

**Министерство здравоохранения  
Российской Федерации**

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования**

**ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)**

*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**

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

**Научные руководители:**

**д.м.н., профессор Аполихина И.А.**

**д.м.н., доцент Фатхудинов Т.Х.**

**Москва 2021**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Современные представления о проблеме «тонкого» эндометрия .....	12
1.1 Маточный фактор бесплодия и роль эндометрия в репродуктивных неудачах .....	12
1.2 «Тонкий» эндометрий и его влияние на репродуктивную функцию ....	13
1.3 Факторы, влияющие на толщину и рецептивность эндометрия .....	17
1.4 Диагностика рецептивности эндометрия .....	19
1.4.1. Ультразвуковое исследование .....	21
1.4.2 Допплерометрическое исследование .....	23
1.4.3 Гистероскопическое исследование .....	25
1.4.4. Гистологическое исследование .....	25
1.4.5 Иммуногистохимическое исследование.....	26
1.4.6 Молекулярно-генетическое исследование .....	29
1.5 Современные представления о терапии маточного фактора бесплодия.....	31
1.5.1 Гормональная терапия.....	31
1.5.2 Физиотерапия .....	32
1.5.3 Современные дополнительные методы терапии .....	34
1.6 Плазма, обогащенная тромбоцитами, в терапии женщин с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием.....	37
1.7 Возможности клеточной терапии женщин с маточным фактором бесплодия .....	41
1.8 Суррогатное материнство .....	44
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Материалы исследования.....	46
2.2 Методы исследования .....	50
2.2.1 Общеклинические методы исследования.....	50
2.2.2 Специальные методы исследования .....	52
2.2.3 Технология приготовления аутологичной PRP .....	57
2.2.4 Определение содержания факторов роста VEGF и PDGF BB в PRP .....	59
2.2.5 Проточная цитофлуориметрия тромбоцитов PRP.....	60

2.2.6 Технология инъекционного введения аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа.....	60
2.2.7 Выделение аутологичной культуры клеток эндометрия .....	62
2.2.8 Фенотипический анализ клеток биопсии эндометрия .....	63
2.2.9 Технология инъекционного введения аутологичной PRP и клеток эндометрия под контролем гистероскопа .....	65
2.2.10 Криопротокол и ведение посттрансферного периода .....	65
2.3 Статистический анализ полученных данных .....	66
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	68
3.1 Клинико-anamнестическая характеристика пациенток с «тонким» эндометрием .....	68
3.2 Динамика клинических симптомов у пациенток с «тонким» эндометрием .....	73
3.3 Данные ультразвукового исследования.....	74
3.4 Данные цветового доплеровского картирования и спектральной доплерометрии .....	76
3.5 Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования .....	83
3.6 Исходы программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием .....	90
3.7 Характеристика состава гранул и активации тромбоцитов в PRP .....	96
3.8 Иммунофенотипический анализ клеток биопсии эндометрия.....	99
3.9 Результаты, полученные в группе пациенток с применением аутологичной PRP и аутологичных клеток эндометрия .....	103
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	109
ВЫВОДЫ.....	130
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	136

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Разработка, внедрение и постоянное усовершенствование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) имеют перед собой вполне конкретную цель: повышение частоты живорождения. Необходимыми условиями для наступления беременности являются наличие эмбриона хорошего качества, эндометрия адекватной толщины и рецептивности и успешное их взаимодействие в период «окна имплантации». Несмотря на развитие и усовершенствование ВРТ маточный фактор бесплодия остается нерешенной проблемой в лечении бесплодия [1].

Недостаточная толщина эндометрия в период «окна имплантации» ассоциирована с повторными репродуктивными неудачами у пациенток в программах ВРТ [2]. Под пороговой величиной минимально необходимой толщины эндометрия для успешного наступления беременности разные авторы могут понимать неодинаковые ее значения. На сегодняшний день «тонким» и недостаточным для наступления беременности большинство специалистов считает эндометрий толщиной 7 мм и менее в середину лютеиновой фазы цикла [3,4,5]. 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, соответственно [6]. Необходимо отметить, что в литературе описаны единичные случаи наступления беременности и живорождения у женщин с толщиной эндометрия менее 4 мм [7,8]. Среди пациенток с бесплодием в клиниках репродуктивной медицины «тонкий» эндометрий встречается в 2,4-8,5% [9,10]. Однако данные исследования не учитывают отмены циклов, обусловленные недостаточным ростом эндометрия, и, следовательно, частота встречаемости «тонкого» эндометрия у пациенток с

бесплодием выше. В циклах стимуляции овуляции без применения ЭКО частота встречаемости может достигать 38-66%. [11].

Известно, что адекватная маточная гемодинамика необходима для формирования эндометрия структурно и функционально оптимального для имплантации эмбриона. В литературе представлены работы, отражающие взаимосвязь между выраженностью гемодинамических нарушений и степенью истончения М-эхо. Показана предиктивная способность параметров маточной гемодинамики в отношении наступления беременности у пациенток в программах ВРТ [12]. Некоторые исследователи предлагают рассматривать «тонкий» эндометрий как независимый негативный прогностический фактор при проведении программ ВРТ, а также в качестве показания для криоконсервации эмбрионов с целью их переноса в полость матки в циклах при достижении оптимальных значений толщины эндометрия [13].

Среди методов лечения бесплодия, ассоциированного с «тонким» эндометрием, наибольшее распространение получило применение эстрогенов [14]. Кроме того, широко используются физические методы лечения [15], назначение ацетилсалициловой кислоты [16], L-аргинина, силденафила цитрата, витамина Е, пентоксифиллина [17]. У части пациенток с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия представленные выше виды терапии не имеют значимого эффекта. С целью повышения эффективности программ ВРТ у этих пациенток стали применяться дополнительные методы, а именно: скретчинг [18], ХГЧ прайминг [19], внутриматочное введение гранулоцитарного фактора роста (G-CSF) [20], аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet Rich Plasma (PRP)) и стволовых/прогениторных клеток [21,22].

Терапевтический эффект применения PRP основан на способности факторов роста, цито- и хемокинов, высвобождающихся при дегрануляции тромбоцитов, запускать в тканях процессы, характерные для продуктивной фазы воспаления – ангиогенез и регенерацию. Впервые внутриматочное применение аутологичной PRP пациенткам с «тонким» эндометрием было

описано в 2015г [23]. На сегодняшний день показано, что внутриматочные инфузии аутологичной PRP приводит к увеличению толщины эндометрия, повышению частоты имплантации и клинической беременности в программах ВРТ [24,25].

Перспективным методом терапии женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием является применение аутологичных стволовых/прогениторных клеток. Стволовые клетки эндометрия, как эпителиальные, так и стромальные, обладают высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению и обеспечивают восстановление функционального слоя эндометрия при фазовых изменениях в менструальном цикле [26]. В клинических исследованиях был показан терапевтический потенциал применения стволовых клеток у пациенток с рефрактерным эндометрием [27]. Субэндометриальное введение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток эндометрия и PRP пациенткам с рефрактерным «тонким» эндометрием, привели к статистически значимому увеличению толщины эндометрия и повышению частоты наступления клинической беременности [27].

Несмотря на развитие ВРТ, появление новых методов терапии, часть пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием не отвечает на проводимое лечение и зачастую единственной возможностью для них реализовать свою репродуктивную функцию становится суррогатное материнство.

