

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

ГОХБЕРГ
Яэль Александровна

**ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЯ ПРОГРАММ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ С ПЕРЕНОСОМ РАЗМОРОЖЕННОГО
ЭМБРИОНА НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ
ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ
НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В СЕКРЕТЕ ЭНДОМЕТРИЯ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

**доктор медицинских наук, профессор
Калинина Елена Анатольевна**

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. РОЛЬ ЭНДОМЕТРИЯ В ПРОЦЕССЕ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНА В ПРОГРАММАХ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ (обзор литературы)	15
1.1. Рецептивность эндометрия и его имплантационная способность	15
1.2. Подготовка эндометрия к переносу размороженного эмбриона.....	18
1.3. Методы диагностики рецептивности эндометрия	20
1.3.1. Гистологический метод исследования эндометрия.....	22
1.3.2. Иммуногистохимический метод исследования эндометрия	24
1.3.3. Электронная микроскопия эндометрия	27
1.3.4. Молекулярно-генетический метод исследования эндометрия	28
1.3.5. Аспирация секрета эндометрия	31
1.4. Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия.....	34
1.5. Регуляция экспрессии малых некодирующих РНК (мнкРНК).....	38
1.5.1. МикроРНК (miRNAs)	38
1.5.2. ПивиРНК (piwiRNAs)	39
1.6. Роль мнкРНК в имплантации эмбрионов	40
1.7. Роль мнкРНК в рецептивности эндометрия.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Материал исследования.....	46
2.2. Критерии включения и исключения в исследование	46
2.3. Дизайн исследования	48
2.4. Методы исследования.....	51
2.4.1. Общеклинические методы исследования	51
2.4.2. Гормональные исследования	53
2.4.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	54
2.4.4. Обследование партнера	55
2.4.5. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов....	57
2.4.6. Эмбриологический этап	57
2.4.7. Этап криоконсервации и размораживания витрифицированного эмбриона.....	58
2.4.8. Алгоритм подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона.....	59

2.4.9. Аспирация секрета эндометрия	60
2.4.10. Перенос эмбриона в полость матки и диагностика беременности	60
2.5. Специальные методы исследования.....	61
2.5.1. Идентификация мнкРНК методом глубокого секвенирования из образцов секрета эндометрия.....	61
2.5.2. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени уровня экспрессии мнкРНК	61
2.6. Статистическая обработка полученных данных.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	63
3.1. Клинико-anamнестическая характеристика групп пациентов, включенных в исследование.....	63
3.2. Характеристика гормонального статуса пациентов	71
3.3. Характеристика анализируемых групп при проведении овариальной стимуляции	73
3.3.1. Характеристика протоколов овариальной стимуляции в программе ВРТ	73
3.3.2. Характеристика спермиологического исследования.....	74
3.3.3. Характеристика эмбриологического этапа и частоты наступления беременности в программе переноса нативного эмбриона	74
3.4. Характеристика анализируемых групп при проведении переноса криоконсервированного эмбриона	76
3.4.1. Сравнительный анализ исходов программы переноса размороженного эмбриона в полость матки	76
3.5. Корреляционный анализ клинических, лабораторных и инструментальных данных в различных группах пациенток.....	77
3.6. Оценка рецептивности эндометрия по уровню мнкРНК в маточном аспирате у женщин на фоне циклической гормональной терапии в программе переноса размороженного эмбриона.....	80
3.7. Тестирование построенных математических моделей оценки экспрессии мнкРНК маточного аспирата пациенток при переносе размороженного эмбриона на фоне циклической гормональной терапии.....	87
3.8. Тестирование построенных математических моделей оценки экспрессии мнкРНК маточного аспирата пациенток при переносе размороженного эмбриона в естественном цикле	88
3.9. Разработка тест-системы по оценке мнкРНК в секрете эндометрия при переносе размороженного эмбриона.....	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	93

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
Приложение №1 АЛГОРИТМ ВЕДЕНИЯ СУПРУЖЕСКИХ ПАР ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭМБРИОНА В КРИОЦИКЛАХ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О ПРОФИЛЕ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В СЕКРЕТЕ ЭНДОМЕТРИЯ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время одной из главных и нерешенных задач остается проблема бесплодия, как женского, так и мужского. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) диагноз бесплодия ставится при отсутствии наступления беременности в течение 12 месяцев у женщин в возрасте до 35 лет и в течение 6 месяцев после 35 лет при регулярной половой жизни без контрацепции [5]. В субъектах и регионах Российской Федерации (РФ) частота встречаемости диагноза «бесплодие» колеблется от 17,2 до 24,0% [18]. Именно поэтому применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в клинической практике для лечения бесплодия возрастает с каждым годом. Однако несмотря на совершенствования методов диагностики и лечебных подходов к данной проблеме, эффективность программ ВРТ составляет 30–40% клинических беременностей в расчете на перенос эмбриона [13, 22].

Нарушение имплантации эмбриона в эндометрий снижает показатели программ ВРТ и является важным аспектом для дальнейшего изучения данного вопроса. Для того, чтобы достичь успеха в наступлении беременности, необходим комплекс взаимосвязанных факторов: качественные мужские и женские гаметы, определяющие весь структурно-функциональный потенциал супружеской пары, качественный эмбрион как генетически, так и морфологически, а также эндометрий, обладающий высоким имплантационным потенциалом и способный к восприимчивости эмбриона [29]. Согласно показателям, одна треть безуспешных протоколов ВРТ связана с качеством эмбрионов, при этом две трети — зависят от состояния эндометрия в целом, что указывает на важность изучения морфофункциональных характеристик клеток эндометрия и поиск новых маркеров имплантации [63].

Решающую роль в имплантации играет рецептивность эндометрия и способность его к восприятию бластоцисты [35]. Установлено, что под

действием прогестерона в лютеиновую фазу менструального цикла эндометрий трансформируется в ткань, способную к имплантации и обеспечению жизнедеятельности эмбриона [30]. Известно, что наиболее благоприятные условия для имплантации плодного яйца и максимальной рецептивности эндометрия соответствуют 6–10-му дню после овуляции [12] или 20–22-му дню при длительности менструального цикла 28 дней, что называют «окном имплантации» [2].

Тем не менее в определенных случаях наблюдается смещение имплантационного окна вследствие индивидуальных особенностей организма, а также при применении гормональной стимуляции в программах ВРТ [113]. В случае развития патологических состояний эндометрия, обусловленных эндогенными и экзогенными факторами, может наблюдаться дисрегуляция секреторной трансформации эндометрия, что в свою очередь приведет к снижению активности продуцирующих секрет клеток эндометрия. Данная проблема может существенно оказывать влияние на нарушение взаимоотношений между материнским организмом и эмбрионом во время доимплантационного периода и приводить к снижению рецептивности [111]. Таким образом, нарушение рецепторных свойств эндометрия является одним из главных факторов в неудачах программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

При изучении качества и свойств эмбрионов было заявлено о достижении определенных успехов, в частности, о повышении эффективности циклов ЭКО, в том числе благодаря проведению преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) методом NGS (Next Generation Sequencing – высокопроизводительное секвенирование нового поколения), методом array CGH (Array Comparative Genomic Hybridization – микроматричная сравнительная геномная гибридизация), методом QF-PCR (Quantitative Fluorescence PCR – количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция (КФ-ПЦР)) [6, 34]. Однако на протяжении многих лет поиск эффективных маркеров рецептивности, которые оказывали бы влияние как на

иммунобиологические, так и на морфологические свойства эндометрия, продолжаются.

На данный момент наиболее применяемыми методами для оценки рецепторного статуса эндометрия являются: гистологический анализ, иммуногистохимическое исследование, электронная микроскопия, молекулярно-генетический анализ [48]. При этом указанные методы могут быть зависимы от определенных сопутствующих фактов, а молекулярные механизмы имплантации по-прежнему не ясны. Поэтому исследование и поиск новых маркеров рецептивности эндометрия является актуальным и дает стимул для дальнейшего изучения данной проблемы.

Роль омиксных высокопроизводительных технологий в имплантации эмбрионов активно изучается [15], в особенности, влияние малых некодирующих РНК (мнкРНК), а именно, представляющие наибольший интерес в транскриптомике, микроРНК (miRNAs) и пивиРНК (piwiRNAs) [53]. Преимущества мнкРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров были продемонстрированы при изучении культуральной среды эмбрионов [28, 161], а также при оценке фертильности супружеской пары на основании изучения фолликулярной жидкости и анализа эякулята [58]. Полученные данные демонстрируют сложную взаимосвязь между мнкРНК, регулирующими экспрессию многих генов в становлении гаметогенеза, получении качественного материала, имплантации эмбрионов. В ходе систематизации результатов выявлена необходимость в изучении регуляции мнкРНК в процессе рецептивности эндометрия. Оценка уровня экспрессии мнкРНК в эндометрии может быть использована в том числе в качестве неинвазивного метода и стать дополнительным маркером рецептивности эндометрия.

Таким образом, учитывая вышесказанное, представляется перспективным, современным и своевременным изучение молекулярно-биологических свойств эндометрия на основании экспрессии мнкРНК. Поиск оптимального маркера рецептивности эндометрия с помощью неинвазивных

методов позволит оптимизировать индивидуальный подход и тактику лечения бесплодия при ВРТ, чему посвящена данная диссертационная работа.

Цель исследования

Оптимизация и прогнозирование результативности лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий при переносе эмбриона в полость матки в криоциклах на основании изучения особенностей экспрессии мнкРНК секрета эндометрия.

Задачи исследования

1. Проанализировать данные анамнеза, клинические и эмбриологические параметры предшествующих циклов ВРТ у супружеских пар, вступающих в протокол переноса криоэмбриона в полость матки.
2. Оценить клиническую эффективность переноса эмбриона в криоциклах с различными протоколами подготовки эндометрия: циклическая гормональная терапия и естественный менструальный цикл.
3. Изучить особенности экспрессии мнкРНК в секрете эндометрия у пациенток на фоне циклической гормональной терапии и в естественном цикле в циклах переноса криоэмбриона в полость матки.
4. Выявить связь между исходами программ ВРТ при переносе эмбриона в криоциклах и особенностями экспрессии мнкРНК секрета эндометрия.
5. Разработать математическую модель для прогнозирования исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ на основании экспрессии мнкРНК секрета эндометрия.
6. Разработать персонифицированный алгоритм ведения супружеских пар при переносе эмбриона в криоциклах на основании полученных данных о профиле экспрессии мнкРНК в секрете эндометрия.

Научная новизна

В проведенном диссертационном исследовании представлены и научно обоснованы новые данные о неинвазивном методе аспирации секрета эндометрия для диагностики имплантационного потенциала эндометрия на основании анализа профиля экспрессии двух классов мнкРНК: микроРНК и пивиРНК. При сочетании методов глубокого секвенирования и количественной ПЦР в реальном времени был идентифицирован ряд внеклеточных мнкРНК в секрете эндометрия в день переноса криоэмбриона, являющихся маркерами рецептивного эндометрия.

При научном анализе данных экспрессии мнкРНК выявлено, что у пациенток в криоциклах на фоне циклической гормональной терапии прогностически значимой в диагностике рецептивности является экспрессия miR-1180-3p в секрете эндометрия, а при подготовке пациенток на фоне естественного менструального цикла — экспрессия piR_020541 и miR-1180-3p.

Впервые разработана математическая модель прогнозирования имплантации эмбрионов у пациенток при подготовке эндометрия на фоне циклической гормональной терапии и в естественном менструальном цикле при переносе размороженного эмбриона.

Практическая значимость

На основании полученных данных разработан персонафицированный алгоритм проведения у пациенток криоциклов с использованием прогностической модели логистической регрессии, построенной на основании профиля экспрессии ассоциированных с рецептивным эндометрием мнкРНК, что позволяет определить наиболее подходящие условия для переноса эмбриона и индивидуализировать лечение бесплодия методами ВРТ.

Разработан прототип тест-системы оценки рецептивности эндометрия по содержанию мнкРНК в секрете эндометрия в день переноса размороженного эмбриона. Тестирование модели показало высокую

прогностическую значимость ($p < 0,05$ для всех входящих в модель коэффициентов).

Положения, выносимые на защиту

1. Возраст пациенток в программах ВРТ значимо коррелирует с уровнем АМГ ($p=0,0077$, $r=-0,36$), ФСГ ($p=0,002$, $r=0,47$), прогестерона в лютеиновой фазе цикла ($p=0,03$, $r=-0,29$), количеством зрелых ооцитов ($p=0,002$, $r=-0,4$), зигот ($p=0,008$, $r=-0,36$) и криоконсервированных бластоцист ($p=0,0001$, $r=-0,44$). Представленный клинический портрет обследуемых супружеских пар соответствует общему контингенту пациентов в криоциклах.

2. При переносе эмбриона в криоциклах на фоне циклической гормональной терапии рецептивный эндометрий достоверно отличается от нерецептивного экспрессией мнкРНК в секрете эндометрия. Анализ экспрессии miR-1180-3p с одновременной оценкой толщины эндометрия в день переноса эмбриона позволяет прогнозировать наступление беременности с вероятностью 0,84 (чувствительность модели 0,71; специфичность модели 0,88), что при отсутствии вмешивающихся факторов позволит улучшить результаты лечения.

3. В естественном менструальном цикле при переносе криоэмбриона у пациенток с наступившей беременностью выявлены статистически значимые отличия по экспрессии мнкРНК piR_020541 и miR-1180-3p ($p < 0,01$) в секрете эндометрия, что позволяет построить математическую модель прогнозирования положительных исходов с вероятностью 0,93.

Личный вклад автора

Автор участвовал в определении темы диссертационной работы, в постановке целей и задач, в разработке дизайна настоящего исследования, а также в систематизации литературных данных по теме работы. Автор лично принимал участие в сборе клиничко-анамнестических и лабораторных данных, ведении и сопровождении пациентов на всех этапах лечения бесплодия методами ВРТ. Проводил забор секрета эндометрия для последующей

обработки материала и интерпретации молекулярно-биологических данных анализа профиля экспрессии мнкРНК методом высокопроизводительного секвенирования (NGS), в том числе с применением статистической обработки данных. Диссертант систематизировал полученные результаты и подготовил практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты исследования представлены на XXIII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2022) в докладе «Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах ВРТ»; на XXIX Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 2023) в докладе «Новые методы диагностики рецептивности эндометрия»; в конкурсе молодых ученых XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2023) в докладе «Особенности экспрессии мнкРНК в маточном аспирате при изучении рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий» (занял I место); в конкурсе молодых ученых в рамках III Научно-практической конференции с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного» (Санкт-Петербург, 2023) в докладе «Роль малых некодирующих РНК в диагностике рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий» (занял I место). Работа представлена на межклинической конференции сотрудников отделений Института репродуктивной медицины (22.06.2023) и на заседании апробационной

комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №8 от 26.06.2023).

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования заключалась в комплексном обследовании мужчин и женщин с бесплодием. Перед планированием работы и ее выполнением был проведен системный анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной забору и оценке маточного аспирата. Проведен критический анализ целесообразности выполнения диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи.

В рамках проведенной работы было выполнено обследование 102 супружеских пар, обратившихся в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий отделением, д.м.н., профессор Е.А. Калинина) на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, д.м.н., профессор Г.Т. Сухих). Все пациенты перед началом программы прошли полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021), а также в соответствии с Приказом Минздрава России от 31.07.2020 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», супружеские пары подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Изучение особенностей экспрессии мнкРНК в аспириате секрета эндометрия проводилось в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева). Анализ мнкРНК в секрете эндометрия осуществлялся методом глубокого секвенирования колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Половина элюата колонки miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), содержащего мнкРНК секрета

эндометрия, была использована для синтеза кДНК-библиотек набором NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11 and Set2, New England Biolab®). Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени была проведена с использованием набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) и смысловых праймеров, специфичных для определенных микроРНК и пивиРНК. Относительную экспрессию мнкРНК в секрете эндометрия определяли методом ΔCt , используя hsa_piR_017716 в качестве референсной РНК.

На последнем этапе оценивали исход программ ВРТ в зависимости от различных параметров: клинико-anamнестических, лабораторных, инструментальных, а также молекулярно-биологических данных, полученных в настоящем исследовании. Построена математическая модель прогнозирования исхода переноса размороженного эмбриона в полость матки в криоциклах. Точность модели оценена на случайной тестовой выборке.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий отделением д.м.н., профессор Е.А. Калинина), в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, д.м.н., профессор Г.Т. Сухих).

По теме диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 6 статей входят в перечень рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК, 6 тезисов представлены в сборниках международных и российских конгрессов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертационная работа представлена 19 таблицами, 9 рисунками, 1 приложением. Список литературы содержит 180 литературных источников, из них 38 отечественных и 142 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. РОЛЬ ЭНДОМЕТРИЯ В ПРОЦЕССЕ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНА В ПРОГРАММАХ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ (обзор литературы)

1.1. Рецептивность эндометрия и его имплантационная способность

Бесплодие у супружеской пары остается одной из важных медицинских и социальных проблем. В Российской Федерации частота встречаемости женского бесплодия — 50%, на долю мужского фактора приходится 20–30%, сочетанная форма женского и мужского бесплодия составляет 20% случаев [16]. Несмотря на активные поиски методов, повышающих эффективность программ ВРТ, доля безуспешных циклов по-прежнему остается существенной. Основные показатели, которые оказывают влияние на низкую эффективность и исход циклов ВРТ, включают в себя как репродуктивный возраст пациенток, вступивших в программу, их соматический и гинекологический анамнез, фактор бесплодия, наличие предыдущих попыток ВРТ, так и трудности в изучении состояния и свойств эндометрия [31]. Установлено, что успешная программа ВРТ возможна при наличии трех определяющих факторов: качества гамет, определяемого состоянием репродуктивной системы обоих партнеров, качества эмбриона, функциональной зрелости (рецептивности) эндометрия [44].

Эндометрий — внутренняя слизистая оболочка, выстилающая полость матки, которая состоит из нескольких основных типов клеток: эпителиальных, выстилающих железы и поверхность эндометрия, стромальных, сосудистых и иммунных. Циклические изменения в эндометрии касаются его функционального поверхностного слоя и включают в себя три последовательные стадии: фаза пролиферации, фаза секреции и фаза десквамации (менструация) [65]. Как известно, в течение всего менструального цикла эндометрий подвергается морфологическим и функциональным изменениям благодаря воздействию гормонов: эстрогена и прогестерона. Половые стероидные гормоны связываются со специфическими

рецепторами на поверхности функционального слоя эндометрия и способствуют изменению их свойств [136]. Эстрогены (ER) оказывают влияние на женскую репродуктивную функцию с помощью рецепторов эстрогена α (ER α) и β (ER β), и, возможно, через рецептор эстрогена, связанный с G-белком (GPER; ранее GPR30) [76]. Существуют различия между экспрессией ER- α и ER- β в тканях и клетках. ER α преимущественно экспрессирует в матке, яичниках и молочных железах, в то время как экспрессия ER β в основном обнаруживается в яичниках, нервной и сердечно-сосудистой системе [75].

В свою очередь прогестерон (PR) имеет как минимум две изоформы рецепторов — А и В. Рецепторы прогестерона А и В идентичны по структуре, за исключением того, что изоформа рецептора PR-В содержит N-концевую последовательность из 164 аминокислот, которая отсутствует в изоформе А рецептора PR. Наличие или отсутствие N-концевого удлинения, по-видимому, ответственно за отчетливые различия в действиях рецепторов PR-А и PR-В [180]. Было выявлено, что PR-А и PR-В присутствуют в клетках эндометрия во время пролиферативной фазы и увеличиваются в соответствии с уровнем эстрогена. В конце фазы секреции уровень PR-А снижается, тогда как уровень PR-В остается постоянным в эпителиальных клетках, что позволяет предположить, что он непосредственно участвует в секреторной активности эндометрия [155].

В течение менструального цикла синхронизация между уровнем прогестерона и эстрогена играет важную роль в регуляции эндометрия. В пролиферативной фазе цикла под действием повышенного уровня эстрогенов происходит утолщение и пролиферация эндометрия, желез и сосудов. Пролиферация клеток затем ингибируется прогестероном во время постовуляторной лютеиновой фазы. Повышение уровня прогестерона происходит с началом секреторной фазы цикла и характеризуется децидуаподобными превращениями посредством которой стромальные клетки дифференцируются в крупные округлые клетки с усиленной

секреторной функцией, способствующие имплантации бластоцисты и наступлению беременности [64, 122, 1, 3].

Одной из основных причин нарушения механизмов имплантации эмбриона является смещение «имплантационного окна» во времени, когда эндометрий максимально восприимчив (рецептивен) и готов к имплантации. В литературе описаны два наиболее применяемых понятия в описании свойств эндометрия: селективность и восприимчивость (рецептивность) [4]. Селективность характеризуется генетически детерминированной внутренней программой эндометрия по определению и отторжению эмбрионов не способных к имплантации. Напротив, восприимчивость (рецептивность) эндометрия включает в себя совокупность структурно-функциональных характеристик слизистой оболочки тела матки, которая создает благоприятные и оптимальные условия для имплантации бластоцисты.

Успешная имплантация эмбриона требует функциональной связи между бластоцистой и рецептивным эндометрием в течение короткого периода времени, известного как «имплантационное окно». Множественные неудачные попытки в имплантации напрямую связаны с отсутствием коммуникации между эмбрионом и эндометрием. Как правило, окно имплантации у женщин определяется на 6–10 день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) в секреторную фазу менструального цикла [8].

Процесс имплантации эмбрионов состоит из трех основных этапов. Первый этап — аппозиция, при которой происходит поиск бластоцистой своего положения относительно эндометрия, в результате которого происходит «диалог» между эмбрионом и эндометрием. Следующим этапом является адгезия (прикрепление), формирование контакта флотирующей бластоцисты с рецептивным эндометрием. Инициация адгезивного процесса происходит при локальном воздействии факторов роста и стероидных гормонов в клетках эндометрия. Третий этап имплантации — инвазия. Этот процесс заключается в проникновении эмбриона в строму через просветный

эпителий, что приводит к тотальной взаимосвязи с материнским организмом. Во время данной фазы в эндометрии происходят многочисленные изменения, происходящие под влиянием гормонов [106].

В настоящее время для повышения эффективности программ ВРТ применяются различные методы изучения качества и свойств эмбрионов. Известно, что с повышением репродуктивного возраста пациенток количество аномальных (анеуплоидных) эмбрионов повышается. В связи с этим широкую распространенность получило применение ПГТ эмбрионов для исключения хромосомных аномалий, что в свою очередь повысило эффективность программ до 60–70% [6, 27, 151]. Результаты исследований, описанных в литературе, показывают важность использования генетического тестирования у определенных групп пациенток. Однако в циклах переноса размороженных эмбрионов, после проведения процедуры ПГТ, частота имплантации остается на уровне 40% [12]. Поэтому исследование и изучение диагностических методов рецептивности эндометрия остается одной из важных составляющих в повышении эффективности программ ВРТ и может стать ключевым фактором в увеличении частоты наступления беременности у пациенток различных групп.

1.2. Подготовка эндометрия к переносу размороженного эмбриона

На протяжении многих лет вопрос имплантации эмбриона в эндометрий остается актуальным среди ученых. Успешная имплантация в программах ВРТ зависит от многих факторов, в том числе от возраста женщин, вступивших в программу ЭКО, сопутствующего соматического и гинекологического анамнеза, от качества полученного эмбриона и метода переноса (в свежем цикле или при переносе размороженного эмбриона) в рецептивный эндометрий в «окно имплантации» [14]. Проведение переноса размороженных эмбрионов увеличилось за последние десятилетия благодаря совершенствованию технологий и повышению частоты наступления беременности (ЧНБ) и живорождения [84]. По данным регистра Российской

Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) на 2017 год проведено 139 779 циклов ЭКО и ЭКО + интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) и 35 628 криопереносов. Общая эффективность на цикл составила: ЭКО-33,9%, ИКСИ-31,2%, криопереносы -39,9% [20]. Более того применение метода витрификации эмбрионов с последующим переносом в криоциклах способствует сохранению фертильности с уменьшением гормонального воздействия, по сравнению со стимулированными циклами, на рецептивность эндометрия [26, 33, 81, 83]. Дополнительные потенциальные преимущества при осуществлении криопереноса заключаются в снижении риска развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) в программах ЭКО [82]. СГЯ напрямую связан со стимуляцией функции яичников и может привести к развитию неотложных состояний [24]. Также благодаря воздействию не только эндогенного, но и экзогенного прогестерона отмечается положительное влияние на секреторную трансформацию эндометрия [157].

Несмотря на преимущества криоциклов остается значительный уровень неопределенности в тактике ведения пациентов. К основным методам подготовки эндометрия в криоциклах относят: естественный цикл (ЕЦ) и циклическую гормональную терапию (ЦГТ) [38]. При наличии овуляторных циклов оптимальным является перенос эмбрионов (ПЭ) в середине лютеиновой фазы цикла без экзогенного воздействия гормонов в ЕЦ, в то же время в других исследованиях описаны преимущества ведения пациентов на фоне ЦГТ с определенной подготовкой эндометрия к переносу.

Так, в исследовании Wang A. et al. [94] проводился ретроспективный анализ 389 циклов переноса размороженных эмбрионов на фоне ЦГТ и ЕЦ. Обнаружена высокая ЧНБ в группе ЕЦ по сравнению с группой ЦГТ (ОШ 2.05, ДИ 1.27-3.31, $p = 0.003$), при этом частота выкидышей статистически значимо не отличалась между двумя группами (ОШ для ЕЦ 0,69, 95% ДИ 0,37-1,32, $p = 0,27$), что может говорить о возможном отсутствии негативного влияния гормональных препаратов на способность эндометрия к имплантации.

При этом в работе Alur-Gupta S. et al. [105] при оценке показателей имплантации в группе ЦГТ и ЕЦ не было выявлено различий в сравнительных группах за исключением пациенток старше 40 лет. У данных пациенток в группе ЕЦ неэффективность цикла криопереноса составила 100% (n=6). Авторы пришли к выводу, что в данной возрастной группе пациенток, в связи с вариабельностью цикла, показана подготовка эндометрия на фоне ЦГТ.

В ходе ретроспективного анализа 2080 циклов криопереноса эмбрионов Mensing L. et al. [72] стратифицировали пациенток на группы: ЕЦ, модифицированный естественный цикл (мЕЦ) и ЦГТ. Возраст пациенток, включенных в исследование, составил ≤ 35 лет, а индекс массы тела (ИМТ) ≤ 30 . Перенос эмбрионов осуществлялся на стадии бластоцисты, которые были заморожены методом витрификации. В ЕЦ, мЕЦ и ЦГТ ЧНБ составила 34,9%, 40,6% и 32,0%, а частота родов – 32,3%, 36,3% и 26,6% соответственно. Однако при сравнении групп пациенток, у которых перенос криоконсервированных эмбрионов осуществлялся на фоне ЦГТ и ЕЦ достоверных различий в исходах программ выявлено не было (ОШ = 0,9 (0,6; 1,2), $p = 0,4$).

На сегодняшний день показано, что оба метода подготовки эндометрия к переносу размороженных эмбрионов в значительной степени эквивалентны по эффективности и безопасности и могут применяться в зависимости от индивидуальных особенностей пациенток [40, 52, 146].

1.3. Методы диагностики рецептивности эндометрия

Поиск оптимальных критериев диагностики рецептивности эндометрия остается одной из актуальных проблем. Для выявления определенных специфических факторов, оказывающих влияние на созревание эндометрия под действием стероидных гормонов, используются различные методы диагностики, выбор которых зависит от исследуемого показателя. Как известно, эндометрий состоит из функционального и базального слоя. Функциональный слой эндометрия играет непосредственную роль в процессе имплантации эмбрионов. Во время пролиферативной фазы цикла происходит

разрастание эпителиальных клеток, которые выстилают и покрывают поверхность эпителиальных желез, а также стромы, которая состоит из кровеносных сосудов, иммунных клеток и фибробластов [79]. Установлено, что в пролиферативную фазу цикла рецепторы ER- α и ER- β достигают пика своей экспрессии, при этом ER- α преимущественно в стромальных/эпителиальных клетках, а также в кровеносных сосудах. Экспрессия ER- β в большей степени обнаружена в эпителии. После овуляции, под действием прогестерона, железы претерпевают секреторную трансформацию, становясь более извилистыми. В это время, в секреторной фазе цикла, происходит подавление ER- α и ER- β прогестероном [158]. В средней секреторной фазе прогестерон достигает своего пика и действует как ключевой фактор множественных молекулярных и морфологических изменений для развития рецептивности эндометрия. Например, эпителиальные клетки эндометрия становятся высоко секреторными, в то время как строма подвергается терминальному процессу дифференцировки, известному как децидуализация. Децидуализированные клетки секретируют необходимый внеклеточный матрикс, необходимый для успешной беременности [80]. Данные изменения, происходящие в железах и сосудах эндометрия, являются основным предиктором «окна имплантации» — времени, когда эндометрий максимально восприимчив для синхронизации с бластоцистой [49].

В настоящее время для повышения частоты имплантации и, следовательно, шансов на рождение здорового ребенка применяются различные методы диагностики состояния эндометрия у женщин в период «окна имплантации» в программах ВРТ. Убедительными методами оценки рецептивности эндометрия являются: гистологический анализ, иммуногистохимическое исследование, электронная микроскопия, молекулярно-генетический анализ.

1.3.1. Гистологический метод исследования эндометрия

На протяжении многих лет основным диагностическим маркером состояния эндометрия являлся – гистологический метод, с помощью которого были изучены морфологические и функциональные особенности образцов ткани эндометрия [9]. Еще в 1949 году Noyes R. et al. [154] впервые описали морфологические изменения клеток эндометрия у женщин с бесплодием, что дало стимул для последующих открытий в этой области. Была выявлена недостаточная трансформация функционального слоя эндометрия и предложен термин «недостаточность лютеиновой фазы» (НЛФ). Данный термин был введен для определения состояний, характеризующихся низким уровнем эндогенного прогестерона, который обеспечивает секреторную активность эндометрия, что в свою очередь, приводит к нарушению процессов имплантации.

Как известно, нормальный уровень прогестерона является необходимым для наступления беременности. Поэтому низкая секреция прогестерона отражается в виде недостаточной трансформации эндометрия и указывает на НЛФ. Несмотря на колебания уровня эндогенного прогестерона в крови во время лютеиновой фазы, некоторые исследователи пришли к выводу, что повышенный средний уровень прогестерона, а также более высокие средние уровни эстрогена и прогестерона в середине лютеиновой фазы могут приводить к беременности [66]. С точки зрения патофизиологических механизмов главной причиной НЛФ является гипоталамо-гипофизарная дисфункция, которая, в первую очередь, связана с низкой концентрацией фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и эстрадиола в фолликулярную фазу цикла, низким соотношением ФСГ/ЛГ, а также к падению пульсационной активностью ЛГ. Описанные нарушения приводят к изменениям состояния эндометрия и как следствие к снижению уровню эстрогенов и прогестерона в лютеиновую фазу цикла, что является одной из причин, снижающих фертильность [120].

