

На правах рукописи

ЭФЕНДИЕВА
Зульфия Нурудиновна

ЛЕЧЕНИЕ ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ НА ФОНЕ «ТОНКОГО»
ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ПОМОЩИ АУТОЛОГИЧНЫХ ОБОГАЩЕННОЙ
ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Аполихина Инна Анатольевна
доктор медицинских наук, доцент Фатхудинов Тимур Хайсамудинович

Официальные оппоненты:

Краснопольская Ксения Владиславовна - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», руководитель отделения репродуктологии

Тапильская Наталья Игоревна - доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных репродуктивных технологий

Ведущая организация:

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России

Защита состоится «26» 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» Минздрава России 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/Efendieva%20Z%20N%20-disser.pdf?1181532594>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка, внедрение и усовершенствование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) имеют перед собой конкретную цель: повышение частоты живорождения. Для наступления беременности необходимо наличие эмбриона хорошего качества, эндометрия оптимальной толщины и рецептивности и успешное их взаимодействие в период «окна имплантации». Недостаточная толщина эндометрия в период «окна имплантации» ассоциирована с повторными репродуктивными неудачами у пациенток в программах ВРТ (Maekawa R. et al., 2017). На сегодняшний день «тонким» и недостаточным для наступления беременности большинство специалистов считает эндометрий толщиной 7 мм и менее в середину лютеиновой фазы цикла (Wu Y. et al., 2014; Revel A., 2012). Анализ более 40 000 циклов переноса эмбриона (ПЭ) показал, что частота наступления беременности и живорождения снижаются с каждым миллиметром при толщине эндометрия менее 8 мм, когда речь идет о ПЭ в свежем цикле экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и менее 7 мм при ПЭ в криоциклах (Liu K. et al., 2018). Среди пациенток с бесплодием в клиниках репродуктивной медицины «тонкий» эндометрий встречается в 2,4-8,5% (Kasius A., et al., 2014; Ribeiro V. et al., 2018). Однако данные исследования не учитывают отмены циклов, обусловленные недостаточным ростом эндометрия. В циклах стимуляции овуляции без применения ЭКО частота встречаемости может достигать 38-66% (Liu K. et al., 2019).

Известно, что адекватная гемодинамика в сосудах матки необходима для формирования эндометрия структурно и функционально оптимального для имплантации эмбриона. Показана предиктивная способность параметров гемодинамики сосудов матки в отношении наступления беременности у пациенток в программах ВРТ (Kim A. et al., 2010). Некоторые исследователи предлагают рассматривать «тонкий» эндометрий как независимый негативный

прогностический фактор при проведении программ ВРТ, а также в качестве показания для криоконсервации эмбрионов (Von Wolff M. et al., 2018).

Среди методов лечения бесплодия, обусловленного «тонким» эндометрием, наибольшее распространение получило применение эстрогенов (Ranisavljevic N. et al., 2019). Кроме того, используются физические методы лечения (Волкова Е.Ю. и соавт., 2012), назначение L-аргинина, силденафила цитрата, витамина Е, пентоксифиллина (Acharya S. et al., 2009). С целью повышения эффективности программ ВРТ у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием применяются дополнительные методы терапии: скретчинг (Краснопольская К.В. и соавт. 2016), внутриматочное введение гранулоцитарного фактора роста (G-CSF) (Mouhayar Y. et al., 2017), аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet Rich Plasma (PRP)) и стволовых клеток (Chang Y., et al., 2019; Santamaria X., et al., 2016).

Терапевтический эффект применения PRP основан на способности факторов роста, цито- и хемокинов, содержащихся в тромбоцитах, запускать в тканях процессы биологического синтеза и регенерации при дегрануляции последних. Впервые внутриматочное введение аутологичной PRP пациенткам с «тонким» эндометрием было описано в 2015г (Chang Y. et al., 2015). На сегодняшний день показано, что применение PRP приводит к увеличению толщины эндометрия, улучшению параметров гемодинамики в сосудах матки, повышению частоты имплантации и клинической беременности в программах ВРТ (Tandulwadkar S. et al., 2017; Molina A. et al., 2018).

Перспективным методом терапии женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием является применение аутологичных стволовых клеток. Стволовые/прогениторные клетки эндометрия обладают высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению и способствуют восстановлению миграционной активности поврежденных стромальных и эпителиальных клеток эндометрия (Zhu H. et al., 2018). В исследованиях был показан терапевтический потенциал применения

стволовых/прогениторных клеток у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием (Tersoglio A. et al., 2020).

Степень разработанности темы исследования

Отсутствие единого эффективного подхода к терапии женщин с бесплодием на фоне рефрактерного «тонкого» эндометрия приводит к повторным неудачам имплантации и отменам программ ВРТ у данной категории пациенток. Разработка нового метода лечения, основанного на инъекционном введении аутологичной PRP непосредственно в эндометрий под контролем гистероскопа перед проведением программ ВРТ, становится одним из многообещающих подходов к решению данной проблемы репродуктивной медицины.

Цель исследования

Разработать новый метод лечения женщин с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием, перед проведением программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования

1. Выявить клинико-anamнестические особенности пациенток с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием.

2. Изучить состояние рецептивности эндометрия в период «окна имплантации» с помощью иммуногистохимического исследования (экспрессии ER, PR, PR/ER, LIF) у пациенток с «тонким» эндометрием.

3. Изучить возможности ультразвукового и доплерометрического исследования для оценки и прогноза эффективности лечения в программах ВРТ у пациенток с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия.

4. Оценить клеточно-количественный состав и функциональную активность тромбоцитов, содержание факторов роста (PDGF BB и VEGF) в PRP, приготовленной по стандартной технологии.

5. Изучить жизнеспособность и клеточный состав культуры клеток, выделенной при биопсии у пациенток с «тонким» эндометрием.