Во всех опубликованных работах внутриматочное введение аутологичной PRP проводится путем инфузии 1-2 мл, что имеет ряд ограничений. Наиболее важным является отсутствие визуального контроля зоны введения PRP. Кроме того, ограничение объема вводимого в полость матки приводит к необходимости проведения повторных процедур забора крови, приготовления PRP и внутриматочных вливаний для достижения терапевтического эффекта. Мишенью для факторов роста являются клетки базального слоя эндометрия, проникновение в которые можно обеспечить только при инъекционном введении PRP. В этих условиях разработка нового подхода к терапии женщин с

бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия становится приоритетной задачей в репродукции. Мы предположили, что технология инъекционного введения PRP сможет повысить эффективность лечения, так как проводится под визуальным контролем и обеспечивает прицельное введение значимого объема (35-40 мл) аутологичной PRP с высвобождением факторов роста непосредственно в измененных участках эндометрия, что приводит к отсутствию необходимости проведения повторных вмешательств для достижения терапевтического эффекта. Также было предположено, что выделение и помещение аутологичных жизнеспособных эпителиальных и стромальных клеток в среду, богатую проангиогенными и прорегенераторными факторами роста и их обратное введение в эндометрий обеспечит его восстановление.

### **Степень разработанности темы исследования**

Отсутствие единого эффективного подхода к терапии женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием не позволяет повысить результативность программ ВРТ у данной категории пациенток. Разработка технологии инъекционного введения аутологичной PRP и минимально манипулированных клеток эндометрия 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 клиничко-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 впервые произведена оценка эффективности терапии бесплодия на фоне «тонкого» эндометрия с применением аутологичной PRP и минимально манипулированных клеток эндометрия. В отличие от 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 на контролируемую глубину. Впервые описан новый подход с применением аутологичных клеток эндометрия совместно с аутологичной PRP у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием.

Изучено влияние инъекционного введения аутологичной PRP как в виде монотерапии, так и в составе комплексной терапии в циклах, предшествующих переносу эмбриона в программах ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием и репродуктивными неудачами в анамнезе. 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.



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. Проведен иммунофенотипический анализ клеток биоптата эндометрия с выделением аутологичных жизнеспособных клеток эндометрия с высоким пролиферативным потенциалом.

### **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, позволит улучшить репродуктивные исходы у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием. Определена пороговая толщина эндометрия в день переноса эмбриона, при которой вероятность наступления беременности у пациенток с исходно «тонким» эндометрием выше.

### **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 проведении и интерпретации лабораторных и инструментальных исследований, аналитической и статистической обработке полученных данных. Автор лично проводил обследование и ведение пациенток на этапах лечения бесплодия, включая 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), 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), 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 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. Получен патент «Способ лечения «тонкого» эндометрия у женщин репродуктивного возраста при помощи аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами» // RU2748490.

Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия 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. Результаты исследования изложены в 10 печатных работах, из которых 3 представлены в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и 2 в иностранных изданиях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы полученных результатов исследований, главы 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.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Современные представления о проблеме «тонкого» эндометрия**

### **1.1 Маточный фактор бесплодия и роль эндометрия в репродуктивных неудачах**

Настоящая демографическая политика в нашей стране одной из первостепенных задач ставит решение проблем, связанных с репродуктивным здоровьем. По данным ВОЗ критическим в отношении распространенности бесплодия считается значение более 15% [28]. Разработка, внедрение и постоянное усовершенствование ВРТ имеет перед собой вполне конкретную цель: повышение частоты живорождения. Однако на сегодняшний день, несмотря на высокий уровень развития репродуктивной медицины, в этой области существует ряд нерешенных проблем.

Маточный фактор бесплодия является одним из ведущих [5], а патологические изменения в эндометрии встречаются в 88% случаев бесплодия [29]. Известно, что для наступления беременности необходимо наличие эмбриона хорошего качества, эндометрия адекватной толщины и рецептивности и успешное их взаимодействие в период «окна имплантации». Несмотря на развитие и усовершенствование ВРТ, маточный фактор бесплодия и повторные неудачи имплантации до настоящего времени остаются нерешенными вопросами в лечении бесплодия [1]. Отсутствие клинической беременности после переноса по крайней мере 4 эмбрионов хорошего качества как минимум в трех циклах ЭКО или криопротоколов у женщин моложе 40 лет рассматривают как повторные неудачи имплантации (Recurrent Implantation Failure (RIF)) [30].

Слизистая оболочка матки уникальна по своим функциям и структуре. Находясь под влиянием стероидных гормонов, эндометрий подвергается изменениям в течение каждого менструального цикла женщины. Известно, что под влиянием эстрогенов в пролиферативную фазу цикла растет

функциональный слой эндометрия и достигает своего максимального значения во время пика лютеинизирующего гормона (ЛГ). Далее под воздействием прогестерона, секретлируемого желтым телом совулировавшего яичника, происходит секреторная трансформация эндометрия. К середине лютеиновой фазы под воздействием гормонов, аутокринных и паракринных факторов изменения в эндометрии приводят к значительному повышению рецептивности последнего, что позволяет имплантироваться бластоцисте [31].

## **1.2 «Тонкий» эндометрий и его влияние на репродуктивную функцию**

Недостаточная толщина эндометрия и снижение его рецептивности в период предполагаемого «окна имплантации» ассоциированы с повторными репродуктивными неудачами в циклах ЭКО [2]. Толщину эндометрия следует измерять во время трансвагинального ультразвукового исследования (УЗИ) и определять как максимальное расстояние между эхогенными границами эндометрия и миометрия в сагиттальной плоскости ближе к дну матки. [11].

В литературе существует противоречивое мнение специалистов по поводу оптимальной толщины эндометрия для прогнозирования наступления беременности у пациенток с нарушением репродуктивной функции. Некоторые исследования не выявили четкой взаимосвязи между толщиной эндометрия и вероятностью наступления беременности [32]. В противовес этому ряд авторов считают толщину эндометрия одним из факторов, определяющих вероятность наступления беременности. Согласно данным многочисленных исследований толщина эндометрия может служить предиктором исходов программ ЭКО и наступления беременности, однако специалисты не пришли к единому мнению относительно пороговой величины толщины эндометрия [33,34].

В настоящее время нет общепринятого понятия «тонкого» эндометрия и разные авторы под пороговой величиной могут понимать неодинаковые значения М-Эхо. В литературе представлены различные данные о минимально необходимой толщине эндометрия в период «окна имплантации» для

успешного наступления беременности. Большинство исследователей в настоящее время «тонким» и недостаточным в отношении наступления беременности считают эндометрий толщиной менее 7 мм [3-5], а значения 8-12 мм определяют как оптимальные для имплантации [35,36]. Однако в литературе описаны случаи наступления беременности и последующего живорождения при максимальной толщине эндометрия 4 мм [7,8].

Согласно данным исследований «тонкий» эндометрий (менее 7 мм) встречается у 2,4% - 8,5% женщин, проходящих лечение в клиниках репродуктивной медицины [9,10]. Следует отметить, что данные исследования не учитывают отмененные циклы в связи с недостаточным ростом эндометрия, а следовательно, частота встречаемости «тонкого» эндометрия у пациенток с бесплодием выше. При этом, частота встречаемости «тонкого» эндометрия в циклах стимуляции функции яичников без применения ЭКО может достигать 38-66% [11].

Специалисты из Израиля в своем исследовании изучили 2334 цикла овариальной стимуляции у пациенток с «тонким» эндометрием. По их данным толщина эндометрия 7 мм и менее ассоциирована со сниженной частотой наступления беременности [37]. Другие исследователи при сравнении частоты наступления беременности у пациенток с толщиной эндометрия менее 7 мм и пациенток с этим показателем равным 8 мм и более при ПЭ также получили результаты 5 и 30,9% соответственно [38]. Анализ более 40 000 циклов ПЭ показал, что частота наступления беременности и живорождения снижается с каждым миллиметром при толщине эндометрия менее 8 мм, когда речь идет о ПЭ в свежих циклах ЭКО и менее 7 мм при ПЭ в криоциклах, соответственно [6]. Метаанализ показал, что толщина эндометрия <8 мм в свежих циклах ЭКО и ПЭ ассоциирована со снижением эффективности программ ВРТ, а для криоциклов ПЭ такая связь отмечается при толщине эндометрия <7 мм [11].