Таким образом, на протяжении долгого времени гистологический метод считался «золотым стандартом» в исследовании состояния эндометрия у женщин с НЛФ. Однако в последние годы многие авторы ставят под сомнение информативность исследования как метод диагностики рецептивной функции эндометрия. Так, Coutifaris C. et al. [153] провели крупное проспективное рандомизированное исследование 847 пациенток. Пациентки были разделены на две группы в зависимости от наличия диагноза бесплодие (n=287) и отсутствия (n=332) (фертильные женщины репродуктивного возраста). Биопсия эндометрия для последующего гистологического исследования проводилась в среднюю секреторную (21–22) и позднюю секреторную фазы цикла (26–27). Было выявлено, что частота НЛФ в среднюю лютеиновую фазу встречается значительно чаще в группе женщин с отсутствием в анамнезе диагноза бесплодие (49,4%) по сравнению с группой женщин с верифицированным бесплодием (43,2%), а также в позднюю лютеиновую фазу (группа фертильных пациенток: 35,3%, группа с диагнозом бесплодие 23,0%). Авторы пришли к выводу об отсутствии различий в образцах эндометрия у фертильных и бесплодных женщин, что дает основание пересмотреть подход к использованию в рутинной практике диагностики бесплодия гистологического метода. Точность гистологического метода была поставлена под сомнение и в исследовании Murray M. et al. [12]. Биопсия эндометрия проводилась 130 пациенткам, участвующим в исследовании. Каждый образец ткани эндометрия оценивали по 32 различным гистологическим признакам и установленным критериям. Данные свидетельствовали о наличии существенной вариабельности гистологических характеристик секреторной фазы эндометрия, что является абсолютно нормальным явлением. Результаты исследования показывают, что дисфункция лютеиновой фазы и секреторной активности эндометрия может отрицательно влиять на исходы программ ВРТ, но биопсия эндометрия с последующей гистологией не может быть единственным диагностическим инструментом в преодолении данной проблемы. В связи с этим, было установлено, что гистологический метод не

является достоверным и специфичным способом оценки рецептивности эндометрия и возможного смещения «имплантационного окна».

1.3.2. Иммуногистохимический метод исследования эндометрия

Для определения рецепторного статуса эндометрия также применяется иммуногистохимический метод исследования (ИГХ). Важную роль в процессе пролиферации эндометрия и инвазии бластоцисты играют такие факторы как эстрогеновые и прогестероновые рецепторы, интегрины, лейкемия ингибирующий фактор (LIF), интерлейкин (IL) -1 β , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), тканевой фактор роста (TGF), фактор роста фибробластов (FGF1) и т.д [11].

Одним из важных факторов в изучении рецепторного статуса эндометрия является лейкемия ингибирующий фактор (LIF), который принадлежит семейству интерлейкина-6 (IL-6). Экспрессия LIF в эутопическом эндометрии происходит в течение всего менструального цикла, но в секреторной фазе уровень LIF значительно повышен. Благодаря активации LIF сигнального пути STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), происходит повышение рецепторных свойств эндометрия за счет влияния на его морфофункциональное состояние [116]. В процессе имплантации на поверхности бластоцисты также имеются специфические LIF-рецепторы: LIF-R и gp130, которые активирует механизм взаимодействия его с эндометрием [19].

В работе Yoo I. et al. [114] показано, что экспрессия LIF начинает повышаться на ранних сроках беременности с 12 дня и достигать максимального пика на 90 день, в то время как экспрессия рецепторов LIF-R достигает своего максимального имплантационного потенциала на 15 день после оплодотворения, а затем снижается. Аналогичные результаты представлены в работе Cambra J. et al. [42]. Было представлено, что подавление экспрессии LIF и LIF-R может привести к иммунному отторжению в период имплантации, что препятствует развитию нормальной беременности.

Стоит отметить еще один значимый фактор – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который участвует в регуляции ангиогенеза и экспрессирует в эндометрии. Было выявлено, что VEGF за счет уменьшения роста кровеносных сосудов, приводит к снижению маточного кровотока и может быть причиной развития «тонкого» эндометрия. Также в работе Cui J. et al. [132] показана активация сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK посредством miR-184, который увеличивает экспрессию VEGF, благоприятно влияет на имплантацию и может выступать в качестве биомаркера рецептивности.

Для изучения роли иммунных клеток в рецептивности эндометрия некоторые исследователи пытались воздействовать на состояние локальных иммунных показателей путем введения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) [68, 107, 108]. Известно, что МКПК у женщин с наступившей беременностью активно продуцируют высокие уровни цитокинов Th2 (IL-4, IL-10) и поддерживают баланс цитокинов Th1/Th2, которые являются важными маркерами на этапе инвазии и имплантации эмбриона [68]. Также возможна роль МКПК в рецептивности эндометрия за счет ремоделирования сосудов и повышения уровней VEGF и LIF [107].

В проведенном ранее метаанализе Maleki-Hajiagha A. et al. [108] представлены данные с участием 886 женщин из 8 исследований. Пациенткам, которым внутриматочно вводили МКПК клиническая беременность регистрировалась значительно чаще, чем в контрольной группе без проведения процедуры МКПК (ОШ 1,92; 95% ДИ: 1,48–2,49; $P < 0,001$). Также частота живорождения была выше в группе пациенток, получавших МКПК (ОШ 1,93, 95% ДИ: 1,35–2,76; $P < 0,001$). Не было выявлено различий между переносом в свежем цикле (ОШ 2,14, 95% ДИ: 1,38–3,32; $P < 0,001$) и при криопереносе эмбрионов (ОШ 1,79, 95% ДИ: 1,32–2,43; $P < 0,001$). Стоит отметить, что также не было выявлено различий при переносе эмбрионов на стадии бластоцисты (ОШ 2,44, 95% ДИ: 1,42–4,20; $P = 0,001$) или на стадии дробления (ОШ 2,01, 95% ДИ: 1,36–2,96; $P < 0,001$). В ходе проведенного метаанализа был сформирован вывод, что МКПК независимо от стадии

развития эмбрионов, а также от программы переноса эмбрионов увеличивает показатели наступления беременности и живорождения. Однако к этому выводу стоит отнестись с осторожностью из-за небольшого количества и качества, включенных в исследование, пациенток.

Данный метод активно применяется у пациенток с повторными неудачами в имплантации (RIF). Аналогичные результаты представлены в работе Wu Y. et al. [45] где показано, что внутриматочное введение МКПК увеличило частоту имплантации (ОШ 2,46 95% ДИ: 1,48-4,09), но при этом в трех исследованиях статистически значимых различий в исходах беременности не наблюдалось. Pourmoghadam Z. et al. [69] в своем исследовании пришли к выводу, что частота имплантации, наступления беременности и живорождения статистически увеличивалась, а частота выкидышей значительно снижалась в группе, получавшей МКПК, по сравнению с группой, не получавшей лечения. В тоже время механизм повышающий вероятность наступления имплантации после введения МКПК до сих пор остается неясным, а результативность в целом не превышает средние значения.

В 2023 году в обзоре Genest G. et al. [103] было сформировано мнение о том, что иммунная терапия назначается чаще всего эмпирическим путем без надлежащих доказательств о ее эффективности. Кроме того, выбор пациенток для проведения данной терапии имеет решающее значение в плане долгосрочных результатов. Так как исследования и выводы основаны на результатах у пациенток с RIF.

К сожалению, на сегодняшний день также отсутствуют данные о наличии диагностических тестов для подтверждения иммуноопосредованного влияния на рецептивность эндометрия в программах ВРТ. Также требуется персонафицированный подход к его использованию в зависимости от протоколов ВРТ.

1.3.3. Электронная микроскопия эндометрия

Электронная микроскопия позволяет исследовать особенности морфологических структур и клеток поверхностного эпителия — пиноподий. Пиноподии характеризуются выпячиванием апикальной поверхности эндометрия толщиной 5–10 мкм и являются прогестерон-зависимыми структурами. Именно благодаря электронной микроскопии пиноподии можно визуализировать на 19–22-й день менструального цикла, что может говорить об их потенциальной роли маркера рецептивности эндометрия [17]. Первоначально предполагалось, что пиноподии образуются в местах прикрепления бластоцисты и строго регулируются присутствием стероидных гормонов яичников [145]. Во время имплантации бластоциста взаимодействует с пиноподиями, а за счет куполообразной формы эпителиальных клеток увеличивается поверхность их взаимодействия. Выявлено, что количество зрелых пиноподий коррелирует с успешной имплантацией эмбрионов [73].

В недавних исследованиях Rarani F. et al. [152] была выявлена корреляционная зависимость образования пиноподий и уровнем половых стероидных гормонов – прогестероном и эстрогеном. Показано, что эстрогены подавляют развитие пиноподий, в то время как прогестерон стимулирует их развитие в секреторную фазу цикла. Поэтому для оценки возможного влияния пиноподий на рецептивность эндометрия, было проведено динамическое наблюдение в лютеиновую и секреторную фазу менструального цикла. Выявлено, что трансформация пиноподий в лютеиновую фазу цикла, происходит на 20–22-й день менструального цикла или на 1–2 дня ранее в стимулированном цикле, захватывая окно имплантации. ЧНБ была выше у пациенток с развитыми пиноподиями и нормальным уровнем прогестерона, что говорит о взаимосвязи гормональной регуляции и пиноподий.

Корреляция гормональной регуляции и развитие пиноподий остается интересной темой для изучения, так, например, в нескольких исследованиях было показано, что повышенный уровень тестостерона негативно влияет на

рост пиноподий, тогда как адреномедуллин и антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) имеют положительное влияние на пиноподии [41, 164].

На основании анализа данных электронной микроскопии в течение всего менструального цикла было обнаружено, что пиноподии классифицируются как развивающиеся, зрелые и регрессирующие. Однако стоит отметить, что определенный день цикла не гарантирует схожесть всех пиноподий по морфологии [54].

Как правило, в течение первых 17–19 дней менструального цикла пиноподии начинают увеличиваться в размерах с образованием небольших (1–2 мкм) куполообразных выпячиваний. К 20-му дню менструального цикла полностью зрелые пиноподии, описанные в различной литературе как сферические, гладкие структуры без микроворсинок, покрывают эндометрий и достигают максимума. К концу секреторной фазы, на 23–25-й день нормального менструального цикла, объем пиноподий начинает регрессировать и приобретать сморщенный вид. Поэтому в последние годы многие исследователи отмечают расхождение относительно морфологии пиноподий в определенные дни цикла у разных женщин, что может свидетельствовать о неточностях представления пиноподий в качестве маркеров рецептивности эндометрия и имплантации, что требует дальнейших исследований и разработки более специфичных тест-систем.

1.3.4. Молекулярно-генетический метод исследования эндометрия

Исследование морфологических и структурных изменений в эндометрии на основании гистологического анализа, экспрессия маркеров рецептивности и влияние локальных иммунных факторов, образование пиноподий — все перечисленные процессы регулируются под влиянием стероидных гормонов на транскрипционном уровне.

Результатом экспрессии генов на транскрипционном уровне является образование молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК). Для понимания процессов, происходящих в период «окна имплантации», изучение единичных

молекул РНК не дает информацию обо всех спектрах процесса и не может рассматриваться как отдельный маркер рецептивности.

В связи с этим был разработан тест ERA (Endometrial Receptivity Analysis) по оценке уровня экспрессии 238 генов. Данный тест позволяет провести молекулярный анализ генов, который способен отличить рецептивный эндометрий от пре- и пострецептивного эндометрия [173]. На сегодняшний день тест ERA является эффективным и широко применяется в клинической практике. Обычно тест ERA выполняется на фоне ЦГТ с помощью инвазивной процедуры забора материала – пайпель-биопсии. В ЦГТ тест выполняется на пятый день после введения прогестерона (PR+5), в ЕЦ на 7-й день после пика ЛГ (ЛГ+7). Полученные данные показывают состояние эндометрия в день проведения биопсии и дают возможность в следующем цикле ПЭ принять решение о персонифицированном и индивидуальном времени переноса эмбрионов – pET (personalized embryo transfer) [61].

В работе Hashimoto T. et al. [70] были отобраны 50 женщин с неудачными попытками переноса эмбрионов (RIF) в анамнезе. Всем пациенткам проведена пайпель биопсия для теста ERA в ходе которого было проанализировано состояние эндометрия, был выбран оптимальный протокол подготовки эндометрия и разработан pET. При проведении теста ERA было выявлено повышение ЧНБ у женщин при pET с неправильно установленным окном имплантации в предыдущих попытках ЭКО (50% против 35%, соответственно). Для пациенток с неясным генезом RIF в анамнезе, поиск «окна имплантации» с использованием теста ERA и выбором pET, улучшает показатели ЧНБ.

Patel J. et al. [144] в своем ретроспективном исследовании изучал эффективность теста ERA и pET у 248 пациенток с RIF в анамнезе. Клинические исходы сравнивали между пациентами с рецептивным (R) и не рецептивным (NR) эндометрием. С помощью ERA эндометрий был R у 82,3% (204/248) пациенток и NR у 17,7% (44/248). Среднее количество неудачных циклов ЭКО в анамнезе составило $3,67 \pm 1,67$ среди пациенток R-ERA и 4,09

$\pm 1,68$ среди пациентов с NR-ERA. ЧНБ была сопоставима между пациентами с R-ERA, которым был проведен рутинный ПЭ, и пациентами с NR-ERA, где перенос осуществлялся в рамках рЕТ. Авторы пришли к выводу, что с помощью ERA можно определить «окно имплантации» и улучшить исходы наступления беременности в циклах ВРТ с помощью рЕТ.

В последнем обзоре Ben Rafael Z. et al. [46] указывает на существенные недостатки в использовании данного теста. Процесс имплантации включает в себя сложную последовательность взаимодействий между эмбрионом и эндометрием, а использование биопсии эндометрия в цикле, предшествующем переносу эмбриона, может описывать локальное состояние эндометрия в определенный период времени. При этом любые гормональные манипуляции в циклах переноса эмбрионов могут по-разному влиять на экспрессию генов, что может привести к высокой степени изменчивости при повторном тестировании одних и тех же пациентов.

Также неясным остается количество генов, которые экспрессируются на поверхности эндометрия, так в работе Macklon N. et al. [121] было обнаружено 330 генов, а Huang J. et al. [39] обнаружили 616 генов. Полученные данные о вариабельности экспрессии генных профилей у пациентов, может быть связано с определенным гормональным статусом и методом оценки данных генов, поэтому целесообразным является разработка статистического анализа полученных данных и коррекция количества генов с помощью, которых можно оценить имплантационный потенциал.

Еще одним недостатком является инвазивный способ забора биологического материала – пайпель-биопсия эндометрия. В зависимости от техники забора материала, его различий по количеству полученных данных и глубине полученного материала, могут возникнуть различные трудности при идентификации генов [74].

Также время взятия материала относительно имплантационного окна остается под вопросом. Например, в недавнем обзоре было установлено, что оптимальным днем переноса эмбрионов является ЛГ +6 или ХГЧ + 7 [83], тест

ERA учитывает ЛГ + 7 и ХГЧ +7 или ХГЧ +7 как равные и оптимальные. Другие также отвергли идею о том, что ЛГ+ 7 равен P + 5, и заявили, что определить дату биопсии непросто и что она не соответствует естественному и медикаментозному циклам [112]. Кроме того, следует отметить, что любые гормональные манипуляции с эндометрием перед переносом эмбрионов или любая стимуляция яичников или запуск овуляции могут по-разному влиять на профиль генов [46].

В связи с вышесказанным необходима разработка и внедрение в практику стандартизированных подходов, а также альтернативные менее инвазивные методы диагностики эндометрия.

1.3.5. Аспирация секрета эндометрия

На сегодняшний день продолжается поиск новых диагностических и прогностических маркеров рецептивности эндометрия, основанных в том числе на минимально инвазивном вмешательстве в полость матки. Несмотря на многочисленные исследования в данном направлении, однозначно идеального фактора для оценки фертильности на данный момент не верифицировано. Поэтому важным и перспективным остается поиск новых методов оценки состояния эндометрия для повышения эффективности программ ВРТ.

Аспирация секрета эндометрия может стать альтернативной и минимально инвазивной процедурой по забору материала с целью последующей интерпретации функциональной активности биологических веществ, циркулирующих в клетках эндометрия. Одной из важных особенностей эпителиальных клеток эндометрия является образование маточных желез (МЖ), секрет которых является первичным микроокружением эмбриона. С помощью данного секрета он контактирует с материнским организмом ещё до имплантации и играет важную роль в рецептивности эндометрия. Секрет эндометрия представляет собой сложную молекулярную систему, которая может включать в себя компоненты как цервикальной слизи, трубно-перитонеальной, так и овариальной жидкости

(некоторые из них неизбежно попадают в маточную среду), а также растворимые продукты расщепления белков, цитокины, ферменты, факторы роста, протеазы и их ингибиторы, а также иммуномодулирующие факторы [169].

Структура и функция секрета эндометрия динамически изменяется на протяжении всего менструального цикла. В периимплантационный период МЖ достигают максимальной функциональной активности. Доказано, что при различных патологических состояниях эндометрия происходит нарушение секреторной трансформации, как следствие, снижение рецептивности. Происходит спад активности МЖ, в частности, выделение секрета эндометрия, с помощью которого эмбрион взаимодействует с материнским организмом [140].

Стоит отметить, что способ получения секрета эндометрия для последующей оценки рецептивности эндометрия, может быть проведен атравматичным способом путем аспирации содержимого с использованием катетера для переноса эмбрионов в полость матки. Безопасность данной процедуры подтверждает возможность забора аспирата в различные фазы менструального цикла для последующей оценки рецепторного статуса. Поэтому аспирация секрета эндометрия может стать идеальным способом для определения смещения «имплантационного окна». Изучение особенностей секрета в различные фазы менструального цикла могут приблизить к пониманию состояния эндометрия в тот или иной период.

Kasvandik S et al. [178] исследовали образцы маточного аспирата в раннюю и среднюю секреторную фазу менструального цикла у одной и той же пациентки для динамического сравнения данных. Они обнаружили, что секрет содержит большее количество экзосомальных, внеклеточных, цитозольных белков и белков плазматической мембраны. Было выявлено, что экспрессия белков, участвующих в иммунной регуляции, гликолизе, кроветворении, выше, в то время как белки, связанные с репликацией дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и сплайсингом мРНК, ниже в

среднюю секреторную фазу по сравнению с ранней секреторной фазой. Авторы пришли к выводу, что секрет эндометрия может быть использован в качестве одного из основных показателей оценки состояния эндометрия и динамики изменения ее транскрипционного профиля.

В серии сравнительных исследований между тканью и секретом эндометрия в пролиферативную и секреторную фазы цикла позволило Guo X. et al. [89] сделать вывод о значительных молекулярных изменениях, ответственных за переход из нерецептивной к рецептивной стадии эндометрия, что дает стимул для последующего изучения молекулярного состава и физиологии МЖ в клетках эндометрия.

При проведении протеомного анализа состава МЖ были получены данные о наличии как минимум 600–1500 разнообразных видов белков. Основываясь на протеомных результатах исследования как ткани эндометрия, так и МЖ были выявлены некоторые основные протеомные изменения, происходящие в эндометрии в переходе от пререцептивной к рецептивной фазе, что предполагает роль этих белков в рецептивности эндометрия.

В исследовании Giacomini E. et al. [88] авторы выделяли РНК из внеклеточных везикул (ВВ), полученных с помощью секрета эндометрия во время нерецептивной (ЛГ+2) и рецептивной (ЛГ+7) фазе цикла у здоровых женщин, а также в рецептивной (ЛГ+7) фазе у женщин с бесплодием. При исследовании ВВ были получены данные о 942 более распространенных генах и 1305 менее распространенных в рецептивной фазе ЛГ+7 по сравнению с нерецептивной фазой ЛГ+2. При анализе пациенток с успешной и неудачной имплантацией после переноса ЛГ+7 одной зуплоидной бластоцисты в следующем цикле обнаружили 97 генов, уровни транскриптов которых были повышены, и 64 гена, уровни транскриптов которых были снижены в группе женщин, достигших беременность. Авторы пришли к выводу, что выделение ВВ с помощью маточного аспирата может быть потенциально менее инвазивной процедурой для изучения эндометрия.

К аналогичным выводам пришли Luddi A. et al. [62] при заборе ВВ, в частности экзосомоподобных везикул, которые экспрессируют предполагаемые маркеры эндометрия, такие как гликоделин А и рецепторы эстрогена и прогестерона, что подтверждает их эндометриальное происхождение. Авторы также идентифицировали эндометриальные клетки, выделяемые из слизистой оболочки матки как самый богатый источник эндометриальных транскриптов, что, вероятно, связано с клеточным (эпителиальным) происхождением. Также количественная оценка трех профилей генов эндометрия в образцах, собранных в разные моменты времени в течение лютеиновой фазы, выявила колебания, по-видимому, повторяющие изменчивость экспрессии генов, о которых сообщалось ранее во время менструального цикла.

Таким образом, представляется актуальным изучение различных маркеров рецептивности эндометрия с помощью неинвазивного метода — аспирации секрета эндометрия с целью определения окна имплантации и повышения эффективности программ ВРТ.

1.4. Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия

Применение различных методов диагностики рецептивности эндометрия, в том числе инвазивных, не привело к пониманию патофизиологических особенностей и молекулярных факторов, участвующих в процессе имплантации эмбрионов. В настоящее время описано множество факторов, имеющих прямое отношение к этому процессу, что позволяет предположить, что процесс взаимодействия эмбриона и эндометрия связан с многофакторной недостаточностью на одном или нескольких уровнях клеточной связи.

С появлением омиксных технологий в области репродуктивной медицины получено более широкое представление о биологической системе в целом. Омиксные технологии включают комплексное изучение взаимодействий клеточных структур на разных биологических уровнях и

отражают состояние организма или его части (от процессов ДНК и генов до метаболитов) [141].

В целом омиксные технологии объединяют в себе: эпигеномику — это наука, изучающая наследуемые изменения в экспрессии генов, происходящие без каких-либо изменений в последовательности генов; [50] точно так же, как геномика изучает полный набор экспрессии генов определенных типов клеток или тканей, протеомика изучает изменения во всех белках, экспрессируемых и транслируемых из одного генома [143], секретомика описывает белки, продуцируемые клетками в окружающую среду, а метаболомика изучает одновременно концентрацию метаболитов и их колебания в определенной среде [101].

Как известно, для наступления беременности нужна синхронизация процессов взаимодействия между эмбрионом и эндометрием, а именно с секретом эндометрия, который продуцируется маточными железами. Протеомный анализ секрета эндометрия, в котором присутствуют различные белковые молекулы, может помочь в понимании процессов имплантации эмбрионов. Сравнительный протеомный анализ аспирата полости матки был проведен в исследовании Fitzgerald H. et al. [102]. Пациенты были разделены на две группы: группа фертильных женщин (n=9) и группа женщин с бесплодием (n=10). Забор материала осуществлялся в пролиферативную фазу цикла. Выявлено четыре белка (SFRP4, CD44, ECM1), экспрессия которых у женщин с бесплодием была значительно снижена по сравнению с фертильными женщинами. Также выявлен белок ASRGL1, который был обнаружен исключительно в группе пациенток с бесплодием. Полученные белки были классифицированы в зависимости от биологических процессов: ASRGL1, SFRP4 и ECM1 – выявлены в железистом эпителии и строме, CD44 – в строме и иммунных клетках, белок ECM1 присутствовал в двух изоформах непосредственно в секрете эндометрия. Однако данное исследование произведено на малой выборке пациентов, а также не

затрагивает изучение состояния локальных факторов в процессе имплантации в секреторную фазу цикла.

В работе He Y. et al. [109] показан протеомный анализ секрета эндометрия в предимплантационный период на 9-й, 12-й и 15-й дни с помощью метода химической маркировки iTRAQ (изобарические метки для относительного и абсолютного количества). Всего было идентифицировано 964 белка. Кроме того, дальнейший анализ выявил еще 279 белков с разным уровнем экспрессии среди трех групп. Было выявлено, что белки катепсин С (CTSC), катепсин В (CTSB) и кислая фосфатаза 5, устойчивая к тартрату (ACP5), играют важную роль в процессе имплантации, а также участвуют в регуляции секреции трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), который усиливает или подавляет различные сигнальные пути, регулируя имплантацию. Полученные данные позволяют прояснить механизмы эмбрионального развития и влияния протеомного профиля на процесс имплантации.

Rai A. et al. [150] с коллегами провели исследование секрета эндометрия, выделенного из внеклеточных везикул, с помощью метода масс-спектрометрии. В эксперименте проводили сравнение групп пациенток в различные фазы менструального цикла. Так, в секреторную фазу цикла были обнаружены специфичные для инвазии бластоцисты белки LGALS1/3, S100A4/11, а также белки SOD1, GSTO1, MPO, CAT, которые обладают антиоксидантной активностью. Среди потенциальных маркеров рецептивности эндометрия выделены белки S100A4, FGB, SERPING1, CLU, ANXA2, а также белки CAT, YWHAЕ, PPIA, обладающие имплантационным потенциалом. Исследование с помощью масс-спектрометрического анализа протеомного профиля в клетках эндометрия дает новое представление о маркерах рецептивности и имплантации, однако данный процесс обусловлен различными техническими трудностями и малой выборкой пациентов, включенных в исследования, поэтому требуются дальнейшие разработки в этом направлении.

В последние годы метаболомный анализ биологических жидкостей и тканей, таких как материнская кровь, амниотическая жидкость, пуповинная кровь, секрет эндометрия являются важными составляющими для оценки физиологических и патологических состояний репродуктивной системы. В исследовании Yang Y. et al. [124] использовали метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) для изучения свойств секрета эндометрия в периимплантационный период. Обнаружены ключевые аминокислоты: пальмитолеиновая кислота, фумаровая кислота и глутаровая кислота, которые могут быть связаны с рецептивностью эндометрия. Показаны глубокие изменения клеточного метаболизма в ранний период имплантации, включая активацию аминокислот с разветвленной цепью и промежуточных продуктов одноуглеродного метаболизма, активацию метаболизма глиоксилатов и дикарбоксилатов. Данные аминокислоты участвуют в регуляции взаимодействия между материнским организмом и эмбрионом.

Calderari S. et al. [125] впервые исследовали метаболомный профиль как в секрете эндометрия, так и в среде эмбриона. Обнаружено 24 различных метаболитов из которых 21 метаболит был обнаружен в исследуемых образцах. Высокая концентрация глюкозы и пирувата в культуральной среде эмбриона указывает на основополагающую роль данных метаболитов в развитии бластоцисты *in vivo*. Интересно, что кислые аминокислоты (глутамат и аспарат) не определялись в секрете эндометрия в отличие от культуральной среды, что свидетельствует о локальной регуляции состава секрета.

В обширном метанализе Hu K. et al. [96] представлена роль важных аминокислот, которые обладают антиоксидантными свойствами и регулируют имплантацию бластоцисты. Описаны наиболее распространенные аминокислоты, обнаруженные в секрете эндометрия: глутамин, глутамат, таурин и глицин. Снижение концентрации той или иной аминокислоты ведет к нарушениям в процессе эмбриогенеза.

Несмотря на обширные исследования в области репродуктомики, понимание того, как взаимодействует эмбрион и эндометрий посредством

окружающей среды, содержащей различные биологические молекулы, до сих пор остается неясным. Именно поэтому продолжается поиск новых молекулярно-биологических маркеров, способных прояснить физиологические процессы для улучшения показателей имплантации и состояния эндометрия.

На сегодняшний день наибольший интерес представляет роль омиксных технологий в изучении гаметогенеза [37, 21], эмбриогенеза [10] и рецептивности эндометрия, а именно мнкРНК. К мнкРНК относятся рибосомальные РНК (rRNAs), транспортные РНК (tRNAs), малые ядрышковые РНК (snoRNAs), микроРНК (miRNAs), пивиРНК (piwiRNAs), малые интерфирующие РНК (siRNAs), малые ядерные РНК (snRNAs) и длинные некодирующие РНК (long ncRNAs) [160].

В последние годы существенный прогресс был достигнут в изучении биогенеза микроРНК и пивиРНК. Представлено достаточно доказательств в фундаментальной роли, которую играют данные молекулы во всех биологических структурах организма человека [160, 147, 47, 117]. Поэтому изучение данных молекул представляет актуальным, современным и новым методом.

1.5. Регуляция экспрессии малых некодирующих РНК (мнкРНК)

1.5.1. МикроРНК (miRNAs)

МикроРНК — одноцепочечные молекулы РНК длиной от 22 до 24 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Биогенез микроРНК берет свое начало с синтеза в ядре длинной первичной микроРНК или премикроРНК, которая индуцирует транскрипцию с помощью РНК полимеразы III. Далее первичная микроРНК с помощью фермента *Drosha*, белка DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), а также РНКазы III расщепляется с образованием премикроРНК в форме шпильки. После процессинга премикроРНК транспортируется из ядра в цитоплазму с помощью белка экспортина-5 (XPO5). В цитоплазме белок РНКазы III и рибонуклеаза *Dicer* разрезает

премикрРНК с образованием коротких дуплексов РНК – микроРНК и малых интерфирирующих РНК. Впоследствии цепь с относительно нестабильным концом на 5'-нетранслируемой областью (5'UTR) (в большинстве случаев) дуплекса выбирается в качестве направляющей цепи для сборки комплекса белков семейства Argonaute (AGO) с образованием эффекторного комплекса, называемого РНК-индуцированным комплекс сайленсинга (RISC). Благодаря комплексу RISC происходит эндонуклеазное расщепление мРНК и/или блокирование синтеза белка при взаимодействии с факторами инициации трансляции [53, 58, 8, 172, 115].

На сегодняшний день выявлено более 2654 микроРНК (по данным базы miRBase v22 ([http:// mirbase.org/](http://mirbase.org/))), которые участвуют в различных биологических процессах. Благодаря совершенствованию знаний о роли мнкРНК идентифицирована способность секретировать микроРНК во всех клетках и организмах, при этом уровень их концентрации является отражением как физиологических, так и патологических состояний [8, 90].

