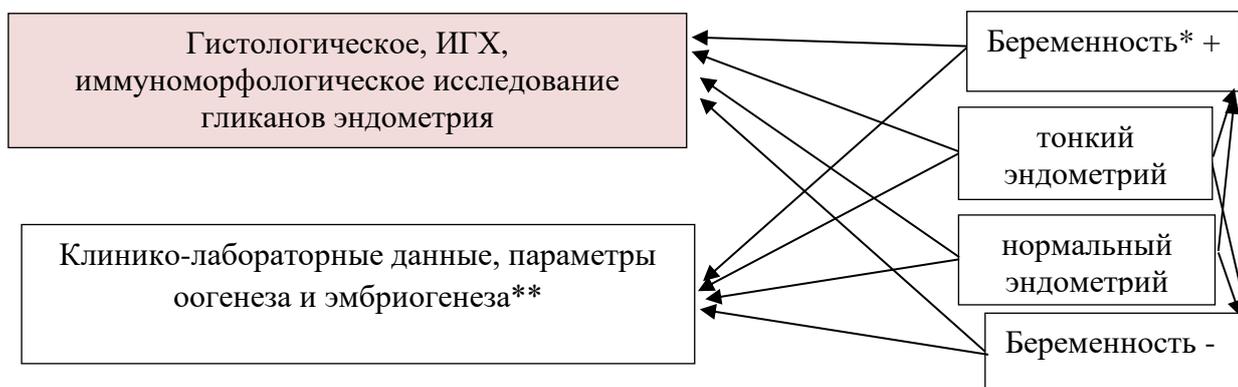


Рисунок 3. Дизайн исследования.

Для решения задач №1-2 (определение пороговой толщины эндометрия на основании выявленных факторов, влияющих на наступление беременности в программах ВРТ) были выделены две группы пациентов:

- группа 1 – пациентки, у которых беременность наступила;
- группа 2 – пациентки, у которых беременность не наступила.

Конечная точка для задач 1-2:

• пороговая толщина эндометрия, определяющая наибольшее скорректированное отношение шансов ( $OШ_{кор}$ ) наступления беременности в программах ВРТ.

Для решения задачи №3 (определение клинико-лабораторных факторов риска, влияющих на толщину эндометрия) были выделены две группы пациентов:

- группа А - пациентки с нормальным эндометрием;
- группа Б - пациентки с тонким эндометрием.

Конечная точка для задачи 3:

- ОШ<sub>кор</sub> развития тонкого эндометрия под влиянием клинико-лабораторных и эмбриологических факторов.

Для решения задач №4-5 (исследование эндометрия) изучались 3 группы пациенток:

- группа 1А - пациентки с нормальным эндометрием, у которых беременность наступила;

- группа 2А - пациентки с нормальным эндометрием, у которых беременность не наступила;

- группа 2Б - пациентки с тонким эндометрием, у которых беременность не наступила;

Конечные точки для задач 4-5:

- параметры гистологического, ИГХ и иммуноморфологического исследования гликанов эндометрия в сравниваемых группах;

- паттерн гликанов эндометрия, определяющий его рецептивность.

Оценивались следующие клинико-лабораторные факторы, влияющие на толщину эндометрия:

- возраст;
- gravidарность;
- паритет;
- гинекологические заболевания;
- операции на матке в анамнезе;
- число программ ВРТ в анамнезе;
- овариальный резерв (количество антральных фолликулов (КАФ), уровень антимюллерова гормона (АМГ), ФСГ);

Оценивались следующие клинико-лабораторные факторы, влияющие на наступление беременности в программах ВРТ:

- возраст;
- индекс массы тела (ИМТ);

- длительность бесплодия;
- число программ ВРТ в анамнезе;
- гинекологические заболевания;
- соматические заболевания;
- овариальный резерв (КАФ, уровень АМГ, ФСГ);
- уровень тиреотропного гормона (ТТГ);
- протокол овариальной стимуляции;
- показатели спермограммы;
- число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), зигот, бластоцист и бластоцист отличного качества;
- толщина эндометрия во время переноса эмбриона (ПЭ).

Была проведена оценка следующих параметров сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза:

- частота патоспермии: астенозооспермии (АЗС), тератозооспермии (ТЗС);
- число ОКК;
- число зигот;
- число бластоцист с оценкой по Гарднеру на 5-е сутки культивирования.

Оценивались следующие исходы программ ВРТ:

- частота биохимической беременности (на основании определения сывороточной концентрации  $\beta$ -субъединицы ХГ ( $\beta$ -ХГ) при уровне  $\beta$ -ХГ более 20 МЕ/л);
- частота клинической беременности (на основании визуализации плодного яйца при УЗИ через 21 день после ПЭ);
- частота потери беременности до 12 недель гестации;
- частота живорождения.

## 2.2. Критерии включения в исследование

### Критериями включения в исследование были:

1. нормальный кариотип супругов;
2. возраст пациентки 18-40 лет;
3. ИМТ пациентки 18-29,9 кг/м<sup>2</sup>;
4. протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ);
5. оплодотворение методом ИКСИ;
6. селективный перенос одной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после забора ооцитов;
7. перенос бластоцисты в «свежем» цикле;
8. единый протокол поддержки посттрансферного периода (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки вагинально);
9. информированное согласие на включение в исследование.

### Критериями не включения в исследование были:

1. 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;
2. аномалии строения внутренних половых органов;
3. СПКЯ;
4. ПНЯ;
5. выраженная патоспермия у партнера.

### Критериями исключения из исследования были:

1. ПГТ;
2. ВРТ с донорским ооцитом или суррогатной мамой;
3. «бедный» ответ на овариальную стимуляцию;
4. отсутствие бластоцист отличного качества в данном протоколе ИКСИ;

5. осложнения при проведении ВРТ (развитие синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) средней или тяжелой степени, кровотечение в брюшной полости, воспалительные осложнения на фоне овариальной стимуляции в изучаемом цикле ВРТ);

6. отказ от участия в исследовании.

### 2.3. Объем выборки

Расчет объема выборки был произведен с помощью программы STATISTICA 10 (США).

Для решения задач 1-2 (определение шансов наступления беременности в зависимости от толщины эндометрия) расчет объема выборки был основан на данных литературы о вероятности наступления беременности у пациенток с тонким эндометрием [164]. Для получения валидных данных при принятии уровня альфа 0,05, мощности исследования – 90%, вероятности живорождения в циклах ВРТ у пациенток с нормальным эндометрием 45%, у пациенток с тонким эндометрием – 17%, достаточно включить в исследование минимум 55 пациенток в группу - всего 110 пациенток.

Для решения задачи 3 (выявление факторов риска развития тонкого эндометрия) объем выборки определялся числом изучаемых факторов риска (предполагается изучение 9 предикторов). В виду того, что максимальное число предикторов, включенных в модель, не должно быть больше, чем число исходов, деленное на значение от 5 до 20, для изучения 9 факторов риска достаточно включить минимум 45 человек в каждую группу (всего – 90 человек).

Для решения задач 4-5 (исследование эндометрия) расчет объема выборки был основан на данных литературы о чувствительности гликоципа в предикции колоректального рака (аналогия с патологией и рецепцией эндометрия) [165]. Для получения валидных данных при принятии уровня альфа 0,05, мощности исследования – 90%, чувствительности – 50%,

вероятности наступления беременности в циклах ВРТ у изучаемой когорты пациенток (без предикции) – 50%, предполагаемой чувствительности гликоципа – 82%, достаточно включить в исследование минимум 21 пациентку в группу - всего 42 пациентки.

## 2.4. Методы исследования

Перед вступлением в программы ВРТ все пациентки были обследованы амбулаторно. Обследование включало обязательные методы исследования, специальные методы исследования, а также исследования по медицинским показаниям. Все обследования в рамках проводимого исследования, за исключением УЗИ органов малого таза, проводились однократно (Таблица 1).

### Обязательные исследования для обоих супругов включали:

- определение антител к бледной трепонеме в крови (RW), антител класса М и G к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1,2), к антигену вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV);
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода *Candida*, на атрофозоиты трихомонад;
- исследование соскоба из цервикального канала на хламидии, микоплазму и уреоплазму методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- исследование соскоба из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2, цитомегаловирус методом ПЦР;
- определение кариотипа супругов, медико-генетическое консультирование.

### Обязательные исследования для женщин включали:

- общеклинический анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- гемостазиограмму;

- определение групповой и резус-принадлежности крови;
- общий анализ мочи;
- количественный анализ антител класса М, G к вирусу краснухи в сыворотке крови;
- цитологическое исследование соскоба эндоцервикса и экзоцервикса;
- УЗИ органов малого таза на 5-8 день менструального цикла;
- флюорографию;
- электрокардиографию;
- заключение терапевта о наличии или отсутствии противопоказаний для проведения программ ВРТ;
- УЗИ молочных желез (до 35 лет) или маммографию (после 35 лет);
- УЗИ щитовидной железы;
- гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, Е2, ТТГ, свободный тироксин ( $T4_{св}$ ), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС), пролактин, кортизол, тестостерон (Т), АМГ.

Обязательным исследованием для мужчины был анализ эякулята.

Исследования по показаниям включали:

- исследование состояние матки, проходимости маточных труб (гистеросальпингография (ГСГ), гистероскопия и лапароскопия);
- консультации смежных специалистов (эндокринолога, уролога).

Специальные методы исследования включали пайпель-биопсию эндометрия в окно имплантации с проведением:

- гистологического исследования эндометрия;
- ИГХ исследования эндометрия с определением уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER), прогестеронового рецептора (PR), лейкемия-ингибирующего фактора (LIF), дифукозилированного гликана LeY и  $\alpha 2,3$ -сиалогликана МЕСА-79;
- лектиновой гистохимии эндометрия - изучения паттерна экспрессии углеводных остатков в тканях эндометрия.

Схема обследования пациентов во время проведения исследования

	18-20 день м.ц. перед циклом ВРТ	4-5-е сутки после пункции	2 недели после ПЭ	3 недели после ПЭ	9-10 недель после пункции
Обследование согласно приказу №107н	X				
Гистологическое и ИГХ исследование рецептивности эндометрия	X				
Гликотип эндометрия	X				
Морфологическая оценка качества эмбрионов		X			
Перенос эмбрионов		X			
ХГЧ			X		
УЗИ	X	X		X	X

#### 2.4.1 Общеклинические методы обследования

На первичной консультации производился сбор анамнестических данных у пациенток, который включал возраст, образование, наличие профессиональных вредностей, «вредных привычек», семейное положение. Полученные данные вносились в индивидуальную карту пациента.

В ходе общего осмотра измерялся рост, масса тела пациентки, рассчитывался ИМТ, измерялось артериальное давление и пульс, оценивался тип телосложения, проводилась пальпация молочных желез. Изучали акушерско-гинекологический анамнез: менструальная функция, число своевременных и преждевременных родов в анамнезе, число самопроизвольных и искусственных прерываний беременности, наличие осложнений во время беременностей и родов. При сборе анамнеза пациенток обращали внимание на число перенесенных гинекологических заболеваний, объеме перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе. Оценивалось наличие перенесенных инфекционных и соматических

заболеваний, оперативных вмешательств. Уточнялись данные о продолжительности бесплодия, проведению диагностических и лечебных манипуляций. Отмечалось наличие или отсутствие программ ВРТ в анамнезе, а также их особенности (протокол овариальной стимуляции, число полученных ооцитов и эмбрионов, и их качество, исход программы ВРТ).

Во время гинекологического исследования проводился осмотр наружных половых органов, и осмотр влагалища и шейки матки в зеркалах. При бимануальном исследовании органов малого таза определяли размеры, форму и консистенцию тела матки, подвижность и наличие болезненности при пальпации, наличие опухолевидных образований в области придатков матки, а также наличие спаечного процесс в малом тазу.

#### **2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза**

УЗИ органов малого таза выполнялось в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - профессор А.И. Гус). Первоначально 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). Оценивались размер и структура тела матки, толщина и структура эндометрия, размеры и объем яичников, число антральных фолликулов в обоих яичниках, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза.

Далее УЗ-мониторинг проводился на 2-3 день менструального цикла, в день начала стимуляции функции яичников, на 6-й день овариальной стимуляции, и затем ежедневно до введения триггера овуляции. Во время УЗ-мониторинга проводилась оценка динамики фолликулогенеза и ответа эндометрия на овариальную стимуляцию, для своевременной возможности коррекции дозы вводимых экзогенно гонадотропинов (ГТ), а также с целью

определения даты введения ант-ГнРГ и даты введения триггера овуляции, а, значит, и даты ТВП.

В дальнейшем УЗИ органов малого таза выполнялось на 21-й день после ПЭ в полость матки при наличии положительного результата  $\beta$ -ХГ с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Повторное УЗИ органов малого таза проводилось через 5-6 недель после ПЭ в полость матки с целью определения сердцебиения эмбриона.

### **2.4.3. Гормональное исследование**

Целью гормонального исследования перед программой ВРТ явилась оценка овариального резерва и функционального состояния эндокринной системы. Для этого проводился анализ крови пациенток в научно-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - д.м.н. Т.Ю. Иванец). Использовался радиоиммунологический метод определения концентрации гормонов в сыворотке крови (тест-системы «Hoffmann La Roche, Ltd.» Швейцария): ЛГ, ФСГ, Е2, ТТГ, Т4<sub>св</sub>, ДГЭАС, пролактин, кортизол, Т, АМГ.

Гормональное обследование выполнялось в I фазу менструального цикла (2-3-й день менструального цикла) в цикле, предшествующем стимуляции функции яичников.

### **2.4.4. Исследование эякулята**

Пациентам перед вступлением в программу ИКСИ проводился анализ эякулята. Эякулят собирался путем мастурбации после 3-4 дней полового воздержания в стерильный пластмассовый контейнер для сбора эякулята. Определялись характеристики клеточных элементов: концентрация сперматозоидов, их подвижность, наличие морфологических изменений сперматозоидов, количество лейкоцитов, а также количество и типы незрелых

клеток сперматогенеза. Также эмбриолог оценивал объем спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, рН (Таблица 2).

Таблица 2

## Нормативные показатели спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
рН	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов	$\geq 15$ млн/мл
Общее количество сперматозоидов	$\geq 39$ млн
Время разжижения	$< 60$ минут
Подвижность сперматозоидов	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением	$\geq 32\%$
Морфология	$\geq 4\%$ нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	$\geq 58\%$ живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	$< 1$ млн/мл
Антиспермальные антитела (АСАТ)	$< 50\%$ сперматозоидов, ассоциированных с АСАТ

Для оценки патологии эякулята руководствовались следующими критериями:

- аспермия - отсутствие эякулята;
- азооспермия - отсутствие сперматозоидов в эякуляте;
- олигозооспермия - снижение концентрации сперматозоидов ниже  $<15$  млн/мл;
- астенозооспермия (АЗС) - снижение подвижности сперматозоидов ниже нормальных значений (общая подвижность  $<40\%$ , сперматозоиды с прогрессивным движением  $<32\%$ );
- тератозооспермия (ТЗС) - повышение количества сперматозоидов с аномальной морфологией ( $>96\%$ ).

### **2.4.5. Пайпель-биопсия эндометрия**

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 и иммуноморфологического исследования гликанов эндометрия (лектиновая гистохимия)

Овуляция подтверждалась при помощи УЗИ и тестов на овуляцию, оценивающих пик ЛГ в моче.

### **2.4.6. Гистологическое исследование эндометрия**

Гистологическое исследование эндометрия проводилось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением - д.м.н., профессор Щеголев А.И.).

Кусочки ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки. Срезы ткани толщиной 4-5 мкм для дальнейшего морфологического исследования изготавливали на микротоме Leika (Germany) и затем окрашивали гематоксилином и эозином (обзорная окраска).

### **2.4.7. Иммуногистохимическое исследование рецептивности эндометрия**

ИГХ исследование эндометрия проводилось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением - д.м.н., профессор Щеголев А.И.) по общепринятой методике на серийных парафиновых срезах эндометрия. Из парафиновых блоков готовили гистологические срезы толщиной 3-4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла, сушили при температуре 37°C в течение 18 часов.

После снятия парафина со срезов их обрабатывали в батарее спиртов 95, 80, 70%, инкубируя в каждом растворе по 2 минуты, и регидратировали в дистиллированной воде. Восстановление антигенной активности проводили в PTLink («Dako») при температуре 97°C в течение 20 мин. в 0,01 М цитратном буфере с pH 6,0.

Блокирование эндогенной пероксидазы проводилось 3%-ым раствором перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в течение 15 минут. Затем срезы ткани промывали буфером PBS.

Экспрессию стероидных рецепторов определяли с использованием мышиных моноклональных антител к ER (клон 1D5 RTU «ДАКО», Дания) и PR (клон 636 RTU «ДАКО», Дания), экспрессию LIF - с использованием кроличьих поликлональных антител в разведении 1:100 (Sigma, США). Для визуализации мест связывания антител с антигенами использовали систему «EnVision» (Dako), позволяющую проводить реакцию окисления субстрата 3,3-диаминобензидина (ДАБ) пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода с образованием водонерастворимого конечного продукта коричневого цвета. Для правильной постановки ИГХ реакций ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре ИГХ реакции, но без добавления первичных антител. Положительные контроли для каждого антитела выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы производителя. После проведения ИГХ реакций срезы контрастировали гематоксилином и заключали в синтетическую среду «Shandon mount TM» (USA). В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении x400. Анализ результатов ИГХ реакций для ER и PR проводили с учетом количества окрашенных ядер клеток и интенсивности окраски в эпителии и строме эндометрия, используя метод гистологического счета H-score по формуле:  $HS = 1a + 2b + 3c$ , где a - % слабо окрашенных клеток, b - % умеренно окрашенных клеток, c - % сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах. Степень выраженности

экспрессии ER и PR расценивали: 0-10% – отсутствие экспрессии, 11-100% – слабая экспрессия, 101-200% – умеренная экспрессия, 201-300% – выраженная экспрессия.

#### 2.4.8. Иммуноморфологическое исследование гликанов эндометрия

Иммуноморфологическое исследование гликанов эндометрия (лектиновая гистохимия), т.е. изучение паттерна экспрессии углеводных остатков в тканях эндометрия, проводилось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением - д.м.н., профессор Щеголев А.И.). Для определения гликотипа были использованы биотинилированные лектины растительного происхождения: *Maackia Amurensis* Lectin II (**MALII**) в концентрации 10 мкг/мл, *Sambucusnigra lectin* (**SNA**) в концентрации 2,5 мкг/мл, *Erythrin Cristagalli* Lectin (**ECL**) в концентрации 2,5 мкг/мл, *Ulex Europaeus* Agglutinin I (**UEAI**) в концентрации 5 мкг/мл, Concanavalin A (**ConA**) в концентрации 2,5 мкг/мл, *Vicia Villosa* Lectin (**VVL**) в концентрации 10 мкг/мл (VectorLabs, USA) в фосфатном буферном растворе (PBS, Sigma, США) с добавлением 4% бычьего сывороточного альбумина (BSA, ПанЭко, Россия), и антитела к углеводным эпитопам **анти-MECA-79** антитела ( $\alpha$ 2,3-сиалогликану) в концентрации 5 мкг/мл и **анти-Le<sup>Y</sup>** антитела в концентрации 1мкг/мл (Таблица 3, 4). Срезы были контрастированы гематоксилином, дегидратированы и заключены в среды «Shandon mount TM» (USA) для анализа под цветовым микроскопом. Выраженность экспрессии терминальных углеводных остатков, связывающихся с лектинами известной специфичности, оценивалась по интенсивности окрашивания продукта реакции в клетках эндометрия при помощи системы анализа изображения на базе микроскопа Nikon ECLIPSE с применением программного приложения.

Характеристика углеводной специфичности лектинов, используемых в лектиновой гистохимии

Группа	Лектин	Моносахаридная специфичность	Комментарии по специфичности
Лектины, связывающие сиаловую кислоту	Лектин из семян маакии амурской <i>Maackia Amurensis</i> (MAL II)	сиаловая кислота ( $\alpha$ 2-3SiaLN)	3'-сиалозиды в составе N-гликанов комплексного типа
	Агглютинин из ягод бузины черной <i>Sambucus nigra</i> (SNA, EBL)	сиаловая кислота ( $\alpha$ 2-6 SiaGal)	6'-сиалозиды в составе N-гликанов комплексного типа
Фукозо-связывающий лектин	Агглютинин из семян утесника европейского <i>Ulex Europaeus</i> (UEA I)	фукоза ( $\alpha$ Fuc)	фукозилированные фрагменты в составе гликанов
Галактозо/N-ацетилгалактозамин-связывающие лектины	Агглютинин из семян вики мохнатой <i>Vicia Villosa</i> (VVL, VVA)	N-ацетилгалактозамин ( $\alpha$ GalNAc)	фрагменты N-ацетилгалактозамина в составе гликанов
	Агглютинин из семян эритрины петушиный гребень <i>Erythrina Crist</i> (ECL, ECA)	терминальная $\beta$ 1-Gal	N-гликаны комплексного типа с терминальными олиголактозаминами фрагментами
Маннозосвязывающий лектин	Лектин из стручков фасоли <i>Canavalia ensiformis</i> (Concanavalin A, Con A)	глюкоза ( $\alpha$ Glc), манноза ( $\alpha$ Man)	N-гликаны олигоманнозного типа и гибридного типа

Характеристика специфичности моноклональных антител, используемых для определения уровня экспрессии углеводных эпитопов в тканях эндометрия иммуногистохимической техникой

Моноклональные антитела	Специфичность	Производитель
Очищенные крысиные антитела к адрессину периферических лимфоузлов мыши (анти-МЕСА-79-антитела, клон МЕСА-79)	Сульфатированные углеводные эпитопы адрессина периферических лимфоузлов, которые являются лигандами L-селектина	BD Pharmingen
Овечьи антитела к антигену, родственному антигенам группы крови углеводной природы Lewis (анти-Le <sup>Y</sup> -антитела, клон LWY/1463)	Дифукозилированный олигосахарид [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -R]	Abcam

#### 2.4.9. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

Стимуляция функции яичников проводилась по протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ) или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ). Доза препарата подбиралась индивидуально в зависимости от возраста пациентки, наличия хирургических вмешательств на яичниках в анамнезе, данных гормонального исследования и числа антральных фолликулов по данным УЗИ. После проведения УЗ-мониторинга при необходимости производилась коррекция дозы препаратов ГТ.

Введение экзогенных ГТ начиналось со 2-3 дня менструального цикла. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм вводился ант-ГнРГ с целью предупреждения эндогенных паразитарных пиков ЛГ. Затем

препарат ант-ГнРГ вводился ежедневно, включая день назначения триггера овуляции.

Триггер овуляции вводился при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17 мм. В качестве триггера овуляции использовался ХГ в дозе 8 000 – 10 000 МЕ в виду отсутствия риска развития СГЯ в наблюдаемой группе пациенток.

ТВП яичников осуществлялась в малой операционной с применением кратковременного внутривенного обезболивания под ультразвуковым контролем с использованием одноразовых пункционных игл через 36 часов после введения триггера овуляции. Полученная фолликулярная жидкость помещалась в стерильные подогретые пробирки, содержащие 0,5 мл гепарина (2500 ЕД/мл).

#### **2.4.10. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение**

Просмотр аспирированной фолликулярной жидкости осуществлялся эмбриологом под контролем стереомикроскопа. Определялось число полученных ОКК, после чего ооциты отмывались от фолликулярной жидкости и крови, а затем помещались в стерильные планшеты с культуральной средой для периода предварительной инкубации в течение 2-3 часов.

После окончания предварительной инкубации производилось денудирование ооцитов, то есть механическое и энзимное удаление клеток кумулюса из препарата. Вначале ОКК помещались на 20 секунд в раствор гиалуронидазы, затем отмывались от фермента в буферной среде и оставлялись на 30 минут в исходной культуральной среде. Оставшиеся клетки кумулюса удалялись механическим путем. После энзимной и механической обработки ооцитов оценивалась степень зрелости клеток:

- если в цитоплазме клетки визуализировалось ядро и отсутствовало полярное тельце - ооцит находился на стадии зародышевого пузырька

(GV-germinal vesicle), что соответствовало профазе первого мейотического деления;

- если в цитоплазме клетки отсутствовало ядро и полярное тельце - ооцит находился на стадии метафазы первого мейотического деления (МI);
- наличие полярного тельца в перивителлиновом пространстве свидетельствовало о завершении процессов созревания ооцита и достижения второго мейотического деления (МII).