По данным Wolff M. и соавт. (2018 г.) «тонкий» эндометрий следует рассматривать как независимый негативный прогностический фактор при

проведении программ ВРТ в естественных циклах. Частота наступления беременности у пациенток с толщиной эндометрия  $\leq 7$  мм составила 7,4%, а у пациенток с толщиной эндометрия  $>7$  мм 30,8% ( $n = 105$ ) ( $p = 0,03$ ). Авторы сообщают, что разница в частоте живорождения не была статистически значимой [13].

Dix с коллегами, после проведения ретроспективного анализа 35 случаев ПЭ пациенткам с толщиной эндометрия менее 6 мм, получили лишь три случая успешной имплантации (8,5%), из которых два закончились живорождением (5,7%), то есть вероятность наступления беременности при «тонком» эндометрии оказалась очень низкой [39]. Схожие данные получили исследователи из Гонконга, изучив взаимосвязь толщины эндометрия и исходов ЭКО у 136 пациенток. Согласно полученным результатам у пациенток в циклах стимуляции функции яичников при толщине эндометрия менее 7 мм частота наступления беременности составила 3%, в то время, как у пациенток с толщиной эндометрия 8 мм и более – 28%. В случае переноса размороженных эмбрионов пациенткам с толщиной эндометрия менее 7 мм частота наступления беременности составила 5%, а у пациенток с толщиной 8 мм и более – 30,9%. Полученные различия были статистически значимы [38]. Группа исследователей из Израиля, выявила связь между возрастом пациенток, проходящих лечение в клиниках ВРТ, и толщиной эндометрия. Зависимость между толщиной эндометрия и частотой наступления беременности резко выражена у пациенток старше 35 лет, вследствие чего авторы предполагают наличие механизмов старения эндометрия и возможность негативного влияния данного процесса на вероятность наступления беременности [33].

Некоторые исследователи предлагают рассматривать «тонкий» эндометрий в качестве показания для заморозки эмбрионов с целью переноса в полость матки в циклах при достижении оптимальной толщины эндометрия [8]. Kasius A. и соавт. (2014 г.), напротив, после проведения систематического обзора и метаанализа, пришли к выводу, что толщина эндометрия не должна

применяться в качестве единственного маркера для отмены ПЭ в полость матки [9].

Интересными являются данные о взаимосвязи толщины эндометрия и исходов программ ЭКО в стимулированных (свежих) циклах и циклах переноса размороженных эмбрионов. Согласно данным Check J.H. и соавт. (2014 г.) при толщине эндометрия 4-5 мм у пациенток частота наступления беременности с свежем протоколе ЭКО составила 10,6%, в то время, как в криопротоколе 27,2% ( $p=0,079$ ) [40]. Метаанализ ( $n=3846$ ) не выявил значимой связи между толщиной эндометрия и наступлением беременности при проведении внутриматочной инсеминации (ВМИ) пациенткам в сочетании со стимуляцией овариальной функции [41]. Zhang T. и соавт. (2018 г.) при анализе 1512 циклов ЭКО, пришли к выводу, что толщина эндометрия в цикле ЭКО является лучшим предиктором репродуктивных исходов в последующих циклах переноса размороженных эмбрионов, чем толщина эндометрия в самом цикле ПЭ, кроме того, толщина эндометрия в день получения яйцеклеток коррелирует с частотой живорождения [42].

Интересные данные получили специалисты при анализе влияния овариального и эндометриального ответа на клинические исходы у пациенток ( $n=9511$ ) с различной толщиной эндометрия в программах ЭКО/интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Бинарный логистический регрессионный анализ показал, что одним из независимых прогностических факторов наступления живорождения является толщина эндометрия, а не уровень эстрадиола (E2) ( $p < 0,05$ ). При этом пролонгированный протокол с применением агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (а-ГнРГ) показал значительно более высокие показатели частоты наступления имплантации и клинической беременности у пациенток с «тонким» эндометрием ( $\leq 7$  мм) [43]. Исследователи из Турции при проведении клинического исследования, в которое вошли 175 пациенток с толщиной эндометрия менее 7мм в день получения ооцитов, пришли к выводу, что



частота наступления беременности не имеет статистически значимой разницы среди пациенток с толщиной эндометрия  $\geq 4$  и  $< 5$ ,  $\geq 5$  и  $< 6$ ,  $\geq 6$  и  $< 7$  мм. Однако при сравнении частоты наступления беременности у данных пациенток с женщинами, толщина эндометрия которых была  $\geq 7$  мм выяснилось, что данные показатели составляет 26% и 51% соответственно ( $p < 0,0001$ ), а частота выкидышей 31% и 17% соответственно ( $p < 0,02$ ) [44].

Необходимо отметить, что беременность, наступившая на фоне «тонкого» эндометрия ассоциирована с риском самопроизвольного прерывания на ранних сроках, у таких пациенток в 2 раза выше риск преждевременных родов и рождения детей с низкой массой тела [45,46]. Анализ 1512 циклов ЭКО показал, что статистически значимыми были различия толщины эндометрия при сравнении пациенток в группах с наступившей и беременностью и без таковой, в то время как при анализе между группами с живорождением и без такой разницы выявлено не было. Авторы предполагают, что наиболее важным фактором, определяющим исход циклов ЭКО, является качество эмбриона [47]. Таким образом, учитывая все вышеизложенное, становится ясно, что толщина эндометрия является важным и во многом определяющим фактором успеха программ ВРТ.

### **1.3 Факторы, влияющие на толщину и рецептивность эндометрия**

Пациентки с «тонким» эндометрием, как правило, имеют сходный анамнез. В основном, это женщины, неоднократно перенесшие внутриматочные вмешательства, сопровождающиеся выскабливанием стенок полости матки: гистероскопии с отдельным диагностическим выскабливанием (РДВ), гистерорезектоскопии, хирургическое прерывание беременности, вакуум-аспирации содержимого полости матки при неразвивающейся беременности (НБ) и т.д. [37]. Такие пациентки отмечают снижение объема менструальных выделений, в анамнезе часто встречаются повторные неудачи

имплантации, вторичное бесплодие и самопроизвольное прерывание беременности на ранних сроках.

Среди основных причин, ведущих к уменьшению толщины эндометрия можно выделить следующие: внутриматочные вмешательства, влекущие повреждение базального слоя эндометрия, хронический эндометрит (ХЭ), нарушение гемодинамики маточных сосудов, сопровождающееся высоким сосудистым сопротивлением, снижение уровня эстрогенов или их эффекта. Кроме того, «тонкий» эндометрий возникает при гипоталамическом гипогонадизме, преждевременной недостаточности яичников, аномалиях Мюллеровых протоков, радиационном воздействии [17,48].

Наиболее часто причиной снижения регенеративной способности эндометрия служит повреждение базального слоя при внутриматочных вмешательствах. В ситуациях, когда повреждения носят глубокий и обширный характер, это приводит к потере локальных прогениторных клеток эндометрия, что обуславливает снижение регенеративной функции, развитие воспаления и может приводить формированию внутриматочных сращений [49,50]. Персистирующий воспалительный процесс в слизистой оболочке матки способствует нарушению рецептивности эндометрия, что может приводить к неудачам имплантации [51,52]. В литературе представлены данные о том, что ХЭ является основной причиной неудач программ ЭКО в 30% случаев [53]. Некоторые же исследователи, считают, что ХЭ не является существенным фактором неудач имплантации в программах ЭКО и не связан с возникновением «тонкого» эндометрия [54]. У пациенток с бесплодием и нормальной толщиной эндометрия ХЭ не считают значимой причиной неудач программ ЭКО [55].