1.5.2. ПивиРНК (piwiRNAs)

Среди мнкРНК наименее изученным классом остаются пивиРНК. Данные молекулы представляют большой интерес для изучения их функциональной активности в биологических, а также в патологических процессах. ПивиРНК — одноцепочечные молекулы РНК длиной 24–31 нуклеотид. Механизм действия пивиРНК включается в себя первичный процессинг и цикл «пинг-понг», который амплифицирует вторичные пивиРНК. При первичном процессинге пивиРНК транспортируются из геномных областей, называемых кластерами пивиРНК, которые связываются с белками piwi (pi) подсемейства AGO или Aub (Aubergine). Последовательность 3'-UTR некоторых кодирующих белок-генов также могут служить источником первичных пивиРНК. Вместе с AGO3 (Argonaute 3) комплекс Aub-piRNA служит триггером для запуска цикла «пинг-понг» и последующей амплификации. Цикл «пинг-понг» заглушает целевую последовательность транспозона и одновременно амплифицирует

последовательность рiРНК. ПивиРНК выполняют в клетке две основные функции: поддержание стабильности генома путем ингибирования экспрессии мобильных участков генома (транспозонов) и регуляция экспрессии кодирующих белок генов за счет РНК-интерференции подобно механизму действия микроРНК [53, 161, 28, 58, 8, 110, 92]. В последние годы активно изучаются преимущества мнкРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров исходов программ ВРТ в исследованиях имплантационного потенциала эмбриона и оценки рецептивности эндометрия [53, 161, 28, 58, 8, 47, 117, 172, 175, 115, 90, 110, 92, 89, 162, 93, 71]

1.6. Роль мнкРНК в имплантации эмбрионов

Жизнеспособность эмбрионов является одним из ключевых факторов, определяющих имплантацию. По результатам многочисленных исследований отбор эмбрионов для переноса в полость матки только по морфологическим критериям имеет относительно слабую корреляцию с имплантацией. Более того, был сделан вывод, что параметры, используемые для оценки бластоцисты (морфология и скорость развития), не являются адекватными показателями даже среди зуплоидных эмбрионов [28, 58, 8].

В свою очередь активно проводился анализ культуральной среды с помощью масс-спектрометрии на основании метаболической активности эмбрионов. Однако частота живорождения существенно не отличалась в группе, в которой эмбрионы отбирались по метаболическому профилю и по сравнению с классическим методом отбора эмбрионов в рамках проведения программы ВРТ [163]. Поэтому актуальным стало изучение мнкРНК, секретлируемых в среду культивирования, и их влияние на процесс имплантации эмбрионов. Полученные данные об экспрессии мнкРНК могут быть использованы в качестве неинвазивных методов прогнозирования качества эмбрионов [170].

В одном из первых исследований по изучению роли мнкРНК в имплантации Rosenbluth E. et al. [97] с коллегами провели количественный анализ микроРНК методом ПЦР. Обнаружены специфичные для

культуральной среды микроРНК: miR-191, miR-645 и miR-372. Высокий уровень экспрессии miR-191 был выявлен у анеуплоидных эмбрионов и отрицательно коррелировал с имплантацией, тогда как экспрессия miR-645 обнаружена в среде эмбрионов с отрицательным результатом ЭКО. Высокий уровень miR-372 также связан с группой отрицательного исхода, однако miR-372 не коррелировал с плоидностью эмбрионов.

В свою очередь целью исследования Асуña-González R. et al. [133] было количественное определение профиля экспрессии hsa-miR-21-3p, hsa-miR-24-1-5p, hsa-miR-191-5p и hsa-miR-372-5p в культуральной среде на 5-й день развития эмбриона *in vitro* и сравнение профиля экспрессии двух групп, классифицированных по исходу: наступления ($n = 25$) или отсутствия ($n = 25$) беременности. Экспрессия hsa-miR-191-5p в культуральных средах у пациенток с наступившей беременностью была в 5,2 раза выше ($p \leq 0,001$), а уровень hsa-miR-24-1-5p в 1,6 раза выше ($p = 0,043$) у пациенток с отрицательным исходом. Между двумя группами hsa-miR-21-3p ($p = 0,38$) и hsa-miR-372-5p ($p = 0,41$) не было существенной разницы. Авторы выявили, что для развития благоприятных условий имплантации анализ уровня hsa-miR-191-5p может стать биомаркером имплантации, в то время как hsa-miR-24-1-5p может указывать на неблагоприятный прогноз имплантации.

В среде культивирования, оценка уровня экспрессии микроРНК, в качестве имплантационного потенциала эмбриона была продемонстрирована в работе Wang S. et al. [56] Авторы провели сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК, используя метод глубокого секвенирования, у эмбрионов на стадии дробления (3 сутки) и на стадии бластоцисты (5 сутки) в зависимости от исходов программ ЭКО. Были идентифицированы три микроРНК: hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-483-5p и hsa-miR-432-5p, специфичные для обеих групп. Полученные данные позволяют предположить, что представленные молекулы могут выступать в качестве биомаркеров оценки состояния эмбрионов.

Несмотря на многочисленные исследования зарубежных коллег, роль пивиРНК в культуральной среде эмбрионов не была изучена. Timofeeva A. et al. [161] в 2020 году впервые опубликовали исследование о роли микроРНК и пивиРНК в имплантации эмбрионов. Было проведено глубокое секвенирование методом NGS с последующей количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Отобраны 50 образцов культуральной среды у 27 фертильных пар, вступивших в программу ВРТ. Выявлено, что качество эмбрионов на стадии морула определяется экспрессией пивиРНК и микроРНК: hsa_piR_011291, hsa_piR_019122, hsa_piR_001311, hsa_piR_015026, hsa_piR_015462, hsa_piR_016735, hsa_piR_019675, hsa_piR_020381, hsa_piR_020485, hsa_piR_004880, hsa_piR_000807, hsa-let-7b-5p, and hsa-let-7i-5p. Авторы продемонстрировали новые данные по профилированию мнкРНК в культуральной среде эмбрионов на стадии морулы с различным потенциалом развития. Нарушение процессов развития эмбрионов может быть связано с дисрегуляцией экспрессии мнкРНК на разных уровнях.

В 2023 году Huang W. et al. [138] опубликовал обширный метанализ данных по экспрессии мнкРНК с 1990 по 2022 годы. Обнаружено, что повышенная экспрессия miR-320, miR-663b, а также пониженная экспрессия miR-454 чаще всего встречалась в исследованиях культуральной среды эмбрионов, а активация miR-21-5p связана с успехом в наступлении беременности. Стоит отметить, что несмотря на успехи в изучении механизмов имплантации, а также поиск определенных молекул, в том числе мнкРНК, в культуральной среде эмбрионов, поиск маркеров рецептивности эндометрия остается приоритетным направлением.

1.7. Роль мнкРНК в рецептивности эндометрия

В процессе имплантации между бластоцистой и эндометрием устанавливается тесная взаимосвязь. В одной из первых работ, посвящённых изучению экспрессии микроРНК в качестве маркеров рецептивности эндометрия, Viella F. et al. [95], распределили пациенток на группы в

зависимости от фаз менструального цикла: ранняя пролиферативная (EP; 6-8 дни; n=4), поздняя пролиферативная (LP; 9-14 дни; n=4), ранняя секреторная (ES; 15-18 дни; n=4), «окно имплантации» (WOI; 19-23 дни; n=4) и поздняя секреторная (LS; 24-28 дни; n=4). Забор материала проводился путем аспирации МЖ с последующей валидацией полученных данных с помощью метода глубокого секвенирования. Выявлена различная экспрессия данных молекул в зависимости от фазы цикла. Так, например, в секреторную фазу цикла экспрессия микроРНК была значительно выше, чем в пролиферативную фазу. Во время «окна имплантации» установлена экспрессия hsa-miR-30d, которая входит в состав семейства miR-30d. Данные микроРНК участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе, регулируют апоптоз посредством слияния с геном TP53, участвует в дифференцировке эктодермы во время эмбрионального развития. Авторы пришли к выводу о возможном новом механизме межклеточного взаимодействия эмбрионов с hsa-miR-30d в клетках эндометрия. При слиянии hsa-miR-30d с трофэктодермой, начинается гиперсекреция молекул адгезии, таких как интегрин бета 3 (ITGB3), интегрин альфа 7 (ITGA7) и кадгерин 5 (CDH5), что благоприятно влияет на процесс имплантации.

В исследовании Ferlita A. et al. [139] авторы также выявили, что экспрессия miR-30d, а также miR-30b повышена в рецептивном эндометрии (ЛГ+7) в сравнении с пререцептивным эндометрием (ЛГ+2). В 2023 году в работе Naydenov M. et al. [165] показана ассоциация семейства miR-449, а именно изоформ miR-449 a/c, miR-449c-miR-449c.1, с рецептивностью эндометрия. Обнаружена молекула miR-449a, которая оказывает влияние на апоптоз эндометриально-стромальных клеток и восприимчивость эндометрия в окно имплантации.

На протяжении многих лет изучается роль половых гормонов на уровень экспрессии мнкРНК в эндометрии. К примеру, в работе Shekibi M. et al. [148] выявлено, что прогестерон активирует экспрессию miR-145 и miR-199 в клетках эндометрия. При этом данные микроРНК подавляют полидиксин

(PODXL), который негативно влияет на рецептивность эндометрия, и первичные эпителиальные клетки эндометрия человека (HEECs). В экспериментальных данных выявлено, что PODXL подавляется прогестероном частично через miR-145 и miR-199 в окно имплантации. Полученные результаты также указывают на возможную важность гормональной регуляции микроРНК для успешной имплантации эмбриона.

В исследовании Salmasi S. et al. [156] также показана роль прогестерона на рецептивность эндометрия. Целью исследования авторов было изучить влияние стимуляции яичников и экзогенного прогестерона на плотность CD31-положительных клеток (эндотелиальных клеток), белка VEGF и экспрессию miR-17-5p в эндометрии непосредственно перед имплантацией. Плотность эндотелиальных клеток, экспрессия белка VEGF и miR-17-5p была увеличена по сравнению с контрольной группой. Авторы пришли к выводу, что введение экзогенного прогестерона повышает уровень VEGF и приводит к разрастанию эндотелиальных клеток, тем самым положительно сказывается на состоянии эндометрия. Сигнальный белок VEGF необходим для успешной имплантации за счет существенного ангиогенеза и васкулогенеза, а при снижении

Акбар R. et al. [131] в своей работе показали роль miR-183 (miR-183-5p, miR-182-5p и miR-96-5p) в рецептивности эндометрия, а также в имплантации. Экспрессия miR-183 активирует рост и развитие клеток эндометрия за счет эстрогензависимой пролиферации эпителия. Семейство miR-183 также играет положительную роль в миграции и пролиферации клеток. Последующий анализ показал, что катенин альфа 2 (CTNNA2) является потенциальным геном-мишенью для miR-183-5p. Ингибирование miR-183-5p увеличивает уровень CTNNA2, что негативно сказывается на имплантации. Авторы пришли к выводу, что экспрессия miR-183-5p, а также ген CTNNA2 могут выступать в роли потенциальных биомаркеров рецептивности эндометрия.

Все вышесказанное свидетельствует об актуальности и целесообразности изучения транскрипционного профиля мнкРНК в эндометрии. Создание перспективных диагностических и прогностических тестов для определения рецептивности эндометрия, на основании молекулярных маркеров, а также изучение новых неинвазивных методов исследования, остается главной задачей в повышении эффективности программ ВРТ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В соответствии с целью исследования, поставленными задачами, а также согласно критериям включения и исключения, в данной диссертационной работе, проведен отбор пациентов среди супружеских пар, обратившихся в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий отделением д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Оценка профиля экспрессии мнкРНК в маточном аспирате проводилась в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН, д.м.н., профессор Г.Т. Сухих) в период с октября 2020 года по декабрь 2021 года. Комиссия по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 20.10.2020 года рассмотрела материалы работы и приняла решение одобрить проведение данного научного исследования (протокол №9). Все пациенты добровольно подписали информированное согласие на участие в исследовании. Проведено полное клиничко-лабораторное обследование в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021), а также в соответствии с Приказом Минздрава России от 31.07.2020 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

2.2. Критерии включения и исключения в исследование

В диссертационном исследовании были оценены клиничко-анамнестические данные супружеских пар, вступивших в программу переноса размороженного эмбриона в полость матки. Критериями включения/исключения служили следующие параметры.

Критерии включения:

- Отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщин от 23 до 40 лет.
- Нормальный овариальный резерв женщины.
- Нормозооспермия у партнера или мужской фактор бесплодия (без выраженной патозооспермии).
- Наличие криоконсервированного методом витрификации эмбриона от предыдущих циклов ВРТ.
- Перенос строго одной бластоцисты морфологически хорошего качества.
- Отсутствие патологии эндометрия и матки.
- Информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- Супружеские пары с наличием противопоказаний для проведения программ ВРТ, в том числе с экстрагенитальной патологией, онкологическими, психическими и генетическими заболеваниями.
- Наружный генитальный эндометриоз III-IV распространения.
- Синдром поликистозных яичников (СПКЯ).
- Патология эндометрия.
- Интерстициальная и/или субсерозная миома матки более 4 см; субмукозная миома, деформирующая полость матки.
- Инфекционно-воспалительные заболевания женских половых органов.
- Пороки развития половых органов.
- Оплодотворение сперматозоидами, выделенными из ткани яичка.

2.3. Дизайн исследования

Проспективное и ретроспективное исследование было проведено в соответствии с поставленными задачами. Для решения поставленной задачи №1 ретроспективно были проанализированы клинические и эмбриологические данные в циклах ВРТ, в которых был получен эмбрион, в последующем планируемый к переносу в полость матки в криоцикле. Дизайн для решения задачи №1 представлен на рисунке 1.

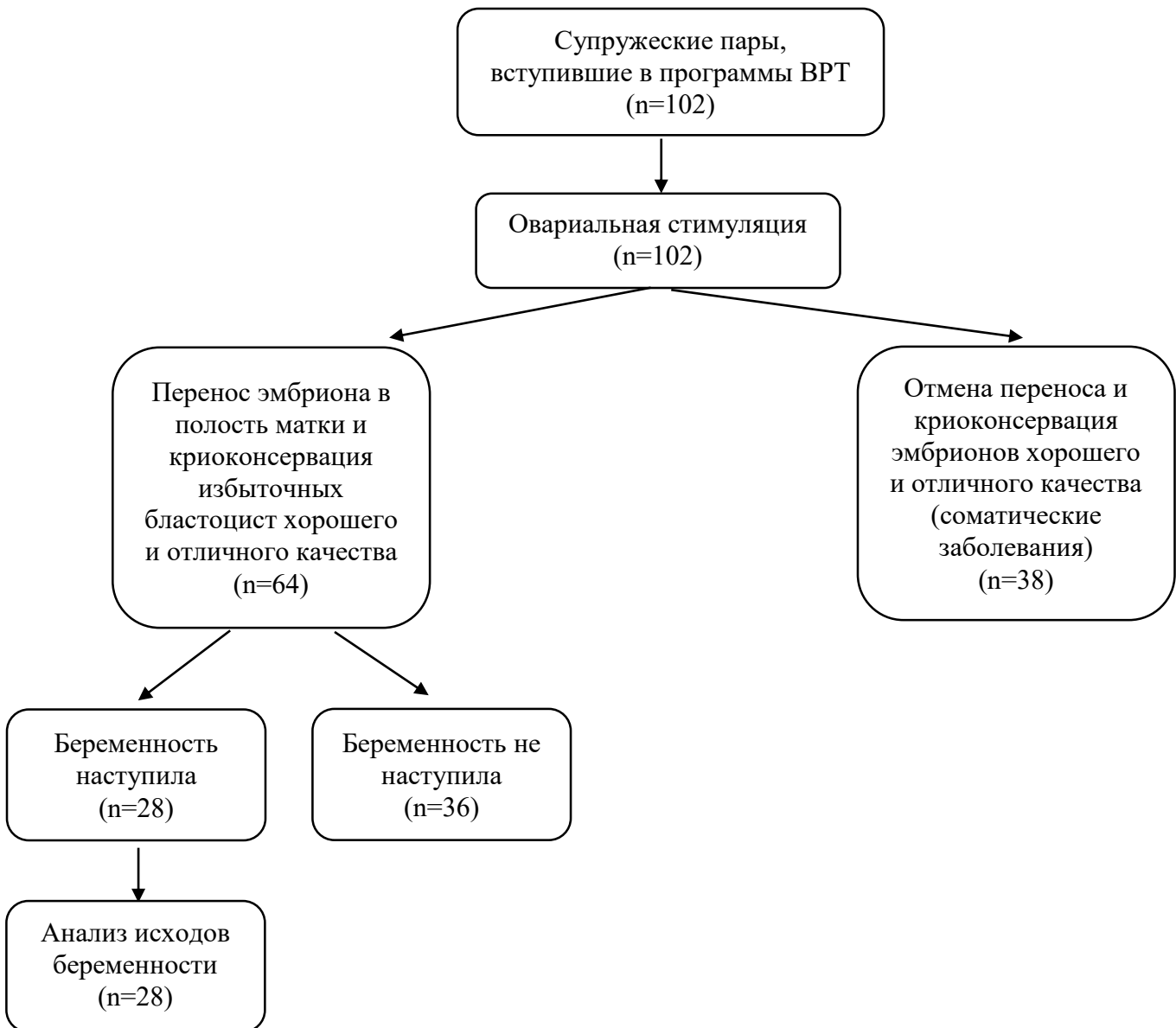


Рисунок 1. Схема дизайна исследования для оценки цикла ВРТ, в котором получен криоконсервированный эмбрион, планируемый к переносу в полость матки.

Пациентки, у которых после переноса нативного эмбриона наступила беременность (n=28), были успешно родоразрешены и вернулись для проведения криоцикла.

Для решения поставленной задачи №2 был разработан следующий дизайн, указанный на рисунке 2. Всем пациенткам проведено полное клинико-анамнестическое, лабораторное и инструментальное исследование перед криопереносом. Проспективно отобраны 102 супружеские пары в зависимости от метода подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона в текущем менструальном цикле. Пациентки были разделены на группы следующим образом:

Группа 1 – группа пациенток с переносом размороженного эмбриона с применением циклической гормональной терапии (ЦГТ), n=60.

Группа 2 – группа пациенток с переносом размороженного эмбриона в естественном цикле (ЕЦ), n=42;

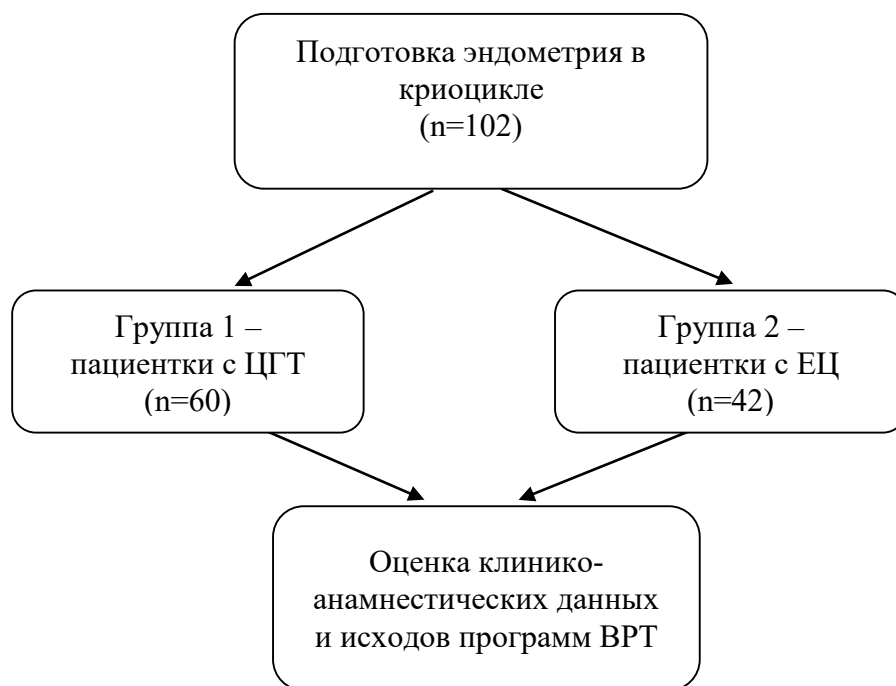


Рисунок 2. Схема дизайна исследования для оценки клинической эффективности переноса размороженного эмбриона в полость матки в зависимости от метода подготовки эндометрия

На третьем этапе работы для изучения особенностей экспрессии мнкРНК в аспирате секрета эндометрия и оценки корреляции с исходами ВРТ было проведено проспективное исследование, дизайн которого представлен на рисунке 3.

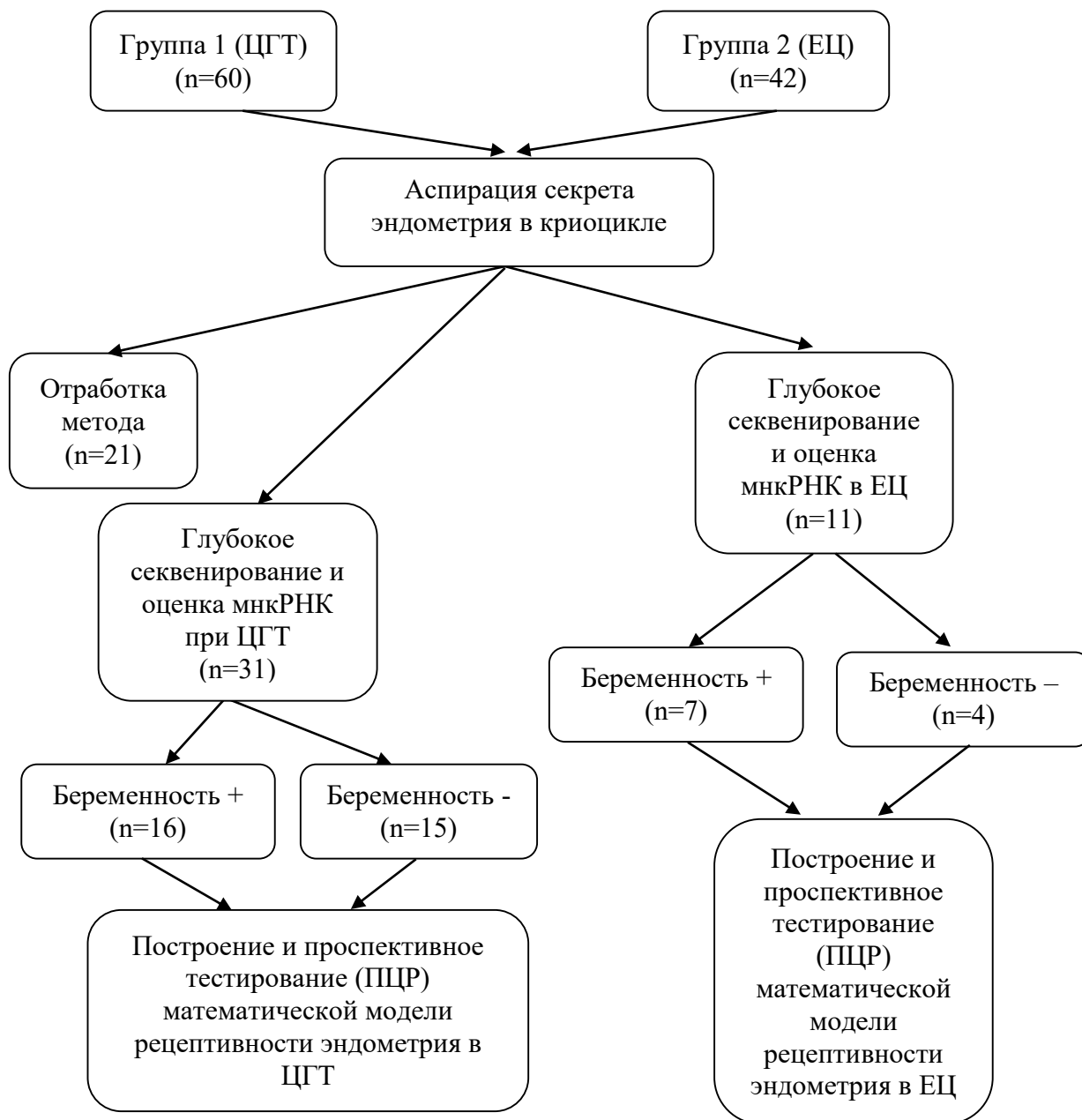


Рисунок 3. Дизайн исследования для оценки эффективности криоцикла в зависимости от метода подготовки эндометрия и уровня экспрессии малых некодирующих РНК в маточном аспирате

Осуществлен забор секрета эндометрия непосредственно перед переносом размороженного эмбриона (за 5 минут до процедуры переноса) и проведена идентификация мнкРНК (микроРНК и пивиРНК) методом

глубокого секвенирования с последующим ПЦР исследованием в реальном времени в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева). На основании полученных клинических и молекулярно-биологических данных проводилось построение математических моделей прогнозирования имплантации эмбриона и оценка их состоятельности.

2.4. Методы исследования

Все супружеские пары проходили предварительное обследование в амбулаторных условиях перед проведением программы ВРТ. Обследования включали в себя как обязательные методы, согласно Федеральным клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (2021), а также в соответствии с Приказом Минздрава России от 31.07.2020 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», так и специальные методы исследования.

2.4.1. Общеклинические методы исследования

Перед вступлением в программу ВРТ у всех супружеских пар проводился сбор анамнеза (год рождения, возраст, условия проживания, семейное положение, профессия), наличие вредных привычек (курение, прием алкоголя и наркотиков), а также производственных вредностей. Подробный опрос об основных жалобах (с какого времени появились жалобы, в течение какого времени не наступала беременность, продолжительность бесплодия), второстепенных жалобах относительно других органов и систем. Также пристальное внимание уделялось наличию в анамнезе психических и перенесенных инфекционных заболеваний: гепатит В и С, венерические заболевания, туберкулез.

История жизни пациентки включала в себя вопросы о перенесенных ранее заболеваниях, оперативных (негинекологических) вмешательствах (операции и травмы с указанием тяжести заболеваний и их продолжительности), начиная с детского периода по настоящее время.

При сборе анамнеза уточнялись наследственные заболевания у ближайших родственников, наличие сердечно-сосудистых заболеваний, тромбоэмболических осложнений, эндокринологические и соматические заболевания, злокачественные новообразования, гинекологический анамнез по материнской линии. Учитывались данные супруга/партнера пациентки, его биографические данные, общее состояние здоровья, наличие хронических заболеваний, репродуктивная функция. Особое внимание уделялось аллергологическому анамнезу пациентки, о возможной непереносимости пищевых продуктов при их употреблении, а также лекарственной гиперчувствительности при приеме препаратов и действие наркоза. Устанавливалась информация о гемотрансфузиях и возможных побочных реакциях на переливание крови и ее компонентов.

Затем проводился сбор и анализ акушерско-гинекологического анамнеза. Проведена оценка менструальной функции: менархе (возраст, в котором появились первые менструации), через какое время установились, характеристика цикла (продолжительность, регулярность, обильность, болезненность), менялся ли цикл в течение жизни и с чем связано с отметкой в истории, дата последней менструации. Проведена оценка половой функции, а именно: проанализирован возраст начала половой жизни, методы контрацепции и продолжительность приема (гормональные, внутриматочные, барьерные и т.д.), наличие инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) в анамнезе. Осуществлялся сбор данных о репродуктивной функции пациенток: количество беременностей в анамнезе, количество родов (самостоятельные или путем операции кесарева сечения; своевременные или преждевременные), а также наличие самопроизвольных выкидышей, абортов и невынашивания беременности.

На следующем этапе обращал на себя внимание гинекологический анамнез пациенток, а именно наличие гинекологических заболеваний, методы их лечения, оперативные вмешательства в прошлом (объем, продолжительность, наличие послеоперационных осложнений),

физиотерапия, профилактика инфекционно-воспалительных заболеваний. Отмечались предыдущие попытки программ ВРТ: протоколы овариальной стимуляции, используемые препараты и их дозы, эмбриологический этап и положительный/отрицательный исход).

Оценивалось общее состояние пациентки, сознание, телосложение и конституционный тип (гиперстенический, нормостенический, астенический), термометрия, измерение артериального давления, измерение роста и массы тела с вычислением индекса массы тела ($\text{ИМТ} = \text{масса тела (кг)} / \text{рост}^2 (\text{м}^2)$). Проводился осмотр состояния кожи и видимых слизистых (окраска, влажность, наличие патологических изменений), определялась степень выраженности подкожной клетчатки, ее равномерность распределения по телу, степень и типа оволосения, наличие отеков.

Проводилось физикальное обследование молочной железы (оценивалась окраска кожных покровов, структура, наличие патологических выделений, пальпация. Гинекологическое обследование включало в себя осмотр наружных половых органов, осмотр шейки матки (оценка величины и формы: коническая/цилиндрическая; оценка формы наружного зева: поперечный/круглый; наличие/отсутствие патологических изменений), состояние стенок влагалища (характер складчатости, цвет слизистой оболочки, изъязвления, разрастания, опухоли) при помощи зеркал, бимануальное влагалищное исследование. Все полученные данные были зафиксированы для последующей обработки в научном исследовании.

2.4.2. Гормональные исследования

Перед вступлением в программу ВРТ всем пациенткам проведена оценка уровня гормонального статуса на 2–3-й день менструального цикла, полученная, в том числе, в программе овариальной стимуляции. В плазме крови оценивали следующие показатели: фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), антимюллеров гормон (АМГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), уровень прогестерона в лютеиновую фазу менструального цикла, эстрадиол (Е2), общий тестостерон (Т), тиреотропный гормон (ТТГ), тироксин (Т4),

дегидроэпиандростеронсульфат (ДГЭА-С), 17-гидроксипрогестерон (17-ОН), кортизол, пролактин (ПРЛ). Референсные значения концентрации гормонов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Референсные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста

Показатели	Референсные значения	Единицы измерения
ФСГ	2,0-10,0	МЕ/л
АМГ	0,5-10,6	нг/мл
ЛГ	2,3-15,0	МЕ/л
Е2	150,0-450,0	пмоль/л
Прогестерон (лютеиновая фаза)	9,0-83,0	нмоль/л
Тестостерон	0,52-2,5	нмоль/л
ТТГ	0,4-3,5	мМЕ/л
Т4	10,0-25,0	пмоль/л
ДГЭА-С	0,9-11,7	мкмоль/сут
17 ОН	0,3-3,0	нмоль/л
Кортизол	140,0-635,0	нмоль/л
ПРЛ	120,0-500,0	мМЕ/л

2.4.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проведено на этапе предварительного обследования пациенток по окончании менструации (при нормальном менструальном цикле продолжительностью 28 дней – на 5-8-й день цикла) для подтверждения отсутствия противопоказаний к проведению программ ВРТ. Проводилось исследование положения, формы и размеров матки, толщины и структуры эндометрия, а также оценивались размеры и объем яичников, состояние фолликулярного аппарата, наличие или отсутствие объемной патологии в малом тазу.