6. Оценить безопасность и эффективность инъекционного введения аутологичной PRP и клеток эндометрия в лечении пациенток с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием в программах ВРТ.

Научная новизна

В ходе исследования проведена оценка эффективности терапии бесплодия на фоне «тонкого» эндометрия с применением аутологичных PRP и минимально манипулированных клеток эндометрия. В отличие от ранее применявшейся в работах с использованием аутологичной PRP технологии внутриматочного инфузионного вливания, впервые аутологичная PRP вводится непосредственно в эндометрий пациенток с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопа.

Показана эффективность применения аутологичной PRP в отношении увеличения толщины эндометрия, улучшения параметров гемодинамики в сосудах матки, повышения частоты наступления беременности и живорождения в программах ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием.

Выполнен сравнительный анализ содержания факторов роста VEGF и PDGF BB в PRP и обычной плазме крови пациенток. Впервые проведен анализ состава гранул и активации тромбоцитов в PRP. Изучены особенности клеточного состава культуры клеток биоптата эндометрия, показана возможность выделения аутологичных жизнеспособных клеток с высоким пролиферативным потенциалом у пациенток с «тонким» эндометрием.

Практическая значимость

Разработан новый метод лечения бесплодия у пациенток с «тонким» эндометрием. Внедрение в клиническую практику нового способа лечения, основанного на инъекционном введении аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы в эндометрий, позволит улучшить репродуктивные исходы у пациенток с «тонким» эндометрием.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное обследование пациенток с «тонким» эндометрием, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Пациентки были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Всем пациенткам проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) и доплерометрическое исследование в период предполагаемого «окна имплантации» (на 5-7 день после овуляции) с определением толщины эндометрия и параметров гемодинамики в сосудах матки. Пайпель-биопсию эндометрия выполняли в период «окна имплантации» цикла, предшествующего лечению, с проведением гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования эндометрия с определением уровня экспрессии эстрогенового рецептора (ER- α), прогестеронового рецептора (PR) и лейкемия-ингибирующего фактора (LIF).

Положения, выносимые на защиту

1. Для пациенток с «тонким» эндометрием характерно нарушение рецептивности эндометрия. Иммуногистохимическое исследование (экспрессии ER, PR, PR/ER, LIF) в период «окна имплантации» не отражает вероятность наступления беременности у данной категории пациенток. Факторами, влияющими на наступление беременности у пациенток с «тонким» эндометрием, являются: возраст, длительность бесплодия, количество внутриматочных вмешательств с выскабливанием стенок полости матки и количество неудачных программ ВРТ в анамнезе, а также толщина эндометрия в день переноса эмбриона.

2. В PRP относительный уровень PDGF BB и VEGF, в 2,8 раза и в 2,4 раза выше по сравнению с уровнем в обычной плазме крови соответственно. Инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий приводит к увеличению толщины эндометрия, улучшению параметров гемодинамики,

повышению частоты наступления беременности и живорождения в программах ВРТ по сравнению с применением только физиотерапии у пациенток с «тонким» эндометрием.

3. Культура клеток, полученная из биоптата эндометрия, представляет собой гетерогенную популяцию, содержащую $78,3\% \pm 15,9$ жизнеспособных эпителиальных и стромальных клеток с высокой пролиферативной активностью ($85,3\% \pm 7,5$ Ki-67+ клеток).

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы научной работы, разработке цели и задач исследования, в сборе биологического материала, интерпретации результатов лабораторных и инструментальных исследований, аналитической и статистической обработке полученных данных. Автор лично проводил обследование и ведение пациенток на этапах лечения бесплодия, включая выполнение гистероскопии с инъекционным введением аутологичной PRP в эндометрий.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле 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 работы

Основные положения работы доложены на XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), на конгрессе American Society for Reproductive Medicine (virtual, 2020), XV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2021), 27-м Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 2021).

Диссертация обсуждена на заседании апробационной комиссии кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (30.03.2021 г., протокол № 3).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный на основании результатов исследования метод лечения с применением аутологичной PRP у женщин с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия внедрен в практическую деятельность отделения эстетической гинекологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты исследования включены в лекции и семинары для клинических ординаторов и аспирантов кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Получен патент «Способ лечения «тонкого» эндометрия у женщин репродуктивного возраста при помощи аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами» RU2748490.

Результаты исследования изложены в 10 печатных работах, из которых 3 представлены в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 2 в иностранных изданиях и 1 патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из оглавления, обзора литературы, материалов и методов исследования, глав результатов исследования и обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка принятых сокращений и списка литературы. Работа представлена на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 рисунками и 37 таблицами. Библиографический указатель включает 18 работ на русском языке и 183 работ на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В проспективное исследование включены 115 пациенток репродуктивного возраста, обратившиеся для лечения бесплодия, обусловленного «тонким» эндометрием.

Критериями включения в исследование были: возраст пациентки 18-40 лет; бесплодие, обусловленное «тонким» эндометрием; толщина эндометрия не более 7 мм в период «окна имплантации»; наличие не менее 2х витрифицированных бластоцист хорошего качества; регулярный овуляторный менструальный цикл; нормальный кариотип супругов; изокоагуляция; подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями не включения в исследование были: противопоказания к ВРТ и использованию физических факторов лечения, в том числе генитального эндометриоза III-IV степени, миомы матки больших размеров, субмукозной миомы матки, аномалий строения внутренних половых органов; синдром поликистозных яичников, преждевременная недостаточность яичников; выраженная патоспермия у партнера; уровень гемоглобина менее 100 г/л; уровень тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$. Критерии исключения из исследования: проведение программ ВРТ с донорским материалом, применение суррогатного материнства, отказ от участия в исследовании.

