

*На правах рукописи*

ДЖИНЧАРАДЗЕ

Лана Гиглаевна

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ  
ФАКТОРОВ РОСТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ У ПАЦИЕНТОК С  
«ТОНКИМ» ЭНДОМЕТРИЕМ

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2021

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

Научные руководители:

кандидат медицинских наук Абубакиров Айдар Назимович

доктор медицинских наук, профессор Федорова Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты:

Рудакова Елена Борисовна - доктор медицинских наук, профессор, отделение вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», научный консультант.

Трахтман Павел Евгеньевич – доктор медицинских наук, профессор, отделение трансфузиологии, заготовки и процессинга гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, заведующий отделением.

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «12» октября 2021 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России [https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Dgincharadze%20L.G.-disser\\_2.pdf?798254692](https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Dgincharadze%20L.G.-disser_2.pdf?798254692)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема бесплодия по-прежнему актуальна и является частью глобальной демографической проблемы Российской Федерации. По данным отечественных и зарубежных авторов распространенность бесплодия достигает 10–15%, в некоторых регионах России – до 20%, а частота самопроизвольного выкидыша в первом триместре беременности сохраняется на уровне 16%. На долю женского бесплодия приходится около 60% [Здановский В.М., Буравченко Н.Б., 2010, Половнева М.И., Корнеева И.Е., Бурменская О.В., 2018]. В настоящее время наиболее востребованными и эффективными методами лечения всех форм бесплодия супружеской пары являются методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). После рождения первого ребенка путем экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в Великобритании в 1977 году, вспомогательные методы достижения беременности интенсивно развиваются и совершенствуются [ЭКО при гинекологических и эндокринных заболеваниях, Т.А. Назаренко.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016]. Несмотря на современный прогресс в технологиях ВРТ за последнее время эффективность программ ВРТ не превышает 40% [ВРТ в России в 2017 Г. / В.С. Корсак].

Среди всех форм бесплодия частота маточной формы составляет около 50%, однако даже при отсутствии патологии матки во время визуальной оценки, беременность не наступает при переносе генетически здорового эмбриона в программах ВРТ [Корнеева И.Е., Феоктистов А.А., Шуршалина А.В., 2005]. В данном случае можно предположить, что имеет место нарушение рецептивности эндометрия. Эндометрий восприимчив для эмбриона только в течение ограниченного периода времени. Это так называемое «окно имплантации» (ОИ), период которого составляет несколько дней – примерно с 19-го по 24-й день нормального менструального цикла, на 6–10-й день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) [Митюрин Е.В., Перминова С.Г., Демура Т.А., Галлямова Е.М., 2014]. Нарушение рецептивности эндометрия выявляют в 2/3 случаев неудачных имплантаций у женщин, планирующих беременность самостоятельно или с помощью ВРТ; в 1/3 случаев ключевую роль играет эмбрион [Половнева М.И., Корнеева И.Е., Бурменская О.В., 2018]. Для оценки рецептивности эндометрия применяют гистологические, иммуногистохимические или молекулярно-генетические методы исследования ткани эндометрия в «окно имплантации». Однако, данные исследования инвазивные, финансово затратны и подразумевают отмену переноса эмбриона в цикле, когда был взят образец ткани. Поэтому, в клинической практике для оценки рецептивности эндометрия используют следующие косвенные методы: измерение толщины эндометрия, оценка его структуры и объема, доплерометрия сосудов матки, которые определяются при проведении ультразвукового исследования (УЗИ). Толщина эндометрия равная или менее 7мм («тонкий» эндометрий) считается пограничной и ассоциирована с низкой частотой наступления беременности [Esmailzadeh S., Faramarzi M., 2007; McWilliams G.D., Frattarelli J.L., 2007]. На данное время нет точного определения пороговой

толщины «тонкого» эндометрия, а некоторые авторы и вовсе не связывают частоту наступления беременности с данным показателем. Имеются данные многочисленных исследований, где выявлена связь увеличения частоты наступления беременности с увеличением толщины эндометрия [Basir G.S. и соавт., 2002; Zhang X. и соавт., 2005].

В настоящее время клиницисты располагают следующими методами увеличения толщины эндометрия: это назначение циклической гормональной терапии (ЦГТ), физиотерапевтические методы лечения, назначение аспирина, витамина Е, L-аргинина, силденафил-цитрата, введение стволовых и прогениторных клеток в полость матки [Casper R.F., 2011; Cervelly I. и соавт., 2012; Chiao T.B., Lee A.J., 2005]. Однако в клинической практике проблемой является так называемый «рефрактерный» «тонкий» эндометрий, когда при назначении вышеуказанных методов лечения, толщина эндометрия не увеличивается. Поэтому, исследователями были предложены новые препараты для подготовки пациенток с «тонким» эндометрием к переносу эмбриона в программах ВРТ. В 2011г Gleicher N. и соавторы впервые применили рекомбинантный препарат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) для увеличения толщины эндометрия. Авторы сообщили об увеличении толщины эндометрия и наступлении беременности у всех 4х пациенток, вошедших в исследование [Norbert Gleicher и соавт., 2011]. Последующие исследования с применением данного препарата не всегда выявляли его положительный эффект на частоту наступления беременности и живорождения [Bin Xu и соавт., 2014; David H. Barad и соавт., 2014; Ensieh Tehraninejad и соавт., 2015]. Другой препарат для терапии бесплодия пациенток с «тонким» эндометрием – это аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами (ПОТр), которую впервые применили для увеличения толщины эндометрия Chang и соавторы [Yajie Chang и соавт., 2015]. Авторы также заявили об увеличении толщины эндометрия и наступлении беременности у всех 5 пациенток в программах ВРТ. Однако, последующие исследования также не всегда были однозначными относительно частоты наступления беременности и живорождения с использованием ПОТр [Aixa Molina и соавт., 2018; Maryam Eftekhari и соавт., 2014; Yajie Chang и соавт., 2019], что свидетельствует о том, что на данном этапе не до конца изучено влияние вышеуказанных препаратов на исходы программ ВРТ.