При отсутствии противопоказаний для проведения программ ВРТ, всем пациенткам на 2-3-й день менструального цикла проводился УЗИ-мониторинг. После подсчета количества антральных фолликулов (КАФ), представленных результатов гормональных исследований, с учетом анамнеза и возраста пациентки, подбирался оптимальный препарат и его дозировка для начала

стимуляции. В течение овариальной стимуляции УЗИ- мониторинг оценки динамики фолликулогенеза и состояния эндометрия выполнялся по мере необходимости, а также для коррекции вводимых доз гонадотропинов, для выбора благоприятного времени введения ант-ГнРГ, триггера овуляции и назначения дня проведения трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП). Далее ТВП и непосредственно ПЭ проводились под контролем УЗИ.

При проведении переноса размороженного эмбриона УЗИ обследование пациенток осуществлялось 2-3-й день менструального цикла с целью оценки состояния органов малого таза. При отсутствии противопоказаний на 2-3-й день цикла проводился УЗИ-мониторинг для выбора оптимального протокола подготовки эндометрия: в ЦГТ или в ЕЦ.

На 21 день после осуществления ПЭ при получении положительного результата выполнялось УЗИ исследование с целью визуализации плодного яйца. Сердцебиение плода регистрировалось через 5-6 недель после ПЭ с помощью УЗИ. Обследования выполнялись при помощи УЗИ аппарата «ВК Medical» (Дания) с использованием трансвагинального датчика с частотой 3,5–7,5 МГц.

2.4.4. Обследование партнера

Осуществлялся сбор анамнеза у партнеров пациенток перед вступлением в программу ВРТ. Уточняли паспортные данные, наличие наследственных и соматических заболеваний, вредных привычек. Особое внимание уделялось половой функции (количество половых партнеров, использование методов контрацепции, наличие ИППП в анамнезе), а также задавались вопросы о реализации детородной функции (наличие детей). При подготовке супружеской пары к программе ВРТ проводилось спермиологическое исследование эякулята. Затем непосредственно в день ТВП пациентки повторно осуществлялся сбор эякулята и анализ спермограммы с последующим оплодотворением. Все необходимые рекомендации для прохождения процедуры были даны предварительно. Сбор материала производился в стерильный контейнер после 3-х–4-х дней полового

воздержания. Результаты исследования оценивали в соответствии с нормативами ВОЗ (2010 г.) по оценке и анализу эякулята представленной в таблице 2 [179].

Таблица 2. Нормативные показатели спермиологического исследования эякулята (ВОЗ, 2010 год)

	Референсные значения	Единицы измерения
Объем	> 1,5	мл
Цвет	Белый, серый	
Консистенция	Жидкая, умер.вязкая	
Мутность	мутная	
Вязкость	0,1-2	см
Время разжижения	< 60	мин
pH	≥ 7,2	
Общее количество сперматозоидов в 1 мл	≥ 39	млн
Концентрация сперматозоидов	≥ 15	млн/мл
Общая подвижность сперматозоидов	≥ 40	%
Класс PR (прогрессивно-подвижные)	≥ 32	%
Класс NP (непрогрессивно-подвижные)	≤ 2	%
Класс IM (неподвижные)	≤ 60	%
Агглютинация сперматозоидов	отсутствует	
Агрегация сперматозоидов	отсутствует	
Нормальные сперматозоиды	≥ 4	%
Дефект головки	< 96	%
Дефект шейки	отсутствуют	%
Дефект хвоста	отсутствуют	%
Лейкоциты	< 1	млн/мл
Лецитиновые зерна	много	в п/зр
MAR тест	0-50	%

2.4.5. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

На 2-3-й день менструального цикла была начата овариальная стимуляция по стандартному протоколу с ант-ГнРГ в комбинации с рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном (р-ФСГ). Начальная доза препарата подбиралась с учетом овариального резерва пациенток (на основании возраста, гормонального обследования, УЗИ органов малого таза). При достижении диаметра фолликулов 14-15 мм назначался препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сут подкожно для предотвращения преждевременного пика ЛГ. Далее для финального созревания ооцитов, в качестве триггера овуляции, при достижении фолликулов диаметра 18-19 мм, назначался человеческий хронический гонадотропин (чХГ) в дозе 8 000-10 000 МЕ внутримышечно. Через 35-36 часов после введения триггера овуляции в условиях операционной и под внутривенной анестезией была выполнена ТВП под контролем УЗИ с использованием одноразовых игл (Vitrolife Inc, США) с забором фолликулярной жидкости и оценкой качества ооцитов.

2.4.6. Эмбриологический этап

Оценка качества ооцитов проводилась эмбриологом после получения фолликулярной жидкости пациенток. Затем в чашку Петри транспортировалась полученная жидкость из пробирок для последующего определения количества ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). В стерильные планшеты с культуральной средой на 2-3 часа помещались ооциты, отмывые от фолликулярной жидкости и примеси крови, для предварительной инкубации. Первый этап включал в себя денудирования в раствор гиалуронидазы и занимал 20 секунд, затем второй этап заключался в отмывании фермента в буферной среде. После проведения всех этапов ооциты погружались культуральную среду, где была произведена преинкубация в течении 30 минут. Спустя указанное время путем пипетирования удалялись оставшиеся клетки кумулюса. Степень зрелости ооцитов оценивалась после энзимной и механической обработки.

Одновременно с денадурированием ооцитов осуществлялось центрифугирование, флотирование и непосредственно обработка эякулята. Оплодотворение ооцитов выполнялось методом ЭКО или ЭКО + ИКСИ. При оплодотворении методом ИКСИ ооциты помещали в культуральную среду для культивирования. Оценка этапов оплодотворения проводилась через 14-16 часов после процедуры ИКСИ. Нормальное оплодотворение регистрировалось при наличии в цитоплазме двух симметричных по размеру пронуклеусов (2PN) и двух полярных телец (2PB). Аномальным оплодотворением считалось наличие одного, трех и более пронуклеусов.

Этап культивирования эмбрионов осуществлялся в средах культивирования СООК (Австралия). Морфологическая оценка эмбрионов по классификации Гарднера (степень зрелости бластоцист, качество трофэктодермы (ТФЭ) и состояние внутриклеточной массы (ВКМ)) [85] проводилось спустя 120-122 часов (на 5 сутки культивирования).

2.4.7. Этап криоконсервации и размораживания витрифицированного эмбриона

Оставшиеся эмбрионы после проведения программы ЭКО/ЭКО+ИКСИ, пригодные для переноса в полость матки, были криоконсервированы методом витрификации на средах компании Kitazato (Япония) строго согласно инструкциям производителя. Эмбрион до момента размораживания хранили в условиях жидкого азота. Разморозку проводили в день переноса за 2 часа на средах Kitazato согласно инструкциям производителя. До момента переноса в полость матки эмбрион помещали в культуральные среды компании VitroLife (Швеция), предназначенные для бластоцист — GT-L. Перенос осуществляли из чашки Петри со средой GT-L без культурального масла. Объем переносимой среды в катетере с эмбрионом был стандартизирован и составлял 4 мкл.

2.4.8. Алгоритм подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона

При вступлении в программу переноса размороженного эмбриона, пациентки были разделены на 2 группы:

Группа 1 (ЦГТ) – перенос размороженного эмбриона осуществлялся на фоне ЦГТ;

Группа 2 (ЕЦ) – перенос размороженного эмбриона осуществлялся на фоне ЕЦ;

Протокол подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона на фоне циклической гормональной терапии

В группе 1 (ЦГТ) проводилось УЗИ исследование органов малого таза на 2-3-й день цикла для подтверждения отсутствия патологии эндометрия, а также отсутствия функциональных кист в яичниках. Пациенткам в криоциклах с ЦГТ, согласно инструкции к препарату, назначали эстрадиол валерат в дозировке 2 мг ежедневно до момента переноса эмбриона с корректировкой дозы при необходимости. На 15–16-й день цикла проводили трансвагинальное УЗИ и оценивали толщину и структуру эндометрия. При достижении толщины эндометрия 7–8 мм назначали микронизированный прогестерон по 200 мг 3 раза в сутки согласно инструкции производителя.

Протокол подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона в естественном цикле

В группе 2 (ЕЦ) УЗИ исследование органов малого таза проводилось на 2-3-й день цикла для подтверждения отсутствия патологии эндометрия, а также отсутствие функциональных кист в яичниках. На 8–10-й день менструального цикла проводился мониторинг роста доминантного фолликула и овуляции. На 14–15-й день после подтверждения спонтанной овуляции (УЗИ или мочевого тест на овуляцию) назначали микронизированный прогестерон по 200 мг 3 раза в сутки согласно инструкции к препарату с целью поддержания лютеиновой фазы менструального цикла и посттрансферного периода. День переноса

соответствовал дню спонтанной овуляции + число дней культивирования эмбриона.

2.4.9. Аспирация секрета эндометрия

Аспирация секрета эндометрия осуществлялась атравматичным способом непосредственно перед переносом размороженного эмбриона (за 5 минут до процедуры переноса). Сбор секрета эндометрия проводился с помощью одноразовых гибких катетеров Wallace (Германия) или Cook (Австралия) для ПЭ, соединенного со шприцем (1 мл) под ультразвуковым контролем. Катетер вводился постепенно, избегая травматизации шейки матки или соприкосновения с дном матки. Далее аспирация проводилась путем потягивания поршня шприца с целью создания вакуума в полости матки и непосредственно осуществлялся забор секрета объемом от 5 до 50 мкл в стерильный пробирку с физиологическим раствором 0,9% NaCl в объеме до 200 мкл. Затем полученный материал транспортировался в лабораторию прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) для проведения секвенирования, транскрипционного анализа и ПЦР. Результаты профиля экспрессии мнкРНК получали в течение 4 часов после забора маточного аспирата.

2.4.10. Перенос эмбриона в полость матки и диагностика беременности

Перенос эмбриона производился после подписания добровольного информированного согласия в соответствующий день лютеиновой фазы менструального цикла. В асептических условиях под контролем УЗИ исследования с помощью одноразового катетера компании СООК (Ирландия).

Диагностика наступления беременности производилась путем определения положительного результата В-ХГЧ через 14 дней после переноса. При получении данных о положительном результате В-ХГЧ УЗИ органов малого таза выполняли на 21 день после переноса эмбриона для визуализации плодного яйца в полости матки. Затем УЗИ проводили через 5-6 недель после переноса эмбриона для определения сердцебиения плода. Клиническая

беременность наблюдалась на 21 день при визуализации плодного яйца в полости матки.

2.5. Специальные методы исследования

2.5.1. Идентификация мнкРНК методом глубокого секвенирования из образцов секрета эндометрия

Из собранных образцов секрета эндометрия были выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Семь из четырнадцати микролитров элюата колонки miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), содержащего мнкРНК секрета эндометрия, были использованы для синтеза кДНК-библиотек набором NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11 and Set2, New England Biolab®), амплифицированных в течение 20 циклов в ходе ПЦР, очищенных в 6% полиакриламидном геле и секвенированных на платформе NextSeq 500/550 (Illumina). Секвенированные последовательности в диапазоне от 16 до 50 п.н. были картированы на базы данных человека GRCh38.p15, miRNABase¹ v21 и piRNABase² с использованием алгоритма Bowtie [177]. Анализ дифференциальной экспрессии мнкРНК проводили с помощью программного пакета DESeq2 [118].

2.5.2. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени уровня экспрессии мнкРНК

Пять из четырнадцати микролитров элюата колонки miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), содержащего мнкРНК секрета эндометрия, были использованы для синтеза кДНК набором miScript® II RT Kit (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя. Количественная ПЦР в реальном времени была проведена с использованием набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) и смысловых праймеров, специфичных для определенных микроРНК и пивиРНК. Относительную экспрессию мнкРНК в секрете эндометрия определяли методом Δ Ct, используя hsa_piR_017716 в качестве референсной РНК.

2.6. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц Microsoft Excel и программы RStudio. В связи с распределением признаков, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Статистический анализ проводили с помощью теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Для сравнения категориальных данных статистический анализ проводили с помощью критерия χ^2 . Для анализа зависимости количественных признаков применяли ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

Модели логистической регрессии разрабатывали с использованием программы RStudio путем поэтапного включения и исключения мнкРНК-предикторов рецептивного эндометрия в соответствии с их вкладом в модель. Прогностическую способность модели оценивали методом ROC-анализа (Receiver operating characteristic) по величине AUC (Area Under Curve), статистической значимости, уровню специфичности и чувствительности.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе исследования проанализированы данные 102 супружеских пар, обратившихся для лечения бесплодия в рамках программы ЭКО/ЭКО+ИКСИ и ПЭ в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий отделением д.м.н., профессор Е.А. Калинина) и соответствующие критериям включения и невключения. Был проведен клиничко-анамнестический ретроспективный анализ данных, полученных при проведении стимуляции овуляции, а также проспективный анализ данных групп пациентов при переносе криоконсервированного эмбриона в настоящем исследовании. Молекулярно-биологическое исследование профиля экспрессии мнкРНК в аспириате секрета эндометрия методом глубокого секвенирования (NGS), а также последующая валидация полученных результатов методом ПЦР анализа, была выполнена в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России.

3.1. Клиничко-анамнестическая характеристика групп пациентов, включенных в исследование

При анализе клиничко-анамнестических данных, пациентки были разделены на две сравнительные группы:

Группа 1 (ЦГТ) — 60 пациенток, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ, в последующем вступившие в программу переноса размороженного эмбриона в цикле ЦГТ;

Группа 2 (ЕЦ) — 42 пациентки, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ, в последующем вступившие в программу переноса размороженного эмбриона в ЕЦ.

При анализе возрастных показателей пациенток и их партнеров не было выявлено статистически значимых различий. Средний возраст пациенток, вступивших в криоперенос эмбриона в группе 1 (ЦГТ) — 34 года (26-40 года), а в группе 2 (ЕЦ) составил 33 года (23-40 года), ($p=0,836$). Средний возраст

партнеров, распределенных в соответствии по группам: в группе 1 (ЦГТ) – 37,5 лет (25-55 лет), в группе 2 (ЕЦ) составил – 35 лет (26-54 года) ($p=0,251$) (таблица 3).

Таблица 3. Характеристика возрастных показателей пациентов, включенных в исследование

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Возраст пациенток, лет	34 (29,25;38)	33 (32;37)	0,836
Возраст партнеров, лет	37,5 (33;42)	35 (32,5;40,5)	0,251

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

При изучении антропометрических данных пациенток значимых различий не выявлено. Средний рост в группе 1 (ЦГТ) – 165 (161;168,75), в группе 2 (ЕЦ) – 167 (163;171), $p= 0,093$. Средний показатель ИМТ у пациенток в группе 1 (ЦГТ) являлся 22/60 (21;25), избыточный вес встречался у 13/60 (21,6%) человек, ожирение I степени у 2/60 (3,3%), В группе 2 (ЕЦ) среднее значение ИМТ равно 21,3/42 (20;23), при этом у 6/42 (14,3%) человек отмечался избыточный вес, у 1/42 (2,4%) ожирение I степени ($p = 0,089$) (таблица 4).

Таблица 4. Данные антропометрических показателей, включенных в исследование пациенток

Параметры*	Группа 1(ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Рост, см	165 (161;168,75)	167 (163;171)	0,093
Масса тела, кг	61 (58;65)	60 (56,5;65,5)	0,494
ИМТ, кг/м ²	22 (21;25)	21,3 (20;23)	0,089

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

В ходе сравнительного анализа соматических заболеваний у пациенток, включенных в исследование, было выявлено, что частота встречаемости детских инфекционных заболеваний (краснуха, ветряная оспа, корь, эпидемический паротит) как в группе 1 (ЦГТ) – 45/60 (75,0%), так и в группе 2 (ЕЦ) – 27/42 (64,3%) находится на высоком уровне ($p=0,088$).

Аллергические заболевания, а именно аллергический ринит, а также легкие аллергические реакции на препараты, проявляемые в виде покраснений, сыпи и зуда, были выявлены у 8/60 (13,3%) пациенток в группе 1 (ЦГТ) и 7/42 (16,7%) в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,197$).

Заболевания сердечно-сосудистой системы (пролапс митрального клапана), а также болезни органов дыхания отмечены у 1/60 (1,7%) пациентки в группе 1 (ЦГТ) 1/42 (2,4%) и у пациентки в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,489$).

Среди заболеваний желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, дискинезия желчевыводящих путей) в группе 1 (ЦГТ) наблюдались у 5/60 (8,3%) и в группе 2 (ЕЦ) у 6/42 (14,3%), что не имело статистически значимых отличий между двумя группами ($p=0,160$).

В анамнезе заболеваний мочевыделительной системы у пациенток встречался хронический цистит в стадии ремиссии в группе 1 (ЦГТ) у 3/60 (5,0%) в группе 2 (ЕЦ) также у 3/42 (7,1%) ($p=0,291$).

При вступлении в программу ВРТ, а также при переносе криоконсервированного эмбриона у всех пациенток показатели уровня гормонов щитовидной железы были в пределах референсных значений. При этом в анамнезе у пациенток в группе 1 (ЦГТ) гипотиреоз встречался у 4/60 (6,7%), диффузный зоб 1/60 (1,7%), тиреоидит 4/60 (6,7%), а в группе 2 (ЕЦ) у 4/42 (9,5%), диффузный зоб у 3/42 (7,1%), тиреоидит 3/42 (7,1%). В ходе изучения полученных данных, статистически значимых отличий в заболеваниях эндокринологической системы выявлено не было ($p=0,306$) (таблица 5).

Таблица 5. **Характеристика соматических заболеваний пациенток, включенных в исследование**

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Детские болезни (корь, краснуха, ветрянка)	45 (75,0%)	27 (64,3%)	0,088
Аллергические заболевания	8 (13,3%)	7 (16,7%)	0,197
Болезни сердечно- сосудистой системы	1 (1,7%)	1 (2,4%)	0,489
Болезни органов дыхания	1 (1,7%)	1 (2,4%)	0,489
Болезни желудочно- кишечного тракта	5 (8,3%)	6 (14,3%)	0,160
Болезни мочевыделительной системы	3 (5,0%)	3 (7,1%)	0,291
Болезни эндокринной системы	9 (15,0%)	10 (23,8%)	0,306

Примечание: *данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

В группах 1 (ЦГТ) и 2 (ЕЦ) характеристика менструального цикла, а также сексуальная функция статистически значимо не отличались между собой.

Так, в группе 1 (ЦГТ) средний возраст регистрации менархе (первая менструация) составил 13 лет (12;14), а в группе 2 (ЕЦ) — 14 лет (13;14) ($p=0,071$).

В обеих группах средняя продолжительность менструального цикла была 28 дней ($p=0,964$), а длительность менструации составила 5 дней ($p=0,627$). Болезненные менструации выявлены у 17/60 (28,3%) в группе 1 (ЦГТ) и 15/42 (35,7%) в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,125$). Возраст начала половой жизни не различался в обеих группах и составил в группе 1 (ЦГТ) — 18 (18;19) и в группе 2 (ЕЦ) — 19 (18;20), $p = 0,378$ (таблица 6).

Таблица 6. Данные менструальной и половой функции пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Возраст менархе, лет*	13 (12;14)	14 (13;14)	0,071
Продолжительность менструального цикла, дни*	28 (27,62;29)	28 (27;29,75)	0,964
Длительность менструального цикла, дни*	5 (5;6)	5 (4,5;6)	0,627
Болезненность во время менструации**	17 (28,3%)	15 (35,7%)	0,125
Возраст начала половой жизни, лет*	18 (18;19)	19 (18;20)	0,378

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни, ** данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

В ходе изучения гинекологического анамнеза было отмечено, что у пациенток в группе 1 (ЦГТ) преобладают ИППП в анамнезе и составляют 9/60 (15,0%), а в группе 2 (ЕЦ) приходится 13/42 (31,0%) случаев (p=0,031). Частота встречаемости гинекологических заболеваний (миома матки малых размеров (<4 см), расположенная субсерозно или интрамурально, аденомиоз, НГЭ) сопоставимы в обеих группах. Также в группе 1 (ЦГТ) у 9/60 (15,0%) пациенток в анамнезе выявлен спаечный процесс в малом тазу, в группе 2 (ЕЦ) – у 8/42 (19,0%) (p=0,390) и наличие хронического эндометрита в анамнезе в группе 1 (ЦГТ) у 9/60 (15,0%) и 5/42 (11,9%) в группе 2 (ЕЦ) (p=0,211). (таблица 7).

Таблица 7. Данные гинекологического анамнеза у обследуемых пациенток

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе (ИППП)	9 (15,0%)	13 (31,0%)	0,031
Миома матки малых размеров	2 (3,3%)	5 (11,9%)	0,121
Аденомиоз	3 (5,0%)	2 (4,8%)	0,689
Наружный генитальный эндометриоз I и II стадий распространения (НГЭ)	7 (11,7%)	6 (14,3%)	0,396
Спаечный процесс в малом тазу	9 (15,0%)	8 (19,0%)	0,390
Хронический эндометрит в анамнезе	9 (15,0%)	5 (11,9%)	0,211

Примечание: *данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

При анализе оперативных вмешательств по гинекологическому профилю у пациенток стоит отметить высокий процент проведения диагностической гистероскопии в группе 1(ЦГТ) – 30/60 (50,0%) и в группе 2 (ЕЦ) – 17/42 (40,5%) (p=0,421), а также диагностической лапароскопии в группе 1 (ЦГТ) – 30/60 (50,0%) и в группе 2 (ЕЦ) – 19/42 (45,2%) (p=0,142), что говорит о комплексной подготовке и диагностике внутриматочной патологии перед проведением криопереноса эмбриона. Внутриматочные вмешательства такие, как полипэктомия, а также отдельное диагностическое выскабливание полости матки (РДВ) проводились по показаниям в группе 1 (ЦГТ) у 17/60 пациенток (28,3%) и 13/42 пациенток (31,0%) в группе 2 (ЕЦ) (p=0,167).

Также стоит отметить проведение миомэктомии в анамнезе без вскрытия полости матки у 4/60 (6,7%) в группе 1 (ЦГТ) и 6/42 (14,3%) в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,311$). Коагуляция поверхностных очагов НГЭ была у 9/60 (15,0%) пациенток в группе 1 (ЦГТ) и 9/42 пациенток (21,4%) в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,145$). Стоит отметить, что односторонняя тубэктомия в группе 1 (ЦГТ) была выявлена у 10/60 (16,7%), двусторонняя у 2/60 (3,3%), тогда как в группе 2 (ЕЦ) односторонняя у 3/42 (7,1%), двусторонняя у 4/42 (9,5%). При анализе данных гинекологических операций не выявлены статистически значимые отличия в двух группах (таблица 8).

Таблица 8. Характеристика гинекологических операций в исследуемых группах

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Полипэктомия, РДВ	17 (28,3%)	13 (31,0%)	0,167
Миомэктомия в анамнезе	4 (6,7%)	6 (14,3%)	0,311
Коагуляция очагов НГЭ	9 (15,0%)	9 (21,4%)	0,145
Тубэктомия	12 (20,0%)	7 (16,7%)	0,798
Манипуляции на шейке матки	7 (11,7%)	6 (14,3%)	0,216
Гистероскопия, РДВ	30 (50,0%)	17 (40,5%)	0,421
Диагностическая лапароскопия	30 (50,0%)	19 (45,2%)	0,142

Примечание: *данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

При изучении акушерско-гинекологического анамнеза у пациенток количество родов в группе 1 (ЦГТ) составило 22/60 (36,7%), а в группе 2 (ЕЦ) – 16/42 (38,1%), что указывает на наличие имплантации в полости матки, однако наблюдается высокий процент неразвивающихся беременностей в

обеих группах ($p=0,336$). По остальным параметрам статистически значимых различий в двух группах не наблюдалось (таблица 9).

Таблица 9. **Исходы беременностей у пациенток в анамнезе**

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Роды	22 (36,7%)	16 (38,1%)	0,162
Преждевременные роды	1 (1,7%)	0 (0%)	0,588
Аборты	4 (6,7%)	5 (11,9%)	0,181
Самопроизвольный выкидыш	5 (8,3%)	5 (11,9%)	0,218
Неразвивающиеся беременности	16 (26,7%)	7 (16,7%)	0,336
Внематочные беременности	9 (15,0%)	5 (11,9%)	0,211

Примечание: *данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

В ходе изучения репродуктивного анамнеза пациенток были выявлены повышенные показатели вторичного бесплодия в обеих группах по сравнению с первичным бесплодием. В группе 1 (ЦГТ) первичное бесплодие выявлено у 24/60 (40,0%), вторичное у 36/60 (60,0%). В группе 2 (ЕЦ) первичное бесплодие встречалось у 18/42 (42,9%), тогда как вторичное бесплодие у 24/42 (57,1%). В группе 1 (ЦГТ) изолированный трубно-перитонеальный фактор (ТПФ) встречался у 10/60 пациенток (16,7%), изолированный мужской фактор (МФ) у 36/60 (60,0%), сочетанный фактор бесплодия 12/60 (20,0%), бесплодие, обусловленное НГЭ у 2/60 (3,3%), тогда как в группе 2 (ЕЦ) – ТПФ у 9/42 пациенток (21,4%), МФ у 26/42 (61,9%), сочетанное бесплодие у 5/42 (11,9%), НГЭ у 2/42 (4,8%). Средние показатели числа попыток ЭКО/ЭКО +ИКСИ в

анамнезе и частота наступления беременности были сопоставимы и не имели статистической значимости (таблица 10).

Таблица 10. Характеристика репродуктивного анамнеза у пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Продолжительность бесплодия, лет*	4 (2;5)	3,5 (2,25;5)	0,933
Первичное бесплодие**	24 (40,0%)	18 (42,9%)	0,466
Вторичное бесплодие**	36 (60,0%)	24 (57,1%)	0,150
Трубно-перитонеальный фактор (ТПФ)**	10 (16,7%)	9 (21,4%)	0,161
НГЭ**	2 (3,3%)	2 (4,8%)	0,547
Мужской фактор (МФ)**	36 (60,0%)	26 (61,9%)	0,506
Сочетанный фактор	12 (20,0%)	5 (11,9%)	0,419
Число попыток ЭКО/ЭКО+ИКСИ в анамнезе*	1 (1;2)	1 (1;2)	0,912
Число беременностей после ЭКО/ЭКО+ИКСИ в анамнезе*	1 (0;2)	1 (0;2)	0,889

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни, **данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

3.2. Характеристика гормонального статуса пациенток

На 2-3 и 21-22 день менструального цикла проведена оценка гормонального статуса пациенток. Параметры гормонального статуса до вступления в программу ВРТ у всех пациенток соответствовали референсным значениям (таблица 11).

Таблица 11. **Характеристика гормонального статуса пациенток, включенных в исследование, до вступления в программу ВРТ**

Базовый уровень гормонов*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p – уровень значимости
ФСГ, МЕ/л	7,01 (5,83;8,25)	6,3 (5,2;7,3)	0,050
АМГ, нг/мл	3,21 (1,96;5,1)	4,1 (2,88;5,1)	0,253
ЛГ, МЕ/л	5,46 (4,21;7,26)	5,8 (4,3;6,67)	0,990
Эстрадиол, пмоль/л	216,5 (170,2;279,6)	225 (180,05;272,2)	0,870
Прогестерон, нмоль/л (лютеиновая фаза)	33,5 (18,68;45,82)	38,9 (30,4;52,45)	0,029
Тестостерон, нмоль/л	1,04 (0,7;1,69)	1,3 (0,8;1,8)	0,362
ТТГ, мМЕ/л	1,72 (1,3;2,45)	2,26 (1,65;2,7)	0,027
Т4, пмоль/л	12,3 (11,6;13,78)	13,3 (12,25;14,7)	0,039
ДГЭА-С, мкмоль/сут	4,14 (2,8;8,12)	5,2 (2,7;9,65)	0,609
17 ОН, нмоль/л	1,77 (1,16;2,58)	2,1(1,35;2,7)	0,522
Кортизол, нмоль/л	325 (226,5;408,58)	320,2 (221,5;358)	0,503
Пролактин, мМЕ/л	225,65 (150;301,25)	274 (225,45;325,45)	0,013

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

Выявлены статистически значимые отличия пациенток по уровню ТТГ в группе 1 (ЦГТ) – 1,72 (1,3;2,45) и в группе 2 (ЕЦ) – 2,26 (1,65;2,7), p = 0,027; по уровню Т4 в группе 1 (ЦГТ) средние показатели составили 12,3 (11,6;13,78), в группе 2 (ЕЦ) – 13,3 (12,25;14,7), p = 0,027; по уровню пролактина в группе 1 (ЦГТ) – 225,65 (150;301,25), в группе 2 (ЕЦ) – 274 (225,45;325,45), p = 0,013, а также по уровню ФСГ в группе 1 (ЦГТ) – 7,01 (5,83;8,25), в группе 2 (ЕЦ) – 6,3 (5,2;7,3), p=0,050, соответственно. Уровень прогестерона в группе 1 (ЦГТ) составил 33,5 (18,68;45,82), в группе 2 (ЕЦ) – 38,9 (30,4;52,45), p = 0,029.

Таким образом, снижение среднего уровня прогестерона в группе 1 (ЦГТ) может быть связано с НЛФ, в связи с чем потребовалась поддержка

гормональными препаратами, согласно индивидуальным особенностям пациенток, в отличие от группы 2 (ЕЦ), где у пациенток отмечалась самостоятельная овуляция и собственная полноценная лютеиновая фаза.

3.3. Характеристика анализируемых групп при проведении овариальной стимуляции

3.3.1. Характеристика протоколов овариальной стимуляции в программе ВРТ

При проведении стимуляции функции яичников на 2-3 день менструального цикла пациенткам на первом этапе назначали препараты антагониста ГнРГ и р-ФСГ по стандартному протоколу, учитывая индивидуальные особенности пациенток. В качестве триггера овуляции вводили чХГ в дозе 8 000–10 000 МЕ внутримышечно (таблица 12).

Таблица 12. Характеристика протоколов овариальной стимуляции пациенток, включенных в исследование

Параметр*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p-уровень значимости
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	1500 (1200;1875)	1350 (1087;1650)	0,089
Длительность стимуляции, дни	17 (16;18)	18 (17,5;19)	0,014
День начала стимуляции	3 (2;3)	3 (3;4)	0,161
День введения триггера (по циклу)	12 (10;13)	12 (10,5;12)	0,424
День ТВП (по циклу)	14 (12;15)	14 (12,5;14)	0,476

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

В ходе анализа обнаружено отсутствие статистически значимых отличий между двумя группами по таким показателям, как суммарная доза препарата, день начала стимуляции, введение триггера и непосредственно оптимальный выбор дня ТВП по данным УЗИ. Однако выявлены различия в

продолжительности дней стимуляции в группе 1 (ЦГТ) — 17 (16; 18), в группе 2 (ЕЦ) — 18 (17,5; 19), $p=0,014$

3.3.2. Характеристика спермиологического исследования

В день ТВП у партнеров проводился забор биологического материала с целью последующего анализа эякулята (таблица 13).