В зависимости от метода подготовки эндометрия к программам ВРТ пациентки были разделены на группы. Группу 1 составили 30 женщин, которым проводили курс электроимпульсной терапии с 5-7го дня цикла в течение 10-12 дней. Группу 2 составили 42 пациентки, которым в пролиферативную фазу цикла (на 6-9 день), предшествующего ПЭ, инъекционно вводили аутологичную PRP в эндометрий в объеме 35-40 мл под контролем гистероскопа. Группу 3 составили 38 пациенток, которым на первом этапе проводили электроимпульсную терапию (первый цикл), на втором – инъекции аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа. В ходе

исследования была сформирована 4я группа пациенток (n=5), которым инъекционно вводили в эндометрий аутологичную PRP и аутологичные минимально манипулированные клетки эндометрия под контролем гистероскопа в пролиферативную фазу цикла, предшествующего ПЭ в полость матки.

Специальные методы исследования включали пайпель-биопсию эндометрия в период «окна имплантации» с гистологическим и иммуногистохимическим исследованием эндометрия с определением уровня экспрессии ER- α , PR, LIF. Ультразвуковое и доплерометрическое исследование в период предполагаемого «окна имплантации» с определением толщины эндометрия и параметров гемодинамики в сосудах матки проводили до и после проведенного лечения. Иммунофенотипический анализ тромбоцитов в PRP проводили методом проточной цитофлуориметрии с характеристикой состава гранул и определением содержания PDGF BB и VEGF в PRP. Фенотипическое и иммуноцитохимическое исследование клеток, выделенных из биоптата эндометрия, проводили с определением экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Приготовление аутологичной PRP проводили в отделе трансфузиологии и экстракорпоральной гемокоррекции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа проводили под внутривенной анестезией в условиях операционной дневного стационара ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Криопротокol проводили на фоне гормональной подготовки эндометрия с применением препаратов эстрогенов (эстрадиола валерат для перорального применения в стартовой дозе 6 мг/сут) и микронизированного прогестерона в дозе 600 мг/сут под динамическим ультразвуковым контролем. При достижении оптимальных значений толщины эндометрия переносили один размороженный эмбрион хорошего качества на стадии бластоцисты в полость

матки. Ведение посттрансферного периода и диагностику беременности осуществляли по стандартизированным методикам.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и пакета программ «Statistica V10» (США).

Результаты исследования и их обсуждение

Были проанализированы анамнестические и клиничко-лабораторные данные пациенток, включенных в исследование. Не было выявлено статистически значимых различий между группами, за исключением более низкой частоты встречаемости неразвивающейся беременности (НБ) на ранних сроках у пациенток 1й (контрольной) группы. Обращает внимание высокая распространенность полипов эндометрия и хронического эндометрита у пациенток во всех группах. Помимо традиционной циклической гормональной терапии ранее пациентки получали и дополнительные методы, например, внутриматочные инфузии G-CSF и аутологичной PRP в объеме 0,5-1 мл однако, без значимого эффекта.

Всем пациенткам проводили УЗИ в период предполагаемого «окна имплантации». На момент включения в исследование толщина эндометрия в середину лютеиновой фазы у всех пациенток была менее 7 мм, статистически значимо не различалась и в среднем составила в 1й группе (n=30) $5,9 \pm 1,2$ мм, во 2й группе (n=42) $5,3 \pm 1,5$ мм, в 3й (n=38) – $5,4 \pm 1,4$ мм. По результатам контрольного УЗИ было выявлено, что во всех группах толщина эндометрия увеличилась статистически значимо по сравнению с исходными значениями ($p < 0,00001$), и в среднем составила в 1й группе (n=30) $7,4 \pm 1,2$ мм, во 2й группе (n=42) $7,4 \pm 1,8$ мм, в 3й группе (n=38) $7,9 \pm 1,6$ мм. Более выраженная динамика толщины эндометрия была отмечена у пациенток 2й и 3й групп по сравнению с 1й группой. При этом, различия в приросте эндометрия между 1й и 3й группами были статистически значимыми ($p = 0,003$) (Рисунок 1).

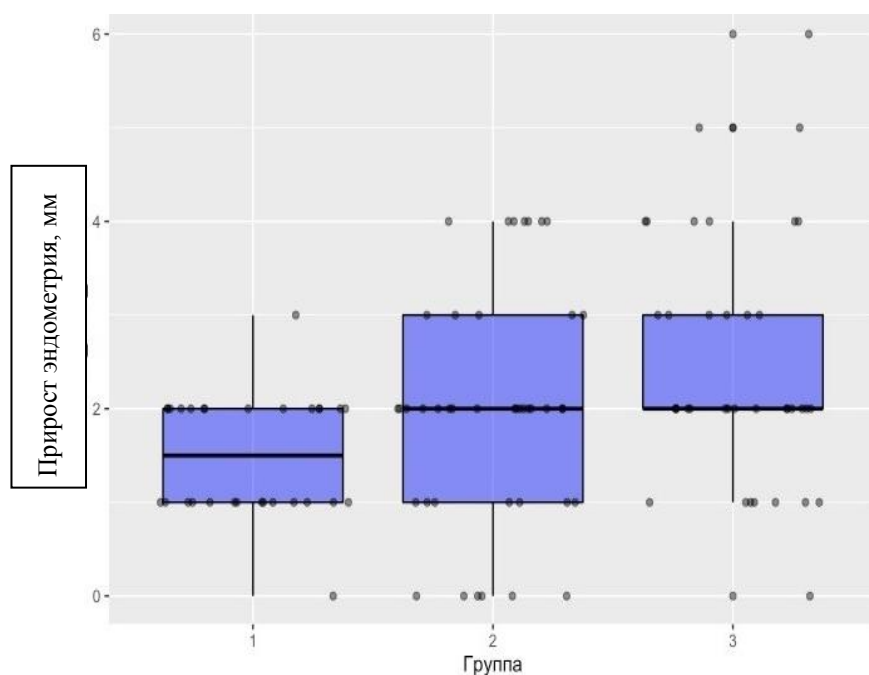


Рис.1. Прирост толщины эндометрия после лечения в трех группах. Статистически значимые различия получены между 1й и 3й группами ($p=0,003$). Тест Краскела-Уоллиса.