Параллельно с очисткой ооцитов производилось центрифугирование, флотирование и обработка спермы супруга. Все зрелые ооциты подвергались оплодотворению методом ИКСИ.

После проведения оплодотворения методом ИКСИ ооциты переносились в культуральную среду для дальнейшего культивирования. Нормальное оплодотворение регистрировалось при наличии двух симметричных по размеру пронуклеусов в цитоплазме через 16-18 часов после проведения ИКСИ. В случае наличия одного или трех и более пронуклеусов в цитоплазме оплодотворение расценивалось как аномальное. При отсутствии пронуклеусов в цитоплазме ооцита ооцит считался не оплодотворившимся. Этап культивирования был произведен с использованием сред культивирования СООК (Австралия).

Показаниями к ИКСИ у наблюдаемых пациентов были:

1. субфертильная сперма у партнера;
2. низкая частота оплодотворения в предыдущей программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

#### **2.4.11. Морфологическая оценка эмбрионов**

Морфологическая оценка эмбрионов проводилась через 120-122 часа (на 5-е сутки) культивирования. Учитывались морфологические характеристики эмбрионов по классификации Гарднера (степень зрелости бластоцист, качество ТФЭ и ВКМ [166,167]).

Степень зрелости бластоцисты классифицировалась следующим образом:

1. ранняя бластоциста - полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона;
2. полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;
3. полная бластоциста - полость занимает весь объем эмбриона;
4. расширенная бластоциста - полость бластоцисты становится больше, начинается истончение блестящей оболочки;
5. ТФЭ начинает проникать через блестящую оболочку;
6. бластоциста покинула блестящую оболочку.

ВКМ классифицировалась следующим образом:

- A. плотная упаковка большого числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- B. свободная упаковка среднего числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- C. незначительное число клеток ВКМ.

ТФЭ классифицировался следующим образом:

- A. большое число клеток формируют единый эпителиальный слой;
- B. небольшое число клеток формируют неплотный эпителиальный слой;
- C. незначительное число клеток ТФЭ.

К эмбрионам отличного качества относились бластоцисты 4-5 класса с ВКМ категории А и качеством ТФЭ категории А.

#### **2.4.12. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода**

ПЭ в полость матки осуществлялся на 5-е сутки после ТВП с помощью «мягкого» катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). В полость матки переносили один эмбрион лучшего качества. Ведение посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам с назначением вагинального микронизированного прогестерона в дозе 600 мг в день.

Через 14 дней после ПЭ в полость матки определялась концентрация  $\beta$ -ХГ в сыворотке крови пациентки. Тест на беременность считался положительным, если уровень  $\beta$ -ХГ составлял более 20 МЕ/л. Через 21 день после ПЭ проводилась диагностика клинической беременности, и при визуализации плодного яйца в полости матки регистрировалась клиническая беременность.

## 2.5. Статистическая обработка полученных данных

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

Для качественных данных определялись риски (%). Для сравнения категориальных данных в двух и более группах, а также для оценки значимых различий между ними использовался тест  $\chi^2$ . Для сравнения бинарных данных мерой сравнения явилось ОШ с доверительным интервалом 95% (95% ДИ). Метод логистической регрессии с расчетом площади под кривой (AUC – от англ. – Area Under the Curve) использовался при расчете ОШ<sub>кор</sub> для контроля конфаундеров.

Для анализа количественных данных в группах сравнения определялся вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова, графический анализ данных). При нормальном распределении данных определялись средние значения со стандартным отклонением, для оценки различий в группах применялись методы параметрической статистики (t-тест/ANOVA). При ненормальном распределении данных определялись медианы с интерквартильным размахом, для оценки различий в группах применялись методы непараметрической статистики (тест Манна-Уитни/тест Крускалла-Уаллиса).

Зависимые данные оценивались с помощью коэффициента корреляции. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена.

Различия между статистическими величинами считались статистически значимыми при уровне достоверности  $p < 0,05$ .

### Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ

Для решения задач №1-2 в исследование случай-контроль изначально были включены 172 пары, обратившиеся для лечения бесплодия методами ВРТ, которые были стратифицированы на группы в отношении 1:3 в зависимости от наступления беременности в данной программе ИКСИ. Пары случай-контроль подбирались на основании уравнивания по 2-м признакам: врачу акушеру-гинекологу и врачу-эмбриологу, выполнявших лечение бесплодия в данной программе ИКСИ. 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 (Рисунок 4).



Рисунок 4. Профиль набора пациентов в исследование.

Таким образом, были сформированы 2 группы пациентов:

- группа 1 – пациенты, у которых беременность наступила (n=43);
- группа 2 – пациенты, у которых беременность не наступила (n=111).

Всем пациенткам было проведено УЗИ и определена толщина эндометрия в окно имплантации (во время ПЭ в цикле ВРТ).

Были проанализированы клинико-лабораторные данные пациенток в 2-х группах сравнения. Возраст, антропометрические данные и частота вредных привычек не различалась в 2-х группах пациентов. В основном пациентки были раннего репродуктивного возраста и имели нормальный ИМТ (Таблица 5).

Таблица 5

Возраст и антропометрические данные пациентов групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Возраст женщин, лет*	32,3±3,4	32,7±3,8	0,5393
Возраст мужчин, лет*	34,1±4,0	35,1±5,3	0,2516
Рост, см*	166,9±4,6	166,1±4,9	0,3603
Масса тела, кг*	60,2±8,5	61,6±7,9	0,3147
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	21,5±2,5	22,3±2,7	0,1000
Курение**	3 (6,9%)	4 (3,6%)	0,3673

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

\*\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

Менструальная и сексуальная функции не отличалась у пациенток 2-х групп (Таблица 6).

Таблица 6

Особенности менструальной и сексуальной функции у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Возраст менархе, лет	12,9±1,2	13,1±1,2	0,4595
Длительность цикла, дней	28,8±1,8	28,7±1,8	0,6213
Длительность менструации, дней	5,0±0,9	4,8±1,0	0,3234
Дебют половой жизни, лет	17,7±2,2	18,1±2,2	0,3297

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

Структура гинекологической заболеваемости была представлена наличием хронического сальпингоофорита с тубэктомией в анамнезе, наружного генитального эндометриоза (НГЭ) и аденомиоза 1-2 стадии, интрамуральной миомой матки малых размеров и миомэктомией в анамнезе, полипами эндометрия и хламидиозом в анамнезе. Гинекологическая заболеваемость была несколько выше в группе незабеременевших пациенток, но значимо отличалась только по числу полипов эндометрия с полипэктомией в анамнезе, которая наблюдалась в 2,1 раз чаще в группе пациенток с не наступившей беременностью ( $p=0,0434$ ). Обращает внимание, что более половины пациенток имели истинный трубный фактор бесплодия в связи с тубэктомией в анамнезе. Также у большего числа пациенток отмечалось вторичное бесплодие. При этом продолжительность бесплодия в обеих группах была сопоставима, составив в среднем 5,5 лет (Таблица 7).

Таблица 7

Структура гинекологической заболеваемости у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Хронический сальпингоофорит*	18 (41,6%)	47 (42,3%)	0,9566
Наружный генитальный эндометриоз*	5 (11,6%)	18 (16,2%)	0,4735
Аденомиоз*	3 (6,9%)	14 (12,6%)	0,3167
Миома матки*	8 (18,6%)	25 (22,5%)	0,5950
Полипы эндометрия в анамнезе*	6 (13,9%)	33 (29,7%)	<b>0,0434</b>
Хламидиоз в анамнезе*	4 (9,3%)	12 (10,8%)	0,7831
Миомэктомия в анамнезе*	4 (9,3%)	14 (12,6%)	0,5662
Тубэктомия в анамнезе*	19 (44,2%)	50 (45,0%)	0,7808
Бесплодие вторичное*	27 (62,8%)	62 (55,8%)	0,4343
Длительность бесплодия, лет**	5,5±3,5	5,9±4,0	0,6084

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

При оценке акушерского анамнеза (число беременностей, число своевременных и преждевременных родов, число самопроизвольных и искусственных прерываний беременности) не было выявлено значимых различий в группах. Обращает внимание низкая gravidарность и паритет у

пациенток, включенных в исследование. Число попыток программ ЭКО или ИКСИ в анамнезе и число наступивших в результате этого беременностей также было сопоставимо в 2-х группах наблюдения (Таблица 8).

Таблица 8

## Акушерский анамнез у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Число беременностей	1 (0-2)	1 (0-1)	0,2899
Число родов	0 (0-0)	0 (0-0)	0,8425
Число самопроизвольных выкидышей	0 (0-1)	0 (0-1)	0,4967
Число искусственных абортов	0 (0-1)	0 (0-0)	0,5030
Число внематочных беременностей	0 (0-0)	0 (0-0)	0,6917
Число попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе	0 (0-1)	0 (0-1)	0,9800
Число беременностей в результате ВРТ	0 (0-0)	0 (0-0)	0,8569

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

При анализе соматической заболеваемости не было выявлено разницы между группами пациенток (Таблица 9).

Таблица 9

## Соматические заболевания у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Аллергические заболевания	4 (9,3%)	7 (6,3%)	0,5172
Заболевания верхних дыхательных путей	3 (6,9%)	8 (7,2%)	0,9602
Заболевания желудочно-кишечного тракта	2 (4,6%)	5 (4,5%)	0,9687
Заболевания мочевыделительной системы	3 (6,9%)	10 (9,0%)	0,6840
Эндокринные заболевания	3 (6,9%)	17 (15,3%)	0,1672

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

Заболевания верхних дыхательных путей (ВДП) были представлены хроническим тонзиллитом и фарингитом, заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) - хроническим гастритом и энтероколитом, урологические

заболевания - хроническим циститом и уретритом, аллергические заболевания - атопическим дерматитом и бронхиальной астмой, эндокринные заболевания – аутоиммунным гипотиреозом. Все соматические заболевания на момент вступления пациенток в программу ВРТ были в состоянии стойкой ремиссии или компенсации.

Были проанализированы лабораторные данные всех пациенток. При статистической оценке клинического и биохимического анализа крови, гемостазиограммы, а также данных общего анализа мочи значимых различий в группах сравнения выявлено не было. Результаты флюорографии органов грудной клетки, УЗИ молочных желез/маммографии, УЗИ щитовидной железы, ЭКГ, мазка на флору из влагалища, а также цитологического исследования шейки матки у всех исследуемых женщин были в пределах нормы и не отличались в изучаемых группах. Сравнительная оценка гормонального статуса пациенток представлена в таблице 10. Не было выявлено отличий в уровне гормонов в сравниваемых группах.

Таблица 10

## Уровень гормонов у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
ФСГ, мЕд/мл	7,3±1,7	6,8±1,8	0,1251
ЛГ, мЕд/мл	6,1±2,9	5,7±2,5	0,3992
Е2, пмоль/л	137,8±106,5	143,9±96,1	0,7295
Пролактин, мЕд/л	335,7±151,9	327,5±152,5	0,7648
Т, нмоль/л	0,9±0,5	1,1±0,6	0,4532
ДГЭА-С	4,1±2,4	4,8±3,0	0,1848
АМГ, нг/мл	3,9±3,4	3,6±3,2	0,5192
ТТГ, мЕд/л	1,6±0,7	1,5±0,7	0,2007
Т4 <sub>св.</sub> , пмоль/л	12,9±2,7	13,2±2,3	0,4516

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

У всех пациенток проводилось УЗИ органов малого таза в день ПЭ. Не было выявлено значимых отличий в параметрах размеров матки, объемов яичников и КАФ, определяющему овариальный резерв. При этом отмечалось, что у пациенток с наступившей в результате ПЭ 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 5).

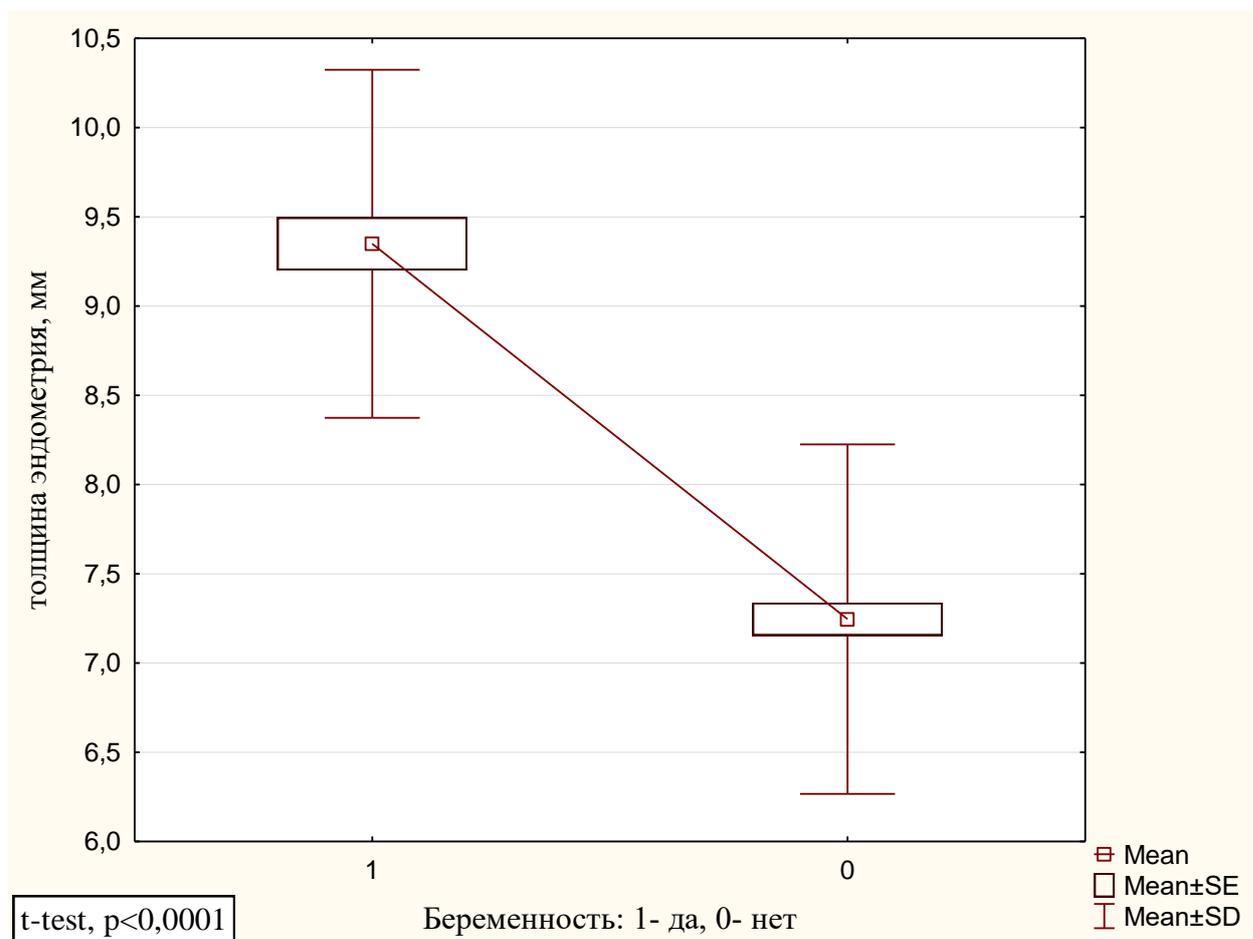


Рисунок 5. Толщина эндометрия по данным УЗИ у пациенток групп 1 и 2.

### 3.2. Особенности овариальной стимуляции у пациенток в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ

Всем пациенткам стимуляцию функции яичников проводили по протоколу с ант-ГнРГ с препаратами рФСГ или чМГ. Не было выявлено разницы в назначении препаратов для овариальной стимуляции. Суммарная доза назначаемых препаратов ГТ была сопоставимой в 2-х группах пациенток. Длительность овариальной стимуляции также не отличалась в группах сравнения (Таблица 11).

Особенности овариальной стимуляции у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Вид ГТ*			
• рФСГ	31 (72,1%)	62 (55,9%)	0,0645
• чМГ	12 (27,9%)	49 (44,1%)	
Длительность стимуляции, дней**	8,9±0,8	8,8±1,1	0,6209
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1360,1±344,1	1366,3±392,2	0,9281

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

### 3.3. Характеристика гаметогенеза и раннего эмбриогенеза у пациентов в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ

Данные сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза представлены в таблице 12. Анализ сперматогенеза не выявил значимых отличий между группами пациентов.

Параметры оогенеза и эмбриогенеза были сопоставимы в 2-х группах пациентов, однако в итоге было получено больше blastocyst отличного качества у пациенток с наступившей беременностью.

**Таким образом,** при анализе клинико-лабораторных и эмбриологических параметров пациенток не было выявлено значимых отличий в клинико-анамнестических и лабораторных данных пациентов за исключением более низкой заболеваемости полипами эндометрия и большего числа blastocyst отличного качества, которое было отмечено в группе пациентов с наступившей беременностью.

Характеристика полученных гамет и эмбрионов у пациентов групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n = 43)	Группа 2 (n = 111)	p-уровень
Нормоспермия*	30 (69,8%)	72 (64,9%)	0,4150
Число ОКК	341	825	
Среднее число ОКК на 1 пациентку**	8 (4-10)	7 (4-11)	0,5061
Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку**	5 (4-8)	5 (3-8)	0,4370
Число зигот	248	566	
Среднее число зигот на 1 пациентку**	5 (3-8)	5 (4-7)	0,3300
Средний уровень фертилизации***	0,91±0,13	0,88±0,18	0,3502
Число бластоцист	195	418	
Среднее число бластоцист на 1 пациентку**	4 (2-6)	3 (1-5)	0,1554
Средний уровень бластуляции***	0,78±0,23	0,74±0,27	0,3756
Среднее число бластоцист отличного качества на 1 пациентку**	1 (1-3)	1 (0-2)	<b>0,0198</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни;

\*\*\* Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест.

### 3.4. Пороговая толщина эндометрия, определяющая вероятность наступления беременности в программах ВРТ (многофакторный анализ)

Изначально пациенты были разделены на группы в зависимости от наступления беременности. Нами были проанализированы дальнейшие исходы, такие как частота самопроизвольного выкидыша до 12 недель гестации и частота живорождения. Из 43 пациенток беременность завершилась родами в 37 случаях (86%), у 6 пациенток случилось самопроизвольное прерывание беременности в 1-м триместре (14%).

Для определения пороговой величины эндометрия, влияющей на наступление беременности и живорождение, был проведен многофакторный анализ (логистическая регрессия) с построением ROC-кривой.

Единственными факторами, влияющими на наступление беременности в настоящей программе ИКСИ, были толщина эндометрия и число полученных бластоцист отличного качества.

С помощью метода логистической регрессии при проведении однофакторного анализа 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%).

Затем был проведен многофакторный анализ, учитывающий возможный конфаундер – число полученных бластоцист отличного качества. С помощью метода логистической регрессии было выявлено, что ОШ<sub>кор</sub> наступления беременности в зависимости от толщины эндометрия с учетом полученных бластоцист отличного качества составляет **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%.

### 3.5. Клинико-лабораторные факторы, влияющие на толщину 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). Нами была поставлена задача выявить клинико-лабораторные факторы риска, способствующие развитию тонкого эндометрия.

Были проанализированы клинико-лабораторные данные пациенток в 2-х группах сравнения. Возраст, антропометрические данные и частота вредных привычек не различалась в 2-х группах пациентов (Таблица 13).

Таблица 13

Возраст и антропометрические данные пациентов групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	p-уровень
Возраст женщин, лет*	32,8±3,7	32,2±3,6	0,2898
Возраст мужчин, лет*	34,9±5,2	34,7±4,7	0,7670
Рост, см*	166,5±5,2	166,1±4,3	0,5976
Масса тела, кг*	62,2±8,4	60,1±7,5	0,1062
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	22,4±2,8	21,7±2,4	0,1195
Курение**	3 (3,5%)	4 (5,8%)	0,5016

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

\*\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

Менструальная и сексуальная функции не отличалась у пациенток 2-х групп (Таблица 14).

Таблица 14

Особенности менструальной и сексуальной функции пациенток групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	p-уровень
Возраст менархе, лет	13,1±1,2	12,9±1,2	0,3617
Длительность цикла, дней	28,5±1,7	28,9±2,0	0,2644
Длительность менструации, дней	4,9±1,0	4,9±0,9	0,8491
Дебют половой жизни, лет	18,2±2,4	17,8±1,9	0,3168

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

Структура гинекологической заболеваемости также не отличалась в 2-х группах пациенток за исключением более высокого числа полипов эндометрия и полипэктомий в анамнезе, которое отмечалось в 2,1 раз чаще у пациенток с тонким эндометрием ( $p=0,0158$ ). Также было выявлено, что пациентки с тонким эндометрием чаще имели вторичное бесплодие по сравнению с пациентками с нормальным эндометрием, у которых чаще отмечалось первичное бесплодие (Таблица 15).

Таблица 15

## Структура гинекологической заболеваемости у пациенток групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	p-уровень
Хронический сальпингоофорит*	36 (42,3%)	29 (42,0%)	0,9677
Наружный генитальный эндометриоз*	13 (15,3%)	10 (14,5%)	0,8896
Аденомиоз*	10 (11,7%)	7 (10,1%)	0,7497
Миома матки*	17 (20,0%)	16 (23,2%)	0,6315
Полипы эндометрия в анамнезе*	28 (32,9%)	11 (15,9%)	<b>0,0158</b>
Хламидиоз в анамнезе*	8 (9,4%)	8 (11,6%)	0,6589
Миомэктомия в анамнезе*	8 (9,44%)	10 (14,5%)	0,3290
Тубэктомия в анамнезе*	35 (41,2%)	34 (49,3%)	0,3148
Бесплодие вторичное*	59 (69,4%)	30 (43,5%)	<b>0,0445</b>
Длительность бесплодия, лет**	5,9±4,1	5,5±3,6	0,5121

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

При оценке акушерского анамнеза (число беременностей, число своевременных и преждевременных родов, число самопроизвольных и искусственных прерываний беременности) было выявлено, что у пациенток с тонким эндометрием отмечалась более высокая гравидарность за счет большей доли самопроизвольных выкидышей в анамнезе. Число попыток программ ЭКО или ИКСИ в анамнезе и число наступивших в результате этого беременностей было сопоставимо в 2-х группах наблюдения (Таблица 16).

Таблица 16

## Акушерский анамнез у пациенток групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	р-уровень
Число беременностей	1 (0-2)	0 (0-1)	<b>0,0177</b>
Число родов	0 (0-0)	0 (0-0)	0,8851
Число самопроизвольных выкидышей	0 (0-1)	0 (0-0)	<b>0,0406</b>
Число искусственных абортов	0 (0-1)	0 (0-0)	0,4242
Число внематочных беременностей	0 (0-0)	0 (0-0)	0,5226
Число попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе	0 (0-1)	0 (0-1)	0,9053
Число беременностей в результате ВРТ	0 (0-0)	0 (0-0)	0,2137

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

При анализе соматической заболеваемости не было выявлено разницы между группами пациенток (Таблица 17).

Таблица 17

## Соматические заболевания у пациенток групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	р-уровень
Аллергические заболевания	5 (5,9%)	6 (8,7%)	0,5002
Заболевания верхних дыхательных путей	6 (7,0%)	5 (7,2%)	0,9641
Заболевания желудочно-кишечного тракта	4 (4,7%)	3 (4,3%)	0,9155
Заболевания мочевыделительной системы	9 (10,6%)	4 (5,8%)	0,2875
Эндокринные заболевания	13 (15,3%)	7 (10,1%)	0,3445

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

Были проанализированы лабораторные данные всех пациенток. При статистической оценке клинического и биохимического анализа крови, гемостазиограммы, а также данных общего анализа мочи значимых различий в группах сравнения выявлено не было. Результаты флюорографии органов грудной клетки, УЗИ молочных желез/маммографии, УЗИ щитовидной железы, ЭКГ, мазка на флору из влагалища, цитологического исследования

шейки матки и гормонального исследования у всех исследуемых женщин были в пределах нормы и не отличались в изучаемых группах.