#### Степень разработанности темы исследования

Толщина эндометрия играет важную роль в прогнозировании наступления беременности и живорождении. Не оценена роль препаратов Г-КСФ и ПОТр для увеличения толщины эндометрия и частоты наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием в программах ВРТ, нет работ сравнивающих эффективность данных препаратов, а также работ по экспрессии генов маркеров рецептивности «тонкого» эндометрия в зависимости от исходов программ ВРТ.

### Цель исследования

Повышение эффективности программ ВРТ при подготовке пациенток с «тонким» эндометрием к переносу размороженных эмбрионов с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (ПОТр).

### Задачи исследования

1. Выявить особенности клиничко - анамнестических данных пациенток с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием.
2. Изучить влияние внутриматочного применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на толщину эндометрия, частоту наступления беременности и живорождения у пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
3. Изучить влияние внутриматочного применения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами на толщину эндометрия, частоту наступления беременности и живорождения у пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
4. Сравнить частоту наступления беременности в зависимости от используемой терапии у пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
5. Изучить специфику экспрессии генов маркеров рецептивности эндометрия (GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, GNLY, EDN3, SFRP4) в «окно имплантации» у пациенток с «тонким» эндометрием в зависимости от исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий.
6. Разработать алгоритм подготовки пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий с применением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами.

### Научная новизна

В настоящей работе выявлены особенности клиничко-анамнестических данных у пациенток с «тонким» эндометрием и нарушением репродуктивной функции. Разработана методика применения аутологичной ПОТр и Г-КСФ и изучена эффективность и безопасность применения у пациенток с «тонким» эндометрием в программах криопереноса размороженного эмбриона. Выявлено, что внутриматочное введение Г-КСФ и аутологичной ПОТр приводят к увеличению толщины эндометрия и частоты наступления беременности и живорождения в программах ВРТ у

пациенток с «тонким» эндометрием. Исследована экспрессия мРНК генов GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, GNLY, EDN3, SFRP4 - маркеров рецептивности эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием в периоде предполагаемого «окна имплантации». Выявлено, что увеличение экспрессии мРНК генов TAGLN и SFRP4 является благоприятным прогностическим фактором наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием.

#### Практическая значимость

На основании данного исследования определена целесообразность назначения Г-КСФ и аутологичной ПОТр у пациенток с «тонким» эндометрием в программах криопереноса размороженных эмбрионов для улучшения исходов программ ВРТ. Определены схемы назначения данных препаратов. Определена пороговая толщина эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием, при толщине эндометрия выше которой увеличивается эффективность программ ВРТ. Применен новый атравматичный метод взятия аспирата из полости матки для исследования генов маркеров рецептивности эндометрия. Определены гены маркеры рецептивности эндометрия, прогнозирующие благоприятный исход программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием.

#### Методология и методы исследования

Проведено проспективное обследование пациенток, обратившихся для лечения бесплодия методом ВРТ и наличием «тонкого» эндометрия и неэффективных программ ВРТ в анамнезе. Все пациентки были обследованы в соответствии с приказом Министерства здравоохранения России №107н от 30.08.2012 года "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Всем пациенткам назначалась циклическая гормональная терапия (ЦГТ) с 4-5го дня менструального цикла (м.ц.) для подготовки эндометрия к переносу размороженных эмбрионов. Пациентки были разделены на три группы методом простой рандомизации с неравномерным распределением по группам (метод конвертов) в зависимости от проводимой терапии: 1 группа – пациентки с назначением только ЦГТ, 2 группа – в дополнение к ЦГТ пациенткам внутриматочно вводился препарат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, 3 группа – в дополнение к ЦГТ пациенткам внутриматочно вводилась аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами. У 20 пациенток перед вступлением в исследуемые группы был взят аспират из полости матки в «окно имплантации» (на 19-21 день м.ц. на фоне приема ЦГТ, на 6й день приема препаратов прогестерона) для определения генов маркеров рецептивности эндометрия (GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, GNLY, EDN3, SFRP4) методом ПЦР в реальном времени.

#### Положения, выносимые на защиту

1. Факторами риска формирования «тонкого» эндометрия являются наличие в анамнезе частых внутриматочных вмешательств в связи с ранними потерями беременности и наличие хронического эндометрита. Более 40% пациенток с «тонким» эндометрием имеют в анамнезе множественные неэффективные программы ВРТ.

2. Внутриматочное введение препаратов Г-КСФ и аутологичной ПОТр в сочетании с ЦГТ благоприятно влияют на увеличение толщины эндометрия и исходы программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием, увеличивая частоту наступления беременности и живорождения по сравнению с применением только ЦГТ.
3. Факторами, ассоциированными с наступлением беременности у пациенток с «тонким» эндометрием являются толщина эндометрия более 7,9мм и увеличение экспрессии мРНК генов TAGLN и SFRP4 в эндометрии в день предполагаемого «окна имплантации».

#### Личный вклад автора

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

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Апробация результатов

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1 – го гинекологического отделения (28 июля 2020г) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (18 декабря 2020г, протокол №35).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Подготовка женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием внедрена в практическую деятельность 1–го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты работы используются в лекциях, на обучающих семинарах для ординаторов, врачей, стажеров симуляционного центра и научно-образовательного центра ВРТ им. Фредерика Паулсена.

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 155 страницах машинописного текста, иллюстрирована 9 рисунками, 21 таблицами. Библиографический указатель включает 12 работ на русском языке и 197 работ на английском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

В исследование вошли 163 пациенток с «тонким» эндометрием (толщина эндометрия не более 7 мм в день переноса эмбриона в криоцикле). Исследование было проспективным рандомизированным сравнительным.

Все женщины методом простой рандомизации с неравномерным распределением по группам были разделены на три группы в зависимости от проводимой терапии.

Всем пациенткам, включенным в исследование, назначалась циклическая гормональная терапия с 4-5 дня м.ц., в случае отсутствия функциональных кист в яичниках и наличия линейной структуры эндометрия и при ее толщине не более 4-5 мм при проведении ультразвукового исследования. Пациенткам назначался препарат эстрадиола валерат по схеме в дозировке до 12 мг в сутки. С 15-16 дня м.ц. добавлялся микронизированный прогестерон в дозировке 600мг или гидрогестерон в дозировке 60мг в сутки.