Всем пациенткам было выполнено доплерометрическое исследование для оценки показателей гемодинамики в сосудах матки. На этапе включения в исследование было отмечено снижение частоты визуализации концевых маточных артерий во всех группах по сравнению с показателями у здоровых женщин. После проведения лечения у всех пациенток было отмечено увеличение частоты визуализации базальных артерий, при этом в 1й и 3й группе различия были статистически значимыми (Таблица 1).

Таблица 1. Динамика частоты визуализации базальных артерий матки по данным ЦДК

Группа	До лечения	После лечения	p (динамика)
1я (n=30)	23 (76,6%)	30 (100%)	0,0156
2я (n=42)	37 (88%)	40 (95,2%)	0,25
3я (n=38)	32 (84,2%)	38 (100%)	0,0312

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный тест МакНемара (с оценкой вероятности отклонения биномиальным тестом)

Статистически значимое увеличение частоты визуализации спиральных артерий по сравнению с исходными значениями отмечалось во 2й ($p=0,0002$) и 3й ($p=0,0005$) группах (Таблица 2).

Таблица 2. Динамика частоты визуализации спиральных артерий матки по данным ЦДК

Группа	До лечения	После лечения	p (динамика)	p (по сравнению со здоровыми женщинами до лечения)
1я (n=30)	17 (56,6%)	22 (73,3%)	0,0625	0,3808
2я (n=42)	18 (42,8%)	31 (73,8%)	0,0002	0,0373
3я (n=38)	16 (42,1%)	28 (73,6%)	0,0005	0,0555

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный тест МакНемара (с оценкой вероятности отклонения биномиальным тестом)

Между показателями толщины эндометрия и параметрами гемодинамики в сосудах матки у пациенток был проведен корреляционный анализ. Выявлена обратная зависимость между значениями М-эхо и PI ($r=-0,5$; $p<0,05$), между толщиной эндометрия и значениями RI ($r=-0,52$; $p<0,05$), а также между значениями М-эхо и показателями S/D ($r=-0,53$; $p<0,05$), в спиральных артериях матки. Кроме того, выявлена зависимость между толщиной эндометрия и значениями уголнезависимых индексов на уровне базальных артерий матки: для PI коэффициент корреляции составил $-0,27$ ($p<0,05$), для RI составил $-0,22$ ($p<0,05$), а для S/D $-0,22$ ($p<0,05$) соответственно.

Аспирационная пайпель-биопсия эндометрия была выполнена 25 пациенткам в период «окна имплантации» цикла, предшествующего терапии. Пациентки были разделены на 2 группы. Группу А (n=13) составили пациентки, у которых беременность наступила, группу Б (n=12) - у которых беременность не наступила. По данным гистологического исследования не было выявлено значимых различий между указанными группами. Для пациенток с «тонким» эндометрием характерно обеднение сосудистого рисунка, эндометриальные железы были представлены в небольшом количестве, извитые, с очагами фиброза стромы вокруг желез и их атрофия (Рисунок 2).

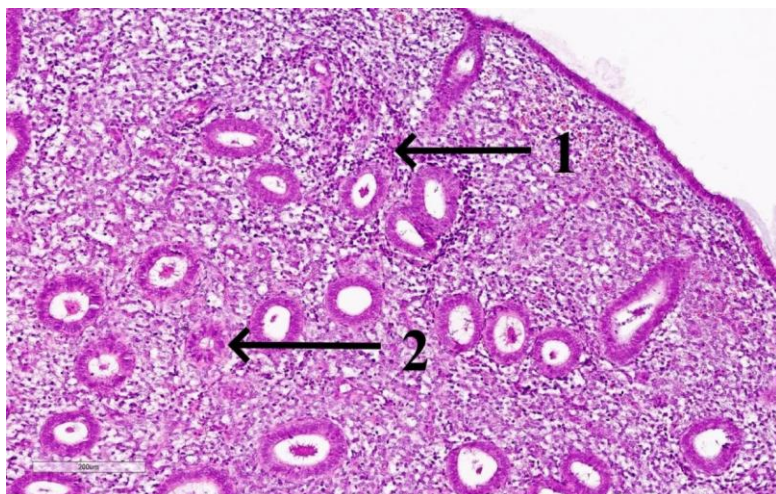


Рис.2. Фрагмент эндометрия с признаками фиброза и атрофии. 1 – очаги фиброза стромы вокруг эндометриальных желёз; 2 – атрофия эндометриальной железы. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 10х. Окуляр 10х.

Согласно результатам ИГХ исследования не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии ER-а и PR рецепторов в зависимости от наступления беременности у пациенток. При наступлении беременности имело место незначительное повышение экспрессии LIF, однако различия не были статистически значимыми (Таблица 3).

Таблица 3. Экспрессия ER-а, PR, LIF и соотношение уровней экспрессии PR/ER-а у пациенток групп А и Б

Показатели экспрессии	Группа А (n=13) Беременность наступила	Группа Б (n=12) Беременность не наступила	p-value
ER-а в железах эндометрия (%), (минимум-максимум)	270,6±45,5 (180-300)	268,9±56,0 (150-300)	0,842
ER-а в строме эндометрия (%), (минимум-максимум)	253±75,9 (70-300)	267,1±47,8 (180-300)	0,887
PR в железах эндометрия (%), (минимум-максимум)	242,5±96,9 (3-300)	270,4±56,8 (130-300)	0,629
PR в строме эндометрия (%), (минимум-максимум)	285,5±37,5 (270-300)	291,0±10,5 (270-300)	0,178
PR/ER-а железы, (минимум-максимум)	0,86±0,31 (0,81-1,2)	1,01±0,11 (0,81-1,2)	0,442
PR/ER-а строма, (минимум-максимум)	1,33±0,92 (0,98-4,24)	1,13±0,20 (0,98-1,5)	0,977
LIF (%)	265,2±49,3	230,2±86,2	0,318

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, критерий Манна-Уитни

После завершения лечения с учетом периода последействия физиотерапии все пациентки вступали в программы ВРТ с целью переноса

размороженных эмбрионов в полость матки. Репродуктивные исходы программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием представлены в таблице 4.