Длительное применение некоторых лекарственных средств, например, кломифена цитрата с антиэстрогенным действием [56], комбинированных оральных контрацептивов [57], может приводить к уменьшению толщины эндометрия. При стимуляции функции яичников часто наблюдается

недостаточный рост эндометрия. Метаанализ показал, что при проведении стимуляции функции яичников кломифен цитратом толщина эндометрия была значительно меньше, чем при стимуляции гонадотропинами. Стимуляция овариальной функции гонадотропинами в комбинации с кломифен цитратом также приводила к уменьшению толщины эндометрия по сравнению со стимуляцией ингибиторами ароматазы [41].

Рост эндометрия может быть слабовыраженным при недостаточной секреции эстрадиола яичниками в ответ на стимуляцию, а также при негативном влиянии сверхвысоких доз E2 в случае повышенного ответа яичников на стимуляцию. Однако недостаточную толщину эндометрия нельзя объяснить только низким уровнем эстрогенов в крови, так как в циклах овариальной стимуляции уровень эстрогенов значительно выше, чем в естественных циклах [58]. Описана взаимосвязь между полиморфизмом генов эстрогеновых рецепторов (ER)  $\alpha$  и  $\beta$  и «тонким» эндометрием [59,60].

Следует отметить, что среди ведущих факторов, негативно влияющих на толщину и рецептивность эндометрия, особо выделяют нарушения гемодинамики в маточных сосудах. Ангиогенез играет ключевую роль в формировании эндометрия. Функциональный слой эндометрия имеет капиллярную сосудистую сеть, в базальном же слое расположены более крупные сосуды - спиральные артерии. Еще в 1957г были опубликованы работы, описывающие сокращение сосудов эндометрия в постовуляторном периоде [61]. Предположительно, это происходит для снижения потока крови и давления кислорода в период «окна имплантации», т.к. известно, что повышение давления кислорода с образованием его активных форм создает неблагоприятные условия для имплантации и развития эмбриона [62].

#### **1.4 Диагностика рецептивности эндометрия**

Изучение роли эндометрия в нарушении репродуктивной функции привело к более глубокому пониманию механизмов взаимодействия его с

эмбрионом и имплантации. Концепция об эндометрии как естественном биосенсоре базируется на таких его свойствах, как восприимчивость и селективность [63]. Восприимчивость обеспечивает трансформацию эндометрия и создание оптимальных условий для имплантации эмбриона и формирования плаценты. Селективность же обеспечивает способность распознавания эмбрионов с низким потенциалом развития, при этом реакция эндометрия приводит к невозможности имплантации. Следовательно, неудачи имплантации могут быть связаны как с нарушением развития самого эмбриона, так и с нарушением процессов восприимчивости и селективности в эндометрии.

Рецептивность эндометрия определяется как совокупность структурно-функциональных характеристик, определяющих способность эндометрия к имплантации бластоцисты. Несмотря на проведение многочисленных исследований, направленных на поиск и разработку новых методов диагностики, до сих пор не существует универсального высокоточного теста, способного определить рецептивность эндометрия и прогнозировать исход программ ВРТ.

Эндометрий наиболее рецептивен в середине секреторной фазы менструального цикла в так называемый период «окна имплантации», т.е. вероятность имплантации ограничена во времени. При этом считается, что на 19-23 дни 28-дневного менструального цикла создаются наиболее благоприятные условия в полости матки для имплантации эмбриона [5]. Однако у некоторых пациенток происходит сдвиг этого промежутка во времени, следовательно, при отсутствии индивидуального подхода, рецептивность эндометрия у них может снижаться, а исходы программ ВРТ окажутся менее благоприятными. Представление о рецептивности эндометрия можно получить по данным ультразвукового, гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований.

### 1.4.1. Ультразвуковое исследование

Наиболее доступным и неинвазивным методом определения рецептивности эндометрия, позволяющим провести диагностику в реальном времени, в клинической практике является УЗИ. Современная медицинская аппаратура позволяет в динамике оценить рост эндометрия, как в циклах контролируемой стимуляции функции яичников, заместительной гормональной терапии, так и в естественном цикле. Основными характеристиками, определяющими качество и готовность эндометрия к имплантации на протяжении долгого времени считались только толщина эндометрия и его трехлинейная структура. По мере совершенствования оборудования у специалистов появилась возможность оценивать не только структуру эндометриальной ткани, но и показатели субэндометриального кровотока [64]. Авторы метаанализа, включившего в себя данные 163 исследований и 88834 пациенток, сообщают, что наиболее значимыми маркерами рецептивности эндометрия при проведении УЗИ служат: трехлинейная структура, толщина  $>7$  мм в период «окна имплантации», объем эндометриальной ткани  $>2$  мл, нормальные показатели гемодинамики маточных сосудов, отсутствие сократительной активности матки и перистальтической активности эндометрия [65].

Анализ сонографических параметров эндометрия при УЗИ в циклах перед проведением ПЭ с использованием донорских ооцитов показал негативное влияние «тонкого» эндометрия на исходы программ ВРТ [66]. Испанские исследователи в своей работе не выявили разницы между толщиной эндометрия в циклах с наступившей беременностью и циклах, в которых беременность не наступила. В то же время статистически значимая разница была выявлена между значениями объема эндометриальной ткани у этих пациенток [67]. Другие авторы сообщают, что по данным трехмерного УЗИ и доплерометрического исследования ( $n = 638$ ), показатели эндометриального кровотока были значительно ниже у пациенток с меньшим объемом

эндометрия, но не у пациенток с «тонким» эндометрием [68]. Необходимо учитывать, что даже при толщине менее 7 мм эндометрий может быть рецептивным [69].

Chen S.L. и соавт. (2010 г.) в своей работе оценивали не только толщину эндометрия, но и наличие его трехслойности. Согласно их результатам у пациенток с трехслойной структурой эндометрия частота наступления беременности составила 24,4% даже при толщине менее 7 мм, в то время как при отсутствии трехслойности беременность не наступала [70]. Показано, что наличие перистальтических волнообразных движений эндометрия и сократительной активности матки в день ПЭ связано с низкой частотой наступления беременности. Сообщается о более высокой частоте наступления беременности у пациенток при выявлении в эндометрии < 2 волнообразных движений в минуту по сравнению с пациентками, у которых их было больше 3 в минуту [71,72]. Маточные сокращения в момент проведения УЗИ могут приводить к изменению показателей толщины эндометрия до 3х мм. Необходимо повторное измерение толщины в период отсутствия сократительной активности матки [73].

Учитывая полученные показатели при УЗИ эндометрий можно классифицировать, что позволит иметь представление о степени готовности его к имплантации и в определенной степени скорректировать дальнейшую тактику ведения пациентки. Так, трехслойный эндометрий в день введения триггера овуляции определяется как рецептивный или относящийся к классу А. Наличие четкой центральной эхогенной линии при проведении трансвагинальной сонографии в день введения триггера овуляции характерно для эндометрия класса В. Нерепреципитивный эндометрий (класс С) определяется как однородный эндометрий без слоистости [74]. Несмотря на то, что воспроизводимость результатов УЗИ считается удовлетворительной, необходимо учитывать субъективность данного метода исследования, что приводит к вариативности измеряемых показателей при проведении его разными специалистами. Было

показано, что вариабельность значений толщины эндометрия составляла 1 мм при проведении УЗИ разными специалистами одной пациентке, а внутренняя вариабельность двух измерений одним и тем же специалистом при слепом исследовании - 0,6–0,7 мм [75]. Особенно это важно учитывать при проведении УЗИ в клиниках ВРТ, когда разница в несколько мм толщины эндометрия может влиять на тактику ведения пациенток.