В первую группу вошли 43 пациенток с «тонким» эндометрием и неудачными попытками ВРТ в анамнезе, где для подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона пациентками назначалась только циклическая гормональная терапия (ЦГТ).

Вторую группу составили 46 пациенток с «тонким» эндометрием и неудачными попытками ВРТ в анамнезе, где в дополнение к ЦГТ пациенткам внутриматочно, в стерильных условиях, с помощью катетера для инсеминации (Smiths Medical International Ltd.) вводился рекомбинантный препарат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) Филграстим в дозировке 300 мкг на 5-6 и 8-9 дни м.ц. Следует отметить, что Филграстим в данном случае является препаратом «off label», т.к. согласно инструкции применения он не предназначен для внутриматочного введения. Согласно инструкции основной способ введения препарата – внутривенный и подкожный для лечения нейтропении.

Третью группу составили 74 пациентки, где в дополнение к ЦГТ пациенткам внутриматочно, в стерильных условиях вводилась аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами в объеме 5-7 мл с помощью катетера для инсеминации (Smiths Medical International Ltd.) на 8-9, 10-11 и 12-13 дни м.ц.

Перенос эмбриона, ведение посттрансферного периода и диагностика беременности осуществлялись по стандартизированным методикам.

Критериями включения в исследование были: возраст от 20 до 42 лет, регулярный овуляторный менструальный цикл (25 – 34 дней), индекс массы тела - 18 – 30 кг/м<sup>2</sup>, оплодотворение методами ЭКО или ИКСИ, бесплодие, обусловленное трубным и/или мужским фактором и/или наружным генитальным эндометриозом, идиопатическое бесплодие, наличие в анамнезе 0 – 2 безуспешных циклов переносов эмбрионов в полость матки (не более 4 бластоцист), наличие не менее 3 витрифицированных бластоцист классов: 1) excellent ( $\geq 3AA$ ); 2) good (3,4,5,6, AB and BA) и/или average (3,4,5,6 BB, AC и CA) (по классификации Gardner and

Schoolcraft (1999), информированное согласие на участие в исследовании. Критериями не включения в исследование были: нескорректированные эндокринные заболевания и/или патологические состояния, сопровождаемые нарушениями овуляторной функции, негативно влияющие на имплантацию эмбриона, верифицированный лапароскопически и/или ультрасонографически наружный генитальный эндометриоз III – IV стадии распространения, интерстициальная и/или субсерозная миома матки более  $\geq 4$  см, субмукозная локализация миомы матки, гидросальпинкс с одной/обеих сторон по данным гистеросальпингографии и/или ультразвукового исследования, пороки развития внутренних половых органов до их хирургической коррекции, приобретенные значительные деформации полости матки, при которых невозможна или затруднена имплантация эмбрионов или вынашивание беременности, олигоастенотератозооспермия III - IV степени, тяжелые формы привычного невынашивания беременности (более 3 ранних потерь беременности), синдром Ашермана II – III стадий, наличие противопоказаний для применения Г-КСФ (согласно инструкции для препарата), гинекологические и экстрагенитальные заболевания, психические заболевания, злокачественные новообразования любой локализации, острые воспалительные заболевания и хронические заболевания любой локализации в стадии обострения, являющиеся противопоказаниями для проведения программ ВРТ, вынашивания беременности и родов.

Специальные методы исследования включали исследование аспирата из полости матки на фоне применения ЦГТ в период предполагаемого «окна имплантации» (на 6й день приема препаратов прогестерона) на экспрессию мРНК генов GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, GNLV, EDN3 и SFRP4 методом ПЦР в реальном времени.

#### Технология получения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами

Пациенткам на 8-9 день м.ц. производился забор аутологичной крови в объеме 400,0 мл в первый контейнер встроенной системы «Blood bag» (фирма JMS Singapore) с антикоагулянтом CPDA -63 ml. Далее контейнер с кровью центрифугировался в рефрижераторной центрифуге «Westan» в течение 8 минут в режиме 1971g при температуре + 22 °С. После центрифугирования с помощью плазмоекстрактора плазма и тромбоциты (верхний и средний слой) перемещались во второй контейнер. Контейнер с аутоэритроцитами отсоединялся, и они реинфузировались пациентке. Второй контейнер с плазмой и тромбоцитами повторно центрифугировался в течение 10 минут с центробежным ускорением 5130g при температуре + 22 °С. После этого с помощью плазмоекстрактора в третий контейнер удалялся верхний слой - это нативная плазма, а нижний слой – концентрированные тромбоциты, взвешенные в плазме, перемещались в специальный контейнер для хранения тромбоцитов (фирма JMS, Singapore). Контейнер с аутологичной ПОТр маркировали, оставляли в течение 1 часа в спокойном состоянии для дезагрегации тромбоцитов, далее переносили в климатическую камеру для перемешивания тромбоцитов LmB Technologie GmbH (производство Германия), где она может храниться в течение 5 суток при температуре +

22 - +24 ° С. При соблюдении данной методики из 400±50 мл цельной крови в результате двухэтапного центрифугирования получали 40±5 мл аутологичной ПОТр с содержанием 0,6-0,7 x 10<sup>11</sup> тромбоцитов в ней. В последующем в стерильных условиях аутологичная ПОТр разделялась на три дозы в контейнеры для хранения тромбоцитов, которые выдавались в процедурную в дни проведения манипуляции.

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

#### Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе были проанализированы клиничко-лабораторные показатели, особенности программ ВРТ в анамнезе и причины бесплодия. Не было выявлено значимых различий в лабораторных показателях и анамнестических данных среди пациенток групп 1, 2 и 3. Было выявлено статистически значимо больше неэффективных программ ПЭ в анамнезе среди пациенток 3й группы (ПОТр) и значимо больше отмен ПЭ в анамнезе в связи с «тонким» эндометрием во 2й группе пациенток (Г-КСФ), а также в 3 группе было статистически значимо больше супружеских пар с мужским фактором бесплодия по сравнению с группами 1 и 2, но мы считаем, что вышеуказанные различия не могли повлиять на равномерность групп нашего исследования.