Таблица 4. Репродуктивные исходы после проведения лечения

Показатели	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Отмены переноса эмбриона	7 (23,3%)	6 (14,3%)	6 (15,7%)	0,77
Беременность клиническая	6 (20%)	14 (33,3%)	12 (31,6%)	0,4660
НБ на сроке 7-8 недель	2 (33,3%)	4 (28,5%)	2 (16,6%)	0,6574
Живорождение (на группу)	13,3%	21,4%	23,7%	0,5996

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

В 1й группе (n=30) беременность наступила у 6 (20%) пациенток. Из них у 2 (33,3%) беременность самопроизвольно прервалась на сроке 7-8 недель, у 4х (66,6%) завершилась своевременными родами. Таким образом, для 1й группы показатель живорождения составил 13,3%. Во 2й группе беременность наступила у 14 пациенток (33,3%). Из них у 4 (28,5%) произошло самопроизвольное прерывание беременности в первом триместре, а 9 (64,3%) завершились своевременными родами. У одной пациентки на сроке 18-19 недель произошло самопроизвольное прерывание беременности в связи с истмико-цервикальной недостаточностью (ИЦН). Таким образом, показатель живорождения для пациенток 2й группы составил 21,4%. Среди пациенток 3й группы беременность наступила у 12 (31,6%) после проведенного двухэтапного лечения. Из них у 2 (16,6%) произошло самопроизвольное прерывание беременности на сроке 7-8 недель, а 9 (75%) завершились своевременными родами. У одной пациентки на сроке 17-18 недель произошло самопроизвольное прерывание беременности в связи с ИЦН. Показатель живорождения для пациенток 3й группы составил 23,7%. Полученные результаты показали преимущества использования аутологичной PRP как в качестве монотерапии, так и в составе комплексной терапии пациенток с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием, по сравнению с

применением только физиотерапии. Шансы наступления клинической беременности были выше во 2й и 3й группах по сравнению с 1й группой в 1,98 раз (95% ДИ для отношения шансов (ОШ)=0,6-7,32) и 1,83 раз (95% ДИ для ОШ=0,53-6,94) соответственно. Шансы наступления живорождения в 3й группе были выше в 2 раза (95% ДИ для ОШ=0,48-9,96), чем в 1й группе, а во 2й группе в 1,76 раз выше по сравнению с 1й (95% ДИ для ОШ=0,43-8,72). Шансы ранних потерь беременности при использовании только физиотерапии в 2,36 раз выше (95% ДИ для ОШ=0,13-44,12), чем при применении аутологичной PRP в составе комплексной терапии у пациенток с «тонким» эндометрием перед проведением программ ВРТ.

Для оценки факторов, влияющих на наступление беременности, группы были разделены на подгруппы. Первая группа была разделена на подгруппу 1А (n=6), где беременность наступила и подгруппу 1Б (n=24), где беременность не наступила. Вторую группу составили подгруппы 2А (n=14) и 2Б (n=28), третью – 3А (n=12) и 3Б (n=26) соответственно. Согласно полученным данным, во всех группах пациентки с наступившей беременностью были статистически значимо моложе по сравнению с теми, у кого беременность не наступила, имели меньшую частоту встречаемости полипа эндометрия, длительность бесплодия и количество неудачных программ ВРТ в анамнезе.

При анализе параметров УЗИ в зависимости от наступления беременности было отмечено, что исходная толщина эндометрия не имела значимых различий в группах 2А и 3А по сравнению с группами 2Б и 3Б соответственно. При анализе данных контрольного УЗИ было отмечено, что в 1й и 3й группах толщина эндометрия в день ПЭ у пациенток с наступившей беременностью была статистически значимо больше по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила ($p=0,0004$ и $p=0,0253$ соответственно). Во 2й группе была отмечена аналогичная тенденция различий в толщине эндометрия, но они не были статистически значимыми.

Для определения порогового значения толщины эндометрия, при котором вероятность наступления беременности выше, проведен ROC-анализ (Рисунок

3). Толщина эндометрия влияет на вероятность наступления беременности в исследуемой популяции пациенток ($AUC=0,725$). Максимальная сумма чувствительности и специфичности (чувствительность (Se) = 50%, специфичность (Sp) = 85%) достигается при толщине эндометрия 9 мм, что может быть использовано как пороговое значение.

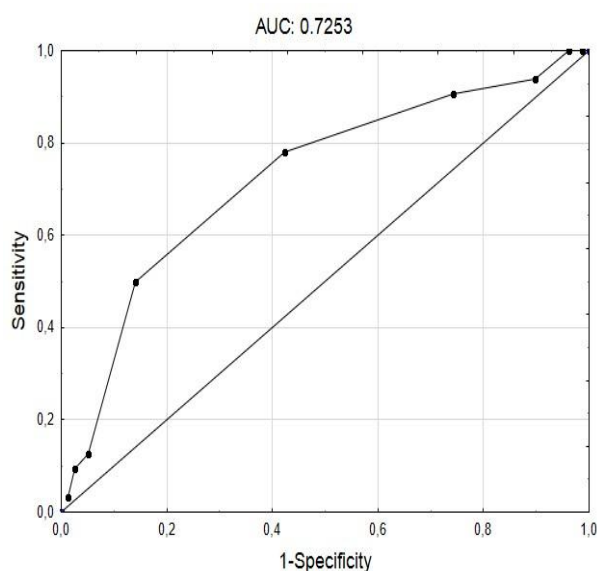


Рис. 3. ROC-кривая зависимости наступления беременности от толщины эндометрия.