Таблица 13. **Характеристика анализа эякулята в день проведения ТВП у пациентов, включенных в исследование**

Параметры*	Группа 1 (n = 60)	Группа 2 (n = 42)	p- уровень значимости
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл в день ТВП, млн	57 (27,25;78,75)	42 (21;65,5)	0,159
% прогрессивно подвижных сперматозоидов	47 (27,5;60)	42 (28,5;55)	0,417
% морфологически нормальных сперматозоидов	2 (2;3)	2 (1;3)	0,073

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

Таким образом, полученные результаты не отличались по параметрам спермограммы в обеих группах.

3.3.3. Характеристика эмбриологического этапа и частоты наступления беременности в программе переноса нативного эмбриона

При сравнительном анализе двух групп не было выявлено различий по количеству ОКК, числу зрелых ооцитов (МII), а также числу оплодотворенных ооцитов (зигот 2PN2PB). Процедура вспомогательного хэтчинга (микроманипуляция, которая способствует рассечению оболочки эмбриона с целью облегчения вылупления эмбриона, если оболочка плотная или после размораживания) в группе 1(ЦГТ) выполнена у 43/60 (71,6%), в группе 2 (ЕЦ)

у 32/42 (76,0%), $p=0,655$. Кроме того, не было выявлено отличий при количестве переносимых и криоконсервированных эмбрионов в программе, предшествующей настоящему исследованию (таблица 14).

Таблица 14. **Характеристика фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток, включенных в исследование**

Параметры	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p – уровень значимости
Число полученных ооцитов в день ТВП*	10 (6;15)	10 (6;16)	0,965
Количество ОКК*	10 (6;15)	10 (6;16)	0,990
Количество зрелых ооцитов МП*	8 (6;11)	8 (4,5;12)	0,990
Количество зигот*	7 (5;10)	7 (4;10)	0,630
Хетчинг**	43 (71,6%)	32 (76,0%)	0,655
Количество переносимых эмбрионов*	1 (0;1)	0 (0;1)	0,047
Количество криоконсервированных эмбрионов в программе*	3 (2;4,75)	4 (2;5)	0,705
Частота наступления беременности в программе переноса нативного эмбриона**	17 (28,3%)	11 (26,2%)	0,497

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни, **данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

В ходе анализа ЧНБ у пациенток в протоколе стимуляции овуляции яичников, выявлено, что среди пациенток группы 1 (ЦГТ) беременность наступила у 17/60 пациенток (28,3%), среди пациенток группы 2 (ЕЦ) у 11/42 (26,2%), ($p=0,17$)

3.4. Характеристика анализируемых групп при проведении переноса криоконсервированного эмбриона

При последующем анализе групп пациенток в рамках проведения переноса криоконсервированного эмбриона были выявлены статистически значимые отличия параметров группы 1 (ЦГТ) и группы 2 (ЕЦ) по толщине эндометрия в день переноса эмбриона ($p < 0,001$) (таблица 15).

Таблица 15. Характеристика анализируемых групп при проведении переноса криоконсервированного эмбриона

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n = 60)	Группа 2 (ЕЦ) (n = 42)	p – уровень значимости
День менструального цикла в день переноса	20 (19;20)	19 (18;20)	0,072
Толщина эндометрия в день переноса эмбриона	8,5 (8,33;9,43)	10 (9,1;10,5)	<0,001

Примечание: *данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Манна-Уитни.

По таким параметрам как день менструального цикла в день переноса эмбриона в полость матки статистически значимых различий групп 1 (ЦГТ) и 2 (ЕЦ) не было выявлено.

3.4.1. Сравнительный анализ исходов программы переноса размороженного эмбриона в полость матки

При проведении переноса размороженного эмбриона в настоящем исследовании в группе 1 (ЦГТ) беременность наступила у 24/60 (40,0%) пациенток и у 19/42 (45,2%) в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,683$). Из них частота родов в расчете на беременность (%) группе 1 (ЦГТ) у 21/24 (87,5%) и в группе 2 (ЕЦ) у 16/19 (84,2%), соответственно ($p=0,450$). Самопроизвольный выкидыш (до 12 нед) в расчете на перенос эмбриона наблюдался у 1/42 (2,4%) пациентки в группе 2 (ЕЦ) ($p=0,412$). Неразвивающаяся беременность в расчете на

беременность в группе 1 (ЦГТ) закончилась у 3/24 (12,5%) пациенток, в группе 2 (ЕЦ) у 2/19 (10,5%), $p=0,689$. Данным пациенткам была проведена вакуум-аспирация плодного яйца с последующем выскабливанием полости матки. Внематочная беременность не наблюдалась ни в одной из групп (таблица 16).

Таблица 16. **Характеристика исходов программы переноса размороженного эмбриона у пациенток, включенных в исследование**

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n=60)	Группа 2 (ЕЦ) (n=42)	p–уровень значимости
Частота наступления беременности, %	24/60 (40,0%)	19/42 (45,2%)	0,683
Частота неразвивающихся беременностей в расчете на беременность, %	3/24 (12,5%)	2/19 (10,5%)	0,689
Частота самопроизвольных выкидышей (до 12 нед) в расчете на перенос эмбриона, %	0 (0%)	1/42 (2,4%)	0,412
Частота родов в расчете на беременность, %	21/24 (87,5%)	16/19 (84,2%)	0,450

Примечание: *данные представлены как абсолютные значения и % с использованием двустороннего точного критерия Фишера

Таким образом, учитывая вышесказанное, не было выявлено статистически значимых отличий при сравнении исходов переноса размороженного эмбриона в полость матки между двумя группами.

3.5. Корреляционный анализ клинических, лабораторных и инструментальных данных в различных группах пациенток

При проведении переноса размороженного эмбриона в группе 1 (ЦГТ) был проведен корреляционный анализ количественных переменных с учетом статистической значимости каждой из них.

Выявлена статистически значимая отрицательная направленность корреляционных связей между возрастом пациенток и уровнем АМГ ($p = 0,0077$, коэффициент корреляции $r = -0,36$), прогестерона ($p = 0,03$, $r = -0,29$), количеством зрелых ооцитов ($p = 0,002$, $r = -0,4$), зигот ($p = 0,008$, $r = -0,36$). Выявлена статистически значимая отрицательная направленность корреляционных связей между уровнем ФСГ с уровнем АМГ ($p = 0,0002$, $r = -0,48$), количеством зрелых ооцитов ($p = 0,0217$, $r = -0,31$), зигот ($p = 0,05$, $r = -0,26$), а также с числом криоконсервированных эмбрионов ($p = 0,0026$, $r = -0,4$). Уровень АМГ отрицательно коррелирует с количеством беременностей в анамнезе ($p = 0,0124$, $r = -0,34$). Мужской фактор бесплодия отрицательно коррелирует с % морфологически нормальных сперматозоидов ($p = 0,002$, $r = -0,4$) и с % прогрессивно-подвижных сперматозоидов. Количество попыток ЭКО в анамнезе положительно коррелирует с возрастом пациенток ($p = 0,001$, $r = 0,43$). Количество криоконсервированных эмбрионов отрицательно коррелирует с возрастом пациенток ($p = 0,0001$, $r = -0,44$), с возрастом партнеров ($p = 0,0076$, $r = -0,36$), с уровнем ФСГ ($p = 0,0026$, $r = -0,4$). День менструального цикла в день переноса эмбриона напрямую коррелировал с продолжительностью цикла ($p = 0,0457$, $r = 0,27$). Толщина эндометрия в день переноса эмбриона напрямую коррелировала с уровнем прогестерона ($p = 0,04$, $r = 0,28$).

В группе 1 (ЦГТ) при сравнении исходов программы: беременность наступила ($n=24$) и беременность не наступила ($n=36$). Были найдены статистически значимые отличия групп: по уровню прогестерона ($p<0,001$), тестостерона ($p=0,02$) и толщине эндометрия в день переноса эмбриона ($p<0,001$). Значения медиан, а также 1 и 3 квартилей числовых значений исследуемых параметров представлены во вставке на рисунке 4. При этом у пациенток с положительным результатом наблюдались более высокие средние показатели уровня прогестерона и толщины эндометрия, но сниженный уровень тестостерона относительно пациенток с отрицательным исходом криопереноса, о чем свидетельствуют данные, представленные на рисунке 4.

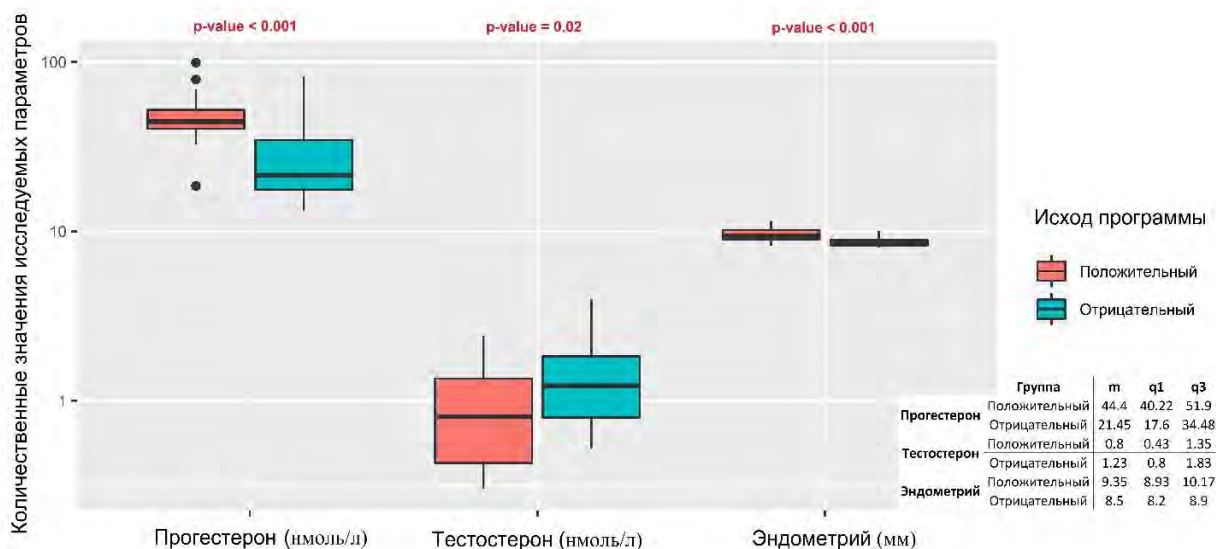


Рисунок 4. Бокс-диаграмма зависимости исходов программы переноса криоконсервированного эмбриона в группе 1 в зависимости от толщины эндометрия, базовых уровней прогестерона и тестостерона.

При проведении переноса размороженного эмбриона в группе 2 (ЕЦ) для количественных клиничко-анамнестических данных были получены коэффициенты корреляций и оценена статистическая значимость каждого из них.

Возраст женщин отрицательно коррелировал с уровнем АМГ ($p = 0,0001$, $r = -0,59$) и положительно коррелировал с уровнем ФСГ ($p = 0,002$, $r = 0,47$), с количеством зрелых ооцитов ($p = 0,003$, $r = 0,45$). Уровень АМГ напрямую коррелировал с количеством полученных ОКК ($p = 0,01$, $r = 0,41$), зигот ($p = 0,02$, $r = 0,36$), криоконсервированных эмбрионов ($p = 0,03$, $r = 0,34$). Уровень ФСГ отрицательно коррелировал с уровнем АМГ ($p = 0,0073$, $r = -0,42$). Мужской фактор бесплодия отрицательно коррелирует с % морфологически нормальных сперматозоидов ($p = 0,0001$, $r = -0,59$). Количество попыток ЭКО в анамнезе напрямую коррелирует с возрастом женщины ($p = 0,004$, $r = 0,45$).

В группе 2 (ЕЦ) были установлены статистически значимые отличия по уровню прогестерона между пациентками с наступившей беременностью ($n=19$) и пациентками, у которых беременность не наступила ($n=23$) ($p < 0,001$).

Значения медиан, а также 1 и 3 квартилей числовых значений исследуемых параметров представлены во вставке на рисунке 5. При этом у пациенток с положительным результатом наблюдался более высокий уровень базового прогестерона относительно пациенток с отрицательным исходом криопереноса, о чем свидетельствуют данные, представленные на рисунке 5 [32].

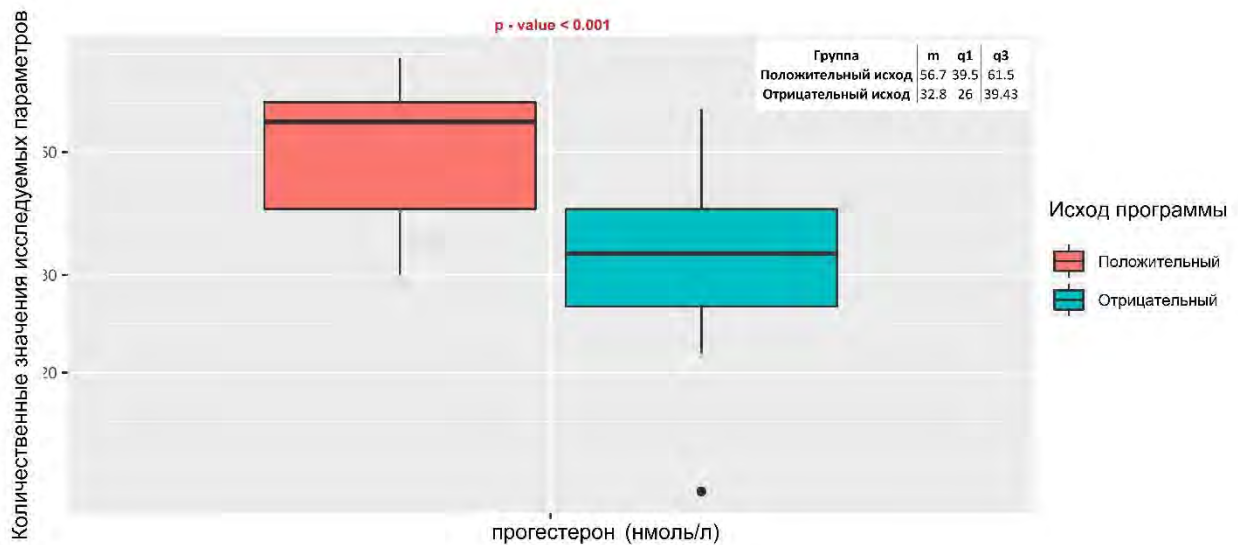


Рисунок 5. Бокс-диаграмма зависимости исходов переноса криоконсервированных эмбриона в группе 2 от уровня прогестерона.

Таким образом, клинический портрет пациенток в различных группах подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона статистически значимо не различался между собой и соответствовал критериям включения в исследование.

3.6. Оценка рецептивности эндометрия по уровню мнкРНК в маточном аспирате у женщин на фоне циклической гормональной терапии в программе переноса размороженного эмбриона

На следующем этапе работы, для оценки рецептивности эндометрия и прогнозирования исходов, ретроспективно, методом глубокого секвенирования в лаборатории прикладной транскриптомики отдела

системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) проведена количественная оценка мнкРНК (микроРНК и пивиРНК) 31 образца секрета эндометрия, собранных непосредственно перед проведением переноса размороженного эмбриона (за 5 минут до переноса) у женщин в группе 1 (ЦГТ). В 15 образцах секрета эндометрия от женщин с отсутствием имплантации эмбриона и в 16 образцах секрета эндометрия от женщин с наступившей беременностью было идентифицировано 289 микроРНК и 488 пивиРНК. Из данного списка мнкРНК в программе RStudio путем поэтапного включения и исключения каждой молекулы были найдены оптимальные комбинации мнкРНК-маркеров рецептивного эндометрия в соответствии с их вкладом в построение моделей логистической регрессии (рисунок 6), где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала степень готовности эндометрия к имплантации (0 – имплантация, 1 – отсутствие имплантации). Все модели, построенные по содержанию микроРНК (рисунок 6А) и пивиРНК (рисунок 6Б) в секрете эндометрия, были статистически значимы и обладали высокой чувствительностью (84–100%), а значит высокой диагностической ценностью наличия рецептивного эндометрия в день переноса криоконсервированного эмбриона. Более низкие значения чувствительности построенных моделей (65–87%) могут быть обусловлены отсутствием информации об имплантационном потенциале эмбриона, переносимого в полость матки, которую можно получить до этапа криоконсервации на стадии морулы или бластоцисты [58], так как причиной отсутствия имплантации может быть не только нарушение формирования рецептивного эндометрия, но и качество самого эмбриона.

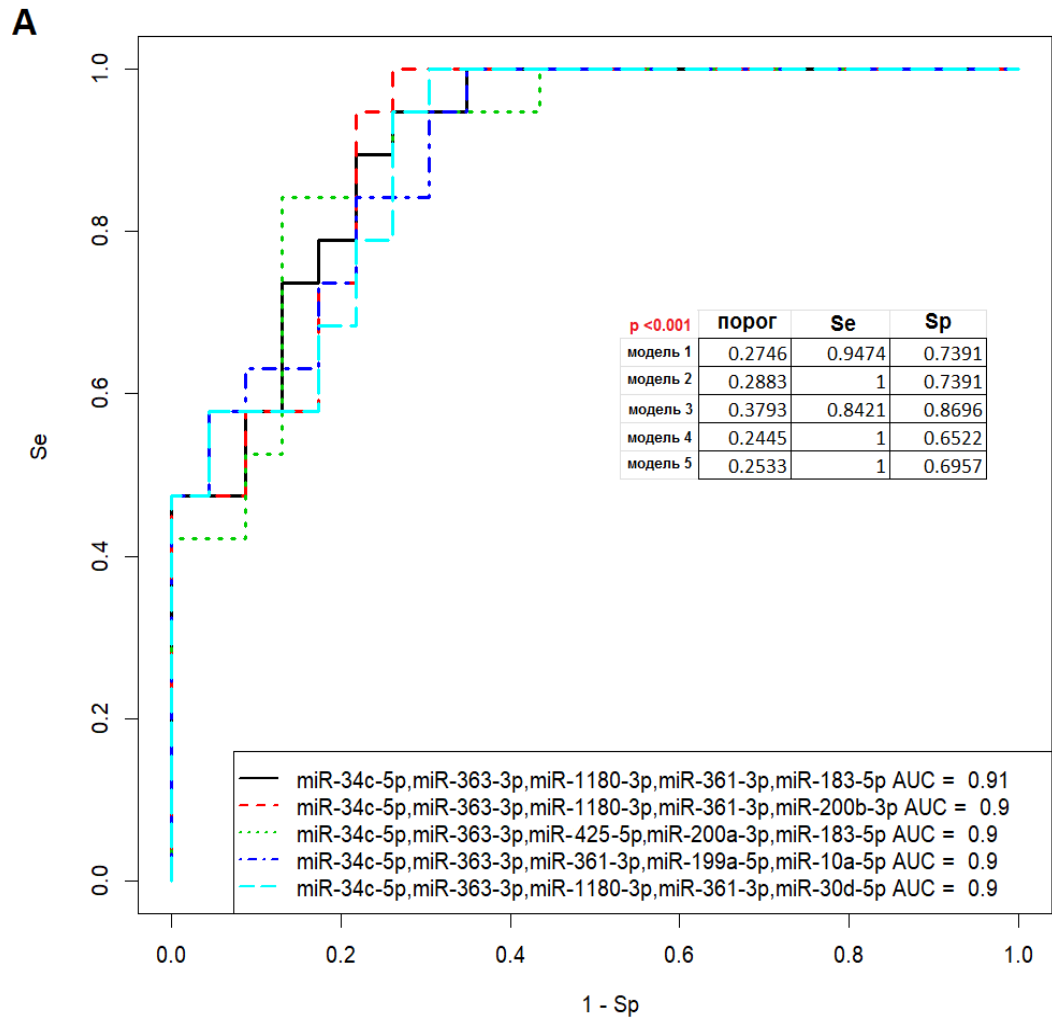


Рисунок 6 (А). Модели логистической регрессии определения готовности эндометрия к имплантации размороженного эмбриона в группе 1 на фоне ЦГТ по данным глубокого секвенирования микроРНК в секрете эндометрия. Se – чувствительность, Sp – специфичность. Идентификационные номера указанных микроРНК – в базе данных miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>).

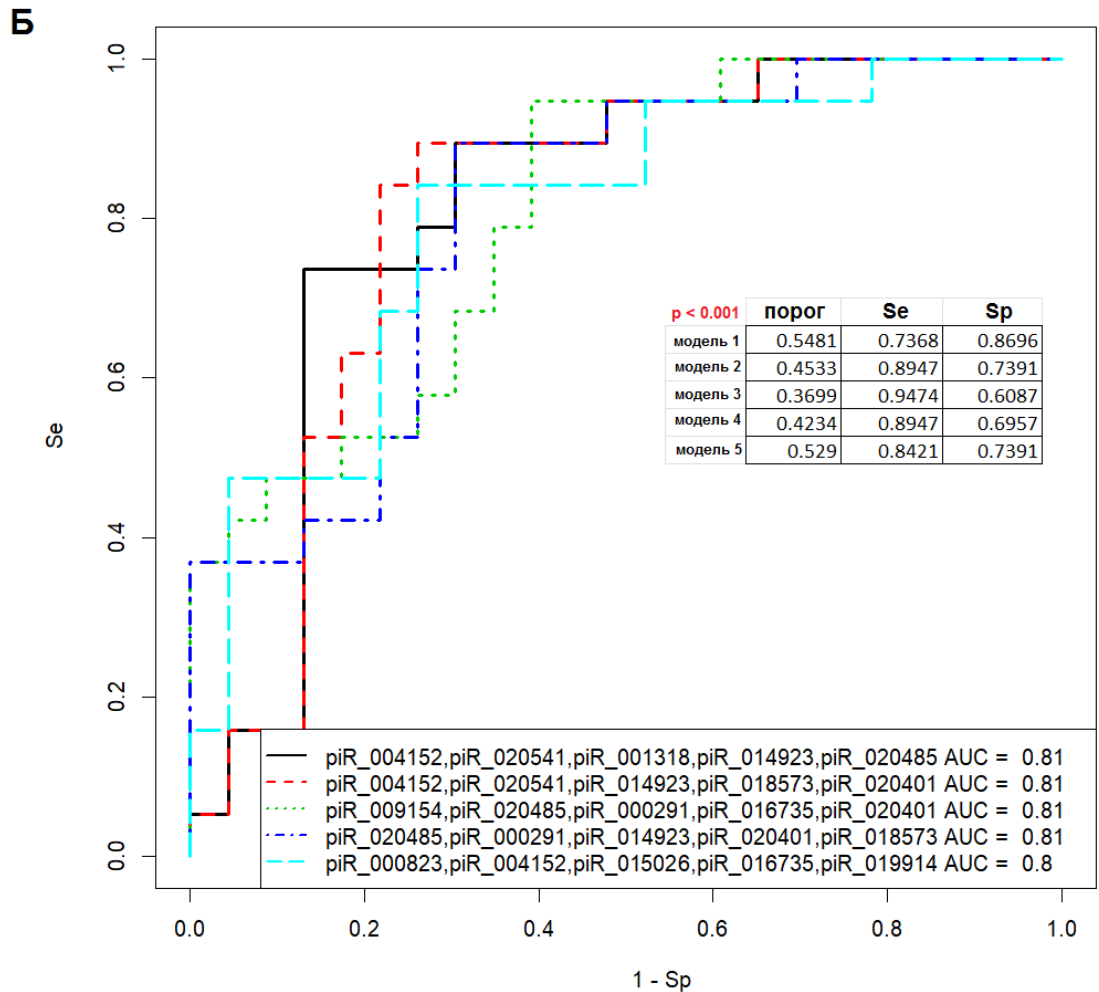


Рисунок 6 (Б). Модели логистической регрессии определения готовности эндометрия к имплантации размороженного эмбриона в группе 1 на фоне ЦГТ по данным глубокого секвенирования пивиРНК в секрете эндометрия. Se – чувствительность, Sp – специфичность. Идентификационные номера указанных пивиРНК – в базе данных piRNAbank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/cgi-bin/accession.cgi>).

Данные секвенирования были валидированы методом количественной ПЦР в реальном времени на всей выборке пациентов, указанных в таблицах 3-16. По значениям «-ΔCt» для микроРНК и пивиРНК, полученных как указано в Главе № 2 «Материалы и Методы Исследования» и в статье Тимофеевой А.В. [36], были построены модели логистической регрессии (рисунок 7) в программе RStudio путем нахождения оптимальной комбинации мнкРНК при поэтапном включении и исключении анализируемых молекул в соответствии с их вкладом в построение модели, где в качестве зависимой переменной

(переменной отклика) выступала готовность эндометрия к имплантации эмбриона.

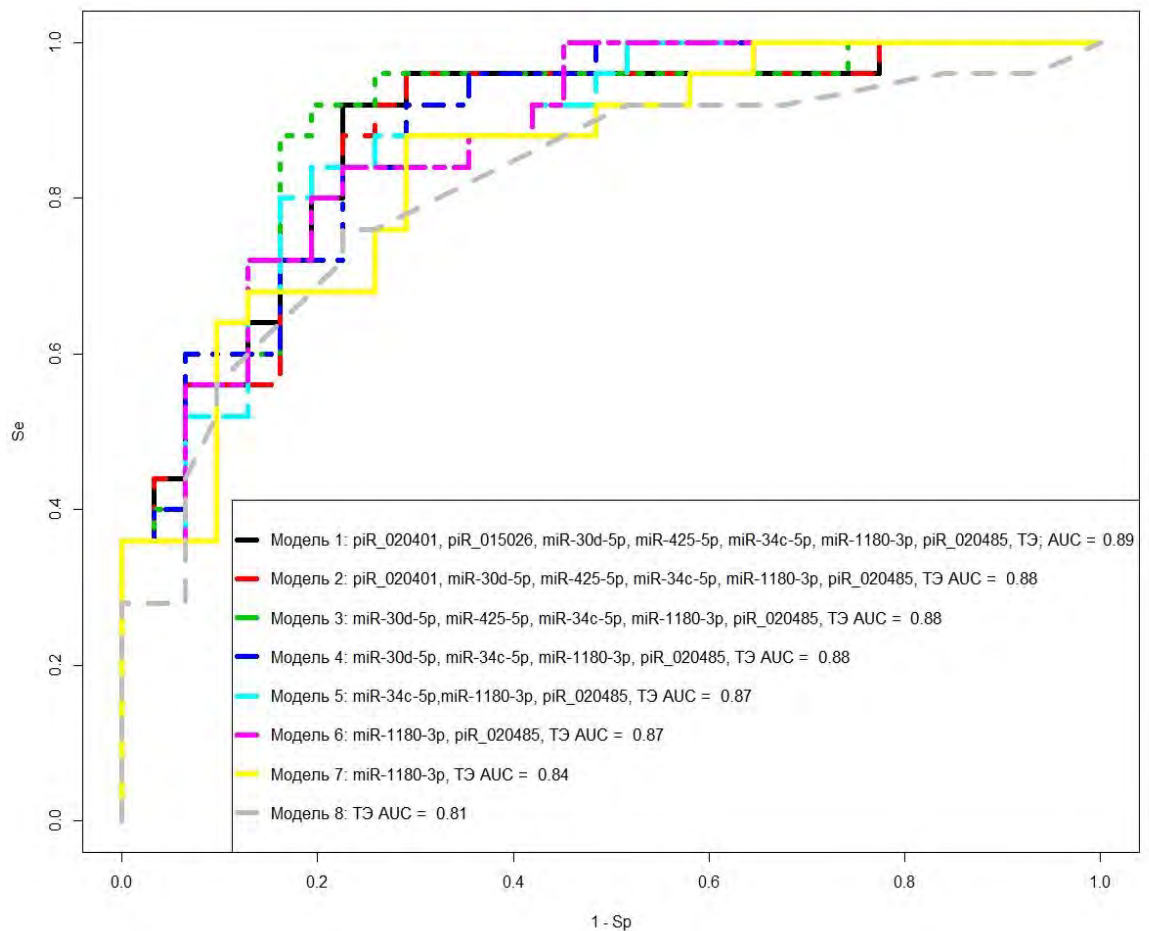


Рисунок 7. Модели логистической регрессии определения готовности эндометрия к имплантации криоконсервированного эмбриона в группе 1 на фоне ЦГТ по данным количественной ПЦР в реальном времени. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Была найдена комбинация из объясняющих переменных (модель 1 рисунок 7), имеющая наибольшую площадь под кривой (AUC=0,89) и состоящая из семи мнкРНК и показателя - толщина эндометрия (ТЭ). Методом обратного исключения из модели 1 рисунка 7 пошагово удаляли по одной самой незначимой объясняющей переменной с получением моделей 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, где каждая последующая модель является производной от предыдущей (таблица 17).