При анализе вида овариальной стимуляции, как возможной ятрогенной причины недостаточного роста эндометрия, было выявлено, что пациенткам с тонким эндометрием, погранично значимо чаще назначались ГТ, содержащие ЛГ. Суммарная доза назначаемых препаратов ГТ и длительность овариальной стимуляции была сопоставимой в 2-х группах пациенток (Таблица 18).

Таблица 18

## Особенности овариальной стимуляции у пациенток групп А и Б

Показатели	Группа Б (n = 85)	Группа А (n = 69)	р-уровень
Вид ГТ*			
• рФСГ	46 (54,1%)	47 (68,1%)	0,0773
• чМГ	39 (45,9%)	22 (31,9%)	
Длительность стимуляции, дней**	8,8±1,0	8,8±0,9	0,9312
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1349,8±349,2	1382,8±413,3	0,5927

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

**Таким образом,** выявленным клинико-анамнестическим фактором риска, оказывающими влияние на толщину эндометрия в изучаемой группе пациенток, было большее число беременностей за счет большей доли самопроизвольных выкидышей в анамнезе и большей доли полипов эндометрия с полипэктомией в анамнезе что, несомненно, связано с воспалительным генезом поражения эндометрия. 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).

### **3.6. Данные гистологического исследования эндометрия**

Из 154 пациенток 32 пациенткам была проведена пайпель-биопсия эндометрия в окно имплантации цикла, предшествующего циклу ВРТ.

При гистологическом исследовании эндометрий во всех случаях соответствовал средней стадии секреции и не отличался между группами пациенток.

### **3.7. Данные иммуногистохимического исследования рецептивности эндометрия в зависимости от его толщины и наступления беременности в программах ВРТ**

Из 32 пациенток, чей эндометрий был подвергнут ИГХ исследованию, беременность наступила у 12 пациенток и не наступила у 20 пациенток. 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.

Таким образом, у всех пациенток с тонким эндометрием, включенных в данную часть исследования, беременность не наступила.

Вначале были проанализированы клинико-лабораторные данные в указанных подгруппах пациенток.

Возраст и антропометрические данные не различались в 3-х группах пациенток. В основном пациентки были раннего репродуктивного возраста и

имели нормальный ИМТ. Среди пациенток в данной когорте вредные привычки и профессиональные вредности отсутствовали (Таблица 19).

Таблица 19

Возраст и антропометрические данные пациентов групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Возраст женщин, лет	33,0±3,9	33,8±1,7	33,0±5,5	0,9194
Возраст мужчин, лет	35,7±3,5	36,6±4,6	35,8±7,5	0,9428
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	22,3±2,8	22,9±2,2	22,4±3,0	0,8844

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, ANOVA

Менструальная и сексуальная функции не отличалась у пациенток 3-х групп (Таблица 20).

Таблица 20

Особенности менструальной и сексуальной функции  
у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Возраст менархе, лет	12,9±1,2	13,1±1,2	12,8±1,1	0,4565
Длительность цикла, дней	28,8±1,8	28,7±1,8	28,8±1,9	0,7243
Длительность менструации, дней	5,0±0,9	4,8±1,0	4,9±1,1	0,6274
Дебют половой жизни, лет	17,5±1,1	17,6±1,8	17,3±1,6	0,7081

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, ANOVA

Структура гинекологической заболеваемости была представлена наличием хронического сальпингоофорита с тубэктомией в анамнезе, НГЭ и аденомиоза 1-2 стадии, интрамуральной миомой матки малых размеров и миомэктомией в анамнезе, полипами эндометрия и хламидиозом в анамнезе. У пациенток с не наступившей беременностью (группы 2А и 2Б) отмечалась большая доля гинекологических заболеваний в виде НГЭ, миомы матки и полипов эндометрия в анамнезе. У них также был более длительный анамнез бесплодия (Таблица 21).

Таблица 21

Структура гинекологической заболеваемости у пациенток  
групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Хронический сальпингоофорит*	6 (50%)	2 (33,3%)	8 (57,1%)	0,6211
НГЭ*	1 (8,3%)	<b>3 (50%)</b>	1 (7,1%)	<b>0,0364</b>
Аденомиоз*	0	1 (16,7%)	1 (7,1%)	0,3809
Миома матки*	2 (16,7%)	<b>4 (66,7%)</b>	<b>4 (28,6%)</b>	0,0935
Полипы эндометрия в анамнезе*	1 (8,3%)	1 (16,7%)	<b>5 (35,7%)</b>	0,2285
Хламидиоз в анамнезе*	0	1 (16,7%)	3 (21,4%)	0,2429
Миомэктомия в анамнезе*	1 (8,3%)	<b>3 (50%)</b>	2 (14,3%)	0,0869
Тубэктомия в анамнезе*	4 (33,3%)	2 (33,3%)	8 (57,2%)	0,4037
Бесплодие вторичное*	7 (58,3%)	6 (66,7%)	5 (35,7%)	0,3425
Длительность бесплодия, лет**	4,7±2,7	<b>9,0±4,5</b>	<b>8,3±5,7</b>	0,0904

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA

При оценке акушерского анамнеза (число беременностей, родов, аборт, попытки программ ЭКО или ИКСИ в анамнезе, наступивших в результате этого беременностей), отмечалась низкая гравидарность и паритет, и отсутствие значимых различий между группами (Таблица 22).

Таблица 22

Акушерский анамнез у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Число беременностей	1 (0-2,5)	1,5 (0-2)	0 (0-1)	0,4895
Число родов	0 (0-0,5)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,2409
Число аборт	0 (0-0,5)	0,5 (0-1)	0 (0-1)	0,5782
Число внематочных беременностей	0 (0-1,5)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,4539
Число попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе	0,5 (0-2)	1,5 (0-3)	0 (0-2)	0,5427
Число беременностей в результате ВРТ	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,0999

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Крускала-Уаллиса

При анализе соматической заболеваемости не было выявлено разницы между группами пациенток (Таблица 23).

Таблица 23

## Соматические заболевания у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р-уровень
Аллергические заболевания	1 (8,3%)	1 (16,7%)	2 (14,3%)	0,8493
Заболевания верхних дыхательных путей	1 (8,3%)	0	0	0,4230
Заболевания желудочно-кишечного тракта	1 (8,3%)	1 (16,7%)	1 (7,1%)	0,7894
Заболевания мочевыделительной системы	1 (8,3%)	0	1 (7,1%)	0,7757
Эндокринные заболевания	1 (8,3%)	1 (16,7%)	3 (21,4%)	0,6548

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

При анализе гормонального статуса также не было выявлено отличий в сравниваемых группах, однако отмечался тренд к более высокому уровню эстрадиола у пациенток с тонким эндометрием, что может быть связано с компенсаторным его повышением в ответ на низкую рецепторную активность. Также отмечался статистически значимый более низкий уровень тироксина в группе 2А, что не имело клинического значения и скорее всего было связано с малым числом наблюдения в данной группе (Таблица 24).

Таблица 24

## Уровень гормонов у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р-уровень
ФСГ, мЕд/мл	8,2±2,0	7,2±2,6	7,4±2,8	0,6551
ЛГ, мЕд/мл	5,8±2,7	5,6±2,5	6,7±3,7	0,7175
Е2, пмоль/л	94,6±48,8	101,9±56,0	<b>178,4±133,2</b>	0,0786
Пролактин, мЕд/л	370,3±177,1	236,2±110,3	301,6±133,0	0,1927
Т, нмоль/л	1,25±0,67	1,02±0,57	0,86±0,46	0,2396
АМГ, нг/мл	4,8±4,6	2,7±1,7	3,5±3,0	0,4705
ТТГ, мЕд/л	1,87±0,81	1,61±0,78	1,58±0,70	0,6107
Т4 <sub>св.</sub> , пмоль/л	13,90±1,91	11,23±2,18	13,66±1,26	<b>0,0100</b>

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA

Не было выявлено разницы в назначении препаратов для овариальной стимуляции. Суммарная доза назначаемых препаратов ГТ была сопоставимой в 3-х группах пациенток. Длительность овариальной стимуляции также не отличалась в группах сравнения (Таблица 25).

Таблица 25

Особенности овариальной стимуляции у пациенток групп 1А, 2А и 2Б				
Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровен ь
Вид ГТ*				
• рФСГ	8 (66,7%)	2 (33,3%)	9 (64,3%)	0,3514
• чМГ	4 (33,3%)	4 (66,7%)	5 (35,7%)	
Длительность стимуляции, дней**	9,2±0,9	9,2±1,9	8,9±0,7	0,8339
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1512,5±371,3	1812,5±766,9	1419,6±371,6	0,2369

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, ANOVA

При анализе гаметогенеза и эмбриогенеза, у пациенток с наступившей беременностью (группа 1А) отмечался более высокий уровень бластуляции и, как следствие, было получено большее число бластоцист отличного качества (Таблица 26).

При проведении УЗИ не было выявлено значимых отличий в параметрах размеров матки, объема яичников и КАФ. При этом отмечалось, что у пациенток с наступившей в результате ПЭ беременностью, была значимо большая толщина эндометрия (9,6±1,1) мм по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила (7,0±1,2) мм ( $p < 0,0001$ ). У пациенток с толщиной эндометрия  $\geq 8$  мм беременность наступила в 66,7% случаев (у 12 из 18 человек), тогда как у пациенток с тонким эндометрием случаев беременности зафиксировано не было (0 из 14 человек) ( $p = 0,0001$ ). При этом следует отметить, что на наступление беременности могли влиять такие факторы (конфаундеры), как эндометриоз и число бластоцист отличного качества, имевшие статистически значимую связь с наступлением

беременности в однофакторном анализе. При проведении многофакторного анализа методом логистической регрессии ОШ наступления беременности в зависимости от наличия тонкого эндометрия с учетом эндометриоза составило **1,47** (95% ДИ=1,05; 2,5). Качество blastocyst потеряло статистическую значимость при проведении многофакторного анализа.

Таблица 26

Характеристика полученных гамет и эмбрионов у пациентов групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Нормоспермия*	9(75%)	5(83,3%)	8 (57,1%)	0,6585
Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку**	4,5 (4-8)	4 (2-5)	6 (3-7)	0,4235
Среднее число зигот на 1 пациентку**	4 (3-7)	4 (2-5)	6 (2-7)	0,5640
Средний уровень фертилизации***	0,77±0,25	0,70±0,22	0,72±0,15	0,7967
Среднее число blastocyst на 1 пациентку**	3,5 (2,5-4,5)	<b>1,5 (1-4)</b>	4 (1-5)	0,2845
Средний уровень blastulation***	0,82±0,20	<b>0,68±0,35</b>	<b>0,68±0,26</b>	0,3370
Среднее число blastocyst отличного качества на 1 пациентку**	2,5 (1-3)	<b>1 (0-1)</b>	<b>0 (0-2)</b>	<b>0,0243</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Крускала-Уаллиса;

\*\*\*Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, ANOVA.

После оценки клиничко-лабораторных данных пациенток было проведено ИГХ-определение рецептивности эндометрия в указанных группах. Следует отметить, что не было получено статистически значимой разницы в изучаемых параметрах рецептивности в зависимости от наступления беременности и толщины эндометрия ( $p > 0,05$ ).

**Экспрессия ER** отмечалась во всех слоях эндометрия, была максимальной в железах, минимальной - в строме эндометрия, и находилась в диапазоне от 15% до 275%. При сравнении уровня экспрессии в группах

пациенток было отмечено, что наибольший уровень экспрессии во всех тканях эндометрия отмечался в группе 1А. Медиана распределения экспрессии в поверхностном эпителии составила 177,5%, в железах – 210%, в строме – 122,5% (Таблица 27, Рисунок 6а).

Таблица 27

## Экспрессия ER у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Поверхност. эпителий (%)* (минимум-максимум)	186,8±58,5 (100-260)	153,3±42,4 (100-210)	174,8±54,2 (75-255)	0,3563
>177,5% (> медианы)**	6 (50%)	2 (33,3%)	6 (42,8%)	0,6542
Железы эндометрия (%)* (минимум-максимум)	205,0±53,2 (80-260)	175,0±85,2 (40-265)	170,0±81,1 (35-275)	0,2089
>210% (> медианы)**	7 (58,3%)	3 (50%)	6 (42,8%)	0,7337
Строма эндометрия (%)* (минимум-максимум)	137,9±44,7 (80-255)	114,2±64,6 (15-210)	121,8±40,1 (65-215)	0,2838
>122,5% (> медианы)**	8 (66,8%)	2 (33,3%)	6 (42,8%)	0,3189

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA;

\*\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

**Экспрессия PR** также отмечалась во всех слоях эндометрия, была максимальной в поверхностном эпителии, меньше - в железах и строме эндометрия, и находилась в диапазоне от 25% до 300%. При этом наибольший уровень экспрессии в поверхностном и железистом эпителии эндометрия отмечался в группе 1А, и не отличался между группами в строме эндометрия. Медиана распределения экспрессии в поверхностном эпителии составила 205%, в железах – 190%, в строме – 180% (Таблица 28, Рисунок 6б).

Соотношение **PR/ER** находилось в диапазоне от 0,20 до 9,0 и было максимальным в строме, и минимальным - в железах эндометрия. В поверхностном эпителии несколько большее соотношение PR/ER отмечалось в группе наступления беременности (группа 1А), в железах было одинаковым вне зависимости от наступления беременности, в строме наибольшее соотношение PR/ER отмечалось у пациенток с не наступившей беременностью (группы 2А и 2Б) (Таблица 29, Рисунок 6в).

Таблица 28

## Экспрессия PR у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Поверхност. эпителий (%)* (минимум-максимум)	208,2±48,9 (130-300)	170,0±56,5 (105-240)	181,4±77,9 (35-260)	0,2203
>205% (> медианы)**	5 (41,7%)	2 (33,3%)	8 (57,1%)	0,6028
Железы эндометрия (%)* (минимум-максимум)	189,2±43,3 (120-255)	138,3±83,2 (25-210)	177,5±72,9 (25-275)	0,3394
>190% (> медианы)**	5 (41,7%)	2 (33,3%)	6 (42,8%)	0,9200
Строма эндометрия (%)* (минимум-максимум)	171,2±36,4 (115-240)	156,6±28,9 (110-185)	185,0±27,7 (130-225)	0,6637
>180% (> медианы)**	4 (33,3%)	1 (16,7%)	8 (57,1%)	0,1943

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA;

\*\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

Таблица 29

## Соотношение экспрессия PR/УК у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Поверхностный эпителий (минимум-максимум)	1,18±0,22 (0,76-1,42)	1,14±0,29 (0,56-1,45)	1,10±0,49 (0,47-2,21)	0,6342
Железы эндометрия (минимум-максимум)	0,98±0,31 (0,48-1,81)	0,79±0,31 (0,20-1,12)	1,15±0,74 (0,21-2,66)	0,7395
Строма эндометрия (минимум-максимум)	1,37±0,52 (0,47-2,31)	2,55±1,16 (0,88-9,0)	1,65±0,48 (0,83-2,64)	0,2967

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA

Экспрессия **LIF** отмечалась во всех тканях эндометрия, была в основном слабо выраженной, максимальной – в строме, минимальной – в железах эндометрия, колебалась от 0,65 до 1,55 баллов, и не отличалась между группами пациенток. Медиана распределения экспрессии во всех тканях эндометрия составила 1,0 балл (Таблица 30, Рисунок 6г).

## Экспрессия LIF у пациенток групп 1А, 2А и 2Б

Показатели	Группа 1А (n=12)	Группа 2А (n=6)	Группа 2Б (n=14)	р- уровень
Поверхностный эпителий, баллы* (мин-макс)	1,04±0,11 (1,00-1,35)	1,00±0,02 (1,00-1,05)	1,03±0,19 (0,65-1,55)	0,7516
>205% (> медианы)**	2 (16,7%)	1 (16,7%)	4 (28,6%)	0,6997
Железы эндометрия, баллы* (мин-макс)	0,99±0,01 (0,95-1,00)	0,98±0,04 (0,90-1,00)	1,00±0,03 (1,00-1,10)	0,6785
>190% (> медианы)**	0	0	1 (7,14%)	0,5149
Строма эндометрия, баллы* (мин-макс)	1,05±0,14 (0,90-1,45)	1,02±0,04 (1,00-1,10)	1,04±0,07 (1,00-1,20)	0,6273
>180% (> медианы)**	3 (25%)	1 (16,7%)	4 (28,6%)	0,8532

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ANOVA;

\*\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

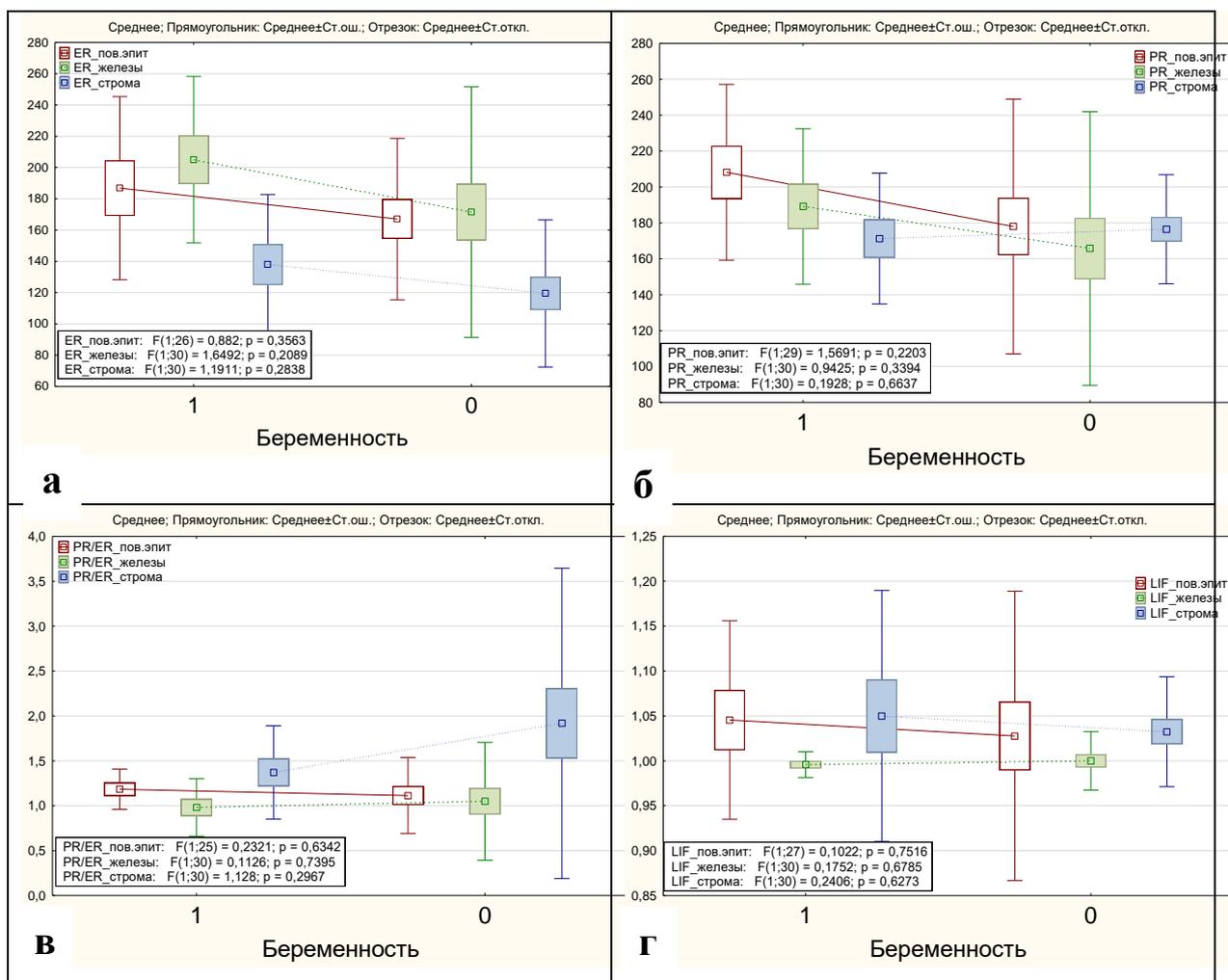


Рисунок 6. Экспрессия ER, PR, LIF и соотношение PR/ER у пациенток в зависимости от толщины эндометрия и наступления беременности в программах ВРТ.

При проведении корреляционного анализа между толщиной эндометрия и экспрессией изучаемых маркеров была выявлена статистически не значимая слабая положительная корреляционная связь с экспрессией ER во всех тканях эндометрия, статистически не значимая слабая положительная корреляционная связь с экспрессией PR в поверхностном эпителии и слабая отрицательная корреляционная связь с экспрессией PR в железах и строме эндометрия, статистически не значимая слабая отрицательная корреляционная связь с PR/ER во всех тканях эндометрия, статистически не значимая слабая положительная корреляционная связь с экспрессией LIF в поверхностном эпителии и слабая отрицательная корреляционная связь с экспрессией LIF в железах и строме эндометрия.

**Таким образом,** 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.

### **3.8. Иммуно-/гистохимическое исследование гликанов эндометрия**

Для оценки изменений в структуре углеводных цепей гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия 32 пациентки сначала были стратифицированы на 2 группы на основании толщины эндометрия:

- группа а (n=18) - пациентки с нормальным эндометрием;
- группа б (n=14) - пациентки с тонким эндометрием.

Для выявления отличий между группами были проанализированы клинико-лабораторные данные в указанных подгруппах пациенток. Возраст, антропометрические данные, менструальная и сексуальная функции не различалась в 2-х группах пациенток (Таблица 31).

Таблица 31

## Возраст и антропометрические данные пациентов групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
Возраст женщин, лет	33,0±5,5	33,3±3,3	0,8611
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	22,4±3,0	22,5±2,6	0,9267

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, t-тест

При оценке гинекологической заболеваемости у пациенток с тонким эндометрием отмечалась большая доля полипов эндометрия в анамнезе и большая доля первичного бесплодия (Таблица 32).

Таблица 32

## Структура гинекологической заболеваемости у пациенток групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
Хронический сальпингоофорит*	8 (57,2%)	8 (44,4%)	0,4760
НГЭ*	1 (7,1%)	4 (22,2%)	0,2438
Аденомиоз*	1 (7,1%)	1 (5,6%)	0,8540
Миома матки*	4 (28,6%)	6 (33,3%)	0,7731
Полипы эндометрия в анамнезе*	<b>5 (35,7%)</b>	2 (11,1%)	0,0948
Хламидиоз в анамнезе*	3 (21,4%)	1 (5,6%)	0,1780
Миомэктомия в анамнезе*	2 (14,3%)	4 (22,2%)	0,5682
Тубэктомия в анамнезе*	8 (57,2%)	6 (33,3%)	0,1780
Бесплодие вторичное*	5 (35,7%)	<b>11 (61,1%)</b>	0,1540
Длительность бесплодия, лет**	8,3±5,7	6,2±3,9	0,2074

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

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

При оценке gravidности и паритета не было выявлено значимых различий между группами (Таблица 33).

Таблица 33

## Акушерский анамнез у пациенток групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
Число беременностей	0 (0-1)	1 (0-2)	0,2406
Число родов	0 (0-0)	0 (0-0)	0,4459
Число аборт	0 (0-1)	0 (0-1)	0,7798
Число внематочных беременностей	0 (0-0)	0 (0-1)	0,2193
Число попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе	0 (0-2)	1 (0-2)	0,0688
Число беременностей в результате ВРТ	0 (0-0)	0 (0-0)	0,3852

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

При анализе соматической заболеваемости не было выявлено разницы между группами пациенток (Таблица 34).

Таблица 34

## Соматические заболевания у пациенток групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
Аллергические заболевания	2 (14,3%)	2 (11,1%)	0,7876
Заболевания верхних дыхательных путей	0	1 (5,6%)	0,3702
Заболевания желудочно-кишечного тракта	1 (7,1%)	2 (11,1%)	0,7024
Заболевания мочевыделительной системы	1 (7,1%)	1 (5,6%)	0,8540
Эндокринные заболевания	3 (21,4%)	2 (11,1%)	0,4252

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

При анализе гормонального статуса был выявлен более высокий уровень эстрадиола у пациенток с тонким эндометрием, что может быть связано с компенсаторным его повышением в ответ на более низкую рецепторную активность (Таблица 35).