Таким образом, факторами, влияющими на наступление беременности у пациенток с «тонким» эндометрием, были: возраст, длительность бесплодия, частота внутриматочных вмешательств, выполненных с целью удаления полипов эндометрия в анамнезе, частота неудачных программ ВРТ и толщина эндометрия в день переноса эмбриона.

Для характеристики состава полученной PRP мы анализировали содержание в пробах белков PDGF BB и VEGF. В качестве образцов сравнения была взята плазма крови тех же пациенток. В образцах PRP по сравнению с обычной плазмой относительный уровень PDGF BB, нормализованный на общий уровень белка, больше в 2,8 раза (Рисунок 4А). Полученные различия были статистически значимыми ($p = 0,0012$). Вестерн-блот анализ показал, что в пробах PRP относительный уровень белка VEGF, нормализованный на общий уровень белка, больше в 2,4 раза, чем в обычной плазме. Полученные различия

были статистически значимыми ($p=0,0343$). Основываясь на полученных данных, можно предположить, что эффективность действия PRP обусловлена стимуляцией ангиогенеза и репарации ткани за счет повышенного содержания в ней PDGF BB и VEGF.

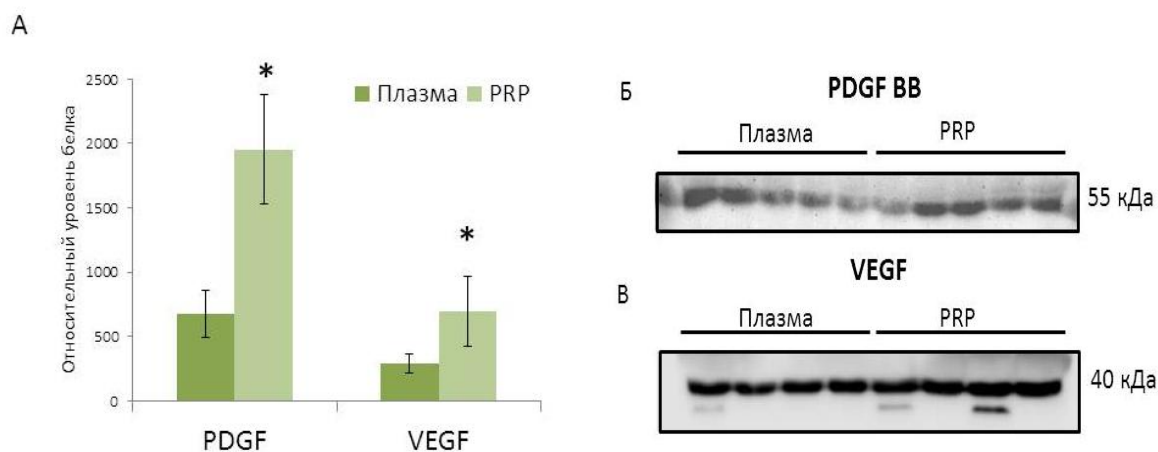


Рис. 4. Относительный уровень белков PDGF BB и VEGF в плазме и PRP, нормализованный на общий уровень белка (А). Репрезентативные изображения мембран, окрашенных антителами против PDGF BB (Б) и VEGF (В) с нанесенными образцами плазмы и PRP пациенток. * - $p < 0,05$ относительно контроля.

Следующим этапом характеристики PRP стал иммунофенотипический анализ образцов методом проточной цитофлуориметрии. Образцы PRP были окрашены антителами против тромбоцитарного маркера CD61 (гликопротеин тромбоцитов IIIa), маркеров активации тромбоцитов CD63 (член суперсемейства тетраспанинов) и молекулы клеточной адгезии P-селектина. Окрашивание против маркера CD61 позволило гейтировать тромбоциты и проанализировать сигнал от антител против CD63 и P-селектина только на клетках, попавших в область интереса. Количество тромбоцитов, положительных по CD63, составило менее 1%. Это указывает на то, что дегрануляция последних еще не произошла. В то же время тромбоциты, окрашенные антителами к P-селектину, составили в среднем $56,7 \pm 11,5\%$. Повышение содержания P-селектин положительных тромбоцитов указывает на ранние стадии их активации и позволяет предположить, что окончательная дегрануляция тромбоцитов происходит в момент введения PRP в эндометрий и

после вмешательства, что важно отметить, учитывая «короткую жизнь» белков и пептидов после дегрануляции тромбоцитов.

Иммунофенотипический анализ изолированной культуры клеток биоптата эндометрия проведен с помощью проточной цитофлуориметрии. Было показано, что полученная культура представляет собой гетерогенную популяцию, положительно окрашивающуюся антителами к маркерам стромальных клеток CD90 (69,7% ± 12,1 CD90+), vimentin (91,3% ± 26,9 vimentin+) и эпителиальных клеток EpCAM (45,0%±21,7 EpCAM+) (Рисунок 5).