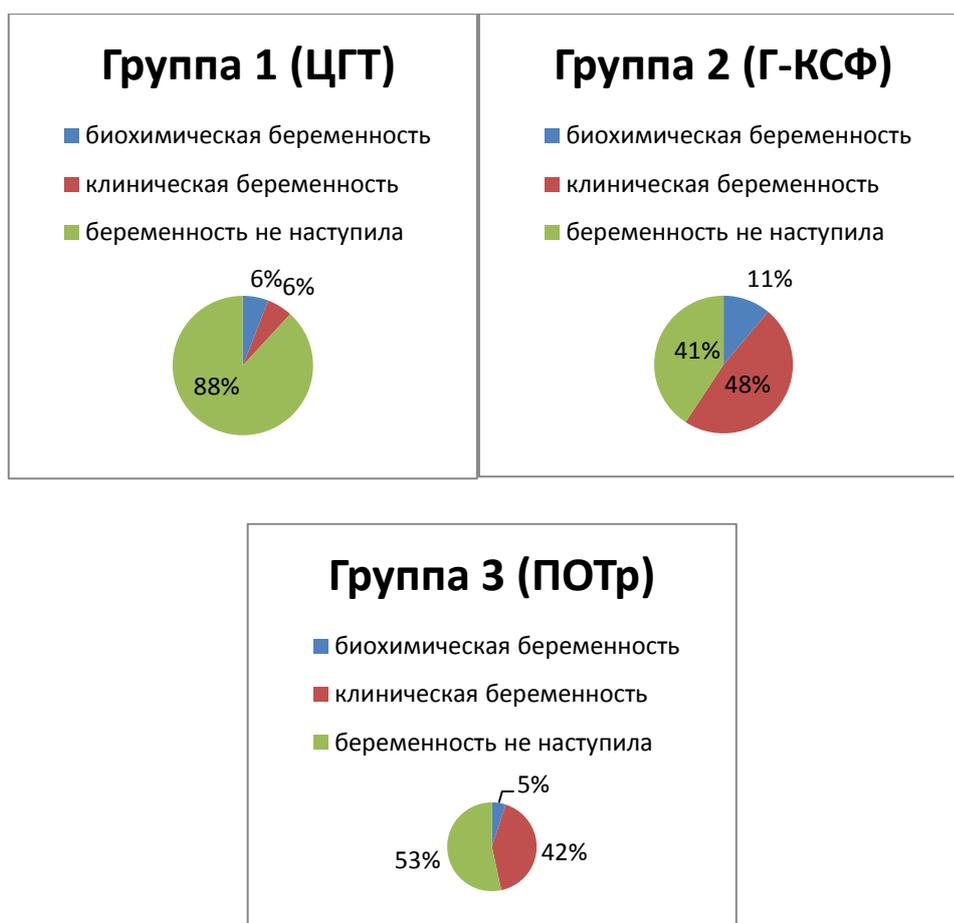
На втором этапе нашего исследования мы проанализировали эффективность применения препаратов Г-КСФ и ПОТр в зависимости от увеличения толщины эндометрия и исходов программ ВРТ. Средняя толщина эндометрия в день переноса эмбриона (19-21 день м.ц.) в группе 1 (ЦГТ) была 7,0 ± 1,1 мм, во 2 группе (Г-КСФ) – 7,9 ± 1,8 мм, в 3 группе (ПОТр) – 8,0 ± 1,3 мм. Разница между 1 и 2 группой статистически значима – p=0,003, разность средних значений – 0,96 (95% ДИ = 0,33; 1,59), между 1 и 3 группой разница также статистически значима – p<0,001, разность средних значений – 1,0 (95% ДИ = 0,53; 1,47), между 2 и 3 группой разница статистически не значима – p=0,790, разность средних значений – 0,04 (95% ДИ = -0,53; 0,61).

УЗИ органов малого таза также было проведено на 9-10, 11-12, 13-14 и 15-16 день м.ц. до назначения препаратов прогестерона. Оценивался прирост толщины эндометрия с 9-10 по 11-12 дни м.ц., с 11-12 по 13-14 дни м.ц. и с 9-10 по 15-16 дня м.ц. в зависимости от назначаемой терапии. При анализе прироста толщины эндометрия с 9-10 по 11-12 дни м.ц. были получены следующие результаты: разница между 1 (ЦГТ) и 2 (Г-КСФ) группами была статистически значима - p=0,015 (0,38 ± 0,05 мм и 0,68 ± 0,11мм соответственно), разность средних значений – 0,30 (95% ДИ = 0,05; 0,55), разница между 1 и 3 (ПОТр) группами статистически значима - p=0,008 (0,38 ± 0,05 мм и 0,59 ± 0,06 мм соответственно), разность средних значений – 0,21 (95% ДИ = 0,03; 0,39), разница между 2 и 3 группами была статистически не значима - p=0,474, разность средних значений – 0,09 (95% ДИ = -0,14; 0,32). При анализе прироста толщины эндометрия с 11-12 по 13-14 дни м.ц. было выявлено, что разница между 1 и 2 группами

статистически значима -  $p=0,006$  ( $0,29 \pm 0,04$  мм и  $0,54 \pm 0,08$  мм соответственно), разность средних значений –  $0,25$  (95% ДИ =  $0,07; 0,43$ ), разница между 1 и 3 группами статистически значима –  $p<0,001$  ( $0,29 \pm 0,04$  мм и  $0,58 \pm 0,06$  мм соответственно), разность средних значений –  $0,29$  (95% ДИ =  $0,13; 0,45$ ), разница между 2 и 3 группами статистически не значима -  $p=0,690$ , разность средних значений –  $0,04$  (95% ДИ =  $-0,15; 0,23$ ).