Таблица 17. Характеристики моделей логистической регрессии

Рисунка 7

Коэффициенты	Значения коэффициентов (95% ДИ)	Критерий Вальда	Значение статистической значимости	ОШ (95% ДИ)	S, %	Se, %
Модель 1					92	77
(Intercept)	14,93 (2,29;30,13)	2,15	0,03	3,07E+06 (9,96;1,23E+13)		
piR_020401	0,19 (-0,3;0,74)	0,73	0,46	1,21 (0,73;2,1)		
piR_015026	0,15 (-0,37;0,7)	0,58	0,55	1,17 (0,68;2,02)		
miR-30d-5p	0,8 (-0,37;2,23)	1,23	0,21	2,24 (0,69;9,3)		
miR-425-5p	-0,49 (-1,63;0,49)	-0,92	0,35	0,61 (0,19;1,64)		
miR-34c-5p	-0,28 (-0,91;0,27)	-0,98	0,32	0,74 (0,4;1,32)		
miR-1180-3p	0,54 (0,07;1,13)	2,09	0,03	1,73 (1,07;3,1)		
piR_020485	-0,44 (-1,08;0,08)	-1,53	0,12	0,64 (0,33;1,09)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,93 (-3,41;-0,82)	-2,96	0	0,14 (0,03;0,43)		
Модель 2					96	71
(Intercept)	14,98 (2,43;30,07)	2,17	0,02	3,21E+06 (11,4;1,15E+13)		
piR_020401	0,12 (-0,32;0,6)	0,54	0,58	1,13 (0,72;1,82)		
miR-30d-5p	0,74 (-0,4;2,1)	1,17	0,23	2,1 (0,66;8,22)		
miR-425-5p	-0,46 (-1,58;0,5)	-0,89	0,37	0,62 (0,2;1,66)		
miR-34c-5p	-0,28 (-0,89;0,27)	-0,99	0,32	0,75 (0,4;1,31)		
miR-1180-3p	0,53 (0,06;1,11)	2,07	0,03	1,71 (1,06;3,04)		
piR_020485	-0,36 (-0,92;0,09)	-1,44	0,14	0,69 (0,39;1,1)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,96 (-3,44;-0,84)	-2,99	0	0,14 (0,03;0,42)		
Модель 3					92	81
(Intercept)	14,38 (2,09;28,99)	2,13	0,03	1,78E+06 (8,16;3,9E+12)		
miR-30d-5p	0,77 (-0,35;2,13)	1,24	0,21	2,17 (0,69;8,46)		
miR-425-5p	-0,47 (-1,57;0,49)	-0,91	0,35	0,62 (0,2;1,63)		
miR-34c-5p	-0,3 (-0,9;0,23)	-1,09	0,27	0,73 (0,4;1,26)		
miR-1180-3p	0,59(0,17;1,13)	2,5	0,01	1,81(1,18;3,11)		
piR_020485	-0,3 (-0,79;0,1)	-1,36	0,17	0,73 (0,45;1,11)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,89 (-3,29;-0,81)	-3,01	0	0,15 (0,03;0,44)		
Модель 4					92	71
(Intercept)	17,72 (7,48;30,77)	3,02	0	5,01E+07 (1,77E+03;2,33E+13)		
miR-30d-5p	0,29 (-0,3;0,96)	0,94	0,34	1,34 (0,73;2,62)		
miR-34c-5p	-0,28 (-0,87;0,26)	-1	0,31	0,75 (0,41;1,3)		

miR-1180-3p	0,54 (0,13;1,05)	2,4	0,01	1,72 (1,14;2,87)		
piR_020485	-0,23 (-0,66;0,14)	-1,16	0,24	0,78 (0,51;1,15)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,94 (-3,35;-0,9)	-3,15	0	0,14 (0,03;0,4)		
Модель 5					84	81
(Intercept)	19,71 (10,2;32,19)	3,56	0	3,65E+08 (2,71E+04;9,6E+13)		
miR-34c-5p	-0,05 (-0,35;0,22)	-0,36	0,71	0,94 (0,7;1,25)		
miR-1180-3p	0,53 (0,13;1,02)	2,41	0,01	1,7 (1,14;2,8)		
piR_020485	-0,26 (-0,69;0,09)	-1,36	0,17	0,76 (0,5;1,1)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-2,08 (-3,45;-1,07)	-3,47	0	0,12 (0,03;0,34)		
Модель 6					84	77
(Intercept)	19,99 (10,67;32,37)	3,66	0	4,84E+08 (4,33E+04;1,15E+14)		
miR-1180-3p	0,51 (0,12;0,99)	2,41	0,01	1,67 (1,13;2,69)		
piR_020485	-0,27 (-0,69;0,08)	-1,42	0,15	0,75 (0,49;1,09)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-2,07 (-3,43;-1,06)	-3,48	0	0,12 (0,03;0,34)		
Модель 7					88	71
(Intercept)	19,14 (10,21;30,77)	3,7	0	2,07E+08 (2,72E+04;2,33E+13)		
miR-1180-3p	0,3 (0,04;0,63)	2,07	0,03	1,36 (1,04;1,88)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,9 (-3,11;-0,97)	-3,53	0	0,14 (0,04;0,37)		
Модель 8					76	77
(Intercept)	15,88 (7,86;26,06)	3,45	0	7,93E+06 (2,6E+03;2,09E+11)		
Толщина эндометрия (ТЭ)	-1,75 (-2,9;-0,85)	-3,38	0	0,17 (0,05;0,42)		

В результирующей модели 7 рисунка 7 все объясняющие переменные оказались статистически значимыми (таблица 17) и независимыми по данным корреляционного анализа по Спирмену ($r=0,02$, $p=0,9$). Специфичность и чувствительность модели 7 рисунка 7 составила 88 и 71%, соответственно, что говорит о высокой диагностической значимости экспрессии miR-1180-3p в секрете эндометрия и измерения толщины эндометрия для определения

готовности эндометрия к имплантации размороженного эмбриона в день переноса. Формула расчета вероятности рецептивного эндометрия для модели 7 рисунка 7 представлена ниже:

Формула модели 7 (рисунок 7):

$$\frac{1}{1+e^{-19.15-0.31x_1+1.905x_2}}$$
, где x_1 : $-\Delta Ct$ (miR-1180-3p), x_2 : толщина эндометрия (мм).

3.7. Тестирование построенных математических моделей оценки экспрессии мнкРНК маточного аспирата пациенток при переносе размороженного эмбриона на фоне циклической гормональной терапии

На следующем этапе проспективно проведена валидация разработанной тест-системы в образцах секрета эндометрия у 8 случайно отобранных пациентов в группе 1 (ЦГТ) с конкретными клиническими характеристиками (таблица 18).

Таблица 18. Результаты расчета вероятности готовности эндометрия к имплантации в программе ВРТ на фоне ЦГТ при использовании модели 7 (рисунок 7).

Пациент	Модель 7 Рисунок 7 (пороговый уровень – 0.68)		Результат программы ВРТ (0 – имплантация, 1 – отсутствие имплантации), подтвержденный лабораторными методами исследования
	Вероятность готовности эндометрия к имплантации эмбриона	Прогноз (0 – имплантация, 1 – отсутствие имплантации)	
1	0,35	1	1
2	0,05	1	1
3	0,11	1	1
4	0,09	1	1
5	0,93	0	0
6	0,76	0	0
7	0,73	0	0
8	0,80	0	0

Подтверждается, что модель номер 7 обладает наибольшей точностью и прогностической ценностью, а именно количественный анализ miR-1180-3p в секрете эндометрия в сочетании с оценкой толщины эндометрия в день криопереноса. Модель 7 показала свою клиническую значимость, а полученная микроРНК может стать дополнительным неинвазивным маркером рецептивности эндометрия при переносе криоконсервированного эмбриона на фоне ЦГТ. Важно отметить, что однофакторная модель, включающая лишь толщину эндометрия, обладает меньшей специфичностью для оценки рецептивности (модель 8 рисунок 7, Sp=76%) как указано в таблице 17.

3.8. Тестирование построенных математических моделей оценки экспрессии мнкРНК маточного аспирата пациенток при переносе размороженного эмбриона в естественном цикле

Молекулы мнкРНК, ассоциированные с рецептивностью эндометрия в группе 1 (ЦГТ), были проверены на способность диагностировать готовность эндометрия к имплантации криоконсервированного эмбриона в группе 2 (ЕЦ) у пациентов, охарактеризованных в таблицах 3-16. По значениям «-ΔSt» для микроРНК и пивиРНК, полученных методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, были построены три модели логистической регрессии с наиболее оптимальными комбинациями мнкРНК (рисунок 8) в программе RStudio путем поэтапного включения и исключения анализируемых молекул в соответствии с их вкладом в построение модели, где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала толщина эндометрия.

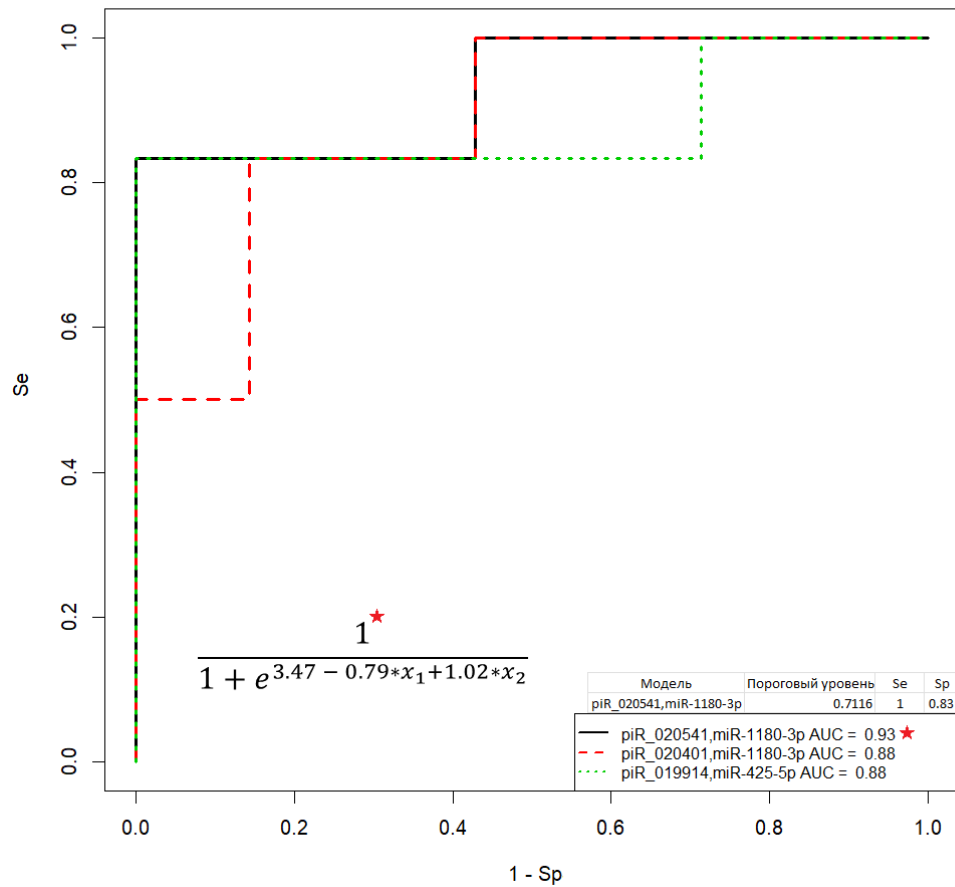


Рисунок 8. Модели логистической регрессии определения готовности эндометрия к имплантации криоконсервированного эмбриона в группе 2 на фоне ЕЦ по данным количественной ПЦР в реальном времени. Se – чувствительность, Sp – специфичность

При анализе характеристик построенных моделей рисунка 8 (таблица 19) выяснилось, что модель 1 оказалась статистически значимой в плане диагностики готовности эндометрия к имплантации эмбриона, при этом чувствительность модели составила 100%, а специфичность – 93%.

Формула модели для ЕЦ:

$$\frac{1}{1 + e^{3.47 - 0.79x_1 + 1.02x_2}}, \text{ где } x_1: -\Delta\text{Ct (miR-1180-3p)}, x_2: (\text{piR_020541})$$

Таблица 19. Характеристики моделей логистической регрессии

Рисунок 8.

Модели Рисунок 8	Коэффициенты	Значения коэффициентов (95% ДИ)	Критерий Вальда	Значение стати- стической значимости	ОШ (95% ДИ)
1	(Intercept)	-3,47 (-15,07;1,95)	-0,965	0,335	0,03 (2,86E-07;7,05)
	piR_020541	0,79 (0,08;2,01)	1,764	0,051	2,2 (1,09;7,47)
	miR-1180-3p	-1,02 (-2,61;-0,19)	-1,905	0,047	0,36 (0,07;0,83)
2	(Intercept)	-5,14 (-17,5;0,89)	-1,249	0,212	0,006 (2,49E-08;2,44)
	piR_020401	0,63 (-0,07;1,73)	1,482	0,138	1,88 (0,93;5,67)
	miR-1180-3p	-1,12 (-3,03;-0,13)	-1,687	0,092	0,32 (0,048;0,88)
3	(Intercept)	-6,48 (-27,7;1,18)	-0,918	0,358	0,001 (8,96E-13;3,27)
	piR_019914	1,59 (0,26;3,87)	1,861	0,063	4,89 (1,3;47,99)
	miR-425-5p	-0,7 (-2,69;0,05)	-1,056	0,291	0,49 (0,07;1,05)

При анализе функциональной значимости мнкРНК, участвующих в моделях (рисунок 7) и (рисунок 8), были идентифицированы потенциальные гены-мишени пивиРНК с использованием алгоритма miRanda [161], а гены-мишени микроРНК были найдены в программе Funrich (<http://www.funrich.org/>). При анализе обогащения сигнальных путей, в которых задействованы выявленные гены-мишени микроРНК и пивиРНК, обнаружено их участие в процессах клеточной адгезии и проведения сигнала внутрь клеток через рецепторы ростовых факторов и интерлейкинов, необходимых для имплантации эмбриона и его последующего роста, и развития (рисунок 9) [36].

Все вышесказанное позволило разработать тест на рецептивность эндометрия в криоциклах по уровню экспрессии мнкРНК в секрете эндометрия, аспирированном непосредственно перед переносом эмбриона.

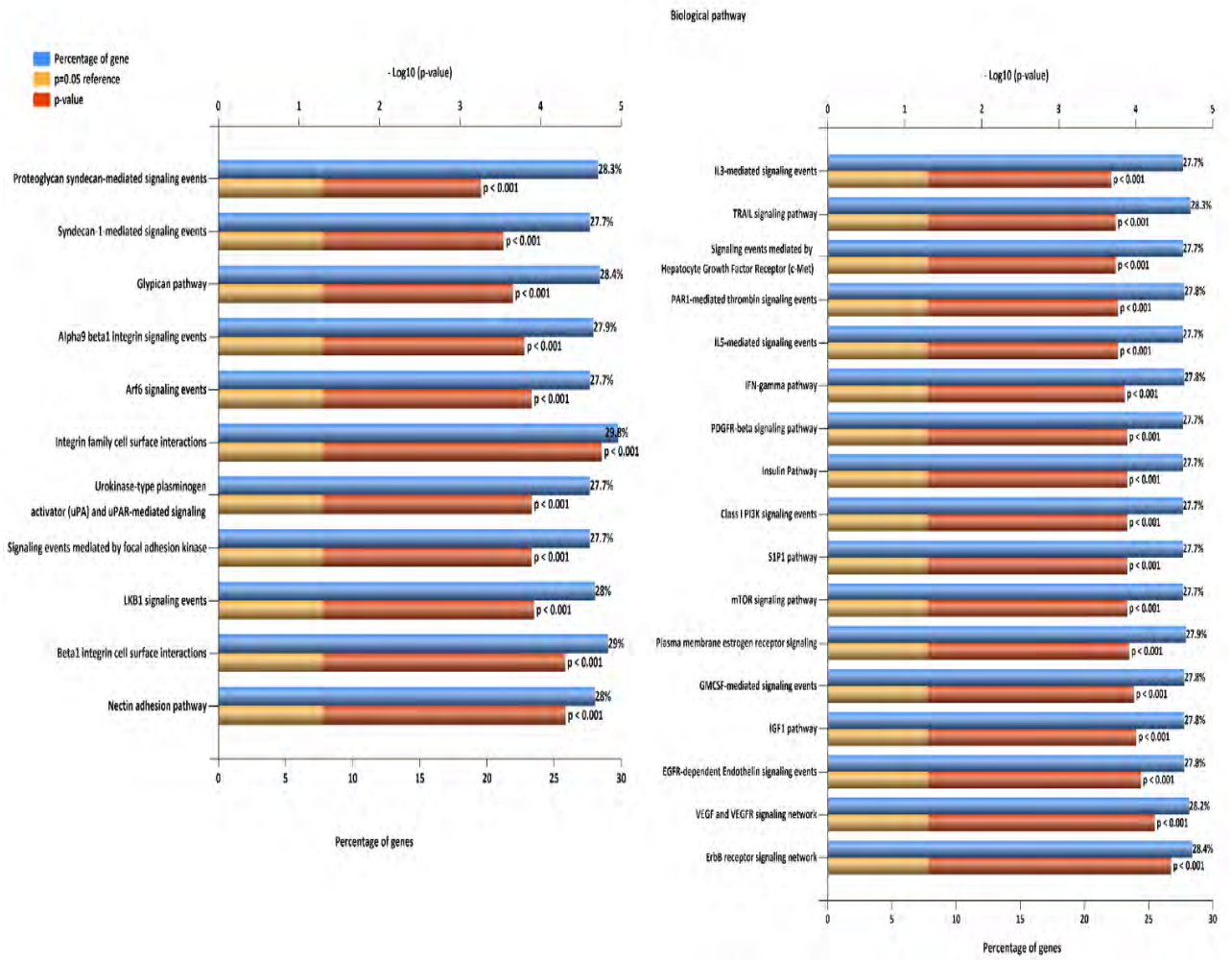


Рисунок 9. Функциональная значимость генов-мишеней мнкРНК, являющихся маркерами рецептивного эндометрия, при использовании программы Funrich.

3.9. Разработка тест-системы по оценке мнкРНК в секрете эндометрия при переносе размороженного эмбриона

На основании полученных данных разработана тест-система оценки профиля экспрессии мнкРНК (микроРНК и пивиРНК) в секрете эндометрия для определения готовности эндометрия к имплантации. При переносе размороженного эмбриона на фоне ЦГТ или в ЕЦ для проведения исследования необходимо провести аспирацию секрета эндометрия в объеме от 5 до 50 мкл содержимого в стерильную пробирку с физиологическим раствором 0,9% NaCl в объеме до 200 мкл. Полученный материал транспортируется в лабораторию молекулярно-биологических методов

исследования для последующего ПЦР-анализа мнкРНК, идентифицированных методом глубокого секвенирования в настоящем исследовании. Аспирация секрета эндометрия проводится непосредственно в день запланированного переноса эмбриона за 4 часа до процедуры. Тест не был валидирован для программ стимуляции функции яичников.

В случае выявления экспрессии мнкРНК при ЦГТ (miR-1180-3p) или в ЕЦ (piR_020541 и miR-1180-3p), можно считать, что эндометрий рецептивный и соответствует благоприятному дню для переноса эмбрионов. При отсутствии экспрессии обозначенных мнкРНК в полученном секрете, эндометрий можно считать нерепрезентивным, что свидетельствует о возможном смещении «имплантационного окна» и неблагоприятном исходе при переносе эмбриона в данном менструальном цикле.

Рекомендуется при последующей подготовке эндометрия осуществлять перенос эмбрионов с учетом индивидуального подхода на основании разработанной тест-системы и алгоритма ведения пациентов при переносе размороженного эмбриона.

Таким образом, в настоящем исследовании разработан новый комплексный подход к проведению переноса размороженного эмбриона, который включает инновационные возможности по диагностике и оценке рецептивности эндометрия на основании экспрессии мнкРНК в секрете эндометрия в сочетании с измерением толщины эндометрия.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На протяжении многих лет диагноз бесплодие остается важной, актуальной, медицинской и социальной проблемой. Известно, что необходимым условием для наступления беременности является последовательный рост и развитие эндометрия в фолликулярную и лютеиновую фазу цикла под действием гормонов эстрогенов и прогестерона. При этом главным критерием для успешного оплодотворения является синхронизация процессов между бластоцистой хорошего и/или отличного качества и рецептивным эндометрием нормальной структуры и толщины.

В данной диссертационной работе показано клиническое влияние прогестерона, в группах подготовки эндометрия, на исходы циклов криопереноса. Так, были установлены статистически значимые отличия по уровню прогестерона между пациентками с наступившей беременностью и отрицательным результатом в двух группах ($p < 0,001$). Вопрос о влиянии уровня гормонов в программах ВРТ изучается многими исследователями. Прогестерон играет ключевую роль в формировании рецептивности эндометрия и имплантации эмбриона. Однако знания о прогностической значимости сывороточного прогестерона в день переноса эмбрионов все еще недостаточны и противоречивы. Например, Volovsky M. et al. [67] в своем крупном ретроспективном исследовании проанализировали 2010 циклов с переносом размороженного эмбриона. Авторами не было выявлено статистически значимых различий в ЧНБ при уровне прогестерона < 10 нг/мл и ≥ 10 нг/мл. (20,82% против 22,78%, $p = 0,30$), и рождаемости (14,25% против 16,21%, $p = 0,23$). У пациенток, у которых прогестерон достиг уровня 20 нг/мл, также не было статистически значимого улучшения исходов беременности. При этом было показано, что уровень прогестерона < 5 нг/мл в день переноса эмбрионов, по-видимому, связан с низкой частотой наступления беременности.

Проспективное когортное исследование о влиянии уровня прогестерона на ЧНБ было проведено Labarta E. et al. [104]. Всего в исследовании

участвовало 1150 пациенток: в 1 группу вошли пациентки с переносом размороженного эмбриона без проведения ПГТ ($n = 184$), во 2 группу – перенос размороженного эмбриона после ПГТ ($n = 308$), в 3 группу пациентки, у которых осуществлен перенос донорских эмбрионов ($n = 658$). У всех пациенток подготовка эндометрия к криопереносу выполнена по стандартным протоколам. Выявлено, что пациентки с уровнем прогестерона $<8,8$ нг/мл (30-й перцентиль) имели значительно более низкую ЧНБ (36,6% против 54,4%) и коэффициент живорождения (35,5% против 52,0%), чем пациентки, у которых данные показатели были $>8,8$ нг/мл. Авторы пришли к выводу, что несмотря на нормальную морфологию эмбрионов, уровень сывороточного прогестерона ниже нормативных значений влияет на ЧНБ и имплантацию. В тоже время остается вопрос об оптимальном пути введения и дозировках прогестерона в зависимости от индивидуальных особенностей.

В работе Tihomirova T. et al. [123] обнаружено, что у пациенток с отрицательным исходом в сравнении с пациентками с положительным результатом уровень прогестерона был значительно ниже $20,08$ нг/мл $\pm 9,44$ против $27,9$ нг/мл $\pm 10,52$ соответственно ($p = 0,034$). При пороговом значении $14,40$ нг/мл прогестерон имел чувствительность 88% и специфичность 75%. При проведении ROC анализа уровня прогестерона отношение шансов (ОШ) составило $0,67$ (95% ДИ= $0,52-0,89$).

В связи с вышеизложенным и анализом собственных результатов можно предположить, что недостаточный базовый уровень прогестерона в сыворотке крови ассоциирован со сниженной ЧНБ и живорождением в целом. Поэтому определение уровня прогестерона в день предполагаемого ПЭ и период имплантационного окна, может быть использован и используется в качестве диагностического метода для прогнозирования успешной имплантации.

В представленном исследовании в группе 1 (ЦГТ) были выявлены различия между пациентками с наступившей беременностью и отсутствием беременности по уровню тестостерона ($p=0,02$). Возможность влияния уровня тестостерона на наступление беременности продемонстрирована в работе

Mokhtar M. et al. [135]. Авторы показали, что введение тестостерона в дозировке 500 мкг/кг/сут в течение трех дней, снижает экспрессию эндометриального белка МЕСА-79, пиноподий, а также влияет на структуру эндометрия, что может негативно сказаться на имплантации и рецептивности эндометрия. Кроме того, в исследовании Huang L. et al. [119] также доказано неблагоприятное влияние тестостерона $<0,305$ нг/мл на исходы беременности в программах ВРТ. В 2023 году Katsika E. et al. [91] провели систематический обзор и метаанализ восьми рандомизированных контролируемых исследований 797 пациенток с бедным ответом. Все пациентки в течение 10-56 дней получали трансдермальные дозы тестостерона (10-12,5 мг/сут) с целью последующей оценки исходов беременности. Выявлена высокая частота живорождения (ОР 2,07, 95% ДИ 1,09–3,92) и ЧНБ (ОР 2,25, 95% ДИ 1,54–3,30). Наблюдалось значительно меньшее количество дней стимуляции функции яичников, низкая общая доза введения гонадотропинов, низкая частота отмены переноса и утолщенный эндометрий.

Отсюда следует, что измерение уровня тестостерона в программах ЭКО может быть важным фактором при составлении индивидуальной схемы лечения, так как колебания уровня тестостерона в сторону больших или меньших значений может негативно влиять на рецептивность эндометрия и на имплантацию эмбрионов.

В данной диссертационной работе были выявлены корреляционные связи в группе 1 (ЦГТ): возраст пациенток отрицательно коррелировал с уровнем АМГ ($p = 0,0077$, коэффициент корреляции $r = -0,36$), прогестерона ($p = 0,03$, $r = -0,29$), количеством зрелых ооцитов ($p = 0,002$, $r = -0,4$), зигот ($p = 0,008$, $r = -0,36$). Выявлена статистически значимая отрицательная направленность корреляционных связей между уровнем ФСГ с уровнем АМГ ($p = 0,0002$, $r = -0,48$), количеством зрелых ооцитов ($p = 0,0217$, $r = -0,31$), зигот ($p = 0,05$, $r = -0,26$), а также с числом криоконсервированных эмбрионов ($p = 0,0026$, $r = -0,4$). Уровень АМГ отрицательно коррелирует с количеством беременностей в анамнезе ($p = 0,0124$, $r = -0,34$). В группе 2 (ЕЦ) возраст

женщин отрицательно коррелировал с уровнем АМГ ($p = 0,0001$, $r = -0,59$) и положительно коррелировал с уровнем ФСГ ($p = 0,002$, $r = 0,47$), с количеством попыток ЭКО в анамнезе ($p = 0,004$, $r = 0,45$), с количеством зрелых ооцитов ($p = 0,003$, $r = 0,45$). Уровень АМГ напрямую коррелировал с количеством полученных ОКК ($p = 0,01$, $r = 0,41$), зигот ($p = 0,002$, $r = 0,36$), криоконсервированных эмбрионов ($p = 0,03$, $r = 0,34$). Уровень АМГ и ФСГ, а также возраст пациенток при вступлении в программы ВРТ, являются основными предикторами овариального резерва [23]. При изучении данного вопроса в работе Scheffer JAV. et al. [43] также были обнаружены значимые корреляции между уровнем АМГ и возрастом пациенток ($r=-0,34$, $p<0,01$), уровнем ФСГ в крови ($r=-0,32$, $p<0,01$), количеством антральных фолликулов (КАФ) ($r=0,81$, $p<0,00001$), а также ЧНБ ($p<0,05$). Возраст пациенток коррелировал с ФСГ ($r=0,46$, $p<0,01$), КАФ ($r=-0,34$, $p<0,00001$) и ЧНБ ($p<0,04$). Подобные результаты представлены в исследовании Zhu J. et al. [57], где уровень АМГ отрицательно коррелировал с возрастом пациенток ($r = -0,606$, $p < 0,001$), что потенциально снижает число и качество полученных клеток, и результативность программ ВРТ.

В связи с вышесказанным, представляется актуальным и крайне важным тщательное гормональное обследование всех пациентов перед вступлением в программы ВРТ. В данной работе у всех пациентов перед программой ЭКО/ЭКО+ИКСИ, а также при переносе криоконсервированного эмбриона базовый уровень гормонов находился в пределах референсных значений. При этом было выявлено определенное влияние на параметры и результативность программ ВРТ.

Также в данной диссертационной работе в группе 1 (ЦГТ) обнаружены статистически значимые отличия пациенток с наступившей беременностью от пациенток с отрицательным результатом протокола по толщине эндометрия в день переноса эмбриона ($p<0,001$). Так, в 2021 году Shalom-Paz. et al. [166] провели крупное рандомизированное исследование двух групп пациенток. В группу А входили пациентки с толщиной эндометрия ≤ 8 мм, в группу В > 8

мм. В ходе сравнительного анализа было выявлено, что в группе В зафиксированы высокие показатели наступления биохимической и клинической беременности, чем в группе А (30,3% против 24,6%, $p = 0,046$ и 24,0% против 18,6%, $p = 0,036$, соответственно). Авторы пришли к выводу, что единственный параметр, который влияет на вероятность наступления беременности с ОШ 1,54 (95% ДИ 1,07–2,22, $p = 0,019$) это толщина эндометрия.

Похожие исследования были приведены и представлены в анализе *Vu Z. et al.* [168]. При сравнении пациентов в группе с толщиной эндометрия >7 мм и в группе <7 мм с верифицированным диагнозом «тонкий» эндометрий по данным УЗИ частота клинической беременности составила (56.21% против 47.13%, $P = 0.00$ в циклах ЦГТ; 55.15% против 49.55%, $P = 0.00$ в естественном цикле).

Полученные данные указывают на важность оценки толщины эндометрия при выборе оптимального и индивидуального подхода, а также поиска инновационных маркеров в ходе переноса криоконсервированного эмбриона в ЕЦ или на фоне ЦГТ.

Клинический портрет супружеских пар статистически значимо не различался по клинико-анамнестическим данным, а также при изучении репродуктивной функции. Поэтому для достижения поставленной цели, в данной диссертационной работе, основополагающим стало изучение новых молекулярных методов диагностики и анализа состояния эндометрия при использовании метода глубокого секвенирования и количественная ПЦР в реальном времени.

Существенным недостатком современных методов диагностики рецептивности эндометрия, введенных в клиническую практику (ERA®, Igenomix; ER-Map®, iGLS; ERPeak, CooperGenomics™), является инвазивный способ получения ткани эндометрия, что отменяет перенос эмбриона в том же цикле. Известно, что «окно имплантации» проявляется в момент резкого изменения транскрипционного профиля в безреснитчатых, но не в

реснитчатых эпителиоцитах, а также в стромальных фибробластах, трансформирующихся в децидуальные клетки [159]. Поэтому высока вероятность различий соотношения реснитчатых, безреснитчатых эпителиоцитов и стромальных клеток в разных образцах биоптата эндометрия, взятых у одной и той же женщины. Более того, при различных патологических состояниях эндометрия, в том числе, хроническом эндометрите, показатель отношения плотности реснитчатых и безреснитчатых эпителиоцитов значимо ниже контрольных значений [137]. Вышеуказанные обстоятельства могут привести к неправильной интерпретации получаемых данных транскриптомного анализа биоптата эндометрия. Кроме того, из-за межцикловых изменений в репродуктивной физиологии «окно имплантации» в менструальном цикле во время проведения инвазивного теста может быть сдвинуто относительно «окна имплантации» в последующих циклах переноса эмбриона из-за физиологической межциклового вариабельности. Поэтому требуется использовать неинвазивный способ анализа рецептивности эндометрия, позволяющий предоставить комплексную оценку трансформации его клеток для обеспечения имплантации эмбриона.

Аспирация секрета эндометрия может стать альтернативным и неинвазивным способом забора материала с целью изучения рецептивности эндометрия и экспрессии мнкРНК. В исследовании He A. et al. [51] авторы провели забор секрета эндометрия у 48 пациенток в день переноса эмбрионов, а также после пика ЛГ (ЛГ + 5, ЛГ + 7, и ЛГ + 9) с помощью аспирации. Впоследствии была отобрана небольшая когорта пациентов (n=22), которым проводился перенос эмбрионов и анализ корреляционных связей между результатами секвенирования и исходами беременности. Авторы получили обширную панель генов, соответствующую различным фазам эндометрия (пререцептивный, рецептивный и пострецептивный эндометрий). Успех секвенирования составил 95,4% (21/22), при этом 1 библиотека для секвенирования не прошла процедуру контроля качества. В результате у 18 пациентов (85,7%, 18/21) выявлено оптимальное «окно имплантации», тогда

как у 3 (14,3%, 3/21) и 0 пациентов спрогнозировано смещение «окна имплантации». ЧНБ составила 77,8% (14/18), а частота живорождения - 72,2% (13/18) для пациенток с нормальным имплантационным окном. У пациентов со смещенным окном не было выявлено клинической беременности, что статистически значимо различало две группы ($p < 0,05$). Полученные данные могут существенно повысить ЧНБ в программах ВРТ при использовании панели генов тех пациенток, у которых эндометрий был рецептивным и соответствовал имплантационному окну. В работе Saraee F. et al. [100] также пришли к выводу, что секретом эндометрия, с выделением внеклеточных везикул, является малоинвазивной процедурой для индивидуальной оценки рецептивности эндометрия и может проводиться во время переноса эмбрионов наряду с трансвагинальным УЗИ. Молекулярный анализ секрета может быть биомаркером определения рецептивности эндометрия. Безопасность процедуры аспирации секрета эндометрия подтверждается отсутствием побочных эффектов от внутриматочного вмешательства и отрицательного влияния на имплантацию в целом за счет неинвазивности метода.