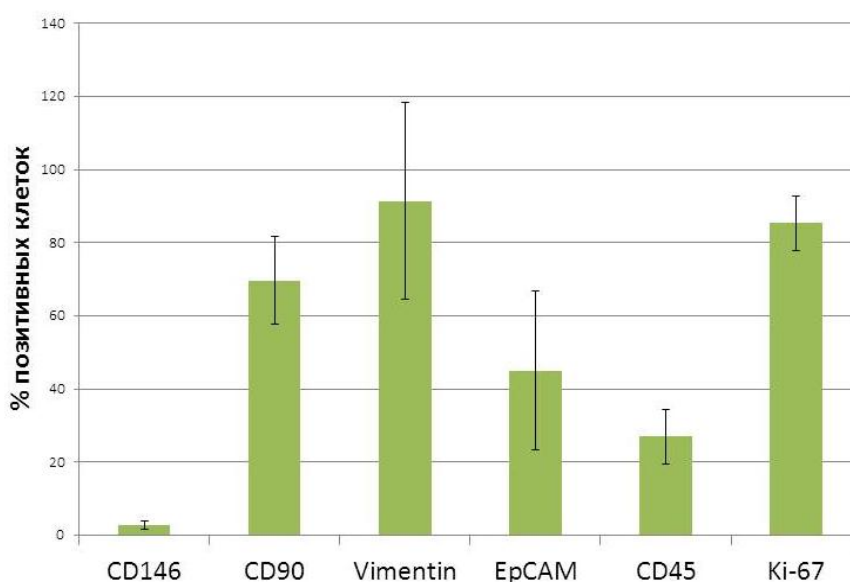


Рис.5. Содержание положительно окрашенных клеток, выделенных из биопсии эндометрия по данным проточной цитофлуориметрии.

Положительный фенотип клеток по маркерам EpCAM и vimentin был также подтвержден иммуноцитохимическим анализом (Рисунок 6Б) с использованием флуоресцентной микроскопии.

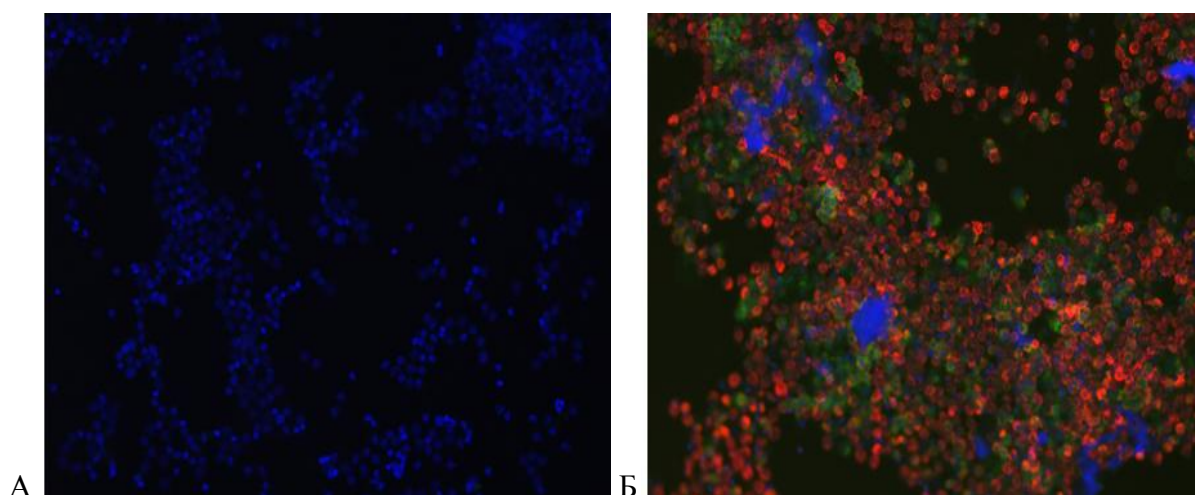


Рис. 6. Иммуноцитохимический анализ. Отрицательный контроль (только вторичные антитела) (А). Окрашивание клеток, полученных из биоптата эндометрия против виментина (красный) и EpCAM (зеленый), ядра, окрашенные с помощью DAPI (синий) (Б). Увеличение x200.

Определение уровня пролиферации выделенной культуры проводили также методом проточной цитофлуориметрии. Использовали маркер клеточной пролиферации Ki-67. Выделенная культура содержала в среднем $85,3\% \pm 7,5$ Ki-67+ клеток, что указывает на их активную пролиферацию и жизнеспособность (Рисунок 5). Данное исследование демонстрирует возможность выделения жизнеспособных стромальных и эпителиальных клеток базального слоя эндометрия из биопсийного материала пациенток с «тонким» эндометрием. Наша гипотеза заключается в том, что помещение этих клеток в транспортную среду, богатую проангиогенными и прорегенераторными факторами роста, и их обратное инъекционное введение в «тонкий» эндометрий обеспечит стимуляцию его восстановления. В ходе исследования была сформирована 4я группа пациенток (n=5), которым инъекционно вводили в эндометрий аутологичную PRP и аутологичные минимально манипулированные клетки эндометрия. Толщина эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» на момент включения в исследование у пациенток составляла от 5 до 6 мм и в среднем составила $5,6 \pm 0,54$ мм. После проведенного вмешательства толщина эндометрия в новом менструальном цикле статистически значимо ($p=0,0431$) увеличилась у всех пациенток и в

период «окна имплантации» составила в среднем $9,6 \pm 1,14$ мм. Криопротоккол проводили на фоне гормональной подготовки эндометрия по описанной схеме. У всех пациенток эндометрий достиг оптимальных значений, что позволило произвести перенос одного размороженного эмбриона в полость матки. Беременность наступила у 3х пациенток в данной группе после ПЭ и завершилась рождением здоровых детей в срок.

ВЫВОДЫ

1. Формирование «тонкого» эндометрия связано с высокой частотой перенесенных вмешательств, сопровождающихся выскабливанием стенок полости матки. Для пациенток с «тонким» эндометрием характерна высокая распространенность перенесенного хронического эндометрита, гипоменструальный синдром и множественные неудачные программы ВРТ в анамнезе.

2. Морфологические изменения в «тонком» эндометрии характеризуются очаговым фиброзом стромы, снижением количества и атрофией эндометриальных желез, обеднением сосудистого рисунка и истончением стенок сосудов. Экспрессия маркеров рецептивности эндометрия (ER, PR, PR/ER, LIF) в период «окна имплантации» не является точным критерием для определения вероятности наступления беременности.