#### **1.4.2 Допплерометрическое исследование**

Количественное трехмерное доплеровское исследование позволяет определять показатели кровотока, характеризующие его интенсивность, васкуляризацию и перфузию. Мощность доплеровского сигнала зависит от кровотока внутри исследуемого органа, а его интенсивность от количества клеток крови в сосудах [76]. Специальные алгоритмы автоматически рассчитывают индекс васкуляризации, индекс кровотока, васкуляризационно-поточный индекс и др. [77]. К основным параметрам, определяющим оценку маточной гемодинамики относят степень васкуляризации миометрия, визуализацию сосудов различного калибра (маточных, аркуатных, радиальных, базальных, спиральных артерий), систолическую и диастолическую составляющую кровотока, величину показателей кривых скоростей кровотока: пульсационного индекса (PI), индекса резистентности (RI), систоло-диастолического соотношения (S/D) [78].

Четкую корреляционную связь между толщиной эндометрия и показателями кровотока в маточных сосудах выявили исследователи, изучавшие динамику толщины эндометрия у пациенток в циклах овариальной стимуляции в программе ЭКО и в естественных циклах [79]. Кроме того, сообщается о предиктивной способности показателей субэндометриального кровотока в отношении наступления беременности у пациенток в программах ВРТ [12,80].

Проспективное исследование случай-контроль (n=169) показало, что оценка PI и RI маточных артерий и субэндометриального кровотока может служить полезным инструментом для клиницистов в прогнозировании рецептивности эндометрия перед ПЭ в стимулированных циклах ВРТ. Показатели PI и RI статистически значимо были ниже в группе пациенток с наступившей имплантацией, по сравнению с группой без имплантации. При этом достоверное снижение показателей PI и RI в обеих группах отмечалось в день введения триггера. Авторы связывают такую динамику с влиянием хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на васкуляризацию эндометрия, благодаря его регуляторному действию на сосудисто-эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor (VEGF)) [81]. Была показана обратная корреляционная зависимость величины PI в маточной артерии в период «окна имплантации» от значений толщины эндометрия и прямая корреляционная зависимость от возраста [82]. Однако, другие авторы при проведении УЗИ и доплерометрического исследования у пациенток в циклах ЭКО/ИКСИ (n=70), не выявили статистически значимой разницы в толщине эндометрия и показателях субэндометриального кровотока в день ПЭ между группой пациенток с наступившей беременностью и группой, где беременность не наступила [83].

В работах, посвященных изучению взаимосвязи ангиогенеза и формирования эндометрия, большое внимание уделялось изучению VEGF, так как он считается одним из основных факторов, регулирующих ангиогенез в эндометрии человека. VEGF экспрессируется клетками эндометрия и регулирует васкуляризацию в слизистой матки [84]. Согласно представленным в литературе данным, для пациенток с «тонким» эндометрием характерно высокое сопротивление в маточных артериях, снижение экспрессии VEGF и бедный рост железистого эпителия [85]. Высокое сопротивление потока крови в радиальных артериях способствует снижению роста железистого эпителия и в результате приводит к снижению уровня экспрессии VEGF в эндометрии [3].



### 1.4.3 Гистероскопическое исследование

Выполнение гистероскопических вмешательств возможно не только с лечебной, но и диагностической целью. При этом хирург проводит визуальную оценку состояния полости матки. В зависимости от фазы менструального цикла гистероскопическая картина эндометрия претерпевает характерные изменения. Так, в пролиферативную фазу эндометрий в норме тонкий, бледно-розового цвета, равномерный с единичными кровоизлияниями и неотторгнувшимися участками ткани, устья маточных труб доступны к осмотру. В секреторную фазу цикла эндометрий утолщен, образует складки [86]. К характерным изменениям эндометрия в середину секреторной фазы цикла относят наличие желез кольцевого типа и хорошо развитой разветвленной сосудистой сети [87].

Гистероскопическая оценка эндометрия у женщин с бесплодием, но сохраненной овуляторной функцией, показала недостаточную трансформацию эндометрия в середину лютеиновой фазы в 67,1% случаев (n=79). При этом, частота наступления клинической беременности после лечения бесплодия одним из методов (индукция овуляции, ВМИ или ЭКО) была выше у женщин с эндометрием, соответствующим фазе цикла и составила 53,9%, по сравнению с женщинами с недостаточной трансформацией эндометрия - 26,4% [88]. Другие авторы провели гистероскопическую диагностику состояния слизистой матки у 162 бесплодных женщин и сообщили о 33% случаев несоответствующей дню цикла картины эндометрия у пациенток. Частота наступления беременности после лечения бесплодия среди пациенток была выше у женщин с физиологичной картиной эндометрия (43,5%) по сравнению с женщинами, у которых эндометрий не соответствовал фазе цикла по данным гистероскопии (24%) [89].

### 1.4.4. Гистологическое исследование

Еще в 1937 г. Rock J. и Bartlett M.K. дали гистологическое описание трансформации эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации»

[90]. Одним из наиболее изученных маркеров «окна имплантации» являются пиноподии - выросты на поверхности эпителия эндометрия диаметром порядка 6 микрон, обнаруживаемые при электронной микроскопии в середину лютеиновой фазы [91]. В литературе представлены спорные данные о продолжительности существования пиноподий. Одни специалисты сообщают о существовании пиноподий менее 48 часов в середину лютеиновой фазы менструального цикла [92], в то же время по другим источникам они появляются после овуляции и сохраняются до конца лютеиновой фазы [93]. Считают, что начальные этапы адгезии бластоцисты происходят именно на поверхности пиноподий [94]. Кроме того, пиноподии высвобождают везикулы с лейкоингибирующим фактором (LIF) в полость матки [95].

Jin X.Y. и соавт. (2017 г.) сообщили, что количество и тип формирования пиноподий влияет на исход программ ВРТ. Согласно представленной ими системе подсчета индекса формирования пиноподий было выявлено, что частота наступления беременности и частота имплантации у женщин с высоким индексом пиноподий были статистически значимо выше, чем у пациенток с низким индексом формирования пиноподий ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,046$ ). Частота наступления беременности у пациенток с значением индекса пиноподий выше 26,5 была выше по сравнению с пациентками с более низким его значением. Чувствительность данного индекса в отношении прогнозирования наступления беременности составила 83%, а специфичность - 45% [96]. У пациенток с ХЭ количество пиноподий снижается [97]. Ряд авторов полагает, что образование пиноподий не является достаточно точным маркером «окна имплантации» [98].

При гистологическом исследовании биоптата эндометрия возможно предположить асинхронное развитие его по отношению к эмбриону, что может также снижать вероятность наступления имплантации.

#### **1.4.5 Иммуногистохимическое исследование**

В патогенезе «тонкого» эндометрия основную роль играют дисхронное созревание желез эндометрия на фоне обеднения его сосудистой сети, асинхронность созревания пиноподий, уплотнение стромального компонента, а также снижение экспрессии некоторых факторов, например, LIF, CD34, VEGF [99]. Экспрессируемый железистым и поверхностным эпителием эндометрия LIF является провоспалительным фактором, относится к семейству интерлейкина-6 и играет особую роль в имплантации бластоцисты, достигая максимальной экспрессии в период "окна имплантации"[100,101]. Alfer J. и соавт. (2017 г.) показали, что снижение экспрессии  $\beta$ 3-интегрина, VEGF, LIF и CD56 связано с недостаточным ангиогенезом, и субоптимальным развитием эндометриальной ткани [102].

Представлены данные, подтверждающие снижение экспрессии LIF в эндометрии пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе [103,104]. Взаимодействие эмбриона с эндометрием в процессе имплантации индуцирует синтез определенных цитокинов, как ИЛ-1, фактора некроза опухолей (ФНО) и трансформирующего фактора роста (TGF)- $\beta$ , что вызывает дальнейшую секрецию LIF стромальными клетками [105]. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF - $\beta$ 3, экспрессируются в стромальных и эпителиальных клетках, влияют на продукцию внеклеточного матрикса, индуцируют повышение экспрессии LIF в эпителиальных клетках эндометрия и снижение секреции ИЛ-6 [106].