Таблица 35

## Уровень гормонов у пациенток групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
ФСГ, мЕд/мл	7,4±2,8	7,8±2,2	0,5781
ЛГ, мЕд/мл	6,7±3,7	5,7±2,6	0,4168
Е2, пмоль/л	<b>178,4±133,2</b>	<b>97,1±49,7</b>	<b>0,0002</b>
Пролактин, мЕд/л	301,6±133,0	325,6±167,6	0,6645
Т, нмоль/л	0,86±0,46	1,18±0,4	0,1367
АМГ, нг/мл	3,5±3,0	4,1±3,9	0,6377
ТТГ, мЕд/л	1,58±0,70	1,78±0,79	0,4542
Т4 <sub>св.</sub> , пмоль/л	13,66±1,26	13,02±2,33	0,3566

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

Не было выявлено разницы в назначении препаратов для овариальной стимуляции. Суммарная доза назначаемых препаратов ГТ была сопоставимой в 2-х группах пациенток. Длительность овариальной стимуляции также не отличалась в группах сравнения (Таблица 36).

Таблица 36

## Особенности овариальной стимуляции у пациенток групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	р-уровень
Вид ГТ*			
• рФСГ	9 (64,3%)	10 (55,6%)	0,6179
• чМГ	5 (35,7%)	8 (44,4%)	
Длительность стимуляции, дней**	8,9±0,7	9,2±1,3	0,5432
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1419,6±371,6	1612,5±532,3	0,2581

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

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

При анализе гаметогенеза и эмбриогенеза, у пациенток с нормальной толщиной эндометрия было получено большее число бластоцист отличного качества (Таблица 37).

Таблица 37

## Характеристика полученных гамет и эмбрионов у пациентов групп а и б

Показатели	Группа б (n=14)	Группа а (n=18)	p-уровень
Нормоспермия*	8 (57,1%)	14 (77,7%)	0,3193
Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку**	6 (3-7)	4 (4-7)	0,7612
Среднее число зигот на 1 пациентку**	6 (2-7)	4 (3-6)	0,6622
Средний уровень фертилизации***	0,72±0,15	0,75±0,23	0,7648
Среднее число бластоцист на 1 пациентку**	4 (1-5)	3 (2-4)	0,9848
Средний уровень бластуляции***	0,68±0,26	0,77±0,26	0,3143
Среднее число бластоцист отличного качества на 1 пациентку**	<b>0 (0-2)</b>	<b>1,5 (1-3)</b>	<b>0,0303</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни;

\*\*\* Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

У пациенток с толщиной эндометрия  $\geq 8$  мм беременность наступила в 66,7% случаев (у 12 из 18 человек), тогда как у пациенток с тонким эндометрием случаев беременности зафиксировано не было (0 из 14 человек) ( $p=0,0001$ ). При проведении многофакторного анализа методом логистической регрессии с учетом числа полученных бластоцист отличного качества ОШ наступления беременности в зависимости от наличия тонкого эндометрия составило **1,47** (95% ДИ=1,05; 2,5).

**При исследовании углеводного профиля эндометрия**, окрашивание продукта реакции наблюдалось как в поверхностном эпителии, так и в эпителии желез эндометрия с различной степенью интенсивности.

Сравнительные результаты окрашивания лектинами гликокаликса в поверхностном эндометрии и в эпителии желез эндометрия в группах а и б представлены в таблице 38 и на рисунке 7. 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. В группе с нормальной толщиной эндометрия экспрессия гликанов была сопоставимой в

поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия, что было подтверждено при проведении корреляционного анализа. В группе тонкого эндометрия наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы в содержании гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами UEA I, SNA, Con A и лектином ECL после обработки нейроминидазой (НМД), и гликана Le<sup>Y</sup>. В группе нормального эндометрия наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы в содержании гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами UEA I и ECL после обработки НМД.

Таблица 38

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами структур гликокаликса поверхностного эпителия (ПЭ) и эпителия желез эндометрия в группах а и б

	ПЭ эндометрия	Эпителий желез	г-	р-уровень
<b>Группа б (n=14)</b>				
<b>Лектины</b>				
MAL II	0,29±0,07 (0,18-0,41)	0,27±0,08 (0,15-0,45)	0,3475	0,1717
UEA I	<b>0,24±0,11 (0,06-0,50)</b>	<b>0,17±0,10 (0,08-0,41)</b>	<b>0,6472</b>	<b>0,0036</b>
SNA	<b>0,32±0,09 (0,14-0,44)</b>	<b>0,17±0,07 (0,07-0,29)</b>	<b>0,5697</b>	<b>0,0135</b>
ECL	0,35±0,12 (0,11-0,51)	0,26±0,10 (0,10-0,42)	0,0734	0,7720
ECL + НМД	<b>0,51±0,11 (0,24-0,68)</b>	<b>0,57±0,28 (0,27-1,49)</b>	<b>0,5873</b>	<b>0,0103</b>
VVL	0,25±0,10 (0,15-0,46)	0,24±0,13 (0,07-0,53)	0,3771	0,1229
Con A	<b>0,39±0,09 (0,26-0,53)</b>	<b>0,28±0,06 (0,17-0,44)</b>	<b>0,5064</b>	<b>0,0319</b>
<b>Антитела</b>				
Анти-МЕСА-79	0,33±0,07 (0,25-0,48)	0,19±0,07 (0,03-0,29)	0,1019	0,7072
Анти-Le <sup>Y</sup>	<b>0,25±0,06 (0,15-0,39)</b>	<b>0,14±0,06 (0,08-0,34)</b>	<b>0,4791</b>	<b>0,0442</b>
<b>Группа а (n=18)</b>				
<b>Лектины</b>				
MAL II	0,28±0,11 (0,14-0,52)	0,27±0,08 (0,15-0,45)	0,2100	0,4711
UEA I	<b>0,24±0,14 (0,07-0,59)</b>	<b>0,22±0,14 (0,05-0,49)</b>	<b>0,5925</b>	<b>0,0328</b>
SNA	0,34±0,08 (0,21-0,52)	0,19±0,11 (0,06-0,46)	0,1990	0,4951
ECL	0,33±0,09 (0,15-0,52)	0,29±0,14 (0,08-0,62)	0,3812	0,1786
ECL + НМД	<b>0,57±0,09 (0,39-0,78)</b>	<b>0,55±0,10 (0,39-0,72)</b>	<b>0,5697</b>	<b>0,0334</b>
VVL	0,26±0,09 (0,10-0,43)	0,21±0,09 (0,09-0,38)	0,5294	0,0628
Con A	0,35±0,09 (0,15-0,54)	0,30±0,07 (0,17-0,40)	0,1505	0,6236
<b>Антитела</b>				
Анти-МЕСА-79	0,42±0,11 (0,19-0,65)	0,20±0,06 (0,10-0,31)	0,4476	0,1445
Анти-Le <sup>Y</sup>	0,22±0,06 (0,12-0,35)	0,14±0,06 (0,05-0,27)	-0,2903	0,3139

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, минимум-максимум, GLM;  
г - коэффициент корреляции

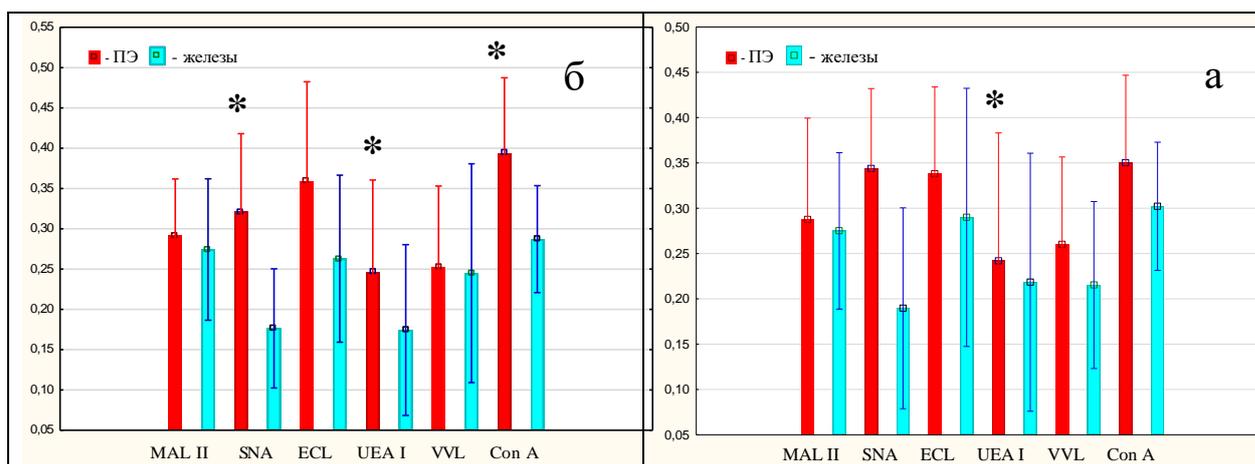


Рисунок 7. Окрашивание лектинами гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия в группе б и в группе а.

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в группах а и б в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия представлены в таблице 39 и на рисунках 8, 9. Единственным выявленным отличием было значимое снижение содержания гликана МЕСА-79 в поверхностном эпителии у пациенток с тонким эндометрием (Рисунок 10). В эпителии желез не было выявлено значимой разницы в окрашивании лектинами гликоконъюгатов, образующих гликокаликс, между пациентками с тонким и нормальным эндометрием.

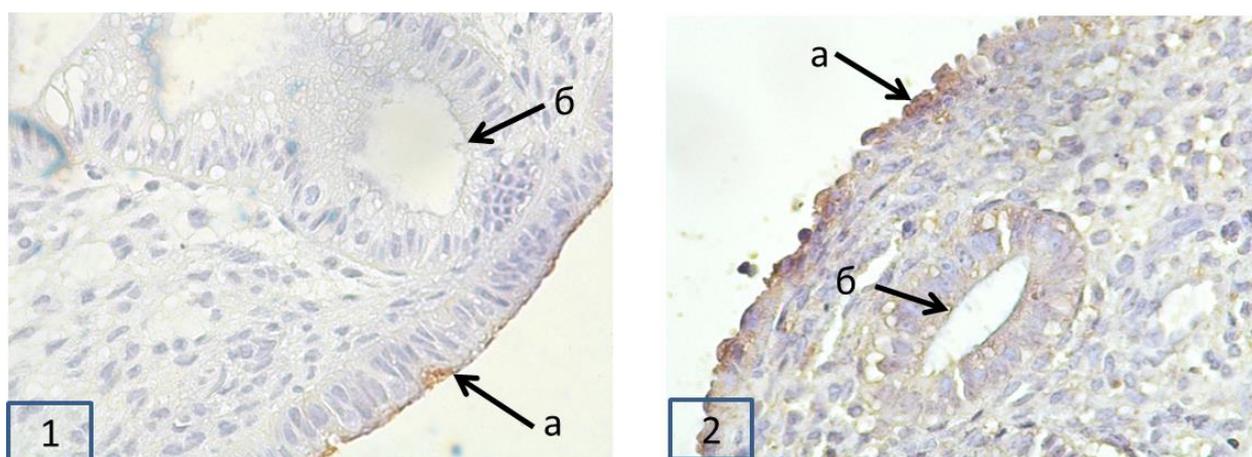


Рисунок 8. Окрашивание покровного эпителия (а) и эпителия желез (б) анти-Le<sup>Y</sup> антителами (1) и лектином Con A (2) у пациенток группы б.

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
<b>Поверхностный эпителий эндометрия</b>			
<b>Лектины</b>			
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
<b>Антитела</b>			
Анти-МЕСА-79	<b>0,33±0,07 (0,25-0,48)</b>	<b>0,42±0,11 (0,19-0,65)</b>	<b>0,0332</b>
Анти-Le <sup>Y</sup>	0,25±0,06 (0,15-0,39)	0,22±0,06 (0,12-0,35)	0,1789
<b>Эпителий желез эндометрия</b>			
<b>Лектины</b>			
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
<b>Антитела</b>			
Анти-МЕСА-79	0,19±0,07 (0,03-0,29)	0,20±0,06 (0,10-0,31)	0,6373
Анти-Le <sup>Y</sup>	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

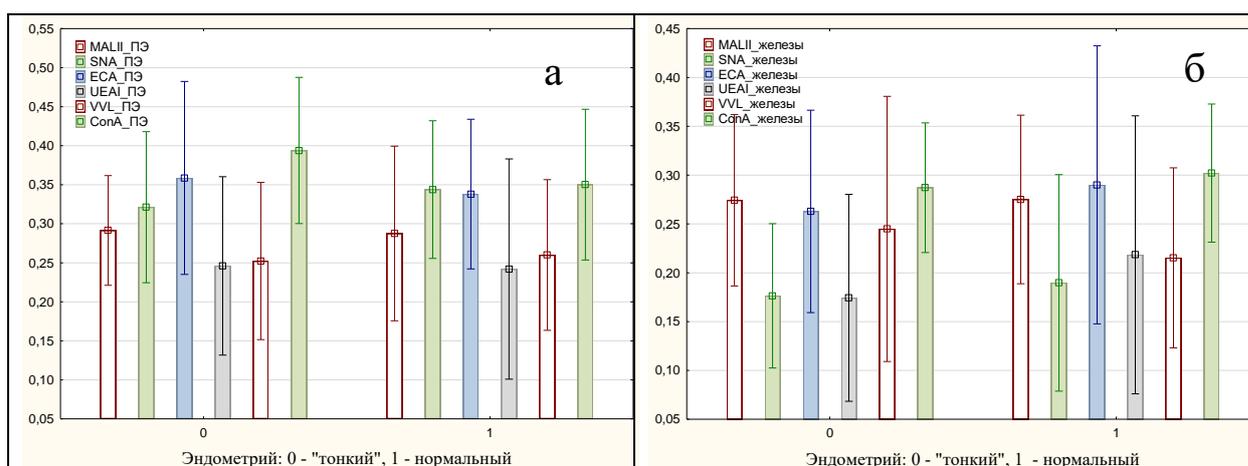


Рисунок 9. Окрашивание лектинами гликокаликса эндометрия в группах тонкого и нормального эндометрия в поверхностном эпителии (а) и эпителии желез эндометрия (б).

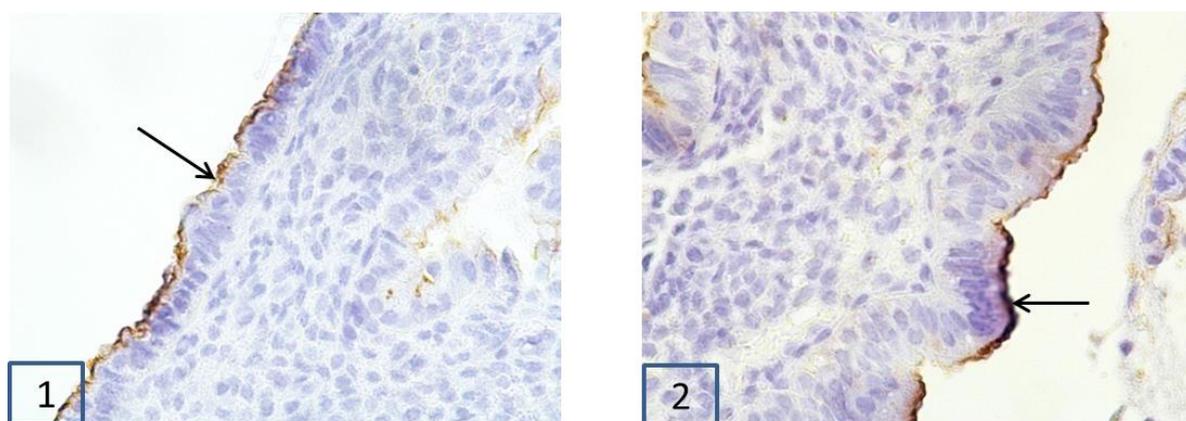


Рисунок 10. Окрашивание сульфатированного  $\alpha 2,3$ -сиалогликана МЕСА-79 анти- МЕСА-79 антителами в поверхностном эпителии пациенток группы а (2) и группы б (1).

**Таким образом,** пациентки с тонким эндометрием имеют особенности молекулярной и структурно-функциональной организации эндометрия, которые проявляются в измененном паттерне гликозилирования эндометриальной ткани: повышенной экспрессии  $\alpha 2,6$ -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  $\alpha 2,3$ -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.

Затем для оценки изменений состава углеводных цепей гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия 32 пациентки сначала были стратифицированы на 2 группы на основании факта наступления беременности в данном цикле ВРТ:

- группа 1 (n=12) - беременность наступила;
- группа 2 (n=20) – беременность не наступила.

Для выявления отличий между группами были проанализированы клиничко-лабораторные данные в указанных подгруппах пациенток. Возраст,

антропометрические данные, менструальная и сексуальная функции не различалась в 2-х группах пациенток (Таблица 40).

Таблица 40

Возраст и антропометрические данные пациентов групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	p-уровень
Возраст женщин, лет	33,0±3,9	33,2±4,6	0,8779
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	22,3±2,8	22,6±2,8	0,7676

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, t-тест

При оценке гинекологической заболеваемости пациентки с наступившей беременностью отличались от группы сравнения только менее продолжительной длительностью бесплодия (Таблица 41).

Таблица 41

Структура гинекологической заболеваемости у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	p-уровень
Хронический сальпингоофорит*	6 (50%)	10 (50%)	1,0
НГЭ*	1 (8,3%)	4 (20%)	0,3788
Аденомиоз*	0	2 (10%)	0,2578
Миома матки*	2 (16,7%)	8 (40%)	0,1680
Полипы эндометрия в анамнезе*	1 (8,3%)	6 (30%)	0,1511
Хламидиоз в анамнезе*	0	4 (20%)	0,0976
Миомэктомия в анамнезе*	1 (8,3%)	5 (25%)	0,2422
Тубэктомия в анамнезе*	4 (33,3%)	10 (50%)	0,3575
Бесплодие вторичное*	7 (58,3%)	9 (45%)	0,4652
Длительность бесплодия, лет**	4,7±2,8	8,5±5,3	<b>0,0283</b>

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

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

При оценке гравидарности и паритета не было выявлено значимых различий между группами (Таблица 42).

Таблица 42

## Акушерский анамнез у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	р- уровень
Число беременностей	1 (0-2,5)	0,5 (0-1,5)	0,4835
Число родов	0 (0-0,5)	0 (0-0)	0,3603
Число абортов	0 (0-0,5)	0 (0-1)	0,6827
Число внематочных беременностей	0 (0-1,5)	0 (0-0)	0,4957
Число попыток ЭКО или ИКСИ в анамнезе	0,5 (0-0)	0 (0-2)	0,9224
Число беременностей в результате ВРТ	0 (0-0)	0 (0-0)	0,8002

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

При анализе соматической заболеваемости не было выявлено различия между группами пациенток (Таблица 43).

Таблица 43

## Соматические заболевания у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	р- уровень
Аллергические заболевания	1 (8,3%)	3 (15%)	0,5809
Заболевания верхних дыхательных путей	1 (8,3%)	0	0,1896
Заболевания желудочно-кишечного тракта	1 (8,3%)	2 (10%)	0,8755
Заболевания мочевыделительной системы	1 (8,3%)	1 (5%)	0,7060
Эндокринные заболевания	1 (8,3%)	4 (20%)	0,3788

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

При анализе гормонального статуса не было выявлено отличий между группами пациенток, хотя отмечался более высокий уровень эстрадиола у пациенток с не наступившей беременностью (Таблица 44).

Уровень гормонов у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	р- уровень
ФСГ, мЕд/мл	8,2±2,0	7,3±2,7	0,3563
ЛГ, мЕд/мл	5,8±2,7	6,4±3,4	0,6453
Е2, пмоль/л	94,6±48,8	155,4±119,4	0,1048
Пролактин, мЕд/л	370,3±177,1	282,0±127,5	0,1118
Т, нмоль/л	1,25±0,67	0,91±0,49	0,1062
АМГ, нг/мл	4,8±4,6	3,3±2,6	0,2466
ТТГ, мЕд/л	1,87±0,81	1,59±0,71	0,3187
Т4 <sub>св.</sub> , пмоль/л	13,90±1,92	12,93±1,91	0,1758

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

Не было выявлено разницы в назначении препаратов для овариальной стимуляции. Суммарная доза назначаемых препаратов ГТ была сопоставимой в 2-х группах пациенток. Длительность овариальной стимуляции также не отличалась в группах сравнения (Таблица 45).

Таблица 45

Особенности овариальной стимуляции у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	р- уровень
Вид ГТ*			
• рФСГ	8 (66,7%)	11 (55%)	0,5153
• чМГ	4 (33,3%)	9 (45%)	
Длительность стимуляции, дней**	9,1±0,9	9,0±1,2	0,6784
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1512,5±371,3	1537,5±532,3	0,8874

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

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

При анализе гаметогенеза и эмбриогенеза, у пациенток с наступившей беременностью было получено большее число бластоцист отличного качества (Таблица 46).

Характеристика полученных гамет и эмбрионов у пациентов групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=20)	p-уровень
Нормоспермия*	9 (75%)	13 (65%)	0,6784
Среднее число зрелых ооцитов на 1 пациентку**	4,5 (4-8)	5 (2,5-7)	0,4957
Среднее число зигот на 1 пациентку**	4 (3-7)	4,5 (2-6,5)	0,7115
Средний уровень фертилизации***	0,77±0,25	0,72±0,17	0,5154
Среднее число бластоцист на 1 пациентку**	3,5 (2,5-4,5)	2,5 (1-5)	0,2757
Средний уровень бластуляции***	0,82±0,20	0,68±0,28	0,1368
Среднее число бластоцист отличного качества на 1 пациентку**	<b>2,5 (1-3)</b>	<b>0 (0-1,5)</b>	<b>0,0120</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни;

\*\*\* Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

**При исследовании углеводного профиля эндометрия**, окрашивание продукта реакции наблюдалось как в поверхностном эпителии, так и в эпителии желез эндометрия с различной степенью интенсивности.

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в поверхностном эндометрии и эпителии желез эндометрия в группах 1 и 2 представлены в таблице 47 и на рисунках 11, 12.

Таблица 47

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в поверхностном эпителии (ПЭ) и эпителии желез эндометрия в группах 1 и 2

	ПЭ эндометрия	Эпителий желез эндометрия	r-	p-уровень
<b>Группа 1 (n=12)</b>				
<b>Лектины</b>				
MAL II	0,27±0,10 (0,14-0,52)	0,28±0,07 (0,19-0,43)	0,4564	0,1582
UEA I	<b>0,27±0,15 (0,08-0,59)</b>	<b>0,22±0,12 (0,10-0,47)</b>	<b>0,6344</b>	<b>0,0266</b>
SNA	0,32±0,08 (0,21-0,52)	0,16±0,08 (0,06-0,34)	0,3400	0,2795
ECL	0,34±0,11 (0,15-0,52)	0,27±0,15 (0,11-0,62)	-0,0157	0,9614
ECL + НМД	0,57±0,10 (0,39-0,78)	0,56±0,09 (0,39-0,71)	0,5237	0,0805
VVL	0,24±0,09 (0,10-0,38)	0,18±0,06 (0,09-0,32)	0,3415	0,2773
Con A	0,32±0,06 (0,21-0,42)	0,29±0,06 (0,17-0,40)	0,2919	0,3573
<b>Антитела</b>				
Анти-МЕСА-79	0,41±0,11 (0,19-0,65)	0,20±0,07 (0,10-0,31)	0,0983	0,7871
Анти-Le <sup>Y</sup>	<b>0,23±0,07 (0,12-0,35)</b>	<b>0,14±0,07 (0,05-0,27)</b>	<b>0,5659</b>	<b>0,0551</b>
<b>Группа 2 (n=20)</b>				
<b>Лектины</b>				
MAL II	0,29±0,08 (0,18-0,47)	0,27±0,09 (0,15-0,45)	0,2314	0,3263
UEA I	<b>0,22±0,10 (0,06-0,50)</b>	<b>0,17±0,12 (0,05-0,49)</b>	<b>0,5441</b>	<b>0,0160</b>
SNA	<b>0,34±0,09 (0,14-0,47)</b>	<b>0,19±0,10 (0,07-0,46)</b>	<b>0,4524</b>	<b>0,0452</b>
ECL	0,35±0,10 (0,11-0,51)	0,28±0,11 (0,08-0,42)	0,3423	0,1396
ECL + НМД	<b>0,54±0,11 (0,24-0,76)</b>	<b>0,56±0,24 (0,27-1,49)</b>	<b>0,5373</b>	<b>0,0145</b>
VVL	<b>0,26±0,09 (0,15-0,46)</b>	<b>0,25±0,12 (0,07-0,53)</b>	<b>0,4773</b>	<b>0,0387</b>
Con A	0,39±0,10 (0,15-0,54)	0,29±0,07 (0,17-0,44)	0,3862	0,1024
<b>Антитела</b>				
Анти-МЕСА-79	0,37±0,10 (0,25-0,59)	0,19±0,06 (0,03-0,29)	0,2141	0,3935
Анти-Le <sup>Y</sup>	0,24±0,06 (0,15-0,39)	0,14±0,06 (0,08-0,34)	-0,1927	0,4157

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, минимум-максимум, GLM;  
r - коэффициент корреляции

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. В группе с наступившей беременностью экспрессия гликанов была более однородно выражена в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия, что было подтверждено при проведении корреляционного анализа. В группе не наступившей беременности наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы при окрашивании

гликоконъюгатов лектинами UEA I, SNA, VVL и лектином ECL после обработки нейроминидазой (НМД). В группе наступившей беременности наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы только при окрашивании лектином UEA I.