3. Для пациенток с «тонким» эндометрием характерно повышение значений уголнезависимых индексов при доплерометрическом исследовании в период «окна имплантации». Выявлена обратная корреляционная связь между толщиной эндометрия и значениями PI, RI, и S/D на уровне базальных артерий матки ($r=-0,27$, $r=-0,22$ и $r=-0,22$ соответственно). Выявлена обратная корреляционная связь между толщиной эндометрия и значениями PI, RI и S/D в спиральных артериях матки ($r=-0,5$, $r=-0,52$ и $r=-0,53$ соответственно).

4. Толщина эндометрия в день переноса эмбриона влияет на вероятность наступления беременности. Определено пороговое значение М-

эха для пациенток с «тонким» эндометрием, равное 9 мм, при котором вероятность наступления беременности в программах ВРТ выше.

5. Относительный уровень PDGF BB и VEGF в 2,8 раза и в 2,4 раза выше в PRP по сравнению с уровнем в обычной плазме крови соответственно.

6. Инъекционное введение аутологичной PRP у пациенток с «тонким» эндометрием приводит к увеличению толщины эндометрия и улучшению параметров гемодинамики в сосудах матки за счет снижения значений уголнезависимых индексов и стимуляции ангиогенеза. Инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий как в виде монотерапии, так и в составе комплексной терапии повышает эффективность программ ВРТ по сравнению с применением только физиотерапии у пациенток с «тонким» эндометрием.

7. Из биоптата эндометрия выделяют от $2,6 \times 10^5$ до $9,6 \times 10^6$ клеток, $78,3\% \pm 15,9$ из которых жизнеспособны и представляют собой гетерогенную популяцию, положительно окрашивающуюся антителами к маркерам стромальных (CD90+ $69,7\% \pm 12,1$ и vimentin $91,3\% \pm 26,9$) и эпителиальных (EpCAM+ $45,0\% \pm 21,7$) клеток с высоким уровнем пролиферации ($85,3\% \pm 7,5$ Ki-67+).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с «тонким» эндометрием не рекомендуется проведение пайпель-биопсии в период предполагаемого «окна имплантации» для диагностики рецептивности эндометрия на основании иммуногистохимического исследования (экспрессии ER, PR, PR/ER, LIF), так как это сопровождается дополнительным повреждением ткани, результаты исследования существенно не влияют на тактику ведения и мало информативны в плане прогноза наступления беременности.

2. Пациенткам с рефрактерным «тонким» эндометрием при отсутствии нарушений гемодинамики в сосудах матки нецелесообразно

повторно проводить физиотерапию для подготовки эндометрия к программам ВРТ при отсутствии эффекта от ранее проведенных курсов.

3. В качестве порогового уровня определена толщина эндометрия равная 9 мм, что может быть использовано как целевое значение М-эха, при котором рекомендован перенос эмбриона у пациенток с исходно «тонким» эндометрием.

4. Пациенткам с рефрактерным «тонким» эндометрием при отсутствии эффективности гормональной и физиотерапии рекомендуется инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа как в виде монотерапии, так и в составе комплексной терапии.

5. Отсутствие аллергических реакций, инфекционных осложнений и негативных явлений при использовании аутологичной PRP позволяет использовать ее в качестве естественного источника факторов роста и митогенов с высокой пролиферативной активностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. «Тонкий» эндометрий в аспекте репродуктивных неудач: современная проблема или гипердиагностика / **Эфендиева З.Н.**, Аполихина И.А., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. - № 9. – С. 32-39.

2. Первый опыт инъекционного введения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в эндометрий пациенток с маточным фактором бесплодия / **Эфендиева З.Н.**, Аполихина И.А., Калинина Е.А., Федорова Т.А., Бакуридзе Э.М., Белоусов Д.М., Фатхудинов Т.Х., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. - № 4. – С. 82-89.

3. Effects of platelet-rich plasma on mesenchymal stem cells isolated from rat uterus / Vishnyakova P., Artemova D., Elchaninov A., **Efendieva Z.**, Apolikhina A., Sukhih G., Fatkhudinov T. // *PeerJ.* – 2020. - 8:e10415.

4. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в комплексной терапии женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием / Аполихина И.А., **Эфендиева З.Н.**, Федорова Т.А., Белоусов Д.М., Вишнякова П.А., Артемова

Д.А., Фатхудинов Т.Х. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. - № 4. – С. 112-119.

5. Новое в лечении пациенток с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия / **Эфендиева З.Н.**, Аполихина И.А., Фатхудинов Т.Х. // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» 2019г. – С.187-188.

6. Хронический эндометрит / Аполихина И.А., **Эфендиева З.Н.** // Приложение к журналу Акушерство и гинекология. -2019. - №3. - С.23-28.

7. Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в лечении женщин с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия / **Эфендиева З.Н.**, Фатхудинов Т.Х., Аполихина И.А. // Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, 20-23 ноября 2019. Научно-практический журнал Гены & Клетки. – С. 267.

8. Autologous platelet-rich plasma injection into the endometrium in patients with uterine factor infertility / **Efendieva Z.**, Apolikhina A., Kalinina E., Fyodorova T., Belousov D. Fatkhudinov T. // Abstracts of American Society for Reproductive Medicine (virtual congress, 2020). Fertility and Sterility, volume 114, № 3, supplement, September 2020. – P. e166.

9. Использование обогащенной тромбоцитами плазмы в комплексной терапии женщин с «тонким» эндометрием / **Эфендиева З.Н.**, Аполихина И.А. // Материалы XXVII Всероссийского Конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» 2021г. – С.12-13.

10. Способ лечения «тонкого» эндометрия у женщин репродуктивного возраста при помощи аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами / Аполихина И.А., **Эфендиева З.Н.**, Калинина Е.А., Федорова Т.А., Фатхудинов Т.Х., Быстрых О.А. // **Патент №2748490.** Дата регистрации 26.05.2021.