Чувствительность эндометрия к половым гормонам и их влияние на клетки-мишени определяются их рецепторами. Экспрессия этих рецепторов может меняться в зависимости от различных физиологических и патологических состояний. Известны изоформы эстрогеновых рецепторов и рецепторов прогестерона [107]. Повторные неудачи имплантации ассоциированы с дисбалансом экспрессии ER $\alpha$  и PR в эндометрии. Соотношение PR/ER $\alpha$ , соответствующее морфологической структуре эндометрия, и количество клеток поверхностного эпителия с наличием пиноподий  $\geq 50\%$  являются значимыми факторами, повышающими вероятность

наступления беременности, при этом гиперэкспрессия ER $\alpha$  в середину секреторной фазы служит неблагоприятным прогностическим фактором [108]. Иммуногистохимический (ИГХ) анализ показал, что в образцах «тонкого» эндометрия экспрессия ER в строме была значительно снижена, по сравнению с образцами нормального эндометрия как в пролиферативную, так и в секреторную фазу цикла, а в железистых клетках снижена только в пролиферативную фазу. При этом статистически значимых различий в экспрессии PR между двумя группами выявлено не было [109].

Авторы крупного метаанализа (n=88834) сообщают об отсутствии убедительных доказательств эффективности использования экспрессии LIF, различных интегринов, матриксных металлопротеиназ (ММП), макрофагального колониестимулирующего фактора, VEGF, HOXA-10 и пр. в клинической практике в качестве маркеров рецептивности эндометрия и прогнозирования исходов программ ВРТ [65]. Гипоксия индуцибельный фактор (HIF), будучи медиатором васкуляризации плаценты и дифференциации трофобласта, активируется не только в условиях гипоксии, но и ренин-ангиотензиновой системой, факторами роста и цитокинами [110]. HIF-1 регулирует гомеостаз, индуцируя транскрипцию ключевых генов, активирует ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$ , в результате чего возрастает секреция VEGF и эритропоэтина [111]. Представлены данные о снижении рецептивности эндометрия при увеличении продукции HIF [112].

Известно, что активация протеинкиназы В (АКТ) участвует в ремоделировании эндометрия и имплантации, при этом бесплодие и невынашивание беременности у женщин с «тонким» эндометрием, вероятно, связаны со снижением экспрессии фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и АКТ. Было показано, что экспрессия белков PI3K, АКТ и Р-АКТ у пациенток с «тонким» эндометрием оказалась значительно ниже по сравнению с экспрессией у пациенток с нормальными значениями толщины эндометрия ( $p <$

0,05). У пациенток с «тонким» эндометрием экспрессия белков PI3K, AKT и P-AKT оказалась снижена в пролиферативную фазу менструального цикла [113].

#### **1.4.6 Молекулярно-генетическое исследование**

Maekawa R. и соавт. (2017 г.) при изучении потенциальных молекулярных механизмов повторных неудач имплантации у женщин с «тонким» эндометрием, пришли к выводу, что для них характерно наличие aberrantly активированных воспалительных элементов и снижение регуляции генов, отвечающих за метаболизм и реакцию клетки на окислительный стресс [2]. Среди механизмов, регулирующих neoangiogenesis и экспрессию VEGF в эндометрии наиболее заметны PI3K/AKT и p38 митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) сигнальные пути [114].

Персонализированное определение «окна имплантации» для конкретной пациентки стало возможным с появлением диагностического теста, использующего молекулярный анализ для оценки эндометриальной восприимчивости, основанного на анализе экспрессии 238 генов, вероятно, определяющих восприимчивость эндометрия к имплантации (endometrial receptivity assay - ERA) [115]. Разработчики сообщают о том, что ERA-тест в определении нормальной рецептивности эндометрия имеет специфичность 88% и чувствительность 99% [116]. Для проведения данного диагностического теста необходимо получение образца эндометриальной ткани путем биопсии в период предполагаемого «окна имплантации» на 7й день после пика ЛГ в естественном цикле либо на 6й день приема прогестерона в циклах заместительной гормональной терапии (ЗГТ). По результатам теста эндометрий определяется как рецептивный, пререцептивный или пострецептивный [117].

Согласно результатам молекулярно-генетического исследования рецептивности эндометрия смещение «окна имплантации» встречается у 24-44% пациенток с неудачами имплантации в программах ВРТ [118,119]. По данным исследования Hromadova L. и соавт. (2019 г.) невосприимчивый

эндометрий в период предполагаемого «окна имплантации» был выявлен у 36,5% (n=85) пациенток. Индивидуальное корректирование дня ПЭ у этих пациенток на основании результатов ERA теста привело к наступлению беременности после ПЭ у 69,2% из них (n=31) [120].

Другие авторы в своем исследовании оценили влияние корректировки дня ПЭ согласно результатам проведенного теста ERA на исходы программ ВРТ. Авторы сообщают о том, что 53 пациенткам в основной группе была выполнена биопсия эндометрия в цикле, предшествующем ПЭ, для дальнейшего гистологического исследования и молекулярно-генетической оценки восприимчивости эндометрия. В группу контроля вошли 503 пациентки, которым не проводилась биопсия эндометрия и определение индивидуального «окна имплантации». При этом у пациенток из основной группы с пре- и пострецептивным эндометрием согласно результатам ERA теста соответствующая корректировка даты проведения ПЭ привела к частоте наступления беременности 33,3%, что сопоставимо с 35,2% в контрольной группе. Таким образом, авторы пришли к выводу, что проведение биопсии эндометрия с дальнейшим определением индивидуального «окна имплантации» с помощью ERA теста в цикле, предшествующем ПЭ, не повышает эффективность программ ВРТ [121].

Другой диагностический тест определяет рецептивность эндометрия на основании комбинированного количественного анализа экспрессии 184 генов, контролирующих пролиферацию эндометрия и материнский иммунный ответ при имплантации эмбриона, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией [122]. Однако опубликовано недостаточно данных, и авторы сообщают о необходимости проведения крупных рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) для оценки эффективности данного метода диагностики. Факторами, лимитирующими широкое применение молекулярно-генетических диагностических тестов, являются коммерческая составляющая, высокая стоимость, а кроме того определение восприимчивости

эндометрия в цикле, отличном от цикла ПЭ, что не позволяет иметь представление о рецептивности эндометрия непосредственно в цикле ПЭ.

## **1.5 Современные представления о терапии маточного фактора бесплодия**

### **1.5.1 Гормональная терапия**

Среди методов лечения женщин с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия традиционной и наиболее распространенной является гормональная терапия [123]. Для увеличения толщины эндометрия используют препараты эстрогенов. Проллиферативный эффект эстрогенов на эпителиальные клетки эндометрия опосредован взаимодействием с ER- $\alpha$  стромальных клеток и последующим выделением эпидермального фактора роста (EGF), инсулиноподобного фактора роста (IGF) и др. [124]. Эстрогены оказывают прямое активирующее действие на PI3K/AKT сигнальный путь, повышают экспрессию VEGF A, что способствует пролиферации эндометрия [125].

Гормональная терапия препаратами эстрогенов с целью повышения эндометриального ответа имеет несколько модификаций и подходов. Было предположено, что увеличение продолжительности применения и суточной дозы E2 приведет к более значимому росту эндометрия [14]. Однако у пациенток с выраженным отставанием роста эндометрия (менее 4 мм в середину лютеиновой фазы) к концу первой недели приема эстрогенов сохранялось его критическое отставание (менее 5 мм) даже при интенсивной эстрогеновой поддержке [126]. Важно учитывать, что применение средних доз эстрогенов более эффективно, по сравнению с применением низких и доз, превышающих рекомендованные [127].