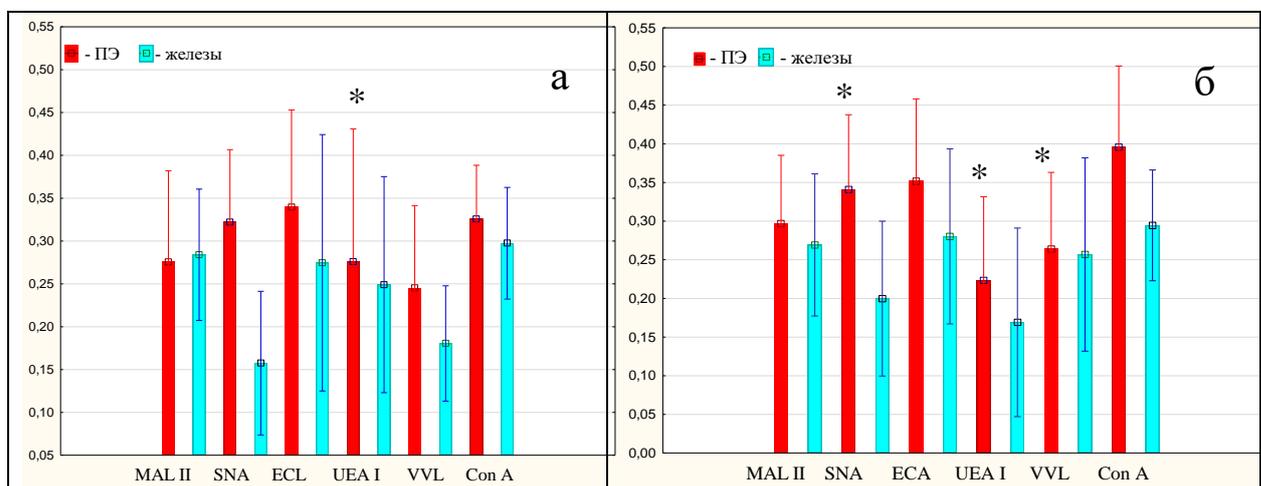


Рисунок 11. Окрашивание лектинами гликокаликса в ПЭ и эпителии желез эндометрия в группе 1 (а) и в группе 2 (б).

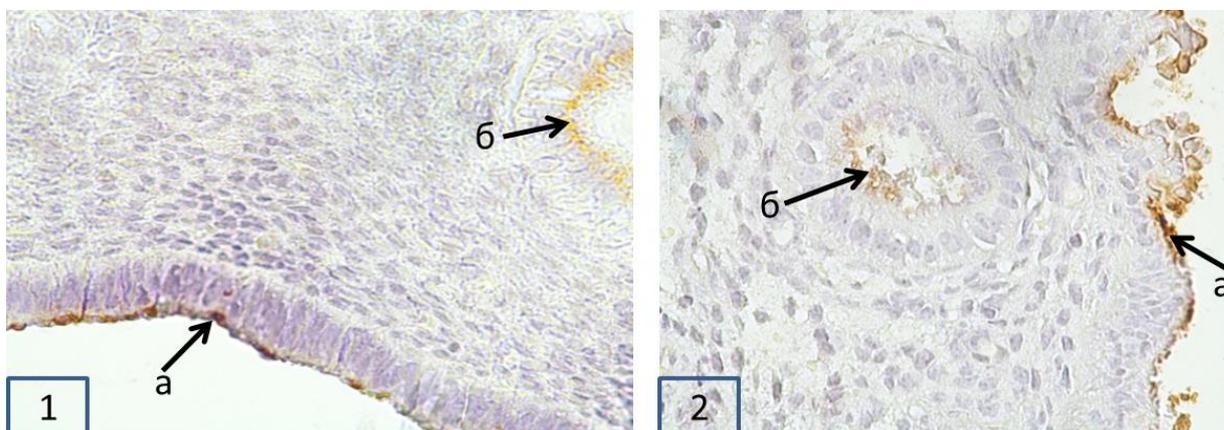


Рисунок 12. Окрашивание покровного эпителия (а) и эпителия желез (б) лектином VVL (1) и лектином SNA (2) у пациенток группы 1.

Сравнительные результаты окрашивания лектинами и антителами гликокаликса в группах 1 и 2 в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия представлены в таблице 48 и на рисунках 13, 14.

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
<b>Поверхностный эпителий эндометрия</b>			
<b>Лектины</b>			
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	<b>0,32±0,06 (0,21-0,42)</b>	<b>0,39±0,10 (0,15-0,54)</b>	<b>0,0474</b>
<b>Антитела</b>			
Анти-МЕСА-79	0,41±0,11 (0,19-0,65)	0,37±0,10 (0,25-0,59)	0,3552
Le <sup>Y</sup>	0,23±0,07 (0,12-0,35)	0,24±0,06 (0,15-0,39)	0,8442
<b>Эпителий желез эндометрия</b>			
<b>Лектины</b>			
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	<b>0,18±0,06 (0,09-0,32)</b>	<b>0,25±0,12 (0,07-0,53)</b>	<b>0,0610</b>
Con A	0,29±0,06 (0,17-0,40)	0,29±0,07 (0,17-0,44)	0,9108
<b>Антитела</b>			
Анти-МЕСА-79	0,20±0,07 (0,10-0,31)	0,19±0,06 (0,03-0,29)	0,5527
Анти-Le <sup>Y</sup>	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

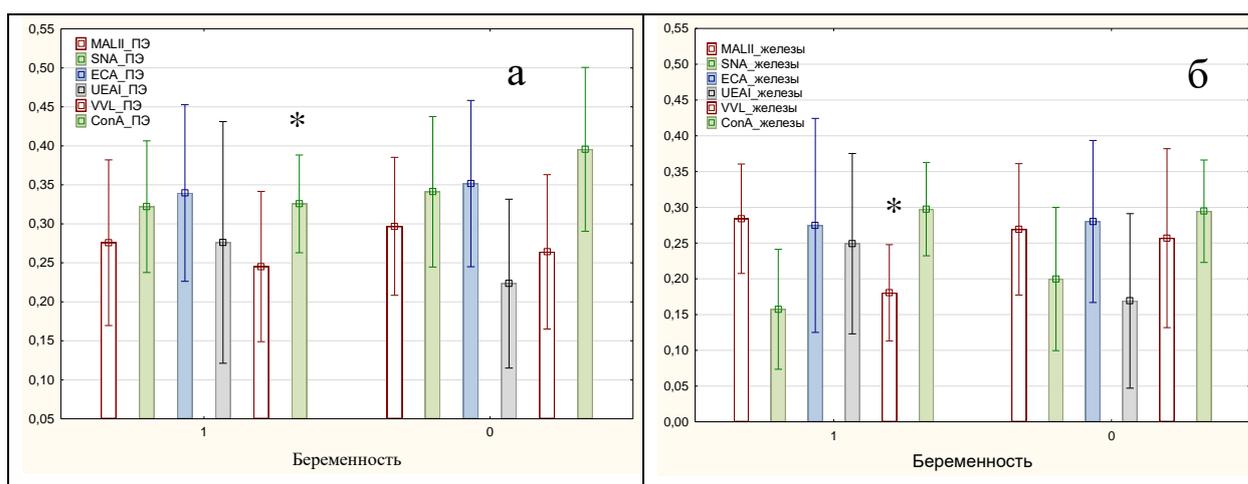


Рисунок 13. Окрашивание лектинами структур гликокаликса эндометрия в группах 1 и 2 в ПЭ (а) и железах эндометрия (б).

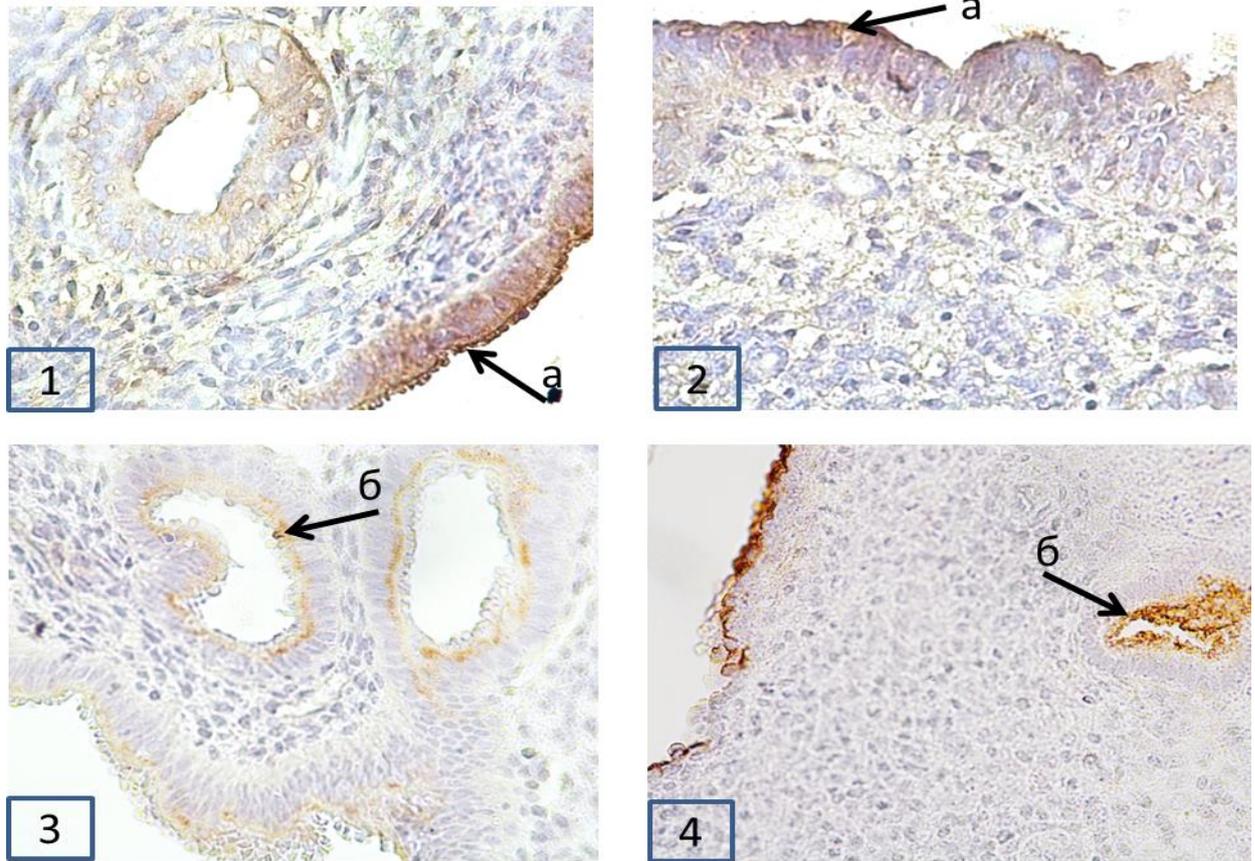


Рисунок 14. Окрашивание поверхностного эпителия (а) и эпителия желез (б) лектином ConA (1-группа 1; 2- группа 2) и лектином VVL (3-группа 1; 4- группа 2)

У пациенток с наступившей беременностью в целом отмечалось менее интенсивное окрашивание лектинами как в поверхностном эпителии, так и в эпителии желез эндометрия, со статистически значимым менее интенсивным окрашиванием лектином Con A в поверхностном эпителии и погранично значимым менее интенсивным окрашиванием лектином VVL в эпителии желез эндометрия. Таким образом при хорошей рецептивности эндометрия в его поверхностном эпителии отмечается значимо сниженное содержание маннозобогатых гликанов (Con A) и гликанов с терминальными остатками  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамина (VVL).

**Таким образом,** пациентки с не наступившей беременностью имеют особенности молекулярной и структурно-функциональной организации эндометрия, которые проявляются в измененном паттерне гликозилирования

эндометриальной ткани: повышенной экспрессии  $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA) и гликанов с терминальными остатками N-ацетилгалактозамина (VVL) в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия. Также у них отмечается 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, 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 может негативно влиять на рецептивность эндометрия.

На основании выявленных гликомаркеров рецептивности нами были найдены пороги экспрессии гликанов и составлена шкала рецептивности эндометрия. Были оценены следующие гликомаркеры:  $\alpha 2,6$ -сиалогликаны (окраска лектином SNA), маннозобогатые гликаны (ConA), N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны (VVL) и сульфатированные  $\alpha 2,3$ -сиалогликаны МЕСА-79, а также фукозилированный гликан Le<sup>Y</sup>.

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  $\alpha 2,3$ -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  $\alpha$ 2,6-сиалогликанов (**SNA**) установлено значение **0,17**. При разнице между поверхностным и железистым эпителием в экспрессии  $\alpha$ 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<sup>Y</sup>** 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 мы разработали **шкалу рецептивности эндометрия**. Для этого мы округлили и ранжировали рассчитанные ОШ в порядке их возрастания: гликоэпитоп МЕСА-79 в поверхностном эпителии = 8,5; маннозобогатые гликаны в поверхностном эпителии = 7,5; гликан **Le<sup>Y</sup>** 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;  $\alpha$ 2,6-сиалогликаны между поверхностным и железистым эпителием = 3,5.

Далее мы придали относительный вес каждому из ОШ, начиная с ОШ  $\alpha$ 2,6-сиалогликанов, приняв его за единицу:  $\alpha$ 2,6-сиалогликаны=1, N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны =1,5, маннозобогатые гликаны между поверхностным и железистым эпителием =1,5, гликан Le<sup>Y</sup> =2, маннозобогатые гликаны в поверхностном эпителии =2, гликоэпитоп МЕСА-79 =2,5 (Таблица 49).

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.

Таблица 49

Шкала оценки вероятности наступления беременности на основании гликомаркеров рецептивности

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

### **3.9. Терапия тонкого эндометрия и его нарушенной рецептивности у пациенток в программах ВРТ**

Все пациентки с тонким эндометрием и выявленным паттерном нарушения его рецептивности по данным ИГХ или лектиновой гистохимии получили лечение перед циклом ПЭ в полость матки.

Первый этап лечения заключался в назначении циклической гормональной терапии в течение 1-2-х менструальных циклов, направленной на восполнение нарушенной рецептивности и соотношения ER и PR. Назначались пероральные или трансдермальные формы эстрогенов в режиме 5-25-й день цикла с добавлением пероральных или вагинальных форм гестагенов с 16 по 25-й день цикла. Дозы препаратов подбирались индивидуально.

На втором этапе лечения назначалась физиотерапия или адъювантная терапия (низкомолекулярные гепарины, гирудотерапия, антиоксиданты), направленная на повышение кровоснабжения и улучшение микроциркуляции органов малого таза.

## ГЛАВА 4. Обсуждение полученных результатов

**На 1-ом этапе** исследования было выявлено, что на наступление беременности в программах ВРТ в отобранной группе пациенток, которая была представлена пациентками в основном раннего репродуктивного возраста, с нормальным ИМТ, невыраженным мужским фактором бесплодия, с нормальным ответом яичников на овариальную стимуляцию и получением бластоцист хорошего качества, оказывают влияние два фактора: число бластоцист отличного качества, которое было больше в группе пациентов с наступившей беременностью, и состояние эндометрия, что выразалось в меньшей заболеваемости полипами эндометрия и, как следствие, хроническим эндометритом в данной группе пациентов [15]. Полученные данные полностью согласуются с данными литературы. Как известно, хроническое воспаление полости матки, а также травмы слизистой оболочки матки при инструментальном воздействии на эндометрий могут сопровождаться снижением его рецептивности [15,44]. В результате воспалительной реакции в месте травмы происходит разрастание соединительной ткани, которая вызывает деформацию, а иногда облитерацию полости матки. При этом нормальный эндометрий полностью или частично подвергается атрофическим изменениям [15].

**На 2-м этапе** исследования была определена пороговая толщина эндометрия, влияющая на наступление беременности в программах ВРТ, которая составила 8 мм. Наши данные полностью совпали с данными ряда исследователей [15,168]. В 1989 году Gonen Y., *et al.* впервые применил понятие тонкого эндометрия, охарактеризовав им эндометрий толщиной менее 8 мм в конце пролиферативной - начале секреторной фазы менструального цикла [16]. В дальнейших исследованиях была отмечена связь толщины эндометрия с бесплодием и невынашиванием беременности, а позже - с эффективностью программы ЭКО [26–29]. Однако, вопрос о пороговой

величине, определяющей тонкий эндометрий, до сих пор остается спорным, составляя по данным разных исследований от 6 до 8 мм [31–33]. В одном из последних крупных исследований *Miwa et al.* (2009) частота наступления беременности в программах ВРТ у пациенток с эндометрием  $\leq 8$  мм была значительно ниже, чем у пациенток с толщиной эндометрия  $> 8$  мм (5,9% по сравнению с 22,4%) [34]. В результате проведенных работ исследователи пришли к заключению, что в клинической практике для успешной имплантации толщина эндометрия 8 мм является пороговой [26,38]. Кроме того, ряд исследователей получили данные о том, что на наступление беременности оказывает влияние толщина эндометрия в циклах овариальной стимуляции с последующим ПЭ в криоцикле, но не толщина эндометрия в криоцикле [169]. Другими исследователями были получены данные о том, что пороговой толщиной эндометрия в «свежем» цикле является 8 мм, тогда как в криоцикле эта величина составляет 7 мм [168]. В нашем исследовании все ПЭ проводились только в «свежем» цикле, что не позволило нам рассчитать пороговую величину толщины эндометрия при криопереносах. И все-таки, несмотря на большой пул работ, в которых было показано негативное влияние уменьшения толщины эндометрия на исходы программ ВРТ, существуют противоположные данные об отсутствии влияния толщины эндометрия на частоту наступления беременности [39].

**На 3-м этапе** исследования мы проанализировали факторы, влияющие на толщину эндометрия в окно имплантации. Выявленными клинико-анамнестическими факторами были большая доля беременностей за счет самопроизвольных выкидышей в анамнезе, и большая доля полипов эндометрия с полипэктомией в анамнезе что, несомненно, связано с воспалительным генезом поражения эндометрия. 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). Следует отметить, что сама овариальная стимуляция может быть фактором, влияющим на толщину

эндометрия [15]. В ряде исследований проводилось сравнение толщины эндометрия в зависимости от назначения и дозы вводимых ГТ. При этом авторы отмечали частое возникновение тонкого эндометрия в стимулированных циклах [15,50–54]. В нашем исследовании мы не получили таких данных. И, действительно, эти факты трудно объяснить, так как уровень эстрадиола в крови пациенток при овариальной стимуляции значительно превышает этот уровень в естественном цикле. Также есть данные литературы о влиянии нарушения функции яичников на толщину эндометрия в программах ВРТ. Так, при СПКЯ происходит изменение соотношения эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в эндометрии [26]. В исследовании Arraao, *et al.* (2002) отмечали увеличение в сыворотке крови андрогенов и экспрессии андрогеновых рецепторов [170]. Гипоэстрогения у пациенток с ПНЯ, является одной из причин развития тонкого эндометрия. Стандартные дозы, разработанные для ЗГТ, являются достаточными для подавления симптомов менопаузы, однако их действие не обеспечивает достижения необходимых параметров в толщине эндометрия, и доплерометрических показателях кровотока маточных артерий. В исследовании O'Donnell RL, *et al.* (2011) увеличение толщины эндометрия до 5 мм наблюдалось после длительной гормонотерапии (12 месяцев) с высоким содержанием гормонов, в то время как при использовании стандартной дозы ЗГТ толщина эндометрия увеличивалась до 3 мм [49]. В нашем исследовании не было получено таких данных за счет строгих критериев исключения (пациентки с ПНЯ и СПКЯ не были включены в исследование). И только хроническое воспаление полости матки (полипы эндометрия), а также травмы слизистой оболочки матки при инструментальном воздействии на эндометрий (выскабливания полости матки во время полипэктомии и при самопроизвольном прерывании беременности) увеличивали шансы развития тонкого эндометрия [15,44].

**На 4-ом этапе** исследования было выявлено, что в отобранной группе пациенток, у которых проводилось ИГХ исследование эндометрия, толщина эндометрия также влияла на частоту наступления беременности в программах

ВРТ. Мы провели исследование рецептивности эндометрия в зависимости от его толщины и наступления беременности в циклах ВРТ. Нами были получены неоднозначные данные. Известно, что при компрометированном эндометрии (при наличии НГЭ, множественных неудачных попытках программ ВРТ в анамнезе, и др.) отмечается повышение экспрессии ER и PR, и данные изменения в основном отмечаются в поверхностном эпителии эндометрия, который первый «вступает в диалог» с бластоцистой [171,172]. Считается, что на фоне высокой экспрессии ER происходит пролиферация эндометрия, изменяется характер генной экспрессии и снижается имплантационная способность эндометрия [173]. Есть и противоположные данные, в которых, наоборот, было обнаружено снижение, а не повышение экспрессии ER и PR в эндометрии пациенток с НГЭ [174]. В нашем исследовании также отмечалось хотя и не значимое, но повышение экспрессии ER у забеременевших пациенток и у пациенток с нормальной толщиной эндометрия. Самые низкие показатели экспрессии ER были выявлены у пациенток с тонким эндометрием, у которых беременность не наступила. Данная тенденция была обнаружена как в эпителиальном, так и стромальном компоненте эндометрия.

Что касается экспрессии PR, то, по данным литературы, у пациенток с НГЭ и бесплодием нарушается соотношение PR-A и PR-B, а в эндометриоидных гетеротопиях экспрессия PR-B не выявляется вовсе, что свидетельствует о развитии резистентности к прогестерону [175,176]. В нашем исследовании отмечалась более высокая экспрессия PR в поверхностном эпителии и железах эндометрия у пациенток с наступившей беременностью и нормальной толщиной эндометрия.

Важным показателем является соотношение PR/ER, которое в норме составляет от 2 до 4 [171]. В поверхностном эпителии и железах несколько большее соотношение PR/ER отмечалось в группе наступления беременности, тогда как в строме наибольшее соотношение PR/ER отмечалось у пациенток с не наступившей беременностью. При этом в нашем исследовании данный показатель был достаточно низким и в среднем в поверхностном эпителии

составил  $(1,18 \pm 0,22)$  в группе наступления беременности и  $(1,11 \pm 0,39)$  в группе не наступления беременности, в строме  $(1,37 \pm 0,52)$  и  $(1,92 \pm 1,14)$  в группах соответственно. Данная тенденция, по всей видимости, свидетельствует о важности относительного преобладания PR над ER в поверхностном эпителии эндометрия, вступающего в контакт с бластоцистой.

Что касается важнейшего, по данным литературы, маркера рецептивности – LIF [177,178], то в нашем исследовании он был слабо выражен, не различался значительно в группах пациенток, хотя и имел тренд к более высокому значению у пациенток с наступившей беременностью и нормальной толщиной эндометрия как в эпителии, так в строме эндометрия. Наши данные согласуются с данными литературы о том, что у женщин с бесплодием, неудачными попытками программ ВРТ, эндометриозом и привычным выкидышем отмечается снижение экспрессии LIF в период окна имплантации [179–181]. При этом в строме экспрессия LIF была более выражена по сравнению с эпителием эндометрия, что не согласуется с ранее полученными данными других исследователей [182].