Анализ прироста толщины эндометрия с 9-10 по 15-16 дни м.ц. показал следующие результаты: в группе 1 (ЦГТ) средний прирост толщины эндометрия составил –  $0,6 \pm 0,7$  мм, во 2 группе (Г-КСФ) –  $1,0 \pm 1,6$  мм, в 3 группе (ПОТр) –  $1,0 \pm 1,2$  мм. Разница между 1 и 2 группами статистически не значима –  $p=0,103$ , разность средних значений –  $0,42$  (95% ДИ =  $-0,10; 0,94$ ), но в 1й группе толщина эндометрия 8мм и более в день ПЭ была у 9 (20,9%) пациенток, а во 2й группе – у 18 (39,1%) пациенток, между 1 и 3 группами разница статистически значима,  $p=0,008$ , разность средних значений –  $0,46$  (95% ДИ =  $0,08; 0,84$ ), между 2 и 3 группами разница статистически не значима,  $p=0,880$ , разность средних значений –  $0,04$  (95% ДИ =  $-0,45; 0,53$ )

Далее мы проанализировали исходы программ ВРТ между группами 1, 2 и 3. При сравнении показателя частоты отмены цикла ПЭ в связи с наличием «тонкого» эндометрия в день ПЭ были получены статистически значимые результаты: статистически значимо больше отмен циклов ПЭ было в 1 группе (ЦГТ) по сравнению с 2 (Г-КСФ) и 3 (ПОТр) группами ( $p=0,045$  (ОШ-2,38 с 95% ДИ= $1,02; 5,57$ ) и  $p<0,001$  (ОШ-7,18 с 95% ДИ= $3,05; 16,89$ ) соответственно), также статистически значимо больше циклов ПЭ отменили по этой причине во 2 группе (Г-КСФ) по сравнению с 3 группой (ПОТр) ( $p=0,009$ , ОШ-3,02 с 95% ДИ= $1,30; 7,00$ ). Частота биохимической беременности не различалась в исследуемых группах. Частота клинической беременности была статистически значимо ниже в 1 группе по сравнению с 2 и 3 группами ( $p=0,030$  (ОШ – 16,55 с 95% ДИ= $2,06; 133,03$ ) и  $p=0,037$  (ОШ – 21,43 с 95% ДИ= $2,78; 164,94$ ) соответственно), но этот показатель не различался между группами Г-КСФ и ПОТр. Не различалась частота потерь беременности до 12 недель гестации между всеми тремя группами. В группе 1 (ЦГТ) не было ни одного случая живорождения, данный показатель статистически различался по сравнению с 2 (Г-КСФ) и 3 (ПОТр) группами ( $p=0,015$  и  $p=0,034$ , соответственно), но в данном показателе не было различий между 2 и 3 группами (Рисунок 1).

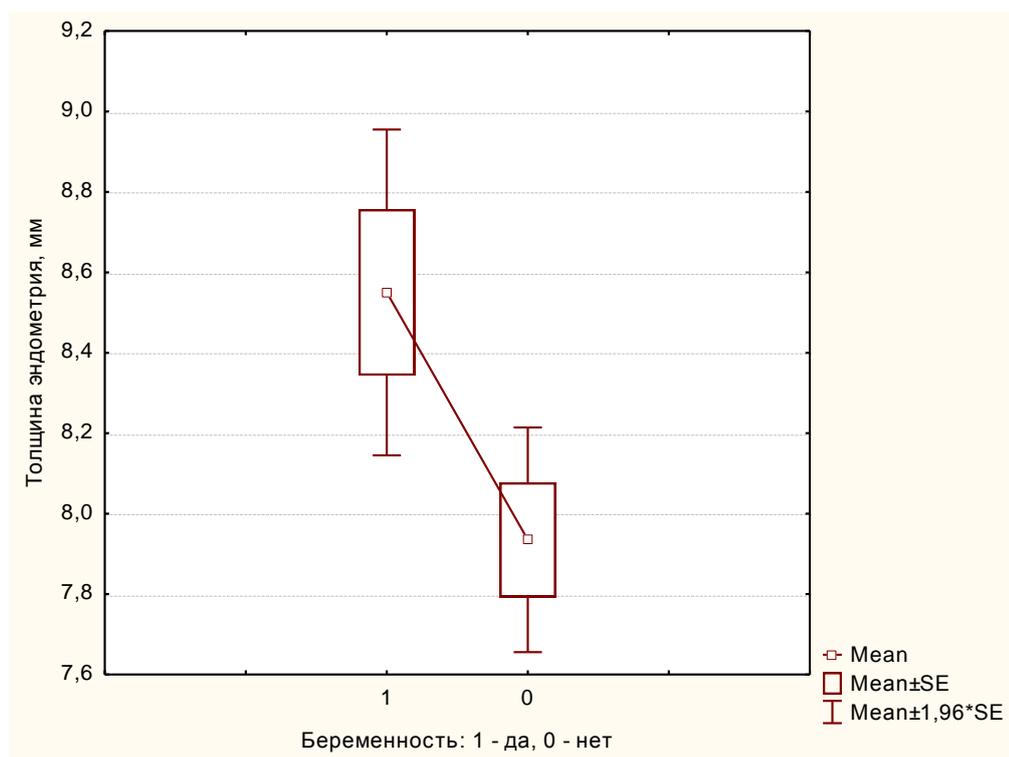


**Рис.1.** Исходы программ ВРТ в группах 1, 2 и 3

На третьем этапе нашего исследования для выявления факторов, влияющих на наступление беременности у пациенток, вошедших в исследование, были выделены 106 пациенток исследования, которым производился перенос эмбриона в полость матки. Пациентки были разделены ретроспективно на 2 группы: группа А (n=46) – беременность наступила и группа Б (n=60) – беременность не наступила.