В настоящем исследовании при сочетании методов глубокого секвенирования и количественной ПЦР в реальном времени были идентифицированы внеклеточные мнкРНК в секрете эндометрия в день переноса эмбриона, являющиеся маркерами рецептивного эндометрия [36]. В случае криоцикла на фоне ЦГТ (Группа 1) построены 8 моделей логистической регрессии в виде комбинации количественных характеристик: модель 1 - piR_020401, piR_015026, miR-30d-5p, miR-425-5p, miR-34c-5p, miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (92% специфичность, 77% чувствительность); модель 2 – piR_020401, miR-30d-5p, miR-425-5p, miR-34c-5p, miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (96% специфичность, 71% чувствительность); модель 3 - miR-30d-5p, miR-425-5p, miR-34c-5p, miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (92% специфичность, 81% чувствительность); модель 4 - miR-30d-5p, miR-34c-5p, miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (92% специфичность, 71%

чувствительность); модель 5 - miR-34c-5p, miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (84% специфичность, 81% чувствительность); модель 6 - miR-1180-3p, piR_020485, толщина эндометрия (84% специфичность, 77% чувствительность); модель 7 - miR-1180-3p, толщина эндометрия (88% специфичность, 71% чувствительность); модель 8 – толщина эндометрия (76% специфичность, 77% чувствительность). При этом модель 7 оказалась наиболее точной для диагностики рецептивного эндометрия у женщин в день переноса криоконсервированного эмбриона на фоне ЦГТ ввиду отсутствия зависимости включенных в нее переменных по данным корреляционного анализа по Спирмену ($r = 0,02$, $p = 0,9$) и статистической значимости всех входящих в модель коэффициентов ($p < 0,05$). В случае переноса криоконсервированного эмбриона в ЕЦ (Группа 2) построены 3 модели логистической регрессии диагностики рецептивного эндометрия. Комбинация значений экспрессии piR_020541 и miR-1180-3p в секрете эндометрия показала наибольший вклад в диагностику рецептивности в ЕЦ (93% специфичность, 100% чувствительность).

При анализе генов-мишеней мнкРНК-маркеров рецептивного эндометрия выявлено, что в основном они участвуют в процессах:

- 1) адгезии, опосредованные синдеканом-1, нектином, глипиканом, семейством интегринов;
- 2) протеолиза внеклеточного матрикса посредством активатора плазминогена урокиназного типа;
- 3) дифференцировки гранулоцитов и моноцитов-макрофагов под действием интерлейкинов 3 и 5 (IL-3, IL-5), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ);
- 4) иммунных реакций при участии интерферона гамма (IFN γ);
- 5) клеточного роста и пролиферации, опосредованных действием тромбоцитарного фактора роста (PDGF), EGF, VEGF, инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), эстрогена, сфингозин-1-фосфат сигнальной системы;
- 6) везикулярного транспорта, контролируемого фактором АДФ-

рибозилирования.

Полученные данные согласуются с результатами секвенирования мнкРНК эпителиальных и стромальных клеток эндометрия человека в рецептивную стадию относительно прорецептивной стадии секреторной фазы менструального цикла женщин [98]. Авторы работы подчеркивают ключевую роль белков клеточной адгезии (в том числе, галектинов, интегрина бета-1 (ITGB1), базигина (BSG) и остеопонтина), регуляторов секреторных процессов и организации внеклеточного матрикса на начальных этапах имплантации эмбриона, таких как аппозиция, адгезия и инвазия. Построены сети белок-белковых взаимодействий бластоцисты и эндометрия [98, 149, 176], где одним из основных белков является ITGB1. В составе мембраны клеток эндометрия ITGB1 взаимодействует с гликопротеином BSG на поверхности трофэктодермы, в которой, в свою очередь, уровень ITGB1 регулируется галектином-3, секретирующимся стромальными и эпителиальными клетками эндометрия, что в конечном итоге и обеспечивает миграцию и инвазию клеток трофобласта [99]. Ввиду участия целого каскада взаимодействующих друг с другом белков в процессе имплантации эмбриона, необходимо до его переноса в полость матки не только оценивать рецептивность эндометрия, но и заранее знать имплантационный потенциал самого эмбриона, ориентируясь не только на его морфологические параметры, но и на молекулярно-биологические характеристики. Важно отметить, что модели логистической регрессии для определения готовности эндометрия к имплантации эмбриона по уровню мнкРНК в день переноса криоконсервированного эмбриона на фоне ЦГТ и в ЕЦ были разработаны в настоящем исследовании без учета имплантационного потенциала эмбриона, что сказалось на числе ложноотрицательных результатов (29% и 17%, соответственно). В предыдущих исследованиях нами были разработаны модели логистической регрессии для определения имплантационного потенциала эмбриона по уровню мнкРНК в среде его культивирования на стадии морулы и бластоцисты в цикле контролируемой овариальной

стимуляции [58] с целью дальнейшего переноса в полость матки или криоаморазивания качественного эмбриона. Поэтому в дальнейшем для улучшения диагностической способности построенных моделей планируется одновременная оценка рецептивности эндометрия и имплантационного потенциала эмбриона по профилю мнкРНК.

Значимость разработанных в данном исследовании моделей подтверждается литературными данными о потенциальной роли входящих в нее значимых микроРНК (miR-30d-5p, miR-425-5p, miR-34c-5p, miR-1180-3p) в процессах, ассоциированных с имплантацией эмбриона. Роль семейства miR-30 в формировании рецептивного эндометрия выявлена в различных исследованиях [95, 86, 87], в частности, наблюдали повышение экспрессии miR-30d-5p в период окна имплантации [86]. Напротив, при повторных неудачах имплантации обнаружено резкое снижение уровня экспрессии miR-30d-5p и повышение уровня экспрессии гена-мишени супрессора передачи сигнала цитокинов 1 (SOCS1) в эндометрии на 7 сутки после пика ЛГ [78]. На мышинных моделях, нокаутных по miR-30d-5p, продемонстрировано влияние дефицита miR-30d-5p в эндометрии и у эмбриона на имплантацию и последующее фетальное развитие [126]. В других исследованиях доказана роль miR-425-5p в регуляции клеточной пролиферации, миграции и инвазии и выявлен повышенный уровень ее экспрессии в тканях различных опухолей, в том числе карциноме почек [142], гепатоклеточной карциноме [134], раке шейки матки [127], раке желудка [128]. miR-34c-5p, являясь ингибитором эпителиально-мезенхимального перехода, клеточной инвазии и миграции путем подавления уровня экспрессии гена-мишени трансмембранного рецепторного белка человека (NOTCH1), вовлечена в патогенез эндометриоза при снижении уровня ее экспрессии в эктопическом эндометрии [171]. Значительное подавление экспрессии miR-34c-5p в эктопическом эндометрии отмечают в период «окна имплантации», в течение которого резко повышается уровень белка 1, специфичного для остановки роста (GAS1), необходимого для имплантации эмбриона, в то время как дефицит экспрессии GAS1,

обнаружен в эндометрии женщин с неоднократными неудачами имплантации в сравнении с рецептивным эндометрием [129, 36].

В настоящем исследовании наибольший вклад в изучении рецептивности эндометрия привнесла микроРНК - miR-1180-3p. Однако miR-1180-3p также рассматривают в качестве супрессора многих эпителиальных опухолей, в том числе рака мочевого пузыря [174], рака поджелудочной железы [167], гепатоцеллюлярной карциномы [60]. Выявлено, что повышенный уровень экспрессии miR-1180-3p обуславливает снижение пролиферации и подвижности раковых клеток путем воздействия на ген-мишень COL12A1 [59]. Также экспрессия miR-1180-3p обнаружена в фолликулярной жидкости [130], в плазме венозной крови [77], в моче [55], но в диагностике рецептивности эндометрия, в настоящем исследовании, представлена впервые. Стоит отметить, что микроРНК – уникальные биологически активные молекулы, которые участвуют в регуляции экспрессии генов на всех уровнях [25]. На сегодняшний день предполагается, что изменение экспрессии микроРНК в различных биологических жидкостях происходит заблаговременно, в отличие от общеизвестных и принятых диагностических биомаркеров, что является крайне важным в определении патологий [7].

Таким образом, в данной диссертационной работе, выявлена экспрессия мнкРНК в секрете эндометрия, которая может быть использована в качестве диагностических и прогностических маркеров оценки рецептивности эндометрия. На основании полученных данных разработан персонафицированный алгоритм ведения пациенток, а также прототип тест-системы при переносе размороженного эмбриона, который может быть использован в клинической практике акушеров-гинекологов.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесплодие остается важной медицинской, социальной и экономической проблемой. С применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) частота наступления беременности значительно возросла. Однако эффективность программ ВРТ по-прежнему остается на уровне 30–40%. Основополагающим фактором, необходимым для реализации успешной беременности, является наличие рецептивного эндометрия и эмбриона морфологически и генетически хорошего качества.

На протяжении многих лет активно изучались различные методы диагностики рецептивности эндометрия, при этом все они были основаны на инвазивном методе забора материала. В данной диссертационной работе впервые показан безопасный неинвазивный метод оценки рецептивности при аспирации секрета эндометрия. Данная процедура может проводиться непосредственно перед переносом размороженного эмбриона и не влияет на частоту наступления беременности и живорождение в целом. Установлено, что секрет эндометрия играет важную роль в процессе имплантации эмбриона и представляет собой сложную молекулярную систему. Поэтому забор секрета эндометрия с помощью аспирации позволяет изучить состояние полости матки на молекулярно-биологическом уровне.

В проведенном исследовании выявлено, что наиболее точным маркером определения «имплантационного окна», когда эндометрий достигает максимальной рецептивности, представляется анализ, основанный на изучении транскрипционного профиля в секрете эндометрия. Определение уровня экспрессии мнкРНК, в особенности, микроРНК и пивиРНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме, а также в культуральной среде эмбрионов позволило оптимизировать тактику ведения пациентов в программах ВРТ. Поэтому в данной работе проведено глубокое секвенирование для изучения секрета эндометрия при переносе размороженного эмбриона в зависимости от различной тактики подготовки эндометрия.

При подготовке эндометрия на фоне ЦГТ у пациенток выявлена экспрессия miR-1180-3p, ассоциированная с рецептивностью эндометрия. Однако сочетание методов оценки состояния эндометрия с помощью исследования экспрессии miR-1180-3p и измерение толщины эндометрия является наиболее оптимальным. На основании полученных данных построены модели логистической регрессии и разработана формула, которая позволит персонифицировать подход к переносу эмбрионов в криоцикле.

Кроме того, была выявлена экспрессия piR_020541 и miR-1180-3p в группе пациенток, у которых перенос осуществлялся на фоне ЕЦ. Данные молекулы показали высокую прогностическую ценность в изучении рецептивности эндометрия. В ходе анализа данных разработана специальная формула, которая также позволит повысить эффективность криопереносов.

Таким образом, на основании проведенного исследования была разработана тест-система по оценке рецептивности эндометрия по содержанию и экспрессии микроРНК и пивиРНК в секрете эндометрия. Также оптимизирован алгоритм ведения пациентов при переносе размороженного эмбриона, что позволит персонифицировать подход и улучшить результативность программ в криоциклах.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток в криоциклах возраст значимо коррелирует с уровнем АМГ, ФСГ, прогестерона, с количеством зрелых ооцитов, зигот и криоконсервированных бластоцист. Представленный клинический портрет обследуемых супружеских пар соответствует общему контингенту пациентов в криоциклах.

2. При подготовке эндометрия с помощью циклической гормональной терапии и в естественном менструальном цикле частота наступления беременности при переносе криоэмбриона сопоставима и составляет 40,0 % и 45,2 %, соответственно.

3. При подготовке эндометрия циклической гормональной терапией в криоциклах выявлена экспрессия малых некодирующих РНК miR-1180-3p в секрете эндометрия. Оценка толщины эндометрия при ультразвуковом исследовании и экспрессии miR-1180-3p позволяет определить имплантационный потенциал эндометрия и его рецептивность.

4. При криопереносе в естественном менструальном цикле в секрете эндометрия выявлена экспрессия малых некодирующих РНК — piR_020541 и miR-1180-3p, которые определяют рецептивность эндометрия.

5. Разработаны математические модели прогнозирования наступления беременности и тест-система для оценки рецептивности эндометрия на фоне циклической гормональной терапии и в естественном цикле в секрете эндометрия в день переноса размороженного эмбриона, которые позволяют индивидуализировать проведение цикла криопереноса.

6. В день переноса криоэмбриона дополнительным неинвазивным маркером рецептивности эндометрия является оценка экспрессии малых некодирующих РНК в секрете эндометрия, что позволяет оптимизировать и повысить результативность программ ВРТ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях диагностики рецептивности эндометрия у пациенток в криоциклах на фоне циклической гормональной терапии и в естественном цикле рекомендована аспирация секрета эндометрия в объеме от 5 до 50 мкл для определения экспрессии малых некодирующих РНК как дополнительный неинвазивный и эффективный способ определения рецептивности эндометрия.

2. Для оптимизации переноса размороженных эмбрионов у пациенток на фоне циклической гормональной терапии целесообразно оценивать толщину эндометрия и экспрессию малых некодирующих РНК - miR-1180-3p в секрете эндометрия по формуле (специалистами ПЦР-лаборатории):

$$\frac{1}{1+e^{-19.15-0.31x_1+1.905x_2}}$$
, где x_1 : $-\Delta Ct$ (miR-1180-3p), x_2 : толщина эндометрия (мм)

Чувствительность модели – 71 %, специфичность – 88 %.

При отсутствии экспрессии miR-1180-3p в секрете эндометрия, следует информировать супружескую пару о целесообразности отмены переноса в данном цикле.

3. Для повышения эффективности переноса размороженных эмбрионов у пациенток в естественном цикле следует оценивать толщину эндометрия и экспрессию малых некодирующих РНК piR_020541 и miR-1180-3p в секрете эндометрия по формуле (специалистами ПЦР-лаборатории):

$$\frac{1}{1+e^{3.47-0.79x_1+1.02x_2}}$$
, где x_1 : $-\Delta Ct$ (miR-1180-3p), x_2 : (piR_020541)

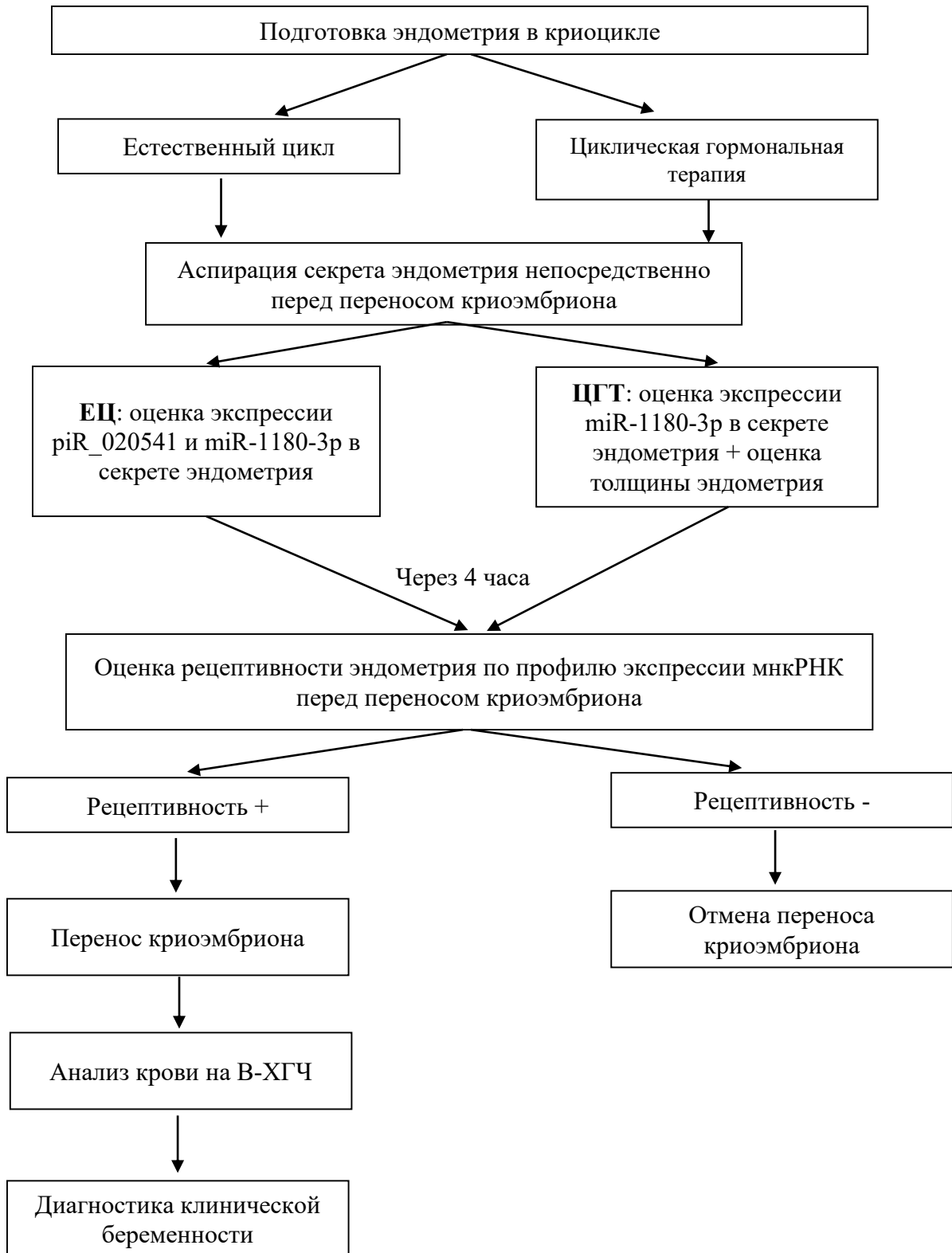
Чувствительность модели 100 %, специфичность 93 %.

При отсутствии экспрессии piR_020541 и miR-1180-3p, следует информировать супружескую пару о целесообразности отмены переноса в данном цикле.

4. Разработанная тест-система на основании экспрессии малых некодирующих РНК в криоциклах на фоне циклической гормональной терапии (miR-1180-3p) и на фоне естественного цикла (piR_020541 и miR-1180-3p) позволяет персонифицировать подход к ведению пациенток и рекомендовать к применению в клинической практике акушеров-гинекологов при лечении бесплодия методами ВРТ.

Приложение №1

**АЛГОРИТМ ВЕДЕНИЯ СУПРУЖЕСКИХ ПАР ПРИ ПЕРЕНОСЕ
ЭМБРИОНА В КРИОЦИКЛАХ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О
ПРОФИЛЕ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В
СЕКРЕТЕ ЭНДОМЕТРИЯ**



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

17-ОН – 17-гидроксипрогестерон

5'UTR – 5'- нетранслируемая область

АМГ – антимюллеров гормон

ант-ГнРГ – антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

ВВ – внеклеточные везикулы

ВКМ – внутриклеточная масса

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВРТ – Вспомогательные репродуктивные технологии

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий
фактор

ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрии

ДГЭА-С – дегидроэпиандростеронсульфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е2 – эстрадиол

ЕЦ – естественный цикл

ИГХ – иммуногистохимический метод исследования

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ИМТ – индекса массы тела

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ИФР-1- инсулиноподобный фактор роста 1

КАФ – количество антральных фолликулов

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МЖ – маточные железы

МКПК – моноклеарные клетки периферической крови

МнкРНК – малые некодирующие РНК

мРНК – матричная РНК

МФ – мужской фактор

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы
ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс
ПГТ – предимплантационное генетическое тестирование
ПРЛ – пролактин
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭ – перенос эмбрионов
р-ФСГ- рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
РАРЧ – Российская Ассоциация Репродукции Человека
РДВ – раздельное диагностическое выскабливание полости матки
РНК – рибонуклеиновая кислота
РЭ – перенос размороженного эмбриона
С1Ф – сфингозин-1-фосфат сигнальной системы
СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников
СПКЯ – синдром поликистозных яичников
Т – тестостерон
Т4 – тироксин
ТВП- трансвагинальная пункция фолликулов
ТПФ – трубно-перитонеальный фактор
ТТГ – тиреотропный гормон
ТФЭ – трофэктодерма
TGF – тканевой фактор роста
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
ЦГТ – циклическая гормональная терапия
чМГ – менопаузальный гонадотропин человека
ЧНБ – частота наступления беременности
чХГ – человеческий хронический гонадотропин
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
АСР5- кислая фосфатаза 5, устойчивая к тартрату
AGO – Argonaute

Array CGH – Array Comparative Genomic Hybridization (микроматричная сравнительная геномная гибридизация)

Aub – Aubergine

BSG – базигин

CDH5 – кадгерин 5

CTNNA2- катенин альфа 2

CTSB – Катепсин В

CTSC – Катепсин С

DGCR8 – DiGeorge syndrome critical region 8

EGF – эпидермальный фактор роста

ER – эстрогены

ERA – Endometrial Receptivity Analysis

ER α – эстроген α

ER β – эстроген β

FGF1 – фактор роста фибробластов

GPER – рецептор эстрогена, связанный с G-белком

GV- germinal vesicle

HEECs – первичные эпителиальные клетки эндометрия человека

IFN γ – интерферон гамма

IL – интерлейкин

IL-3 – интерлейкин 3

IL-5 – интерлейкин 5

ITGA7 – интегрин альфа 7

ITGB1 – интегрин бета 1

ITGB3 – интегрин бета 3

iTRAQ – Isobaric tags for relative and absolute quantitation (изобарические метки для относительного и абсолютного количественного).

LIF – лейкемия ингибирующий фактор

long ncRNAs – длинные некодирующие РНК

MI – первое мейотическое деление

MII – второе мейотическое деление

miRNAs – microRNA (микроРНК)

NGS – Next Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)

NOTCH1 – трансмембранный рецепторный белок человека

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

pET – personalized embryo transfer (персонализированный перенос эмбрионов)

piwiRNAs – piwi-interacting RNA (пивиРНК)

PODXL – полидиксин

PR – прогестерон

PR-A – рецепторы прогестерона А

PR-B – рецепторы прогестерона В

QF-PCR – Quantitative Fluorescence PCR (КФ-ПЦР)

RIF – recurrent implantation failure (повторные неудачи в имплантации)

RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга

rRNAs – рибосомальные РНК

siRNAs – малые интерферирующие РНК

snoRNAs – малые ядрышковые РНК

snRNAs – малые ядерные РНК

SOCS1 – супрессор передачи сигнала цитокинов 1

STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета

tRNAs – транспортные РНК

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

XPO5 – экспортин-5

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманова, Н. Ф. Диагностика рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий на основании иммуноморфологического исследования гликанов эндометрия: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2019. – С. 155.
2. Аганезов, С. С. Рецептивность при различной толщине эндометрия у женщин репродуктивного возраста (обзор литературы) / С. С. Аганезов, К. Э. Гогичашвили, Н. В. Аганезова // Гинекология. – 2022. – Т.24, № 1. – С. 4–10.
3. Агнаева, А. О. Эндометрий в репродукции: оценка функции и возможности коррекции: руководство для врачей / А. О. Агнаева, Д. О. Баженов, О. Н. Беспалова [и др.]. – М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа". – 2023. – С. 480.
4. Анализ маточной жидкости как новая возможность повышения частоты имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий / А. А. Бабаян, Н. П. Макарова, Н. В. Кондакова [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2021. – № 11. – С. 32-40.
5. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/infertility> – 14.09.2020.
6. Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг / Е. В. Кулакова, Е. А. Калинина, Д. Ю. Трофимов [и др.] // Акушерство и Гинекология. - 2017, № 8. - С. 21 - 27.
7. Гареев, И. Ф. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? / И. Ф. Гареев, О. А. Бейлерли // Профилактическая медицина. – 2018. – Т. 21, № 6. – С. 142-150.
8. Гохберг, Я. А. Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Я. А. Гохберг,

А. В. Тимофеева, Е. А. Калинина // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – № 11. – С. 56-62.

9. Довгань, А. А. Современные тренды в поиске маркеров рецептивности эндометрия – от отдельных параметров к комплексному подходу / А. А. Довгань, М. М. Зиганшина, Н. В. Долгушина // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – № 11. – С. 26-32.

10. Драпкина, Ю. С. Оптимизация и индивидуализация программ вспомогательных репродуктивных технологий с использованием профиля экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2020. – С. 143.

11. Дюжева, Е. В. Гормональная подготовка эндометрия у пациенток с неэффективными попытками ЭКО в анамнезе: Дис ... канд. мед. наук. – М., 2010. - С. 119.

12. Кибанов, М. В. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов / М. В. Кибанов, Г. М. Махмудова, Я. А. Гохберг // *Альманах клинической медицины*. – 2019. – Т. 47. – №1. – С. 12-25.

13. Клинические характеристики пациенток с нарушением показателей раннего эмбриогенеза в программах ЭКО / Т. А. Назаренко, К. В. Краснопольская, Н. И. Сесина [и др.] // *Проблемы репродукции*. – 2019. – Т. 25, № 2. – С. 60-66.

14. Князева, Е. А. Реализация вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с бесплодием с учетом молекулярно-генетических особенностей эндометрия: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2021. - С. 149.

15. Коган, И. Ю. Омиксные технологии - новая стратегия оценки функции эндометрия / И. Ю. Коган, А. С. Глотов, О. В. Малышева [и др.] // *Экстракорпоральное оплодотворение: Практическое руководство для врачей*. – М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа". – 2021. – С. 68-76.

16. Корсак, В. С. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2017 год / В. С. Корсак, А. А. Смирнова, О. В., Шурыгина // Проблемы репродукции. – 2019. – Т. 25, № 6. – С. 9-21.

17. Краснопольская, К. В. Современные подходы к оценке рецептивности эндометрия (обзор литературы) / К. В. Краснопольская, Т. А. Назаренко, И. Ю. Ершова // Проблемы репродукции. – 2016. – Т.22, № 5. – С.61-69.

18. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Женское бесплодие. М.: Российское общество акушеров-гинекологов. – 2021.

19. Морфологический и молекулярный субстрат нарушения рецептивности эндометрия у бесплодных пациенток с наружно-генитальным эндометриозом / Е. А. Коган, Е. А. Калинина, А. В. Колотовкина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2014. – № 8. – С. 47-52.

20. Неудачи и дефекты имплантации после ЭКО / Е. Б. Рудакова, Т. В. Стрижова, Е. А. Федорова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 4 (Приложение). – С. 186.

21. Оценка уровня экспрессии пивирНК hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости пациенток с различными исходами программ экстракорпорального оплодотворения / М. А. Шамина, А. В. Тимофеева, И. С. Федоров [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 143-153.

22. Паскарь, С. С. Возможности и перспективы применения прогностических моделей в лечении бесплодия (обзор литературы) / С. С. Паскарь, А. С. Калугина // Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 8-11.

23. Паскарь, С. С. Некоторые характеристики образа жизни и их влияние на репродуктивное здоровье / С. С. Паскарь, А. С. Калугина // Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга. – 2018. – № 1. – С. 69-73.

24. Паскарь, С. С. Принципы безопасного лечения бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий / С. С. Паскарь, А. С.

Калугина, А. Г. Ткачук // Журнал акушерства и женских болезней. – 2020. – Т. 69, № 4. – С. 83-88.

25. Перспективы использования микроРНК в современных методах диагностики и терапии / Д. О. Корнилов, М. А. Тряпицын, В. М. Симарзина [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2022. – Т. 19, № 2. – С. 109–131.

26. Петросян, Я. А. Использование криоконсервированных эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Я. А. Петросян, А. М. Фролова, А. Г. Сыркашева // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 4. – С. 195-200.

27. Преимплантационный анализ транскриптома бластоцисты / А. Г. Волкова, Н. П. Макарова, А. В. Тимофеева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 4. – С. 16-20.

28. Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины / Ю. С. Драпкина, А. В. Тимофеева, В. В. Чаговец [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 9. – С. 24-32.

29. Рецептивность «тонкого» эндометрия у пациенток в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Г. В. Куликова, Н. Ф. Абдурахманова, Н. М. Файзуллина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2019. – № 10. – С.100-107.

30. Рецептивность эндометрия у пациенток с эндометриоз ассоциированным бесплодием (обзор литературы) / Е. А. Калинина, А. В. Колотовкина, Е. А. Коган [и др.] // Проблемы репродукции. – 2012. – № 4. – С. 55-62.

31. Роль различных факторов воздействия на эндометрий в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / Я. А. Гохберг, Н. П. Макарова, А. А. Бабаян [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 1. – С. 28-34.

32. Сравнительный анализ клинико-anamнестических данных супружеских пар при переносе размороженного эмбриона в естественном

цикле и в цикле заместительной гормональной терапии / Я. А. Гохберг, И. С. Федоров, А. В. Тимофеева [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2022. – № 9. – С. 72-80.

33. Сыркашева, А. Г. Подготовка эндометрия к переносу размороженных эмбрионов / А. Г. Сыркашева, Я. А. Петросян., Е. А. Калинина // *Акушерство и гинекология*. – 2019. – № 9 (Прил.). – С. 7-10.

34. Тапильская, Н. И. Ведение беременности ранних сроков, наступившей в результате протоколов ВРТ / Н. И. Тапильская, И. Ю. Коган, А. М. Гзгзян. – М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа". – 2020. – С. 144.

35. Тапильская, Н. И. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор как ключевой регулятор инвазивного потенциала эмбриона и рецептивности эндометрия / Н. И. Тапильская, А. М. Гзгзян, И. Ю. Коган // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2019. – Т. 68, № 1. – С. 83-92.

36. Тимофеева, А. В. Оценка рецептивности эндометрия по уровню малых некодирующих РНК в маточном аспирате у женщин на фоне циклической гормональной терапии / А. В. Тимофеева, И. С. Федоров, Я. А. Гохберг [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2023. – №7. – С. 90-102.

37. Шамина, М. А. Оптимизация лечения бесплодия у пациентов с повторным отсутствием имплантации эмбриона на основании оценки профиля экспрессии малых некодирующих РНК: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2022. – С. 144.

38. Эффективность различных протоколов подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Я. А. Петросян, А. Г. Сыркашева, А. Ю. Романов [и др.] // *Гинекология*. – 2020. – Т. 22, № 2. – С.17.

39. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage / J. Huang, H. Qin, Y. Yang [et al.] // *Reproduction*. – 2017. – Vol.153, № 6. – P. 749-758.

40. A randomized controlled, non-inferiority trial of modified natural versus artificial cycle for cryo-thawed embryo transfer / E. R. Groenewoud, B. J. Cohlen, A. Al-Oraiby [et al.] // *Human reproduction*. – 2016. – Vol. 31, № 7. – P. 1483- 1492.

41. Adrenomedullin improves fertility and promotes pinopodes and cell junctions in the peri-implantation endometrium / B. C. Matson, S. L. Pierce, S. T. Espenschied [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2017. – Sep 1; Vol. 97, № 3. – P. 466-477.

42. Allogeneic Embryos Disregulate Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Its Receptor in the Porcine Endometrium During Implantation / J. M. Cambra, A. Jauregi-Miguel, M. Alvarez-Rodriguez [et al.] // *Front Vet Sci*. – 2020. – Nov 24;7. – P. 611598.

43. Are age and anti-Müllerian hormone good predictors of ovarian reserve and response in women undergoing IVF? / JAB. Scheffer, B. Scheffer, R. Scheffer [et al.] // *JBRA Assist Reproduction*. – 2018. – Sep 1;22, № 3. – P. 215-220.

44. Assessment of endometrial receptivity during implantation window in women with unexplained infertility / L. Wang, S. Lv, W. Mao [et al.] // *Gynecology Endocrinology*. – 2020. – Vol. 36, № 10. –P. 917-921.

45. Autologous peripheral blood mononuclear cells intrauterine instillation to improve pregnancy outcomes after recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis / Y. Wu, L. Li, L. Liu [et al.] // *Arch Gynecology Obstetrics*. – 2019. – Vol. 300. – P. 1445-1459.

46. Ben Rafael, Z. Endometrial Receptivity Analysis (ERA) test: an unproven technolog / Z. Ben Rafael // *Human Reproduction Open*. – 2021. – Vol.14, № 2: hoab010.

47. Bian, Y.Y. Relationship of small non-coding RNA in the seminal plasma with male infertility: An update / Y. Y. Bian, C. Wang, C. N. Zhang // *Zhonghua Nan Ke Xue*. – 2019. – Vol.25, № 5. – P.460-465.

48. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action // Y. Gnainsky, I. Granot, P. Aldo [et al.] // *Reproduction*. – 2015. – Vol. 149, № 1. – P. 75-85.

49. Blesa, D. Clinical management of endometrial receptivity / D. Blesa, M. Ruiz-Alonso, C. Simón // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2014. – Vol.32, № 5. – P. 410- 413.

50. Bruno, S. Epigenetic cell memory: The gene's inner chromatin modification circuit / S. Bruno, R. J. Williams, D. Del Vecchio // *PLoS computational biology*. – 2022. – Apr 6;18, № 4. – e1009961

51. Can biomarkers identified from the uterine fluid transcriptome be used to establish a noninvasive endometrial receptivity prediction tool? A proof-of-concept study / A. He, H. Wu, Y. Zou [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 20.

52. Casper, R. F. Optimal endometrial preparation for frozen embryo transfer cycles: window of implantation and progesterone support / R. F. Casper, E.H. Yanushpolsky // *Fertility and Sterility*. – 2016. – Vol. 105, № 4. – P. 867-872.

53. Cell-free, Embryo-Specific snRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient fertility and IVF efficiency / A. V. Timofeeva, V. V. Chagovets, Y. S. Drapkina [et.al.] // *Int. J. Molecular Sci*. – 2019. –Vol. 20, № 12. – P. 2912.

54. Changes in Morphology and Presence of Pinopodes in Endometrial Cells during the Luteal Phase in Women with Infertility Problems: A Pilot Study. / M. Aunapuu, P. Kibur, T. Järveots [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2018. – Oct. 10. – Vol.54, № 5. – P.69.

55. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine / L. Cheng, X. Sun, B. J. Scicluna [et al.] // *Kidney Int*. – 2014. – Vol.86(2): – P.433-44.

56. Characterization of microRNAs in spent culture medium associated with human embryo quality and development / S. Wang, L. Chen, Y. Zhu [et al.] // *Ann Transl Medicine*. – 2021. – Vol.9, № 22. – P.1648.

57. Chronological age vs biological age: a retrospective analysis on age-specific serum anti-Müllerian hormone levels for 3280 females in reproductive center clinic / J. Zhu, T. Li, W. Xing [et al.] // *J. Gynecology Endocrinology*. – 2018. – Vol.34, № 10. – P.890-894.
58. Clinical Relevance of Secreted Small Noncoding RNAs in an Embryo Implantation Potential Prediction at Morula and Blastocyst Development Stages / A. V. Timofeeva, I. S. Fedorov, M. A. Shamina [et al.] // *Life (Basel)*. – 2021. – Vol.1;11(12). – P. 1328.
59. Clinical significance of microRNA-1180-3p for colorectal cancer and effect of its alteration on cell function / C. Li, W. Jin, D. Zhang [et al.] // *Bioengineered*. – 2021. – Vol.12, № 2. – P.10491-10500.
60. Clinical significance of miR-1180-3p in hepatocellular carcinoma: a study based on bioinformatics analysis and RT-qPCR validation / Z. Zhou, X. Zhou, X. Jiang [et al.] // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10. – №.1.-P. 11573.
61. Clinical utility of the endometrial receptivity analysis in women with prior failed transfers / L. E. Eisman, M. D. Pisarska, S. Wertheimer [et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2021. – Vol. 38. – P. 645–650.
62. Clues to Non-Invasive Implantation Window Monitoring: Isolation and Characterisation of Endometrial Exosomes / A. Luddi, N. Zarovni, E. Maltinti [et al.] // *Cells*. – 2019. – Aug 1;8, № 8. – P. 811.
63. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / L. Craciunas, I. Gallos, J. Chu [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Vol. 25, № 2. – P. 202-223.
64. Cousins, F. L Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis / F. L. Cousins, D. F. O, C. E. Gargett // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. – 2018. – Vol. 50. – P.27–38.
65. Development of Organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability / M. Boretto, B. Cox, M. Noben [et al.] // *Development*. – 2017. – Vol.144. – P.1775 – 1786.

66. Diagnosis and treatment of luteal phase deficiency: a committee opinion / Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Reproductive Endocrinology and Infertility // *Fertility and Sterility*. – 2021. – Vol. 115, № 6. – P. 1416-1423.

67. Do serum progesterone levels on day of embryo transfer influence pregnancy outcomes in artificial frozen-thaw cycles? / M. Volovsky, C. Pakes, G. Rozen [et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2020. – Vol. 37, № 5. – P. 1129-1135.

68. Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems--Step-by-Step Maternal Recognition of the Developing Embryo / H. Fujiwara, Y. Araki, K. Imakawa [et al.] // *Am J Reproduction Immunology*. – 2016. – Vol. 75, №3. – P. 281-289.

69. Efficacy of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells on the pregnancy outcomes in patients with recurrent implantation failure: A systematic review and meta-analysis / Z. Pourmoghadam, S. Abdolmohammadi-Vahid, F. Pashazadeh [et al.] // *J Reproduction Immunology*. – 2020. – Vol. 137. – P. 103077.

70. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: A retrospective, two-centers study / T. Hashimoto, M. Koizumi, M. Doshida [et al.] // *Reproduction Medicine Biology*. – 2017. – Jun 27. – Vol.16, № 3. – P. 290-296.

71. Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure / C. Shi, H. Shen, L. J. Fan [et al.] // *Clinical Medicine J (Engl.)*. – 2017. – Mar 5;130, № 5. – P. 566-573.

72. Endometrial preparation methods prior to frozen embryo transfer: A retrospective cohort study comparing true natural cycle, modified natural cycle and artificial cycle / L. Mensing, E. S. Dahlberg, B. Bay [et al.] // *Arch Gynecology Obstetrics*. – 2022. – Vol. 306, № 4. – P. 1381-1388.

73. Endometrial Receptivity Markers in Mice Stimulated with Raloxifene Versus Clomiphene Citrate and Natural Cycles / C. Chen, Q. Yan, K. Liu [et al.] // *Reproduction Sci.* – 2016. – Vol. 23, № 6. – P. 748– 755.

74. Endometrial receptivity revisited: endometrial transcriptome adjusted for tissue cellular heterogeneity /M. Suhorutshenko, V. Kukushkina, A. Velthut-Meikas [et al.] // *Human Reproduction.* – 2018. – Nov 1. – Vol.33, № 11. – P. 2074-2086.

75. Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease / Z. R. Tang, R. Zhang, Z. X. Lian [et al.] // *Cells.* – 2019. – Sep 21;8, № 10. – P. 1123.

76. Estrogen Receptor Function: Impact on the Human Endometrium. / K. Yu, Z. Y. Huang, X. L. Xu [et al.] // *Front Endocrinology (Lausanne).* – 2022. – Vol. 28, №13.- P. 827724.

77. Evaluation of exosomal miRNAs as potential diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction using next-generation sequencing / M. Guo, R. Li, L. Yang [et al.] // *Ann Transl Med.* – 2021. – Vol. 9, № 3. - P. 219.

78. Expression and significance of miR-30d-5p and SOCS1 in patients with recurrent implantation failure during implantation window / Y. Zhao, D. He, H. Zeng [et al.] // *Reproduction Biology Endocrinology.* – 2021. – Sep 8;19, № 1. – P. 138.

79. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease / J. Evans, L. A. Salamonsen, A. Winship [et al.] // *Nat Rev Endocrinol.* – 2016. – Vol. 12, № 11. – P. 654-667.

80. Fitzgerald, H. C. In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women's health / H. C. Fitzgerald, D. J. Schust, T.E. Spencer // *Biology Reproduction.* – 2021. – Feb 11; Vol. 104, № 2. – P. 282-293.

81. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes / M. Roque, T. Haahr, S. Geber [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2019. – Vol. 25. – № 1. – P. 2-14.

82. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction / K. M. Wong, M. van Wely, F. Mol [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2017. – Mar 28;3, № 3. – CD011184.
83. Frozen embryo transfer: a review on the optimal endometrial preparation and timing / S. Mackens, S. Santos-Ribeiro, A. van de Vijver [et al.] // *Human Reproduction.* – 2017. – Nov 1;32, № 11. – P. 2234-2242.
84. Frozen-thawed embryo transfer: the potential importance of the corpus luteum in preventing obstetrical complications / B. Singh, L. Reschke, J. Segars [et al.] // *Fertility Sterility.* – 2020. – Vol. 113, № 2. – P. 252-257.
85. Gardner, D. K. Culture and transfer of human blastocysts / D. K. Gardner, W. B. Schoolcraft // *Current Opinion Obstetrics Gynecology.* – 1999. – Vol. 11, № 3. – P. 307–311.
86. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing / A. G. Sha, J. L. Liu, X. M. Jiang [et al.] // *Fertility Sterility.* – 2011. – Vol. 96, № 1. – P. 150-155.e5.
87. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium / S. Kuokkanen, B. Chen, L. Ojalvo [et al.] // *Biology Reproduction.* – 2010. – Vol. 82, № 4. – P. 791-801.
88. Global transcriptomic changes occur in uterine fluid-derived extracellular vesicles during the endometrial window for embryo implantation / E. Giacomini, G. M. Scotti, V. S. Vanni [et al.] // *Human Reproduction.* – 2021. – Jul 19., Vol. 36, № 8. – P. 2249-2274.
89. Guo, X. The endometrial proteomic profile around the time of embryo implantation † / X. Guo, T. C. Li, X. Chen // *Biology of Reproduction.* – 2021. – Vol. 104, № 1. – P. 11–26.
90. Ha, M. Regulation of microRNA biogenesis / M. Ha, V. N. Kim // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15, № 8. – P. 509-524.

91. Higher live birth rate following transdermal testosterone pretreatment in poor responders: a systematic review and meta-analysis / E. T. Katsika, J. K. Bosdou, D. G. Goulis [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. – 2023. – Vol. 46, № 1. – P. 81-91.
92. Hirakata, S. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation / S. Hirakata, M. C. Siomi // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1859. – P. 82–92.
93. Homer, H. Review: Embryo- and endometrium-derived exosomes and their potential role in assisted reproductive treatments-liquid biopsies for endometrial receptivity / H. Homer, G. E. Rice, C. Salomon // *Placenta*. – 2017. – № 54. – P. 89-94.
94. Hormone replacement versus natural frozen embryo transfer for euploid embryos / A. Wang, G. Murugappan, J. Kort [et al.] // *Arch Gynecology Obstetrics*. – 2019. – Vol. 300, № 4. – P. 1053-1060.
95. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome / F. Vilella, J. M. Moreno-Moya, N. Balaguer [et al.] // *Development*. – 2015. – Vol. 142. – P. 3210-3221.
96. Hu, K. Metabolite availability as a window to view the early embryo microenvironment in vivo / K. Hu, Y. Yu // *Mol Reprod Dev*. – 2017. – Vol.84, № 10. – P. 1027-1038.
97. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation / E. M. Rosenbluth, D. N. Shelton, L. M. Wells [et al.] // *Fertility Sterility*. – 2014. – Vol. 101, № 5. – P. 1493-1500.
98. Human endometrial cell-type-specific RNA sequencing provides new insights into the embryo-endometrium interplay/ M. Koel, K. Krjutškov, M. Saare [et al.] // *Human Reproduction Open*. – 2022. – Vol,13, № 4. – hoac043.
99. Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion / Z. Bojić-Trbojević, M. Jovanović Krivokuća, A. Vilotić [et al.] // *Sci Reproduction*. – 2019. – Feb 14;9, № 1. – P. 2136.

100. Human uterine fluid lavage-derived extracellular vesicle isolation: a comparative study for minimally invasive endometrial receptivity assessment / F. Saraee, F. Shekari, A. Moini [et al.] // *Reprod Biomed Online*. – 2022. – Vol. 45, № 3. – P. 457-472.

101. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics / M. M. Rinschen, J. Ivanisevic, M. Giera [et al.] // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2019. - Vol.20, № 6. – P. 353-367.

102. Idiopathic infertility in women is associated with distinct changes in proliferative phase uterine fluid proteins / H. C. Fitzgerald, J. Evans, N. Johnson [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2018. – Jun 1;98, № 6. – P. 752-764.

103. Immunomodulation for unexplained recurrent implantation failure: where are we now? / G. Genest, S. Banjar, W. Almasri [et al.] // *Reproduction*. – 2023. – Jan 4. – Vol. 165, № 2. – R39-R60.

104. Impact of low serum progesterone levels on the day of embryo transfer on pregnancy outcome: a prospective cohort study in artificial cycles with vaginal progesterone / E. Labarta, G. Mariani, S. Paoletti [et al.] // *Human Reproduction*. – 2021. – Feb 18;36, № 3. – P. 683-692.

105. Impact of method of endometrial preparation for frozen blastocyst transfer on pregnancy outcome: a retrospective cohort study / S. Alur-Gupta, M. Hopeman, D. S. Berger [et al.] // *Fertility Sterility*. – 2018. – Vol. 110, № 4. – P. 680-686.

106. Implantation Window and Angiogenesis / M. P. Karizbodagh, B. Rashidi, A. Sahebkar [et al.] // *J Cell Biochem*. – 2017. – Vol. 118, № 12. – P. 4141-4151.

107. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by HCG improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study / N. Yu, B. Zhang, M. Xu [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2016. – Vol. 76, № 3. – P. 212-216.

108. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells in patients with recurrent implantation failure: A systematic review and meta-analysis / A. Maleki-Hajiagha, M. Razavi, M. Rezaeinejad [et al.] // *J Reprod Immunol.* – 2019. – Vol. 131. – P. 50-56.
109. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of porcine uterine fluid during pre-implantation period of pregnancy / Y. He, X. Zang, J. Kuang [et al.] // *J Proteomics.* – 2022. – № 15. – P. 261:104570.
110. Iwasaki, Y. W. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions / Y. W. Iwasaki, M. C. Siomi, H. Siomi // *Annu Rev Biochem.* – 2015. – Vol. 84. – P. 405-433.
111. Kelleher, A. M. Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy / A. M. Kelleher, F. J. De Mayo, T. E. Spencer // *Endocr Rev.* – 2019. – Vol. 40, № 5. – P. 1424-1445.
112. Kliman, H. J. Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium / H. J. Kliman, D. Frankfurter // *Fertil Steril.* – 2019. – Vol. 111, № 4. – P. 618-628.
113. Lessey, B. A. What exactly is endometrial receptivity? / B. A. Lessey, S. L. Young // *Fertil Steril.* – 2019. – Vol. 111, № 4. – P. 611-617.
114. Leukemia inhibitory factor and its receptor: expression and regulation in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and pregnancy / I. Yoo, S. Chae, J. Han [et al.] // *Asian-Australas J Anim Sci.* – 2019. – № 32. – P. 192-200.
115. Liang, J. Role of microRNAs in embryo implantation / J. Liang, S. Wang, Z. Wang // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2017. – Nov 21;15, № 1. – P. 90.
116. LIF and LIF-R expression in the endometrium of fertile and infertile women: A prospective observational case-control study/ C. Margioulas-Siarkou, Y. Prapas, S. Petousis [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol.13, № 6. – P. 4721-4728.
117. Long non-coding RNA exchange during the oocyte-to-embryo transition in mice / R. Karlic, S. Ganesh, V. Franke [et al.] // *DNA Res.* – 2017. – Apr 1;24, № 2. – P. 129-141.

118. Love, M. I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M. I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome Biol.* – 2014. – 15, № 12. – P. 550.

119. Low basal serum testosterone level is detrimental to the embryo implantation in the patients with severe endometriosis / L. Huang, M. Chen, L. Long [et al.] // *J Obstet Gynaecol Res.* – 2021. – Vol. 47, № 6. – P. 2166-2174.

120. Luteal phase deficiency in regularly menstruating women: prevalence and overlap in identification based on clinical and biochemical diagnostic criteria / K. C. Schliep, S. L. Mumford, A. O. Hammoud [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – Vol. 99, № 6. – E1007-14.

121. Macklon, N. Recurrent implantation failure is a pathology with a specific transcriptomic signature / N. Macklon // *Fertil Steril.* – 2017. – Vol. 108, № 1. – P. 9-14.

122. Maenhoudt, N. Modeling Endometrium Biology and Disease / N. Maenhoudt, A. De Moor, H. Vankelecom // *J Pers Med.* – 2022. – Jun 27; Vol. 12, № 7. – P. 1048.

123. Measurement of serum progesterone levels on the day of embryo transfer is a useful tool in prediction of successful pregnancy / T. Tihomirova, D. Parvanov, G. Stamenov [et al.] // *Annuaire de l'Afrique du Nord.* – 2018. – Vol.103. – P.53–59.

124. Metabolic Changes of Maternal Uterine Fluid, Uterus, and Plasma during the Peri-implantation Period of Early Pregnancy in Mice / Y. Yang, L. Wang, C. Chen [et al.] // *Reproductive sciences.* – 2020. – Vol. 27, № 2. – P. 488-502.

125. Metabolomic differences in blastocoel and uterine fluids collected in vivo by ultrasound biomicroscopy on rabbit embryos / S. Calderari, N. Daniel, E. Mourier [et al.] // *Biology of reproduction.* – 2021. – Apr 1;104, № 4. – P. 794-805.

126. MicroRNA-30d deficiency during preconception affects endometrial receptivity by decreasing implantation rates and impairing fetal growth / N. Balaguer, I. Moreno, M. Herrero [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology.* – 2019. – Vol.221, № 1. – 46.61-46.e16.

127. MicroRNA-425-5p is a potential prognostic biomarker for cervical cancer / L. Sun, R. Jiang, J. Li [et al.] // *Annals of clinical biochemistry*. – 2017. – Vol. 54, № 1. – P. 127-133.

128. MicroRNA-425-5p is upregulated in human gastric cancer and contributes to invasion and metastasis *in vitro* and *in vivo*/ Z. Zhang, Y. Li, L. Fan [et al.] // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2015. – Vol.9, № 5. – P.1617-1622.

129. MicroRNAs in Small Extracellular Vesicles Indicate Successful Embryo Implantation during Early Pregnancy / Q. Tan, S. Shi, J. Liang [et al.] // *Cells*. – 2020. – Mar 6;9, № 3. – P. 645.

130. MiR-15a-5p levels correlate with poor ovarian response in human follicular fluid / K. Zhang, W. Zhong, W. P. Li [et al.] // *Reproduction*. – 2017. – Oct; Vol. 154, № 4. – P. 483-496.

131. MiR-183-5p regulates uterine receptivity and enhances embryo implantation / R. Akbar, K. Ullah, T. U. Rahman [et al.] // *Journal of molecular endocrinology*. – 2020. – Jan;64, № 1. – P. 43-52.

132. MiR-184 Combined with STC2 Promotes Endometrial Epithelial Cell Apoptosis in Dairy Goats via RAS/RAF/MEK/ERK pathway / J. Cui, X. Liu, L. Yang [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11, № 9. – P. 1052.

133. MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development / R. J. Acuña-González, M. Olvera-Valencia, J. S. López-Canales [et al.] // *Reproductive biology and endocrinology*. – 2021. – Vol. 131,19, № 1. – P. 109.

134. MiR-425-5p promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through SCAI-mediated dysregulation of multiple signaling pathways. / F. Fang, T. Song, T. Zhang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – May 9;8, № 19. – P. 31745-31757.

135. Mokhtar, M. H. Testosterone Decreases the Number of Implanting Embryos, Expression of Pinopode and L-selectin Ligand (MECA-79) in the Endometrium of Early Pregnant Rats / M. H. Mokhtar, N. Giribabu, N. Salleh //

International journal of environmental research and public health. – 2020. – Vol. 17, № 7. – P. 2293.

136. Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk. / M. Massimiani, V. Lacconi, F. La Civita [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 21, № 1. – P. 23.

137. Morfologicheskaia kharakteristika éndometriia u patsientok s miomoi matki i khronicheskim éndometritom pri besplodii [Endometrial morphological characteristics in patients with hysteromyoma and chronic endometritis in infertility] / E. L. Kazachkov, E. E. Voropaeva, E. A. Kazachkova [et al.] // Arkhiv patologii. – 2019. – Vol. 81, № 6. – P. 41-48.

138. Non-Coding RNAs as Biomarkers for Embryo Quality and Pregnancy Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis / W. Huang, A. C. H. Chen E. H. Y. Ng [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2023. – Mar 17;24, № 6. – P. 5751.

139. Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology / A. Ferlita, R. Battaglia, F. Andronico [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2018. – Jul 20;19, № 7. – P. 2120

140. Ochoa-Bernal, M. A. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates / M. A. Ochoa-Bernal, A. T. Fazleabas // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, № 6. – P. 1973.

141. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology / R. R. Egea, N. G. Puchalt, M. M. Escrivá [et al.] // Journal of human reproductive sciences. – 2014. – Vol. 7, № 2. – P. 73-92.

142. Oncogenic miR-425-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma/ J. Quan, Y. Li, X. Pan [et al.] // Oncology Letters. – 2018. – Vol. 16, № 2. – P. 2175-2184.

143. Pandit, S. Noninvasive assessment of human oocytes and embryos in assisted reproduction: Review on present practices and future trends/ S. Pandit, R. Sharma // Medical journal, Armed Forces India. – 2022. – Vol. 78, № 1. – P. 7-16.

144. Personalized Embryo Transfer Helps in Improving In vitro Fertilization/ICSI Outcomes in Patients with Recurrent Implantation Failure / J. A. Patel, A. J. Patel, J. M. Banker [et al.] // *Journal of human reproductive sciences.* – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 59-66.

145. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions / K. E. Quinn, B. C. Matson, M. Wetendorf [et al.] // *Molecular and cellular endocrinology.* – 2020. – Vol. 5, № 501. – P. 110644.

146. Preparation of endometrium for frozen embryo replacement cycles: a systematic review and meta-analysis / H. Yarali, M. Polat, S. Mumusoglu [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics.* – 2016. – Vol. 33, № 10. – P. 1287-1304.

147. Profiling the small non-coding RNA transcriptome of the human placenta / V. D. Martinez, D. E. Cohn, N. Telkar [et al.] // *Scientific data.* – 2021. – Vol. 8, № 1. – P. 166.

148. Progesterone suppresses podocalyxin partly by up-regulating miR-145 and miR-199 in human endometrial epithelial cells to enhance receptivity in in vitro models / M. Shekibi, S. Heng, Y. Wang [et al.] // *Molecular human reproduction.* – 2022. – Vol. 28, № 11. -gaac 034.

149. Proteomic Insights into Endometrial Receptivity and Embryo-Endometrial Epithelium Interaction for Implantation Reveal Critical Determinants of Fertility /J. Evans, J. Hutchison, L. A. Salamonsen [et al.] // *Proteomics.* – 2020. – Vol. 20, № 1. – e1900250.

150. Proteomic profiling of human uterine extracellular vesicles reveal dynamic regulation of key players of embryo implantation and fertility during menstrual cycle / A. Rai, Q. H. Poh, M. Fatmous [et al.] // *Proteomics.* – 2021. – Vol. 21, № 13-14. – e2000211.

151. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study /Z. Yang, J. Lin, J. Zhang [et al.] // *BMC medical genomics.* – 2015. – № 8. – P. 30.

152. Rarani, F. Z. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs / F. Z. Rarani, F. Borhani, B. Rashidi // *Journal of cellular physiology*. – 2018. – Vol. 233, № 12. – P. 9145-9158.

153. Reprint of: Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status / C. Coutifaris, E. R. Myers, D. S. Guzick [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2019. – Vol.112, № 4 Suppl1. – e116-e124.

154. Richard J. Paulson. A new journal—2020 // *F&S Reports*. – 2020. – Vol. 1, Issue 1, Page 1.

155. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology / B. Patel, S. Elguero, S. Thakore [et al.] // *Human Reproduction update*. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 155-173.

156. Salmasi, S. Evaluating the effect of ovarian stimulation and exogenous progesterone on CD31-positive cell density, VEGF protein, and miR-17-5p expression of endometrium immediately before implantation / S. Salmasi, M. Sharifi, B. Rashidi // *Biomedicine & pharmacotherapy*. – 2021. – Jan;133. – P. 110922.

157. Serum luteal phase progesterone in women undergoing frozen embryo transfer in assisted conception: a systematic review and meta-analysis / P. Melo, Y. Chung, O. Pickering [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2012. – Vol. 116, № 6. – P. 1534-1556.

158. Shekibi, M. MicroRNAs in the Regulation of Endometrial Receptivity for Embryo Implantation / M. Shekibi, S. Heng, G. Nie // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol.23, № 11. – P. 6210.

159. Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle / W. Wang, F. Vilella, P. Alama [et al.] // *Nature medicine*. – 2020. – Vol.26, № 10. – P. 1644-1653.

160. Small non-coding RNA and cancer / G. Romano, D. Veneziano, M. Acunzo [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 38, № 5. – P. 485-491.

161. Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage / A. V. Timofeeva, Y. S. Drapkina, I. S.

Fedorov [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, № 24. – P. 9399.

162. Small RNA-seq analysis of extracellular vesicles from porcine uterine flushing fluids during peri-implantation / R. Hua, Y. Wang, W. Lian [et al.] // Gene. – 2021. – Vol 766. – P. 145117.

163. Spent embryo culture medium metabolites are related to the in vitro attachment ability of blastocysts / F. D'Souza, S. Uppangala, G. Asampille [et al.] // Scientific reports. – 2018. – № 8. – P. 17025.

164. Study on the changes of gonadotropin releasing hormone agonist in pinopodes / W. Q. Zhou, Y. L. Jiang, H. B. Tang [et al.] // Zhonghua fu chan ke za zhi. – 2017. – Aug 25. – Vol. 52, № 8. – P. 539-544.

165. The Dynamics of miR-449a/c Expression during Uterine Cycles Are Associated with Endometrial Development / M. Naydenov, M. Nikolova, A. Apostolov [et al.] // Biology (Basel). – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 55.

166. The effect of endometrial thickness and pattern on the success of frozen embryo transfer cycles and gestational age accuracy / E. Shalom-Paz, N. Atia, Y. Atzmon [et al.] // Gynecological endocrinology. – 2021. – Vol. 37, № 5. – P. 428-432.

167. The effects of miRNA-1180 on suppression of pancreatic cancer/ L. Gu, J. Zhang, M. Shi [et al.] // American journal of translational research. – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 2798-2806.

168. The impact of endometrial thickness change after progesterone administration on pregnancy outcome in patients transferred with single frozen-thawed blastocyst / Z. Bu, X. Yang, L. Song [et al.] // Reproductive biology and endocrinology : RB&E. – 2019. – Vol.17, № 1. – P. 99.

169. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success / L. A. Salamonsen, J. Evans, H. P. Nguyen [et al.] // American journal of reproductive immunology. – 2016. – Vol.75, № 3. – P. 218-225.

170. 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, E. J. Forman, K. H. Hong [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2014. – Vol. 101, № 3. – P. 656-663.e1.

171. The role of miR-34c-5p/Notch in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in endometriosis / Y. Luo, D. Wang, S. Chen [et al.] // *Cellular signalling*. – 2020. – № 72. – P. 109666.

172. The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review / A. Salas-Huetos, E. R. James, K. I. Aston [et al.] // *Andrology*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 7-26.

173. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan, A. Kan, J. Hitkari [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2018. – Vol. 35, № 4. – P. 683-692.

174. The suppressive effects of miR-1180-5p on the proliferation and tumorigenicity of bladder cancer cells / Q. Ge, C. Wang, Z. Chen [et al.] // *Histology Histopathology*. – 2017. – Vol. 32, № 1. – P. 77-86.

175. Treiber, T. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways / T. Treiber, N. Treiber, G. Meister // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 5-20. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Dec;19(12):808. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 May;20(5):321.

176. Trophoctoderm differentiation to invasive syncytiotrophoblast is promoted by endometrial epithelial cells during human embryo implantation / P. T. Ruane, T. Garner, L. Parsons [et.al] // *Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 37, № 4. – P. 777-792.

177. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome / B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop [et al.] // *Genome Biology*. – 2009. – № 10, R25.

178. Uterine Fluid Proteins for Minimally Invasive Assessment of Endometrial Receptivity / S. Kasvandik, M. Saarma, T. Kaart [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2020. – Vol. 105, №1. – P. dgz019.

179. World Health Organization reference values for human semen characteristics / T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein [et al.] // Human Reproduction update. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 231–245.

180. Wu, S. P. Progesterone Receptor Regulation of Uterine Adaptation for Pregnancy / S. P. Wu, R. Li, F. J. De Mayo // Trends in endocrinology and metabolism: TEM. – 2018. – Vol. 29, № 7. – P. 481-491.