По данным систематического обзора и мета-анализа [7], который объединил 96 исследований, посвященных оценке маркеров рецептивности эндометрия установлено, что на сегодняшний момент, ни один из используемых в клинической практике маркеров не может быть признан эффективным, поскольку показатели диагностической ценности их определения (особенно специфичность) имеют низкие значения. Это касается наиболее часто определяемых в клинике параметров, включая ультразвуковые (толщина эндометрия), морфологические (пиноподии) и иммуногистохимические (экспрессия ER, PR и LIF).

В клинической практике толщина эндометрия является основным и наиболее дискутируемым предиктором наступления беременности в циклах ВРТ, прогностическая точность определения которого, по данным систематического обзора, при пороговой толщине эндометрия более 7 мм характеризуется чувствительностью 99% и специфичностью 3% (что является

свидетельством того, что у 97% пациенток, у которых беременность не наступила, толщина эндометрия была 7 мм и более) [7]. Т.е. нормальный эндометрий ( $>7$  мм по данным литературы и  $>8$  мм в нашем исследовании) является фактором, необходимым для наступления беременности в циклах ВРТ, но недостаточным для высокой эффективности цикла. Проведенное нами исследование экспрессии ER, PR и LIF в эндометрии показало отсутствие статистически значимой разницы в изученных маркерах рецептивности в зависимости от толщины эндометрия и наступления беременности.

Основываясь на вышеизложенных фактах, следующим этапом (**5-м этапом** исследования) явился поиск более эффективных и специфичных маркеров рецептивности. Вначале гликотип эндометриальной ткани был исследован у пациенток с тонким ( $<8$  мм) и нормальным ( $\geq 8$  мм) эндометрием, а затем 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 была предпринята попытка установить, экспрессия каких гликанов ассоциирована с рецептивным эндометрием, толщина которого превышает 8 мм.

В качестве маркеров были изучены гликаны апикальной части (гликокаликса) поверхностного эпителия и гликаны эпителия желез эндометрия. Предпосылками такого выбора были: 1) известные данные об участии гликанов гликокаликса эпителиальных клеток эндометрия в контактных взаимодействиях с бластоцистой при аппозиции и последующей имплантации эмбриона [183]; 2) существовании паттерна гликозилирования (гликотипа) эндометрия в период окна имплантации, ассоциированного с рецепцией бластоцисты [122]; 3) гормонально-зависимое изменение паттерна гликозилирования в менструальном цикле [117,118].

Анализ и интерпретация результатов окрашивания структур эндометрия лектинами и антителами осуществлялась в соответствии с их углеводной специфичностью. Оценивалась экспрессия  $\alpha 1,2$ -фукозилированных

гликанов (окраска лектином **UEA-I** и анти-**Le<sup>Y</sup>** антителами). Функциональный остаток  $\alpha$ 1,2-Fuc входит в состав множества гликанов, в том числе антигенов группы крови **ABO**, **Lewis** и их производных и родственных антигенов, которые являются рецепторами эндогенных лектинов организма и широко представлены на разнообразных клетках и в тканях и участвуют в физиологических и патофизиологических реакциях в организме. Экспрессия гликанов, содержащих **сиаловую кислоту** - наиболее распространенную терминальную (т.е. концевую) группу гликопротеинов и гликолипидов, оценивали по окраске лектином **MAL-II** и анти-**MECA-79** антителами ( $\alpha$ 2,3-сиалогликаны) и лектином **SNA** ( $\alpha$ 2,6-сиалогликаны). Сиаловая кислота входит в состав рецепторов селектинов (одно из семейств молекул адгезии) – основных молекул, осуществляющих межклеточные контакты. Также проводилось исследование экспрессии остатков  $\alpha$ -**D-маннозы** - терминальных или 1,2-связанных в маннозобогатых гликанах (окраска лектином **Con A**); Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1- дисахарида N-ацетиллактозамина, который часто маскирован сиаловой кислотой и является лигандом галектинов (окраска лектином **ECL**); коровых (в O-связанных гликанах) или терминальных остатков N-ацетилгалактозамина – GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1- (окраска лектином **VVL**) [184].

При анализе результатов лектиновой гистохимии и иммуногистохимии в распределении  $\alpha$ 1,2-**фукозилированных гликанов**, окрашиваемых лектином **UEA-I** и анти-**Le<sup>Y</sup>** антителами в поверхностном эпителии эндометрия и эпителии эндометриальных желез, не было отмечено статистически значимой разницы у пациенток с тонким и нормальным эндометрием, однако отмечалось погранично значимое более интенсивное окрашивание **UEA-I** в железах у пациенток с наступившей беременностью по сравнению с теми, у кого беременность не наступила.

При анализе корреляционных связей между экспрессией  $\alpha$ 1,2-фукозилированных гликанов в гликокаликсе покровного эпителия и эпителия желез эндометрия было выявлено, что у всех пациенток вне зависимости от

толщины эндометрия и наступления беременности определялась прямая корреляционная связь средней силы в экспрессии фукозилированных гликанов (окраска лектином UEA-I) с преобладанием их в поверхностном эпителии.

Известно, что лектин UEA-I специфически окрашивает углеводный кор типа 2 (антиген Н тип 2 [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -R]) – один из пяти типов углеводных коров, на основе которых идет биосинтез групповых антигенов системы АВ0 и родственных антигенов системы Lewis, в том числе и LeY [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -R][12]. Корреляционная связь в содержании фукозилированных гликоконъюгатов, окрашиваемых UEA-I в гликокаликсе покровного эпителия и клетках эпителия желез выявлялась у пациенток сравниваемых групп, что может свидетельствовать о наличии единообразных изменений эндометриальной ткани в период средней стадии секреции у всех пациенток, включенных в исследование.

По данным литературы экспрессия фукозилированных гликанов в эндометрии исследовалась в менструальном цикле человека и млекопитающих. Установлено, что у LIF-нокаутных мышей наблюдается снижение экспрессии гликанов с  $\alpha$ 1,2Fuc-остатком в период окна имплантации, что проявляется в неудачах имплантации, бесплодии и свидетельствует о важной роли функциональных остатков  $\alpha$ 1,2Fuc в рецепции бластоцисты [122]. У человека, по данным ряда авторов, имеются противоречивые данные о распределении  $\alpha$ 1,2Fuc-остатков в составе гликоконъюгатов в разные фазы менструального цикла. Так, в ряде исследований выявлено слабое окрашивание структур эндометрия лектином UEA-I, и интенсивность окрашивания не меняется в зависимости от фазы цикла [9]. Отмечается, что у некоторых пациенток окрашивание лектином UEA-I наблюдается не только в области гликокаликса покровного и железистого эпителия, но и в цитоплазме; в некоторых случаях, окрашивается только гликокаликс поверхностного эпителия [185] и интенсивность окрашивания связана с фазой менструального цикла [186,187]. Экспрессия

$\alpha$ 1,2-фукозилированных гликанов в секреторной фазе менструального цикла подтверждается исследованиями экспрессии олигосахарида Н типа 2 [132], который входит в состав углеводных цепей высоко гликозилированного муцина TAG-72, экспрессируемого только в секреторную фазу цикла [8].

При исследовании  $\alpha$ 1,2-фукозилированных гликанов особый акцент делается на гликан  $Le^Y$ , поскольку установлено, что он экспрессируется в секреторную фазу цикла в составе углеводных цепей  $\alpha v\beta 3$  интегрина эндометриального эпителия – одной из ключевых молекул опосредующих межклеточные контакты [188]. Есть экспериментальные доказательства, что  $Le^Y$  может функционировать как регуляторная и сигнальная молекула, поскольку установлено, что ингибирование экспрессии  $Le^Y$  ассоциировано с нарушением экспрессии матриксной металлопротеиназы типа 9 (MMP-9), фактора роста эпидермиса (EGF) и активации его рецептора (EGFR), а также блокадой DAG/PKC сигнального пути, который регулирует рост, деление и дифференцировку клеток [11]. Блокирование биосинтеза олигосахарида  $Le^Y$  *in vitro* в клетках эндометриальной линии RL-95-2 ведет к снижению адгезионных взаимодействий с клетками эмбриональной линии JAR и негативно регулирует  $\alpha v\beta 3$ /FAK-сигнальный путь, ответственный за инвазию и миграцию внедряющихся клеток [189], что является свидетельством ключевой роли  $Le^Y$  в межклеточных контактах при имплантации [12]. Эти данные подтверждаются также в *in vitro* экспериментах по определению экспрессии  $Le^Y$  и фермента FUT4 (катализирует добавление  $\alpha$ 1,3Fuc-остатка к кору типа 2, на котором синтезируется  $Le^Y$ ) в клетках линий RL95-2 и HEC-1A с высоким и низким рецептивным потенциалом эндометриального эпителия, соответственно. Установлено, что экспрессия  $Le^Y$  и FUT4 коррелирует с высокой рецепцией клеток линии JAR и активирует EGFR/MAPK сигнальный путь [190].

Поверхностный эпителий – основная структура, где представлены молекулы рецептивности, а эндометриальные железы – продуцируют и транспортируют биоактивные вещества, которые регулируют рецептивность

эндометрия к акцепции и имплантации бластоцисты в период окна имплантации [191]. Отсутствие межгрупповых различий по этим гликанам может объясняться, прежде всего, особенностью когорты пациенток данного исследования, поскольку данные о повышении экспрессии  $\alpha$ 1,2-фукозилированных гликанов в окно имплантации и ассоциации этих изменений с наступлением беременности установлено для фертильных женщин, которые не включались в данное исследование. Очевидно, что пациентки программ ВРТ имеют особенности молекулярной и структурно-функциональной организации эндометрия. Возможно, что для рецептивного статуса необходима активация экспрессии фермента FUT4, который катализирует присоединение фукозы в  $\alpha$ 1,3 положении корового GlcNAc- в структуре типа 2, что также не исследовалось в данной работе. Полученные результаты позволяют сделать выводы: наличие взаимосвязи изменений экспрессии  $\alpha$ 1,2-фукозилированных гликанов в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия благоприятно для наступления беременности; аналогичные связи, выявленные у пациенток с «тонким» эндометрием, свидетельствуют о существовании дополнительных факторов, определяющих рецептивность эндометрия.

Трансформация плазматической мембраны клеток в фазу окна имплантации включает не только морфологические изменения – формирование пиноподий, но и молекулярные - экспрессию молекул адгезии и их рецепторов [192]. В контексте данной работы основной акцент был сделан на изучение **рецепторов для L-селектина**, поскольку начальные взаимодействия и стадия «аппозиции» опосредуются L-селектином бластоцисты и его углеводными лигандами, экспрессированными в эндометрии [118,193,194]. Основным лигандом для всех селектинов, включая L-селектин является углеводный олигосахарид Sialyl Le<sup>X</sup> [NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-R], который содержит  $\alpha$ 2,3-связанную сиаловую кислоту и  $\alpha$ 1,3-связанную фукозу. В исследованиях *in vitro* установлено, что взаимодействие Sialyl Le<sup>X</sup> /L-селектин не только опосредует адгезию

бластоцисты к эндометриальному эпителию, но и индуцирует апоптоз поверхностного эпителия эндометрия, что способствует имплантации [189].

Однако, более аффинными лигандами для L-селектина являются сульфатированные фукозилированные гликоконъюгаты ( $\text{SO}_3 \rightarrow 6\text{GlcNAc}$ ), которые детектируются моноклональными антителами МЕСА-79 [138]. МЕСА-79 специфически связывается с сульфатированными углеводными эпитопами адресина периферических лимфоузлов (peripheral lymph node addressin (PNAd)). В частности, МЕСА-79 связывается с соответствующими углеводными фрагментами CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1, которые экспрессируются высоким эндотелием лимфоузлов и являются адресинами (т.е. адресом) для L-селектина лимфоцитов, благодаря чему осуществляется рециркуляция и контакт лимфоцитов с антигеном. Аналогичные эпитопы для L-селектина бластоцисты обнаружены в эндометрии, причем их экспрессия повышается в секреторную, и падает в пролиферативную фазы цикла [139,195].

По данным литературы, исследование экспрессии МЕСА-79 эпитопа у фертильных пациенток в среднюю стадию секреции позволило выявить его ассоциацию с пиноподиями. Причем в областях мембраны покровного эпителия, где пиноподии отсутствовали, не выявлялась и экспрессия МЕСА-79 [84]. Инъекции тестостерона в соответствующую стадию секреции у крыс снижали количество пиноподий и экспрессию МЕСА-79, и, соответственно, влияли на имплантацию бластоцисты [196].

По данным литературы фертильные пациентки имеют значимо более высокую экспрессию МЕСА-79, чем пациентки с бесплодием в естественном цикле [140]. Причем, отсутствие МЕСА-79 эпитопа в структурах эндометрия у пациенток с бесплодием свидетельствует о бесперспективности проведения программы ВРТ [143]. У пациенток с бесплодием, при наличии экспрессии МЕСА-79 частота клинической беременности и имплантации более чем в 2 раза выше при более высоком уровне МЕСА-79 по сравнению с пациентками с низким уровнем экспрессии [197]. У пациенток, получавших гормональную

терапию в цикле переноса эмбриона по программе ВРТ с донорскими ооцитами, значимо высокая экспрессия МЕСА-79 в гликокаликсе покровного эпителия ассоциирована с беременностью [142]. При эндометриозе и аденомиозе отмечается снижение экспрессии МЕСА-79 эпитопа по сравнению с фертильными женщинами [140,195].

В нашем исследовании проводилось окрашивание эндометриальной ткани анти-МЕСА-79 антителами, а также лектином МАL-II, который детектирует остатки  $\alpha$ 2,3-связанной сиаловой кислоты в составе различных гликанов, в том числе и лигандов L-селектина и лектином SNA, который имеет специфичность к остаткам  $\alpha$ 2,6-связанной сиаловой кислоты. При этом специфичность анти-МЕСА-79 антител и лектина МАL-II частично перекрываются, поскольку анти-МЕСА-79 антитела распознают сложный эпитоп, который включает остатки фукозы,  $\alpha$ 2,3-связанной сиаловой кислоты и сульфата, присоединенного по 6 положению к N-ацетилглюкозамину.

Анализ результатов показал, что окрашивание лектином МАL-II гликокаликса поверхностного эпителия и эпителия желез не имело значимых различий ни в межгрупповом сравнении, ни при анализе корреляционных связей содержания окрашенных гликоконъюгатов в исследованных структурах эндометрия у пациенток с учетом исходов программ ВРТ и толщины эндометрия. При этом, отмечалось отсутствие тренда к изменению содержания окрашенных лектином МАL-II гликоконъюгатов при вышеуказанных сравнениях.

Окраска анти-МЕСА-79 антителами выявила значимые отличия в экспрессии МЕСА-79 эпитопа: у пациенток с толщиной эндометрия  $\geq 8$  мм выявлено в 1,3 раза больше содержание МЕСА-79 в гликокаликсе поверхностного эпителия, чем у пациенток с тонким эндометрием ( $p=0,0332$ ). При этом наблюдался тренд к более высокому содержанию МЕСА-79 в поверхностном эпителии, по сравнению с эпителием эндометриальных желез. Также отмечалось более высокое содержание МЕСА-79 у пациенток с наступившей беременностью, что, однако, не было статистически значимо.

Корреляционный анализ содержания гликоконъюгатов, окрашенных лектином **SNA** показал, что меньшее его содержание в железах по сравнению с поверхностным эпителием отмечалось в группе пациенток с тонким эндометрием ( $r=0,5697$ ;  $p=0,0135$ ) и у пациенток, у которых беременность не наступила ( $r=0,4524$ ;  $p=0,0452$ ).

По данным литературы известно, что терминальные остатки сиаловой кислоты (представленные  $\alpha 2,3$ -;  $\alpha 2,6$ - и  $\alpha 2,8$ -связанной сиаловой кислотой) вовлечены в различные межклеточные взаимодействия. Они могут: служить в качестве лигандов для молекул адгезии; оказывать антиадгезивный эффект благодаря формированию отрицательного заряда поверхности клетки; маскировать потенциальные лиганды для межклеточных коммуникаций [198].

Адгезионные взаимодействия при физиологических процессах чаще всего опосредуются  $\alpha 2,3$ -связанной сиаловой кислотой, которая входит в состав лигандов L-селектина. При патологии (например, онкотрансформациях или доброкачественных процессах) адгезионные взаимодействия чаще опосредуются  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислотой. Так, экспрессия разветвленных N-гликанов с терминальными остатками  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислоты выявляется в различных злокачественных опухолях и связана с повышением потенциала клеток к адгезии и инвазии [199]. Также, повышенное содержание  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислоты обнаруживается в составе гликоконъюгатов на толерогенных клетках (незрелые дендритные клетки, T-регуляторные клетки), где эти остатки выполняют функцию лигандов для ингибиторных рецепторов эффекторных клеток – сиглеков, что позволяет избегать активации эффекторных реакций и уничтожения клеток, экспрессирующих эти гликаны [200], что может быть нежелательным эффектом в ряде случаев, включая развитие злокачественных и доброкачественных новообразований. Кроме того,  $\alpha 2,6$ - связанная сиаловая кислота маскирует дисахарид  $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ , который является лигандом галектинов – мультифункциональных молекул иммунной системы,

регулирующих клеточную адгезию и иммунный ответ при воспалении и онкотрансформации [201,202]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что  $\alpha 2,6$ - связанная сиаловая кислота негативно регулирует иммунный ответ против клеток, экспрессирующих гликаны, которые имеют ее в составе.

На клеточных моделях иммортализованных эндометриальных клеток человека установлено, что TGF- $\beta 1$  повышает их адгезию к мезотелию, индуцируя увеличение экспрессии  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислоты, что предполагается как один из механизмов развития эндометриоза [203]. Однако, описан также эффект, свидетельствующий о снижении  $\alpha 2,6$ -паттерна сиалирования в перитонеальной жидкости, строме и эпителиальных клетках эндометрия у пациенток с эндометриозом, что ассоциировано с усилением миграционных свойств эндометриальных клеток, что также может быть механизмом формирования очагов эндометриоза [204].

Вышеописанные факты свидетельствуют об изменениях экспрессии остатков  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислоты в составе гликанов эндометриальной ткани и связи этого процесса с патологией эндометрия. В нашем исследовании установленный факт связи изменений экспрессии  $\alpha 2,6$ - связанной сиаловой кислоты в поверхностном эпителии и эпителии желез эндометрия у пациенток с тонким эндометрием может быть свидетельством нарушений биосинтеза  $\alpha 2,6$ - сиалогликанов. Как было установлено на предыдущем этапе исследования, эндометриоз является кофактором, влияющим на наступление беременности. Вероятно, наличие эндометриоза может оказывать влияние на особенности экспрессии  $\alpha 2,6$ - сиалогликанов в данной выборке, что согласуется с данными других исследователей [203,204]. Также необходимо отметить факт выявления межгрупповых различий по эпитопу MESA-79, который является, на сегодняшний день, одним из наиболее перспективных маркеров рецептивности. Наши данные подтверждают эту точку зрения, поскольку повышение экспрессии MESA-79 выявлено у пациенток с нормальным эндометрием.

Анализ результатов окрашивания структур эндометрия лектинами Con A (детекция остатков маннозы, а также **маннозобогатых** гликанов), VVL (детекция остатков N-ацетилгалактозамина) и ECL (детекция остатков N-ацетиллактозамина) позволил выявить значимое повышение функциональных остатков маннозы (Con A) ( $p=0,0471$ ) в поверхностном эпителии и остатков N-ацетилгалактозамина (VVL) ( $p=0,0610$ ) в эпителии желез эндометрия у пациенток, беременность у которых не наступила.

Как известно, функциональные остатки маннозы, наряду с остатками N-ацетилглюкозамина и фукозы часто ассоциированы с антигенами патогенов и входят в состав патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) или в состав т.н. образов опасности (ДАМП), которые локализованы на патологических клетках или клетках с измененной функцией, имеющих молекулярные отличия от нормальных клеток. ПАМП и ДАМП распознаются иммунной системой в качестве чужеродных и вызывают иммунный ответ, гуморальный или клеточный [205]. Первую линию иммунной защиты в подобных ситуациях осуществляют гуморальные и клеточные факторы врожденного иммунитета. В данном случае возможно участие маннозо-связывающего лектина (MBL) – эндогенного лектина, который является растворимым рецептором и входит в систему опознавания паттернов врожденного иммунитета. Результатом его связывания с маннозой является запуск лектинового пути активации комплемента с последующим цитолизом клеток. Также, эндогенные лектины, распознающие остатки маннозы представлены на клетках врожденного иммунитета – макрофагах и дендритных клетках (маннозный рецептор), посредством которых осуществляется элиминация клеток, несущих образы патогенности и опасности, в частности и отмирающих клеток, которые уходят в апоптоз. Имеются данные об экспрессии маннозного рецептора на маточных естественных киллерных клетках (uNK) [206].

На сегодняшний день данные, свидетельствующие об экспрессии и локализации маннозо-содержащих гликанов у фертильных пациенток,

пациенток с бесплодием в окно имплантации, и при патологии эндометрия, немногочисленны и противоречивы. Klentzeris LD., и соавт. 1991 отмечают высокую экспрессию маннозо-содержащих гликанов (окраска Con A) в цитоплазме и апикальной зоне эпителия желез, клетках стромы и поверхностном эпителии. При этом, у пациенток с бесплодием отсутствовало, или было слабо выражено окрашивание лектином Con A в поверхностном эпителии и эпителии желез [207]. По другим данным, Con A-окрашивание выражено только в децидуальных клетках при эктопической беременности по сравнению с нормальным эндометрием фертильных женщин в разные фазы цикла [186]. Данные Sivridis E., *et al.* (2000) свидетельствуют, что цитоплазматическое окрашивание клеток эндометрия характерно для злокачественных неоплазий [208]. У здоровых женщин в постменопаузе при атрофических и гиперпластических процессах в эндометрии не выявлено различий в содержании Con A-окрашенных гликоконъюгатов, но отмечается более высокое их содержание по сравнению с фертильными женщинами и выраженная окраска в цитоплазме, в области базальной мембраны и апикальной поверхности, а также в капиллярах [185].

Косвенным отражением реакции организма на наличие избыточного количества ПАМП и ДАМП является повышение содержания в крови и секретах MBL и иммунных клеток, экспрессирующих маннозный рецептор. Так, у пациенток с идиопатическим бесплодием установлено повышение содержания MBL и IL-18 в эндометриальных секретах [209]. При эндометриозе имеются противоречивые данные о содержании MBL: отмечается повышение MBL и компонентов комплемента [210]; содержание MBL при эндометриозе сопоставимо со здоровыми пациентками [211,212]. Взаимодействие MBL с лигандами инициирует иммунные реакции, направленные на удаление из организма молекул, которые распознаются как “чужие”, в том числе бактериальной природы [213] или осуществляет клиренс апоптотических клеток [214].

Полученные нами данные свидетельствуют, что в группе пациенток с тонким эндометрием и с не наступившей беременностью экспрессия маннозо-содержащих гликанов в поверхностном эпителии были значительно повышенными, что свидетельствует об измененном профиле гликозилирования в структурах эндометрия и отсутствии эффективности программ ВРТ у пациенток с выявленными особенностями. Можно предположить, что повышенное содержание гликанов с терминальными остатками маннозы и N-ацетилгалактозамина, ассоциированное с неудачами ВРТ отражает возможное формирование ПАМП и ДАМП как мишеней для локального привлечения иммунных клеток с целью элиминации клеток, несущих “чужие” или “опасные” антигены, которые могут не отражать инфекционного процесса, но быть ассоциированы с молекулярными изменениями вследствие развития атрофических процессов в эндометрии или пролеченного эндометриоза.

Особый интерес представляет анализ результатов связывания лектина **ЕСL** (детекция остатков N-ацетиллактозамина, которые являются лигандами галектинов). Установлено, что распределение N-ацетиллактозамина и его сиалированных форм (с одним и двумя остатками сиаловой кислоты) в нормальном эндометрии, соответствующем пролиферативной фазе цикла, при атрофии эндометрия, в децидуальной ткани и карциноме эндометрия чрезвычайно вариабельно. При этом N-ацетиллактозамин диффузно распределен в эндометрии, с преимущественной локализацией в железах, а его сиалированные формы – слабо экспрессируются в нормальном эндометрии, но сильно - в пролиферирующем нормальном эндометрии, и, особенно, при карциноме эндометрия [215].