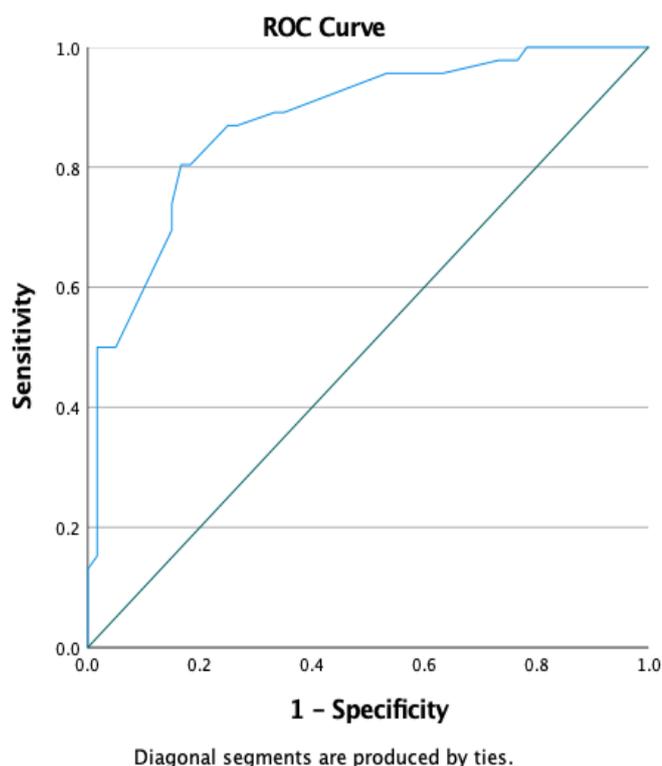
При анализе клинико-лабораторных и анамнестических данных не было выявлено статистически значимых различий между группами за исключением больше неэффективных попыток ВРТ в группе с наступившей беременностью (48 (75%) против 59 (45,0%),  $p < 0,001$ ). Данный результат возможно объяснить тем, что при множестве неэффективных попыток ПЭ пациентки обследуются более углубленно и устраняются причины возможных неудачных попыток ПЭ, что в последующем способствует благоприятному исходу программ ВРТ.

На четвертом этапе исследования мы проанализировали толщину эндометрия в день переноса эмбриона в группах с наступившей (группа А) и не наступившей беременностью (группа Б), в группе А – средняя толщина эндометрия в день ПЭ была равна  $8,6 \pm 1,4$  мм, в группе Б –  $7,9 \pm 1,1$  мм, разница статистически значима ( $p = 0,013$ ) (Рисунок 2).



**Рис.2.** Толщина эндометрия у пациенток групп А и Б.

С помощью метода логистической регрессии, при проведении однофакторного анализа был выявлен пороговый уровень толщины эндометрия, при котором вероятность наступления беременности выше, данный показатель составил 7,9 мм, достоверность модели и площадь под кривой (AUC) были максимальными (AUC=0,876, чувствительность (Se)=73,9%, специфичность (Sp)=85,0%). (Рисунок 3).



**Рис.3.** ROC-кривая зависимости наступления беременности от толщины эндометрия

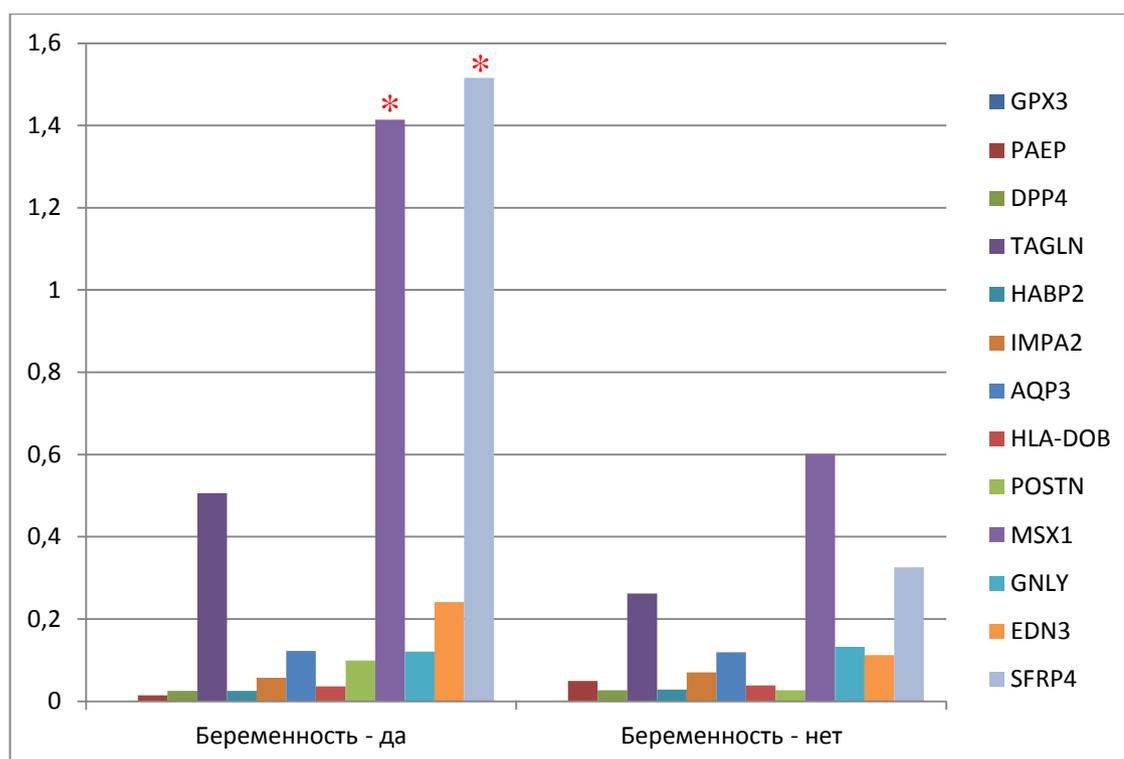
На пятом этапе исследования была проведена сравнительная оценка профиля экспрессии мРНК следующих генов: GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, GNLY, EDN3 и SFRP4 методом ОТ-ПЦР у 20 пациенток, у которых был взят аспират из полости матки перед вступлением в исследование. Аспират из полости матки был взят на фоне приема ЦГТ, на 6й день приема препаратов прогестерона (день предполагаемого «окна имплантации»). Ретроспективно пациентки были разделены на 2 группы: группа а (n=7) - пациентки, у которых беременность наступила в следующем цикле криопереноса и группа б (n=13) - пациентки, у которых беременность не наступила в следующем цикле криопереноса. В результате анализа экспрессии мРНК генов-маркеров рецептивности эндометрия было выявлено, что экспрессия мРНК генов TAGLN и SFRP4 была статистически значимо выше в эндометрии пациенток с наступившей беременностью ( $p < 0,05$ ), экспрессия мРНК данных генов имела умеренную корреляционную связь с наступлением беременности у пациенток данного исследования ( $r=0,557$  и  $r=0,527$  соответственно). У пациенток с наступившей беременностью уровень экспрессии мРНК гена TAGLN в эндометрии была в 1,9 раз выше, а мРНК гена SFRP4 в 4,6 раз выше по сравнению с эндометрием пациенток с не наступившей беременностью (Таблица 1) (Рисунок 4).