Помимо этого, менялся способ введения препаратов. Эстрадиол может назначаться в пероральной, трансдермальной и вагинальной формах. Однако, первичный метаболизм E2 в печени при пероральном приеме приводит к тому, что лечебный эффект в основном обусловлен действием метаболитов, которые

обладают значительно более низким сродством к  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторам эстрогенов. Преимуществами трансдермальных лекарственных форм E2 являются отсутствие первичного прохождения через печень, менее значимое влияние на систему гемостаза и большая биодоступность препарата. Рост эндометрия может обеспечиваться экзогенным E2 в циклах ЗГТ и эндогенным E2. Согласно представленным данным, толщина эндометрия, среднее значение пульсационного индекса (PI) маточной артерии и процент васкуляризации матки были статистически значимо выше при вагинальном применении препаратов эстрадиола по сравнению с пероральным [128]. При вагинальном применении E2 увеличение толщины эндометрия было значительно выше, чем в группе с пероральным применением эстрогенов, однако значительных различий между группами в частоте наступления имплантации и клинической беременности не выявлено [129]. Другим шагом на этапе изучения возможностей гормональной терапии «тонкого» эндометрия была модификация типа молекулы. Согласно представленным данным толщина эндометрия у пациенток, которым назначали препарат синтетического эстрогена была значимо выше, чем у пациенток, получавших препараты натурального эстрогена [130].

### **1.5.2 Физиотерапия**

На этапе прегравидарной подготовки женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием на сегодняшний день широко применяются физические методы лечения [15,131]. Одним из хорошо себя зарекомендовавших методов является электроимпульсная терапия. Механизм действия обусловлен изменением биоэлектрической активности мышечных элементов и нервов внутренних органов, что приводит клетку в состояние возбуждения, при этом происходит двигательная реакция мышцы или нерва. Электростимуляция вызывает сокращение и расслабление мышечных волокон, что приводит к активации кровотока посредством расширения периферических сосудов, нормализации процессов ангиогенеза



[132]. Согласно результатам исследования Волковой Е.Ю. (2012 г.), применение электроимпульсной терапии в комплексном лечении женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием привело к восстановлению перфузии в маточных сосудах, увеличению толщины эндометрия и частоты наступления беременности в протоколах ЭКО [15]. Схожие данные получили другие авторы после комплексного лечения физическими методами пациенток. Сообщается об увеличении толщины эндометрия у пациенток во II фазу менструального цикла, появлении однородной структуры эндометрия и увеличении  $V_{\min} > 2,5$  см/с по данным контрольного доплерометрического исследования [133].

Применение интенсивной низкочастотной магнитотерапии у пациенток в программе ЭКО приводит к повышению эффективности до 37,5% и снижает частоту репродуктивных неудач до 8,3%. Авторы связывают данный эффект с улучшением гемодинамики в маточных, аркуатных и радиальных артериях под воздействием проводимой терапии [134]. У пациенток с маточным фактором бесплодия применение лечебных физических факторов приводит к активации капиллярного кровотока, снижению периферического сопротивления сосудов, увеличению числа функционирующих артериальных сосудов субэндометриальной зоны, что обуславливает восстановление симметричной маточной перфузии на всех уровнях. По данным литературы электроимпульсная терапия при исходной толщине эндометрия  $< 8$  мм приводит к ее значимому увеличению, что улучшает репродуктивные исходы [135].

Шнейдерман М.Г. и соавт. (2015 г.) опубликовали данные о существенном увеличении толщины эндометрия у пациенток с «тонким» эндометрием при орошении полости матки газовой смесью [136]. Другие авторы сообщают о применении иглоукалывания и нейромышечной электростимуляции в режиме биологически обратной связи с целью увеличения толщины эндометрия [137]. Была показана эффективность нейромышечной стимуляции мышц тазового дна в терапии пациенток с «тонким» эндометрием

перед ПЭ в программах ВРТ (n=41). Согласно результатам исследования 60% пациенток из основной группы (n=20) достигли толщины эндометрия >8 мм после проведенной терапии. Средняя толщина эндометрия до и после лечения составила соответственно 5,6 мм (0,82 мм) и 7,93 мм (1,42 мм) в основной группе против 5,50 мм (1,0) и 6,78 мм (0,47) в контрольной группе (p = 0,002). Частота наступления беременности также была выше в основной группе, но эта разница не была статистически значимой [138]. Систематический обзор показал значительную эффективность и безопасность иглорефлексотерапии в лечении женщин с нарушением репродуктивной функции и рецептивности эндометрия в отношении увеличения толщины эндометрия, частоты наступления клинической беременности и улучшении показателей маточной гемодинамики, однако уровень доказательности оказался низким [139].

### **1.5.3 Современные дополнительные методы терапии**

С целью увеличения толщины эндометрия и улучшения кровообращения в маточных сосудах в клинической практике распространено применение низких доз ацетилсалициловой кислоты [140], омега-3 жирных кислот [16], силденафила цитрата [141], L-аргинина [142], пентоксифиллина и витамина Е [17].

Согласно данным литературы локальная травматизация эндометрия способствует повышению регенераторного потенциала и оказывает положительное влияние на частоту наступления беременности в циклах ЭКО [18]. Скретчинг эндометрия может проводиться как во время офисной гистероскопии, когда биопсийными щипцами наносятся продольные царапины по задней и боковым поверхностям матки, так и при аспирационной пайпель-биопсии эндометрия. В литературе представлены данные, что выполнение биопсии эндометрия в цикле, предшествующем ПЭ, оказывает положительное влияние на исходы программ ЭКО [143]. Контролируемая травматизация

слизистой приводит к массивному выбросу факторов роста и цитокинов, что способствует восстановлению структуры и рецептивности эндометрия [144].

В литературе представлены данные о применении прайминга ХГЧ в фолликулярную фазу менструального цикла на фоне применения препаратов эстрогенов [145,19] применении а-ГнРГ в лютеиновую фазу цикла [137]. Основываясь на предположении о способности рецепторов к ХГЧ модулировать дифференцировку эндометрия и ангиогенез, исследователи оценили применение подкожных инъекций ХГЧ в фолликулярную фазу цикла на фоне ЗГТ у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием. Инъекции ХГЧ приводят к значительному увеличению толщины эндометрия, значения которой до терапии составляли  $5,07 \pm 0,43$  мм, а после  $7,85 \pm 0,52$  мм соответственно ( $p < 0,001$ ) [19]. Применение а-ГнРГ в лютеиновую фазу у пациенток с «тонким» эндометрием в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП), ПЭ и на 3й день после ПЭ приводит к значительному увеличению толщины эндометрия, частоты имплантации и клинической беременности по сравнению с контрольной группой [146].

Другие исследователи сообщили о том, что применение тамоксифена цитрата в программах ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием приводит к значительному увеличению толщины эндометрия с  $6,11 \pm 0,98$  мм до  $7,87 \pm 1,48$  мм в естественном цикле, с  $6,24 \pm 1,01$  мм до  $8,22 \pm 1,67$  мм на фоне ЗГТ и с  $6,34 \pm 1,03$  мм до  $8,05 \pm 1,58$  мм в циклах овариальной стимуляции ( $p < 0,001$ ) [147]. Представлены данные об улучшении исходов программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием при применении гормона роста. У пациенток ( $n=83$ ), получавших терапию гормоном роста, значительно увеличивается толщина эндометрия, частота имплантации и частота наступления беременности по сравнению с контрольной группой, где пациентки получали гормональную терапию эстрогенами ( $p < 0,05$ ). Авторы сообщают о стимулировании гормоном роста процессов пролиферации, васкуляризации, а также повышении экспрессии VEGF, IGF-1 и интегрин бета-3 (IntB3) в клетках эндометрия [148].

Вместе с тем, исследование с участием 225 пациенток не выявило какого-либо влияния терапии гормоном роста в циклах ВРТ на толщину эндометрия пациенток, при этом, частота наступления беременности у них была статистически значимо выше [149].