Известно, что галектин-1, галектин-3 и галектин-5 – члены одного из семейств эндогенных лектинов – галектинов – секреторные белки, которые находятся в ассоциации с гликокаликсом клетки или гликанами внеклеточного матрикса. В литературе имеются данные об экспрессии галектинов в эндометрии, а именно, строме (галектин-1 в поздней секреторной фазе) и

эпителии (галектин-3 в секреторной фазе) [216]. Также установлена их экспрессия трофэктодермой бластоцисты после хетчинга, и участие в имплантации бластоцисты [125]. Предполагается, что галектины, посредством взаимодействия с их углеводными лигандами (основным лигандом является дисахарид N-ацетиллактозамин - Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1) вовлечены не только в процессы имплантации бластоцисты, но и в регуляцию гомеостаза эндометрия.

В нашем исследовании проводилось окрашивание ткани лектином ECL, который детектирует дисахарид Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1- в нативном виде и после предобработки ткани нейраминидазой – ферментом, отщепляющим терминальные остатки сиаловой кислоты. В первом случае – результат окрашивания отражает распределение лигандов галектинов в структурах эндометрия и свидетельствует о наличии функциональных групп для взаимодействия с ними, во втором – распределение демаскированных эпитопов, и отражает изменения субтерминальных структур гликанов.

Несмотря на то, что в межгрупповом анализе не было выявлено значимых различий, анализ корреляционных связей между содержанием вышеуказанных функциональных остатков гликанов в поверхностном эпителии и эпителии эндометриальных желез показал, что прямая средняя связь выявляется при окраске лектином ECL после предобработки ткани НМД. НМД отщепляет терминальные остатки сиаловой кислоты, в результате чего происходит демаскировка остатка Gal $\beta$ -, и дисахарида Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1, к которым чаще всего присоединены сиаловые кислоты, вследствие чего окраска лектином ECL возрастает, что и продемонстрировано в нашем исследовании. Причем, экспрессия Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1 в эпителии желез эндометрия выше, чем в поверхностном эпителии. Данная закономерность выявлена у пациенток с тонким эндометрием ( $p=0,0103$ ). Аналогичная связь установлена у пациенток с нормальной толщиной эндометрия ( $p=0,0334$ ), однако экспрессия дисахарида Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1 была выше в поверхностном эпителии, чем в эпителии желез эндометрия. Результаты свидетельствуют о

различных закономерностях регуляции экспрессии рецептора галектинов в основных структурах эндометриальной ткани, определяющих рецептивность у пациенток программ ВРТ с учетом толщины эндометрия и наступления беременности.

Обобщая вышесказанное, полученные данные свидетельствуют о необходимости введения новых критериев оценки рецептивности эндометрия, основанных на молекулярных сигнатурах маркеров, поскольку маркеры, используемые в клинической практике в настоящее время, имеют низкую эффективность. Разработанная в данном исследовании шкала оценки вероятности наступления беременности на основании гликомаркеров рецептивности позволяет дать комплексную оценку гликан-основанного рецепторного аппарата поверхностного эпителия и эпителия желез эндометрия в цикле, предшествующем циклу ЭКО. Такой подход позволяет охарактеризовать истинное функциональное состояние эндометрия, поскольку исключается влияние препаратов, используемых в различных протоколах стимуляции суперовуляции. Полученные данные имеют большое научное и практическое значение и открывают перспективы для исследования гликома эндометрия при различных патологиях в репродукции.

## 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  $(9,3 \pm 0,9)$  мм по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила -  $(7,2 \pm 0,9)$  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  $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и гликана Le<sup>Y</sup> в поверхностном эпителии по сравнению с эпителием желез эндометрия.

5. Для пациенток с тонким эндометрием характерна сниженная в 1,3 раза экспрессия  $\alpha 2,3$ -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)  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2,6-сиалогликанов (SNA), маннозобогатых гликанов (ConA) и  $\alpha$ 1,2-фукозилированного гликана Le<sup>Y</sup> 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.

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

где P (B) – вероятность наступления беременности, Exp – экспонента, Э – толщина эндометрия в мм, B – число blastocysts 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<sup>Y</sup> 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<sup>Y</sup>.

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
<b>MECA-79</b> в поверхностном эпителии	$\geq 0,42$	2,5
	$< 0,42$	0
<b>маннозобогатые гликаны</b> в поверхностном эпителии	$< 0,39$	2
	$\geq 0,39$	0
<b>Le<sup>Y</sup></b> - дельта между поверхностным и железистым эпителием	$< 0,12$	2
	$\geq 0,12$	0
<b>N-ацетилгалактозамин-терминированные гликаны</b> в железистом эпителии	$< 0,18$	1,5
	$\geq 0,18$	0
<b>маннозобогатые гликаны</b> - дельта между поверхностным и железистым эпителием	$< 0,06$	1,5
	$\geq 0,06$	0
<b><math>\alpha 2,6</math>-сиалогликаны</b> – 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 сокращений

- АЗС - астенозооспермия
- АМГ - антимюллеров гормон
- а-ГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ант-ГнРГ - антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ВЗОМТ - воспалительные заболевания органов малого таза
- ВКМ – внутриклеточная масса
- ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
- ГСГ - гистеросальпингография
- ГТ - гонадотропины
- ДГЭАС - дегидроэпиандростерон-сульфат
- ДИ – доверительный интервал
- Е2 - эстрадиол
- ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
- ЗГТ - заместительная гормональная терапия
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИКСИ - (от *англ.* – intracytoplasmic sperm injection, ICSI)  
интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
- ИР - индекс резистентности
- ИМТ- индекс массы тела
- ИППП - инфекции, передающиеся половым путем
- КАФ – количество антральных фолликулов
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- НГЭ – наружный генитальный эндометриоз
- НМД - нейроминидаза
- ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс
- ОШ - отношение шансов
- ОШ<sub>кор</sub> - скорректированное отношение шансов
- ПГТ - преимплантационное генетическое тестирование
- ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников
- ПИ - пульсационный индекс

ПЭ - перенос эмбрионов  
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон  
рФСГ - рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон  
РКИ – рандомизированное контролируемое исследование  
СГЯ - синдром гиперстимуляции яичников  
СДО - систолодиастолическое отношение  
СПКЯ - синдром поликистозных яичников  
Т - тестостерон  
ТВП – трансвагинальная пункция яичников  
ТЗС - тератозооспермия  
ТТГ - тиреотропный гормон  
Т<sub>4</sub><sub>св</sub> - свободный тироксин  
ТФЭ - трофэктодерма  
УЗИ - ультразвуковое исследование  
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон  
β-ХГ - β-субъединица хорионического гонадотропина  
ХГ - хорионический гонадотропин  
чМГ - человеческий менопаузальный гонадотропин  
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение  
AUC - area under the curve, площадь под кривой  
α-GalNAc - α-N-ацетилгалактозамин  
Con A - *Concanavalin A*  
ECL - *Erythrin Cristagalli Lectin*  
EGF - эпидермальный фактор роста  
Exp – экспонента  
ER – эстрогеновый рецептор  
ERA – тест эндометриальной восприимчивости  
FGF - фактор роста фибробластов  
G-CSF – гранулоцит стимулирующий фактор роста  
LIF – лейкемия ингибирующий фактор  
Le<sup>Y</sup>- дифукозилированный гликан Lewis Y

MALII - *Maackia Amurensis Lectin II*

MECA-79 - сульфатированный  $\alpha$ 2,3-сиалогликан

MMP - металлопротеиназы

PR - прогестероновый рецептор

SNA – *Sambucus Nigra lectin*

TGF - тканевой фактор роста

UEA I - *Ulex Europaeus Agglutinin I*

VEGF - сосудистый эпидермальный ростовой фактор

VVL - *Vicia Villosa Lectin*

### Список литературы

1. Российская Ассоциация Репродукции Человека. Регистр ВРТ. Отчет за 2017 год. - Санкт-Петербург, 2017. - 75 с.
2. Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста /Е.П. Бейк [ и др. ] // Акушерство и гинекология. - 2018. - № 4. - С. 78–84.
3. Сокур С.А. Взаимосвязь патозооспермии и анеуплоидии хромосом в сперматозоидах и эмбрионах в программах вспомогательных репродуктивных технологий / С.А. Сокур, Н.В. Долгушина, Ж.И. Глинкина // Акушерство и Гинекология. - 2013. - № 3. - С. 10–13.
4. Современные представления о дифференцированном подходе к выбору протокола стимуляции суперовуляции в циклах ЭКО /А.Г. Сыркашева [и др. ] // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 5. - С. 38–43.
5. Senturk L.M. Thin endometrium in assisted reproductive technology / L.M. Senturk, C.T. Erel // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. - 2008. - Vol. 20 (3). - P. 221–228.
6. Mahajan N. The endometrium in assisted reproductive technology: How thin is thin? / N. Mahajan, S. Sharma // J. Hum. Reprod. Sci. - 2016. -Vol. 9 (1). - P. 3–8.
7. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / Craciunas L. [ et al. ] // Hum. Reprod. Update. - 2019. - Vol. 25 ( 2 ). - P. 202–223.
8. Aplin J.D. Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation / J.D. Aplin // J. Reprod. Fertil. - 1991. - Vol. 92 ( 2 ). - P. 525–541.
9. Clark G.F. Functional glycosylation in the human and mammalian uterus / G.F. Clark // Fertil. Res. Pract. - 2015. - Oct 23;1:17. eCollection2015
10. Dutt A. Lactosaminoglycans are involved in uterine epithelial cell adhesion in vitro / A. Dutt, J.P. Tang, D.D. Carson // Dev. Biol. - 1987. - Vol. 119

- (1). - P. 27–37.
11. LeY oligosaccharide upregulates DAG/PKC signaling pathway in the human endometrial cells / Y. Li [ et al. ] // *Mol. Cell. Biochem.* - 2009. - Vol. 331 (1–2). - P. 1–7.
  12. Effects of LeY glycan expression on embryo implantation / J. Gu [ et al. ] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* - 2016. - Vol. 20 (16). - P. 33–35.
  13. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst / M. Meseguer [ et al. ] // *Biol. Reprod.* - 2001. - Vol. 64 ( 2 ). - P. 590–601.
  14. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women / A.W. Horne [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* - 2005. - Vol. 72 (2). - P. 216–229.
  15. Результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с тонким эндометрием / Н.Ф. Абдурахманова [ и др. ] // *Гинекология.* - 2019. - Т. 21, № 1. - С. 23–27.
  16. Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization / Y. Gonen [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 1989. - Vol. 52 (3). - P. 46–50.
  17. Endometrial ultrasonography as a predictor of pregnancy in an in-vitro fertilization programme after ovarian stimulation and gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins / J.B. Oliveira [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1997. - Vol. 12 (11). - P. 2515–2518.
  18. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles / E. Khalifa [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1992. - Vol. 7 (5). - P. 677–680.
  19. Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted reproductive treatments / P. Serafini [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 1994. - Vol. 62 (4). - P. 815–822.
  20. The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte-embryo transfer cycle / J.H. Check [ et al. ] //

- Fertil. Steril. - 1993. - Vol. 59 (1). - P. 72–75.
21. Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET) / G. Sher [ et al. ] // Hum. Reprod. - 1991. - Vol. 6 (2). - P. 232–237.
  22. Inhorn M.C. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century / M.C. Inhorn, P. Patrizio // Hum. Reprod. - 2015 - Vol. 21 (4). - P. 411–426.
  23. Defining infertility—a systematic review of prevalence studies / S. Gurunath [ et al. ] // Hum. Reprod. - 2011 - Vol. 17 (5). - P. 575–588.
  24. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / J.M. Franasiak [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2014. Vol. 101 (3). - P. 656–663.
  25. Molecular Interplay in Successful Implantation: Ten Critical Topics in Reproductive Medicine / J. Cha [ et al. ] // Washington, DC: Science/AAA. - 2013. - P. 44–48.
  26. Афян А.И. Тонкий эндометрий в клинике вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы) / А.И. Афян, Н.В. Долгушина // Гинекология. - 2014. - Т. 16, № 5 - С. 78–83.
  27. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization / N. Noyes [ et al. ] // Hum. Reprod. - 1995. - Vol. 10 (4). - P. 919–922.
  28. Endometrial thickness as a predictor of pregnancy after in-vitro fertilization but not after intracytoplasmic sperm injection / L. Rinaldi [ et al. ] // Hum. Reprod. - 1996. - Vol. 11 (7). - P. 1538–1541.
  29. Weissman A. The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an in vitro fertilization program / A. Weissman, L. Gotlieb, R.F. Casper // Fertil. Steril. - 1999. Vol. 71 (1). - P. 147–149.
  30. Endometrial pattern, thickness and growth in predicting pregnancy outcome

- following 3319 IVF cycle / Zhao J. [ et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* - 2014. - Vol. 29 (3). - P. 291–298.
31. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization / S. Bassil // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* - 2001. - Vol. 18 (3). - P. 258–263.
  32. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome / P. Kovacs [ et al.] // *Hum. Reprod.* - 2003. - Vol. 18 (11). - P. 2337–2341.
  33. Thin endometrium in donor oocyte recipients: enigma or obstacle for implantation? / L. Dain [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2013. - Vol. 100 (5). - P. 1289–1295.
  34. Pathophysiologic features of “thin” endometrium / I. Miwa [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2009. - Vol. 91 (4). - P. 998–1004.
  35. Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization–embryo transfer / X. Zhang [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2005. - Vol. 83 (2). - P. 336–340.
  36. Lebovitz O. Treating patients with “thin” endometrium – an ongoing challenge / O. Lebovitz, R. Orvieto // *Gynecol. Endocrinol.* - 2014. - Vol. 30 (6). - P. 409–414.
  37. Arce H. Association between endometrial thickness in oocyte donation cycles and pregnancy success rates / H. Arce, E. Velilla, M. López-Teijón // *Reprod. Fertil. Dev.* - 2016. - Vol. 28 (9). - P. 1288–1294.
  38. A pilot study to prevent a thin endometrium in patients undergoing clomiphene citrate treatment / Takasaki A. [et al.] // *J. Ovarian Res. BioMed Central*, 2013. Vol. 6 (1). P. 1–5.
  39. Endometrial thickness in women undergoing IUI with ovarian stimulation. How thick is too thin? A systematic review and meta-analysis / N.S. Weiss [ et al.] // *Hum. Reprod.* - 2017. - Vol. 32 (5). - P. 1009–1018.
  40. Low-dose aspirin does not improve ovarian stimulation, endometrial

- response, or pregnancy rates for in vitro fertilization / B.S. Hurst [et al. ] // *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* - 2005. - Vol. 2. - P. 2-8.
41. Low-dose aspirin for oocyte donation recipients with a thin endometrium: prospective, randomized study / L.N. Weckstein [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 1997. - Vol. 68 (5). - P. 927–930.
  42. Sher G. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF / G. Sher, J.D. Fisch // *Hum. Reprod.* - 2000. - Vol. 15 (4). - P. 806–809.
  43. Sher G. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development / G. Sher, J.D. Fisch // *Fertil. Steril.* - 2002. - Vol. 78 (5). - P. 1073–1076.
  44. In vitro fertilization pregnancy in a patient with proven chronic endometritis / H.M. Fatemi [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2009. - Vol. 91 (4). - P. 1293e9-1293e11.
  45. Tchente N.C. Asherman’s syndrome : management after curettage following a postnatal placental retention and literature review / N.C. Tchente, G. Brichant, M. Nisolle // *Rev. Med. Liege.* - 2018. - Vol. 73 (10). - P. 508–512.
  46. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study / T. Pérez-Medina [ et al.] // *Hum. Reprod.* - 2005. - Vol. 20 (6). - P. 1632–1635.
  47. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility / S. Matsuzaki [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 2009. - Vol. 24 (12). - P. 3180–3187.
  48. Myers E.M. Comprehensive management of severe Asherman syndrome and amenorrhea / E.M. Myers, B.S. Hurst // *Fertil. Steril.* - 2012. - Vol. 97 (1). - P. 160–164.
  49. Physiological sex steroid replacement in premature ovarian failure: randomized crossover trial of effect on uterine volume, endometrial thickness and blood flow, compared with a standard regimen / R.L. O’Donnell [ et al.]

- // Hum. Reprod. - 2012. - Vol. 27 (4) - P. 1130–1138.
50. Esmailzadeh S. Endometrial thickness and pregnancy outcome after intrauterine insemination / S. Esmailzadeh, M. Faramarzi // Fertil. Steril. - 2007. - Vol. 88 (2). - P. 432–437.
  51. Sharara F.I. Endometrial pattern on the day of oocyte retrieval is more predictive of implantation success than the pattern or thickness on the day of hCG administration / F.I. Sharara, J. Lim, H.D. McClamrock // J. Assist. Reprod. Genet. - 1999. - Vol. 16 (10). - P. 523–528.
  52. Effects of clomiphene citrate on the endometrium of regularly cycling women / W. Sereepapong [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2000. - Vol. 73 (2). - P. 287–291.
  53. Endometrial thickness is a valid monitoring parameter in cycles of ovulation induction with menotropins alone / J.D. Isaacs [ et al. ] // Fertil. Steril. - 1996. - Vol. 65 (2). - P. 262–266.
  54. The dynamics of endometrial growth and the triple layer appearance in three different controlled ovarian hyperstimulation protocols and their influence on IVF outcomes / P. Kuć [ et al. ] // Gynecol. Endocrinol. - 2011. - Vol. 27 (11). - P. 867–873.
  55. Bulun S.E. Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis/ S.E. Bulun, M. Bowling // Periodontol 2000. - 2013. - Vol. 61(1). - P. 89-102.
  56. Blesa D. Clinical Management of Endometrial Receptivity / D. Blesa, M. Ruiz-Alonso, C. Simón // Semin. Reprod. Med. - 2014. - Vol. 32 (5). - P. 410–414.
  57. Wilcox A.J. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy / A.J. Wilcox, D.D. Baird, C.R. Weinberg // N. Engl. J. Med. - 1999. - Vol. 340 (23). - P. 1796–1799.
  58. Cavagna M. Biomarkers of endometrial receptivity-a review / M. Cavagna, J.C. Mantese // Placenta. - 2003. - Vol. 24 Suppl B. - P. 39–47.
  59. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine's research works American Society for Reproductive Medicine,

Birmingham and other places [Electronic resource]. URL:

[https://www.researchgate.net/scientific-](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/2076149684_The_Practice_Committee_of_the_American_Society_for_Reproductive_Medicine)

[contributions/2076149684\\_The\\_Practice\\_Committee\\_of\\_the\\_American\\_Society\\_for\\_Reproductive\\_Medicine.](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/2076149684_The_Practice_Committee_of_the_American_Society_for_Reproductive_Medicine)

60. Rarani F.Z. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs / F.Z. Rarani, F. Borhani, B. Rashidi // *J. Cell. Physiol.* - 2018. - Vol. 233 (12). - P. 9145–9158.
61. Ольховская М.А. Биомаркеры «имплантационного окна» / М.А. Ольховская // *Проблемы репродукции.* - 2007. - № 1. - С. 72–77.
62. Arsenic-induced toxicity in the endometrium of adult albino rat and the possible role of human chorionic gonadotropin hormone / A.M. Elshawarby [et al. ] // *Egypt. J. Histol.* - 2014. - Vol. 37 (2). - P. 327–338.
63. Mokhtar M.H. Investigating the effects of testosterone on uterine fluid regulation and endometrial receptivity in a rat model / M.H. Mokhtar // - 2016. - P. 1-211.
64. Effects of Bu-Shen-An-Tai recipe and its two components on endometrial morphology during peri-implantation in superovulated mice / D. Cui [et al.] // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* - 2014. Vol. 34 (5). - P. 768–774.
65. Activation of Toll-like receptor 3 reduces actin polymerization and adhesion molecule expression in endometrial cells, a potential mechanism for viral-induced implantation failure / M. Montazeri [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 2015. - Vol. 30 (4). - P. 893–905.
66. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles / G. Nikas [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1999. - Vol. 14 (3). - P. 787–792.
67. Endometrial Receptivity Markers in Mice Stimulated With Raloxifene Versus Clomiphene Citrate and Natural Cycles / C. Chen [ et al. ] // *Reprod. Sci.* - 2016. - Vol. 23 (6). - P. 748–755.
68. MicroRNA-223-3p suppresses leukemia inhibitory factor expression and pinopodes formation during embryo implantation in mice. / X. Dong [ et al.]

- // Am. J. Transl. Res. - 2016. - Vol. 8 (2). - P. 1155–1163.
69. Quinn C. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window / C. Quinn, E. Ryan, E. Claessens // *Fertil Steril.* - 2007. - № 87 (5). - P. 1015–1021.
  70. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women / A.A. Acosta [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2000. - Vol. 73 (4). - P. 788–798.
  71. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility / R.S. Usadi [ et al.] // *Fertil. Steril.* - 2003. - Vol. 79 (4). - P. 970–974.
  72. Ovulation induction disrupts luteal phase function / A. Tavaniotou [ et al. ] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2001. - Vol. 943. - P. 55–63.
  73. Gemzell-Danielsson K. Effects of progestogens on endometrial maturation in the implantation phase / K. Gemzell-Danielsson, M. Bygdeman // *Ernst Schering Res. Found. Workshop.* - 2005. - № 52. - P. 119–138.
  74. Steroid receptor expression in human endometrium during the follicular phase of stimulated cycles / D. Kyrou [ et al. ] // *Hum. Reprod.* Oxford University Press. - 2009. - Vol. 24 (11). - P. 2931–2935.
  75. Ovulation induction and endometrial steroid receptors / F.H. Hadi [ et al.] // *Hum. Reprod.* - 1994. - Vol. 9 (12). - P. 2405–2410.
  76. Dimitriadis E. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation / E. Dimitriadis // *Hum. Reprod. Update.* - 2005. - Vol. 11 (6). - P. 613–630.
  77. Comparison of pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer between the donors and the recipients in a donor oocyte program / J.H. Check [ et al. ] // *J. Assist. Reprod. Genet.* - 1992. - Vol. 9 (3). - P. 248–250.
  78. Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity / M.H. Gaast [ et al. ] // *Reprod. Biomed. Online.* -

2008. - Vol. 17 (4). - P. 553–563.
79. Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin  $\beta 3$  and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase / Q. Chen [ et al.] // *Fertil. Steril.* - 2008. - Vol. 89 (5). - P. 1357–1363.
  80. Salleh N. Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception / N. Salleh, N. Giribabu // *Sci. World J.* - 2014. - Vol. 2014. - P.e 201514
  81. Melford S.E. Of mice and (wo)men: factors influencing successful implantation including endocannabinoids / S.E. Melford, A.H. Taylor, J.C. Konje // *Hum. Reprod. Update.* - 2014. - Vol. 20 (3). - P. 415–428.
  82. Expression of galectin-8 on human endometrium: Molecular and cellular aspects / H. Nikzad [ et al. ] // *Iran. J. Reprod. Med.* - 2013. - Vol. 11 (1). - P. 65–70.
  83. Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium / A. Franchi [ et al. ] // *Mol. Hum. Reprod.* - 2008. - Vol. 14 (7). - P. 413–421.
  84. Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel function for pinopodes in endometrial receptivity / R. Nejatbakhsh [et al. ] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* - 2012. - Vol. 10. - P. 46.
  85. GnRH analogues may increase endometrial Hoxa10 promoter methylation and affect endometrial receptivity / F. Li [ et al.] // *Mol. Med. Rep.* - 2015. - Vol. 11 (1). - P. 509–514.
  86. Surgery for Benign Gynecological Disorders Improve Endometrium Receptivity / O. Celik [ et al.] // *Reprod. Sci.* - 2017. - Vol. 24 (2). - P. 174–192.
  87. Endometrial Glycodelin-A Expression in Patients with IVF Failure / A. Ilgin [ et al. ] // *TJRMS.* - 2017. - Vol. 1 (1). - P. 156.
  88. Taheripanah R. et al. Uterine and Serum Glycodelin Concentration in Recurrent Implantation Failure Versus Normal Fertile Women on