Таблица 1. Уровень экспрессии мРНК генов-маркеров рецептивности эндометрия у пациенток групп а и б

	Группа а (n=7)	Группа б (n=13)	r-	p-уровень
GPX3	0,00087 (0,00045- 0,00190)	0,00097 (0,00037-0,00186)	0,135	p > 0,05
PAEP	0,01441 (0,00612-0,12466)	0,04961 (0,02015-0,24713)	-0,105	p > 0,05
DPP4	0,02538 (0,01920-0,02981)	0,02689 (0,01545-0,06323)	0,061	p > 0,05
TAGLN	0,50581 (0,46960-0,59560)	0,26182 (0,19615-0,46116)	<b>0,557</b>	<b>p &lt; 0,05</b>
HABP2	0,02551 (0,01145-0,05343)	0,02882 (0,01144-0,07606)	0,045	p > 0,05
IMPA2	0,05693 (0,02596-0,08446)	0,07015 (0,03125-0,11529)	0,001	p > 0,05
AQP3	0,12214 (0,08482-0,18073)	0,11936 (0,06546-0,34151)	0,136	p > 0,05
HLA-DOB	0,03590 (0,02920-0,05944)	0,03847 (0,02341-0,09921)	0,120	p > 0,05
MSX1	1,41421 (0,58661-1,59662)	0,60151 (0,40613-1,05946)	<b>0,354</b>	p > 0,05
POSTN	0,09921 (0,04276-0,14640)	0,02720 (0,01255-0,08152)	<b>0,436</b>	p > 0,05
GNLY	0,12074 (0,04049-0,26929)	0,13243 (0,06935-0,36182)	0,083	p > 0,05
EDN3	0,24148 (0,10821-0,52307)	0,11266 (0,05195-0,32988)	<b>0,391</b>	p > 0,05
SFRP4	1,51572 (0,76245-1,96961)	0,32609 (0,19389-0,56775)	<b>0,527</b>	<b>p &lt; 0,05</b>

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

r - коэффициент корреляции



**Рис. 4.** Уровень экспрессии мРНК генов маркеров рецептивности эндометрия у пациенток групп а и б

В связи с выявлением мРНК генов TAGLN и SFRP4 в эндометрии, ассоциированных с более высокой частотой наступления беременности, мы решили провести анализ экспрессии мРНК генов-маркеров рецептивности эндометрия среди пациенток лечебных групп с целью выявления их однородности по данным показателям. В группе с ЦГТ вошли 9 пациенток, в группе с Г-КСФ – 4 пациентки, в группе с ПОТр – 7 пациенток. Было выявлено статистически значимое увеличение экспрессии мРНК гена EDN3 в группе с ПОТр по сравнению с группой с Г-КСФ, но вышеуказанный ген не был ассоциирован с более высокой частотой наступления беременности, поэтому лечебные группы были сопоставимы по уровню экспрессии мРНК генов-маркеров рецептивности эндометрия (таблица 2).

**Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК генов-маркеров рецептивности эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием в группах 1, 2 и 3**

	Группа 1 ЦГТ n= 9	Группа 2 Г-КСФ n= 4	Группа 3 ПОТр n= 7	p-уровень
GPX3	0,00087 (0,00041- 0,00332)	0,00114 (0,00037- 0,00195)	0,00097 (0,000311- 0,00140)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05

PAEP	0,02658 (0,01441 – 0,04961)	0,16652 (0,11913 – 0,19072)	0,02720 (0,00545 – 0,42782)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
DPP4	0,02538 (0,01284 – 0,03273)	0,01649 (0,01540 – 0,02408)	0,04269 (0,02387 – 0,06964)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
TAGLN	0,50581 (0,26182 – 0,62996)	0,38807 (0,30169 – 0,46801)	0,29389 (0,18624 – 0,46725)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
HABP2	0,02628 (0,01144 – 0,80586)	0,03361 (0,01397 – 0,05798)	0,02882 (0,00897 – 0,90735)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
IMPA2	0,03716 (0,02752 – 0,06622)	0,08643 (0,06560 – 0,10586)	0,07015 (0,03108 – 0,10971)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
AQP3	0,11266 (0,06546 – 0,34151)	0,14550 (0,08335 – 0,21060)	0,12214 (0,08657 – 0,29487)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
HLA-DOB	0,03590 (0,03273 – 0,04369)	0,05799 (0,02231 – 0,11903)	0,03847 (0,02676 – 0,08166)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
MSX1	0,82169 (0,44033 – 1,58740)	0,51589 (0,34239 – 0,86198)	0,66742 (0,53677 – 1,20491)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
POSTN	0,04318 (0,02720 – 0,09921)	0,06228 (0,01951 – 0,12174)	0,05317 (0,00808 – 0,05317)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05

GNLY	0,12074 (0,06935 – 0,18091)	0,35974 (0,30135 – 0,35974)	0,09583 (0,00341 – 0,15061)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05
EDN3	0,11008 (0,07784 – 0,24148)	0,07914 (0,04482 – 0,12004)	0,51169 (0,24368 – 0,67184)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 <b>p3 &lt; 0,05</b>
SFRP4	0,58102 (0,35766 – 1,51572)	0,26937 (0,20797 – 0,42340)	0,56775 (0,19105 – 2,54560)	p1 > 0,05 p2 > 0,05 p3 > 0,05

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

p1- сравнение групп 1 и 2, p2 – сравнение групп 1 и 3, p3 – сравнение групп 2 и 3

Результаты проведенного исследования продемонстрировали преимущество применения препаратов Г-КСФ и ПОТр для подготовки пациенток с «тонким» эндометрием к программам переноса размороженных эмбрионов в добавление к ЦГТ по сравнению с назначением только ЦГТ. Следует отметить, что в нашем исследовании не было выявлено ни одного побочного эффекта после назначения данных препаратов.