- Implantation Window / R. Taheripanah [ et al. ] // *Int. J. Women's Heal. Reprod. Sci.* - 2017. - Vol. 5 (2). - P. 103–106.
89. Afami M.E. Identify and characterise stem cell population of the human endometrium / F. Afami // *Lancaster University.* - 2015 - P. 1-360.
90. Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation / A. Stavreus-Evers [ et al. ] // *Mol. Hum. Reprod.* - 2002. - Vol. 8 (8). - P. 765–769.
91. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor and Its Receptors Mediate Decidualization and Potentiate Survival of Human Endometrial Stromal Cells / K. Chobotova [ et al. ] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2005. - Vol. 90 (2). - P. 913–919.
92. Matsumoto H. Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via alpha5beta1 integrin / H. Matsumoto, K. Sakai, M. Iwashita // *Mol. Hum. Reprod.* - 2008. - Vol. 14 (8). - P. 485–489.
93. Strowitzki T. The human endometrium as a fertility-determining factor / T. Strowitzki // *Hum. Reprod.* - 2006. - Vol. 12 (5). - P. 617–630.
94. Differential expression of vascular endothelial growth factor angiogenic factors in different endometrial compartments in women who have an elevated progesterone level before oocyte retrieval, during in vitro fertilization-embryo transfer treatment / X. Chen [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2015. - Vol. 104 (4). - P. 1030–1036.
95. Sternlicht M.D. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior/ M.D. Sternlicht, Z. Werb // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2001. - Vol. 17 (1). - P. 463–516.
96. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer / N. Inagaki [ et al. ] // *Hum. Reprod.* 2003. Vol. 18 (3). P. 608–615.
97. Mucin 15 is lost but mucin 13 remains in uterine luminal epithelial cells and

- the blastocyst at the time of implantation in the rat / C.E. Poon [ et al. ] // *Reprod. Fertil. Dev.* - 2014. - Vol. 26 (3). - P. 421–431.
98. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? / C. Fox [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2016. - Vol. 105 (4). - P. 873–884.
99. Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis / N. Dharmaraj [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 2014. - Vol. 29 (8). - P. 1730–1738.
100. Gnainsky Y. Implantation: Mutual Activity of Sex Steroid Hormones and the Immune System Guarantee the Maternal–Embryo Interaction / Y. Gnainsky, N. Dekel, I. Granot // *Semin. Reprod. Med.* - 2014. - Vol. 32 (5). - P. 337–345.
101. Transcriptomics of the human endometrium / P. Díaz-Gimeno [ et al. ] // *Int. J. Dev. Biol.* - 2014. - Vol. 58 (2–4). - P. 127–137.
102. Recent Advances in Understanding Endometrial Receptivity: Molecular Basis and Clinical Applications / C. Grothusen [ et al. ] // *Am. J. Reprod. Immunol.* - 2014. - Vol. 72 (2) - P. 148–157.
103. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure / M. Ruiz-Alonso [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2013. - Vol. 100 (3). - P. 818–824.
104. Демидов В.Н., Гус. А.Й. Ультразвуковая диагностика гиперпластических и опухолевых процессов эндометрия // Под ред. В.В. Митькова, М.В. Медведева. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике, Т.3. - М.: Видар, 1997. - С. 120-131.
105. Ultrasound characteristics and histological dating of the endometrium in a natural cycle in infertile women compared with fertile controls / A. Lindhard [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2006. - Vol. 86 (5). - P. 1344–1355.
106. Ultrasonography as a predictor of embryo implantation after in vitro fertilization: a controlled study / B. Puerto [ et al.] // *Fertil. Steril.* - 2003. - Vol. 79 (4). - P. 1015–1022.
107. The impact of endometrial thickness (EMT) on the day of human chorionic

- gonadotropin (hCG) administration on pregnancy outcomes: a 5-year retrospective cohort analysis in Malaysia / J.M. Chan [ et al. ] // *Fertil. Res. Pract.* - 2018. - Vol. 4 (1). - P. 5.
108. Bu Z. The Impact of Endometrial Thickness on the Day of Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) Administration on Ongoing Pregnancy Rate in Patients with Different Ovarian Response / Z. Bu, Y. Sun // *PLoS One* / - 2015. - Vol. 10 (12). - P. e0145703.
109. Ершова И.Ю. Современные подходы к оценке рецептивности эндометрия / И.Ю. Ершова, К.В. Краснопольская, Т.В. Назаренко // *Проблемы репродукции.* - 2016. - Т. 22, №5. - С. 61–69.
110. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles with morphological good-quality blastocyst . W. Yang [ et al. ] // *Medicine (Baltimore).* - 2018. - Vol. 97 (2). - P. e9577.
111. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome? / L.T. Mercé [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2008. - Vol. 89 (1). - P. 111–117.
112. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / L.W. Chien [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 2002. - Vol. 78 (2). - P. 245–251.
113. Intra-observer, interobserver, interultrasound transducer and intercycle variation in colour Doppler assessment of uterine artery impedance / C.V. Steer [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1995. - Vol. 10 (2). - P. 479–481.
114. Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal Doppler study / M.C. Scholtes [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 1989. - Vol. 52 (6). - P. 981–985.
115. The role of endometrial and subendometrial vascularity measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in the prediction of pregnancy during

- frozen-thawed embryo transfer cycles / E.H.Y. Ng [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 2006. - Vol. 21 (6). - P. 1612–1617.
116. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия / М.М. Зиганшина [ и др. ] // *Акушерство и гинекология.* - 2017. - №12. - С. 17–24.
117. Understanding and improving endometrial receptivity / J.A. Miravet-Valenciano [ et al. ] // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* - 2015. - Vol. 27 (3). - P. 187–192.
118. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion / J. Gu [ et al. ] // *Glycoconj. J.* - 2012. - Vol. 29 (8–9). - P. 599–607.
119. Scott D.W. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation / D.W. Scott, R.P. Patel // *Glycobiology.* - 2013. - Vol. 23 (6). - P. 622–633.
120. Gupta G. Glycomics: An Overview of the Complex Glycocode / G. Gupta, A.Surolia. // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2012. - Vol.749. - P.1-13
121. Lectin histochemistry for detecting cadmium-induced changes in the glycosylation pattern of rat placenta / M. Díaz [ et al. ] // *Biotech. Histochem.* - 2017. - Vol. 92 (1). - P. 36–45.
122. Jones C.J.P. Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycocode play a critical role in implantation? / C.J.P. Jones, J.D. Aplin // *Glycoconj. J.* - 2009. - Vol. 26 (3). - P. 359–366.
123. Jones C.J.P. Reproductive Glycogenetics – A Critical Factor in Pregnancy Success and Species Hybridisation / C.J.P. Jones, J.D. Aplin // *Placenta.* - 2009. - Vol. 30 (3). - P. 216–219.
124. Bucior I., Burger M.M. Carbohydrate–carbohydrate interactions in cell recognition / I. Bucior, M.M. Burger // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2004. - Vol. 14 (5). - P. 631–637.
125. Kimber S.J. Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation / S.J. Kimber // *Semin. Reprod. Med.* - 2000. - Vol. 18 (3). - P. 237–254.

126. Rabinovich G.A. Glycobiology of immune responses / G.A. Rabinovich, van Y. Kooyk, B.A. Cobb // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2012. - Vol. 1253 (1). - P. 1–15.
127. Structure and function of laminin 1 glycans; glycan profiling / F. Jin [ et al. ] // *Glycobiology.* - 1995. - Vol. 5 (2). - P. 157–158.
128. The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 and shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression and galectin-1 binding. / U. Jeschke [ et al. ] // *J. Histochem. Cytochem. Histochemical Society.* - 2009. - Vol. 57 (9). - P. 871–881.
129. Progesterone regulates glycosylation in endometrium / J.D. Aplin [ et al. ] // *Biochem. Soc. Trans.* - 1997. - Vol. 25 (4). - P. 1184–1187.
130. Kirn-Safran C. Dynamics of Uterine Glycoconjugate Expression and Function / C. Kirn-Safran, D. Carson // *Semin. Reprod. Med.* - 1999. - Vol. 17 (3). - P. 217–227.
131. Kimber S.J. Glycosylation changes during differentiation of the murine uterine epithelium / S.J. Kimber, R.E. Stones, S.S. Sidhu // *Biochem. Soc. Trans.* - 2001. - Vol. 29 (Pt 2). - P. 156–162.
132. Kimber S.J., Expression of carbohydrate antigens in the rat uterus during early pregnancy and after ovariectomy and steroid replacement / S.J. Kimber, I.M. Illingworth, S.R. Glasser // *J. Reprod. Fertil.* - 1995. - Vol. 103 (1). - P. 75–87.
133. Cyclic modulation of epithelial glycosylation in human and baboon (*Papio anubis*) endometrium demonstrated by the binding of the agglutinin *Dolichos biflorus* / C.J. Jones [ et al. ] // *Biol. Reprod.* - 1998. - Vol. 58 (1). - P. 20–27.
134. Immunolocalization of Le(y) oligosaccharide in endometrium during menstrual cycle and effect of early luteal phase mifepristone administration on its expression in implantation stage endometrium of the rhesus monkey / D. Ghosh [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1998. - Vol. 13 (5). - P. 1374–1379.
135. Modulation of syndecans in the uterus throughout the menstrual cycle: comparison between endometrium and myometrium / T. Lorenzi [ et al. ] //

- Fertil. Steril. - 2011. - Vol. 95 (8). - P. 2608–2611.
136. Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle / T. Lai [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2007. - Vol. 87 (1). - P. 121–126.
137. Afify A.M. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle / A.M. Afify, S. Craig, A.F. Paulino // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. - 2006. - Vol. 14 (3). - P. 328–333.
138. Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface / O.D. Genbacev [ et al. ] // Science. - 2003. Vol. 299 (5605). - P. 405–408.
139. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle / T. Lai [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2005. - Vol. 83 (4) - P. 1297–1302.
140. L-Selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects / L. Margarit [ et al. ] // Hum. Reprod. - 2009. - Vol. 24 (11). - P. 2767–2777.
141. ORIGINAL ARTICLE: High Expression of l-Selectin Ligand in Secretory Endometrium is Associated with Better Endometrial Receptivity and Facilitates Embryo Implantation in Human Being / B. Wang [ et al. ] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2008. - Vol. 60 (2). - P. 127–134.
142. Immunohistochemical expression of endometrial L-selectin ligand is higher in donor egg recipients with embryonic implantation / M. Shamonki [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2006. - Vol. 86 (5). - P. 1365–1375.
143. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity / R.A. Foulk [ et al. ] // J. Assist. Reprod. Genet. - 2007. - Vol. 24 (7). - P. 316–321.
144. Meseguer M. MUC1 and endometrial receptivity / M. Meseguer, A. Pellicer, C. Simón // Mol. Hum. Reprod. - 1998. - Vol. 4 (12). - P. 1089–1098.
145. The effects of sex steroid hormones and interleukin-1-beta on MUC1 expression in endometrial epithelial cell lines / A.W. Horne [ et al. ] //

- Reproduction. - 2006. - Vol. 131 (4). - P. 733–742.
146. Expression of the pantumour Thomsen-Friedenreich antigen in the human placenta with the diagnosis of hydatidiform mole / D.U. Richter [ et al. ] // *Anticancer Res.* - 2007. - 27 (4A). - P. 2001–2004.
  147. Clark G.F. The role of glycans in immune evasion: the human fetoembryonic defence system hypothesis revisited / G.F. Clark // *Mol. Hum. Reprod.* - 2014. - Vol. 20 (3). - P. 185–199.
  148. Low-dose aspirin for infertile women with thin endometrium receiving intrauterine insemination: a prospective, randomized study / Y.Y. Hsieh [ et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* - 2000. - Vol. 17 (3). - P. 174–177.
  149. Aspirin for in vitro fertilisation / C.S. Siristatidis [ et al. ] // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* - 2016. - Vol. 11. P. CD004832.
  150. The benefits of low-dose aspirin therapy in women with impaired uterine perfusion during assisted conception / I. Wada [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 1994. - Vol. 9 (10). - P. 1954–1957.
  151. A matched study to determine whether low-dose aspirin without heparin improves pregnancy rates following frozen embryo transfer and/or affects endometrial sonographic parameters / J.H. Check [ et al. ] // *J. Assist. Reprod. Genet.* - 1998. - Vol. 15 (10). - P. 579–582.
  152. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes / D. Glujovsky [ et al. ] // *Cochrane Database Syst. Rev.* - 2010. - Vol. 20 (1) - CD006359.
  153. Comparison between oral and vaginal estrogen usage in inadequate endometrial patients for frozen-thawed blastocysts transfer / X. Liao [ et al. ] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* - 2014. - Vol. 7 (10). - P. 6992–6997.
  154. Griesinger G. Endometrial thickness on the day of embryo transfer is a poor predictor of IVF treatment outcome / G. Griesinger, S. Trevisan, B. Cometti // *Hum. Reprod. Open.* - 2018(1):hox031. eCollection 2018.
  155. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme / N.

- Lédée-Bataille [ et al. ] // Hum. Reprod. - 2002. - Vol. 17 (5). - P. 1249–1253.
156. Acharya S. The use of a combination of pentoxifylline and tocopherol in women with a thin endometrium undergoing assisted conception therapies – a report of 20 cases / S. Acharya, E. Yasmin, A.H. Balen // Hum. Fertil. - 2009. - Vol. 12 (4). - P. 198–203.
157. Gleicher N. Successful treatment of unresponsive thin endometrium / N. Gleicher, A. Vidali , D.H. Barad // Fertil. Steril. - 2011. - Vol. 95 (6). - P. 2123.e13-2123.e17.
158. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Administration for Infertile Women With Thin Endometrium in Frozen Embryo Transfer Program / Y. Li [ et al. ] // Reprod. Sci. - 2014. - Vol. 21 (3). - P. 381–385.
159. Luteal phase support with GnRH-a improves implantation and pregnancy rates in IVF cycles with endometrium of  $\leq 7$  mm on day of egg retrieval / H. Qublan [ et al. ] // Hum. Fertil. - 2008. - Vol. 11 (1). - P. 43–47.
160. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure / A. Raziel [ et al.] // Fertil. Steril. - 2007. - Vol. 87 (1). P. 198–201.
161. Potdar N. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis / N. Potdar, T. Gelbaya, L.G. Nardo // Reprod. Biomed. Online. - 2012. - Vol. 25 (6). - P. 561–571.
162. Endometrial disruption does not improve implantation in patients who have failed the transfer of euploid blastocysts / M.D. Werner [ et al. ] // J. Assist. Reprod. Genet. Springer. - 2015. - Vol. 32 (4). - P. 557–562.
163. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization / A. Barash [ et al. ] // Fertil. Steril. - 2003. - Vol. 79 (6). - P. 1317–1322.
164. Outcome of assisted reproduction treatment in patients with endometrial thickness less than 7 mm / B. Kumbak [ et al. ] // Reprod. Biomed. Online. - 2009. - Vol. 18 (1). - P. 79–84.

165. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips / V.I. Butvilovskaya [ et al. ] // *Cancer Med.* - 2016. - Vol. 5 (7). - P. 1361–1372.
166. Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives / D.K. Gardner [ et al. ] // Informa healthcare. - 2009. - P. 912.
167. Gardner D.K. Culture and transfer of human blastocysts / D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* - 1999. - Vol. 11 (3). - P. 307–311.
168. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers / K.E. Liu [ et al. ] // *Hum. Reprod.* - 2018. - Vol. 33 (10). - P. 1883–1888.
169. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst / T. Zhang [ et al. ] // *Medicine (Baltimore)*. - 2018. - 97(4):e9689.
170. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome / K.B. Apparao [ et al. ] // *Biol. Reprod.* - 2002. - Vol. 66 (2). - P. 297–304.
171. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе / М.М. Левиашвили [и др.] // *Акушерство и гинекология*. - 2012. - Т. 4., №1. - С. 65–69.
172. Морфологический и молекулярный субстрат нарушения рецептивности эндометрия у бесплодных пациенток с наружным генитальным эндометриозом / Е.А. Коган Е.А. [и др.] // *Акушерство и гинекология*. - 2014. - № 8. - С. 47–51.
173. Levels of oestrogen receptor, progesterone receptor and  $\alpha$ B-crystallin in eutopic endometrium in relation to pregnancy in women with endometriosis / C. Moberg [ et al. ] // *Hum Fertil.* - 2014. - № 19. - P. 1–8.
174. Особенности экспрессии рецепторов половых стероидных гормонов

- при наружном генитальном эндометриозе / В.М. Денисова [ и др. ] // Молекулярная медицина. - 2014. - № 5. - С. 29–32.
175. High throughput, cell type-specific analysis of key proteins in human endometrial biopsies of women from fertile and infertile couples / R.E. Leach [ et al. ] // Hum Reprod. - 2012. - Vol. 27 (3). - P. 814–828.
176. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis / S.E. Bulun [ et al. ] // Semin Reprod Med. - 2010. - Vol. 28 (1). - P. 36–43.
177. Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy / E. Dimitriadis [ et al. ] // Placenta. - 2010. - Vol. 31 Suppl. - P. S99-104.
178. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation / M. Marwood [ et al. ] // Endocrinology. - 2009. - Vol. 150 (6). - P. 2915–2923.
179. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window / E. Dimitriadis [ et al. ] // Reprod. Biol. Endocrinol. - 2007. - Vol. 29 (5). - P. 44.
180. Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window / E. Dimitriadis [ et al. ] // J. Reprod. Immunol. - 2006. - Vol. 69(1). - P. 53–64.
181. LIF expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases / H.D. Tsai [ et al. ] // J Assist Reprod Genet. - 2000. - Vol. 17(8) - P. 415–418.
182. Иммуногистохимическая характеристика рецептивности эндометрия в циклах ЭКО / Д.А. Ниаури [ и др. ] // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 9. - P. 44–49.
183. Peverini S. Superovulation affects glucosamine trisaccharides in the glycocalyx of the rat endometrium at the time of implantation / S. Peverini,

- B. Kramer // *J. Anat.* - 1995. - Vol. 187 ( Pt 2). - P. 487–490.
184. Kimber S.J. Blastocyst implantation: the adhesion cascade / S.J. Kimber , C. Spanswick // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2000. - Vol. 11 (2). - P. 77–92.
185. Aging of the human endometrium: peri-implantation phase endometrium does not show any age-dependent variation in lectin binding / I. Noci [ et al. ] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* - 1996. - Vol. 64 (1). - P. 11–21.
186. Bychkov V. Lectin Binding to Normal Human Endometrium / V. Bychkov, P.D. Toto // *Gynecol. Obstet. Invest.* - 1986. - Vol. 22 (1). - P. 29–33.
187. Bychkov V. Wheat Germ and Peanut Agglutinin Binding to Normal, Dysplastic and Neoplastic Cervical Epithelium / V. Bychkov, P.D. Toto // *Gynecol. Obstet. Invest.* - 1986. - Vol. 21 (3). - P. 158–163.
188. Lessey B.A. Adhesion molecules and implantation . B.A. Lessey // *J. Reprod. Immunol.* - 2002. - Vol. 55(1–2). - P. 101–112.
189. Difucosylated oligosaccharide Lewis Y is contained within integrin  $\alpha\beta3$  on RL95-2 cells and required for endometrial receptivity / D. Zhang [ et al.] // *Fertil. Steril.* - 2011. - Vol. 95 (4). - P. 1446-1451.e1.
190. Differential expression of LeY and fucosyltransferase IV correlates with the receptivity of RL95-2 and HEC-1A human uterine epithelial cells / S. Liu [et al.] // *Cell Biol. Int.* - 2012. - Vol. 36 (5). - P. 469–474.
191. Uterine glands impact uterine receptivity, luminal fluid homeostasis and blastocyst implantation / A.M. Kelleher [ et al. ] // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6 (1). - P. 38078.
192. Murphy C.R. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation / C.R. Murphy // *Cell Res.* - 2004. - Vol. 14 (4). - P. 259–267.
193. Role of Selectins and their Ligands in Human Implantation Stage / Y. Feng [ et al. ] // *Glycobiology.* - 2017. - Vol. 27 (5). - P. 385–391.
194. Horne A.W. Adhesion molecules and the normal endometrium / A.W. Horne, J.O. White, el-N. Lalani // *BJOG.* - 2002. - Vol. 109 (6). - P. 610–617.
195. Endometrial L-selectin ligand is downregulated in the mid-secretory phase during the menstrual cycle in women with adenomyosis / T.H. Lai [ et al. ] //

- Taiwan. J. Obstet. Gynecol. - 2018. - Vol. 57 (4). - P. 507–516.
196. Testosterone decreases the expression of endometrial pinopode and L-selectin ligand (MECA-79) in adult female rats during uterine receptivity period / H.M. Mokhtar [ et al. ] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. - 2014. - Vol. 7 (5) - P. 1967–1976.
197. Original article: High Expression of l-Selectin Ligand in Secretory Endometrium is Associated with Better Endometrial Receptivity and Facilitates Embryo Implantation in Human Being / B.Wang [ et al. ] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2008. - Vol. 60 (2). - P. 127–134.
198. Varki A. Sialic acids in human health and disease / A.Varki // Trends. Mol. Med. - 2008 - Vol. 14(8). - P. 351-360.
199. Ranjan A.  $\alpha$ 2,6 sialylation associated with increased beta 1,6-branched N-oligosaccharides influences cellular adhesion and invasion / A. Ranjan, R.D. Kalraiya // J. Biosci. - 2013. - Vol. 38 (5). - P. 867–876.
200. Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells / J. Jenner [ et al. ] // Exp. Hematol. - 2006. - Vol. 34 (9). - P. 1212–1218.
201. Zhuo Y. Emerging Role of  $\alpha$ 2,6-Sialic Acid as a Negative Regulator of Galectin Binding and Function / Y. Zhuo, S.L. Bellis // J. Biol. Chem. - 2011. - Vol. 286 (8). - P. 5935–5941.
202. Рапопорт Е.М. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции / Е. М. Рапопорт, О.В. Курмышкина, Н.В. Бовин // Биохимия. - 2008. - Т. 73, № 4. - С. 483-497.
203. Increased  $\alpha$ 2-6 sialylation of endometrial cells contributes to the development of endometriosis / H.J. Choi [ et al. ] // Exp. Mol. Med. - 2018. Vol. 50 (12). - P. 164.
204. Reduced  $\alpha$ -2,6 sialylation regulates cell migration in endometriosis / C. Maignien [ et al. ] // Hum. Reprod. - 2019. - Vol. 34 (3). - P. 479–490.
205. Rabinovich G.A., Croci D.O. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer / G.A. Rabinovich. D.O.

- Croci // *Immunity*. - 2012. - Vol. 36 (3). - P. 322–335.
206. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor / N. Kane [ et al. ] // *Endocrinology*. - 2009. - Vol. 150 (6). - P. 2882–2888.
207. Lectin binding of endometrium in women with unexplained infertility / L.D. Klentzeris [ et al. ] // *Fertil. Steril.* - 1991. - Vol. 56 (4). - P. 660–667.
208. Lectin-binding patterns in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: the prognostic value of concanavalin A / E. Sivridis [ et al. ] // *Virchows Arch.* - 2000. - Vol. 436 (1). - P. 52–58.
209. Higher interleukin-18 and mannose-binding lectin are present in uterine lumen of patients with unexplained infertility / P. Oger [ et al. ] // *Reprod. Biomed. Online*. - 2009. - Vol. 19 (4). - P. 591–598.
210. The role of complement components C1q, MBL and C1 inhibitor in pathogenesis of endometriosis / J. Sikora [ et al. ] // *Arch. Gynecol. Obstet.* - 2018. - Vol. 297 (6). - P. 1495–1501.
211. Özerkan K. Mannose-binding lectin levels in endometriosis / K. Özerkan, B. Oral, G. Uncu // *Fertil. Steril.* - 2010. - Vol. 94 (2). - P. 775–776.
212. Kavoussi S.K. Expression of mannose-binding lectin in the peritoneal fluid of women with and without endometriosis / S.K. Kavoussi, M.D. Mueller, M.D. Lebovic // *Fertil. Steril.* - 2006. - Vol. 85 (5). - P. 1526–1528.
213. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells / E.C. Asbeck [ et al. ] // *BMC Microbiol.* - 2008. - Vol. 8 (1). - P. 229.
214. Mannose-Binding Lectin Is Required for the Effective Clearance of Apoptotic Cells by Adipose Tissue Macrophages During Obesity / R. Stienstra [ et al. ] // *Diabetes*. - 2014. - Vol. 63 (12). - P. 4143–4153.
215. N-acetyllactosamine and sialosyl-N-acetyllactosamine in normal and malignant human endometrium / V. Ravn [ et al. ] // *Glycosylation Dis.* - 1994. - Vol. 1 (4). - P. 271–278.

216. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation / M. Wolff [ et al. ] // Mol. Hum. Reprod. - 2005. - Vol. 11 (3). - P. 189–194.