### ВЫВОДЫ

1. Для пациенток с «тонким» эндометрием и неэффективными программами ВРТ характерны: наличие в анамнезе хронического эндометрита – у 59,1%; у каждой второй – потеря беременности до 12 недель гестации; отсутствие наступления беременности в программах криопереноса размороженного эмбриона в анамнезе у 41,7% пациенток.
2. Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами в сочетании к ЦГТ приводит к увеличению толщины эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием по сравнению с назначением только ЦГТ (средняя толщина эндометрия в день ПЭ -  $8,0 \pm 1,3$  мм против  $7,0 \pm 1,1$  мм соответственно,  $p < 0,001$ , разность средних значений – 1,0 (95% ДИ = 0,53; 1,47)), что позволяет повысить эффективность программ ВРТ (частота клинической беременности 41,0% против 5,9% соответственно,  $p = 0,037$ , ОШ – 16,55 с 95% ДИ = 2,06; 133,03, частота живорождения 27,9% против 0%,  $p = 0,034$ ).
3. Применение препарата гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в добавлении к ЦГТ приводит к увеличению толщины эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием по сравнению только с назначением ЦГТ (средняя толщина эндометрия в день ПЭ -  $7,9 \pm 1,8$  мм против  $7,0 \pm 1,1$  мм,  $p = 0,003$ , разность средних значений – 0,96 (95% ДИ = 0,33; 1,59)), что позволяет повысить эффективность программ ВРТ (частота клинической

- беременности 46,4% против 5,9% соответственно,  $p=0,030$ , ОШ – 21,43 с 95% ДИ=2,78; 164,94, частота живорождения 64,7% против 0%,  $p=0,015$ ).
4. Методы подготовки эндометрия с применением аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора не различались между собой по эффективности при сравнении исходов программ ВРТ (частота клинической беременности 41,0% и 46,4% соответственно,  $p=0,762$ , частота живорождения 27,9% и 64,7% соответственно,  $p=0,444$ ).
  5. Пороговым уровнем толщины эндометрия, при достижении которого возрастает частота наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием является толщина эндометрия равная 7,9мм, площадь под кривой (AUC) = 0,876, чувствительность (Se)=73,9%, специфичность (Sp)=85,0%.
  6. Молекулярно-генетическими маркерами прогноза наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием являются увеличение в эндометрии в «окно имплантации» экспрессии мРНК гена TAGLN в 1,9 раз и мРНК гена SFRP4 в 4,6 раз, экспрессия мРНК в данных генов имела умеренную корреляционную связь с наступлением беременности у пациенток данного исследования ( $r=0,557$  и  $r=0,527$  соответственно).
  7. Разработанный алгоритм подготовки пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий с применением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами позволяет повысить эффективность программ ВРТ до 46,4%.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении программ криопереноса размороженного эмбриона пациенткам с «тонким» эндометрием (менее 7мм) для улучшения исходов программ ВРТ рекомендовано назначение препарата Г-КСФ или аутологичной ПОТр внутриматочно в дополнение к ЦГТ. Г-КСФ и аутологичную ПОТр можно одинаково рекомендовать для подготовки пациенток с «тонким» эндометрием к ПЭ, т.к. при их назначении не было отмечено различий в исходах программ ВРТ.
2. Препарат Г-КСФ рекомендовано вводить в дозировке 300 мкг внутриматочно на 5-6 и 8-9 дни м.ц в дополнение к ЦГТ.
3. Аутологичную ПОТр рекомендовано вводить внутриматочно в объеме 5-7мл на 8-9, 10-11 и 12-13 дни м.ц. в дополнение к ЦГТ. Изготовление аутологичной ПОТр следует проводить в специализированных отделениях гравитационной хирургии крови, кабинетах трансфузиологии сертифицированными специалистами, обеспечивающими получение качественной аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами в количестве не менее  $0,5-0,6 \times 10^{11}$ .

4. При проведении программы криопереноса размороженного эмбриона у пациенток с «тонким» эндометрием рекомендовано произвести ПЭ при достижении толщины эндометрия более 7,9мм.
5. В цикле предшествующем программе криопереноса размороженного эмбриона у пациенток с «тонким» эндометрием рекомендовано атравматичное взятие аспирата из полости матки в предполагаемое «окно имплантации» для определения уровня экспрессии мРНК генов TAGLN и SFRP4, повышение экспрессии данных генов является прогностически благоприятным признаком наступления беременности.
6. В клинической практике репродуктолога рекомендуется использовать алгоритм, разработанный на основании полученных данных (см. Приложение)

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и плазмы, обогащенной тромбоцитами, в подготовке пациенток с «тонким» эндометрием в программах переноса размороженных эмбрионов / **Джинчарадзе Л.Г.**, Абубакиров А.Н., Мишиева Н.Г., Федорова Т.А., Бакуридзе Э.М., Быстрых О.А. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. - № 4. – С. 90-96.
2. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в гинекологии / **Джинчарадзе Л.Г.** // **Акушерство и гинекология.** – 2020. - № 5. – С. 150-155.
3. Внутриматочное введение гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора у пациенток с «тонким» эндометрием в программах криопереноса размороженных эмбрионов / **Джинчарадзе Л.Г.**, Абубакиров А.Н., Мишиева Н.Г. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. - № 8. – С. 106-110.
4. Эффективность внутриматочного введения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, для подготовки «тонкого» эндометрия к программе криопереноса размороженных эмбрионов / **Джинчарадзе Л.Г.**, Абубакиров А.Н., Мишиева Н.Г., Бакуридзе Э.М., Быстрых О.А. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. - № 2. – С. 90-95.

## Приложение 1

### Алгоритм подготовки пациенток с «тонким» эндометрием в программах ВРТ