Новый подход в терапии пациенток с фиброзными изменениями эндометрия представили исследователи из Китая. Авторы вводили в участки измененного эндометрия пациенток (n=18) систему пролонгированного высвобождения фактора роста фибробластов-b (FGF) каждые 4 недели в течение 2-4 циклов. Согласно результатам пилотного исследования после проведенной терапии у пациенток увеличился объем менструальной крови, толщина эндометрия, а площадь фиброзных изменений уменьшилась. У трех пациенток наступила беременность, 2 из них с помощью ВРТ [150].

Среди методов, направленных на увеличение толщины эндометрия, сегодня широко применяют внутриматочное введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (G-CSF) [20], что способствует повышению частоты наступления клинической беременности по сравнению с плацебо, особенно среди женщин в странах Азии [151]. Согласно результатам исследования Kunicki и соавт. (2017 г.), внутриматочные инфузии G-CSF пациенткам с «тонким» эндометрием приводят к увеличению толщины эндометрия, но не влияют на частоту имплантации и живорождения по сравнению с группой контроля [152]. С этим согласуются результаты исследования, где пациенткам с рефрактерным «тонким» эндометрием проводили внутриматочные инфузии 1 мл G-CSF перед ПЭ в полость матки. Авторы сообщили об увеличении толщины эндометрия у 54,3% (n=35) пациенток, однако, отметили отсутствие влияния исследуемого метода на частоту наступления беременности. Кроме того, у 16 пациенток ПЭ был отменен в связи недостаточным ростом эндометрия [153]. По данным метаанализа внутриматочное и системное применение G-CSF перед ПЭ в полость матки приводит к увеличению частоты наступления беременности у

пациенток с привычными неудачами имплантации в анамнезе [154]. Нет каких-либо данных о возникновении негативных явлений при внутриматочных инфузиях G-CSF, однако были высказаны опасения по поводу системного его применения. Отмечается повышение риска развития миелоидных новообразований, связанного с терапией G-CSF [155].

### **1.6 Плазма, обогащенная тромбоцитами, в терапии женщин с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием**

Аутологичную плазму, обогащенную тромбоцитами (Platelet-Rich Plasma (PRP)), получают из собственной крови пациентки путем двухэтапного центрифугирования и разделения форменных элементов, что позволяет достичь повышенной концентрации тромбоцитов в плазме [156].

Терапевтический эффект применения PRP основан на способности факторов роста, цито- и хемокинов, содержащихся преимущественно в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов, запускать процессы ангиогенеза и регенерации в тканях. Среди основных факторов роста, обеспечивающих запуск механизмов регенерации в тканях, можно выделить: тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), TGF, FGF, VEGF, IGF-1, EGF и др. Высвобождение факторов роста из тромбоцитов происходит при их дегрануляции в поврежденных тканях. В литературе описана способность факторов роста регулировать процессы клеточной миграции, пролиферации, дифференцировки, а также способствовать продукции и накоплению экстрацеллюлярного матрикса [156]. Кроме того, тромбоциты способны накапливать, благодаря эндоцитозу, медиаторы, среди которых сфингозин-1-фосфат и лизофосфатиды. Данные вещества обладают антиапоптотической активностью в отношении клеток эндотелия, участвуют в их пролиферации и способствуют формированию капиллярноподобных структур. Сфингозин-1-фосфат является лигандом рецептора гена эндотелиальной дифференцировки (endothelial differentiation gen (EDG)), что объясняет его ключевое значение в ангиогенезе [25].

Существуют различные классификации и технологии получения PRP. В зависимости от концентрации тромбоцитов и наличия или отсутствия лейкоцитов выделяют обогащенную тромбоцитами плазму крови (PRP), плазму крови, обогащенную тромбоцитами и лейкоцитами (Leucocyte- and Platelet-Rich Plasma (L-PRP)), а также обедненную тромбоцитами плазму крови (Platelet-Poor Plasma (PPP)) [157]. Согласно классификации Ehrenfest D. выделяют 4 категории препаратов крови в зависимости от содержания лейкоцитов и фибрина: собственно чистая PRP (Pure-PRP(P-PRP)), L-PRP, чистый обогащенный тромбоцитами фибрин (P-PRF) и фибрин, обогащенный лейкоцитами и тромбоцитами (L-PRF) [158].

Несмотря на множество различных алгоритмов получения PRP, практически все из них включают забор крови у пациента в ёмкость с антикоагулянтом, центрифугирование и разделение форменных элементов крови для получения конечного препарата с повышенной концентрацией тромбоцитов. Было показано, что для достижения терапевтического эффекта необходима концентрация тромбоцитов не менее 1 000 000 на микролитр в PRP [159]. Кроме того, исключительно важно сохранить жизнеспособность тромбоцитов и предотвратить их активацию и выброс факторов роста до введения PRP в ткань.

Следует отметить, что PRP-терапия широко применяется в различных областях медицины, а особенное распространение нашла в стоматологии, ортопедии, дерматологии, пластической хирургии и регенеративной медицине благодаря способности стимулировать процесс заживления ран [160,161]. Применение PRP оказывает стимулирующее действие на пролиферацию клеток и рост тканей, не только благодаря содержанию факторов роста, но и противовоспалительным и антимикробным свойствам, которые были продемонстрированы на хондроцитах человека [162].

В настоящее время проводится большое количество исследований по оценке эффективности применения PRP в гинекологии, а именно: в терапии привычных неудач имплантации, маточного фактора бесплодия,

преждевременной недостаточности яичников, заболеваний вульвы, сексуальной дисфункции [163]. В эпоху стремительного развития регенеративной медицины исследования о возможностях применения PRP-терапии в репродуктивной сфере стали особенно актуальны и могут быть полезным инструментом в тканевой инженерии. На сегодняшний день проводятся исследования по оценке эффективности и безопасности применения PRP как дополнительного метода терапии в программах ВРТ [164]. Однако отсутствие единого стандарта приготовления PRP, информации о концентрации тромбоцитов и клеточном составе полученной плазмы существенно затрудняет сравнительный анализ этих работ.

Впервые применение аутологичной PRP в терапии женщин с бесплодием на фоне рефрактерного «тонкого» эндометрия было описано в 2015 г специалистами из Китая. В пилотное исследование были включены 5 пациенток с толщиной эндометрия в период «окна имплантации» <7 мм. Авторы продемонстрировали, что проведение внутриматочных инфузий 1 мл аутологичной PRP на фоне приема эстрогенов способствовало увеличению толщины эндометрия и привело к наступлению беременности у всех пяти пациенток после ПЭ в программах ВРТ [23].

Согласно результатам исследования Tandulwadkar S. и соавт. (2017 г.) применение аутологичной PRP в цикле переноса размороженных эмбрионов способствует увеличению толщины эндометрия и улучшению показателей внутриматочного кровотока [24]. Другие исследователи также продемонстрировали повышение эффективности программ ЭКО у пациенток с «тонким» эндометрием на фоне терапии аутологичной PRP. Molina A. и соавт. (2017 г.) в своем исследовании (n=19) проводили внутриматочные инфузии 1 мл аутологичной PRP на 10-й и 12-й день цикла на фоне ЗГТ пациенткам с «тонким» эндометрием перед проведением ПЭ. Согласно представленным данным, частота наступления беременности составила 73,7%, частота живорождения - 26,3% [25]. Chang Y. и соавт. (2019 г.) опубликовали

результаты исследования, в которое были включены 64 пациентки с толщиной эндометрия менее 7 мм в период «окна имплантации». Частота имплантации и клинической беременности у пациенток, получавших терапию аутологичной PRP, была статистически значимо выше, чем у пациенток из контрольной группы (27,94% и 11,67%,  $p < 0.05$ ; 44,12% и 20%,  $p < 0,05$  соответственно). Кроме того, авторы показали, что средняя концентрация тромбоцитов в PRP в 4,21 раза превышала таковую в цельной крови пациенток, также концентрация PDGF-AB, PDGF-BB и TGF- $\beta$  была выше по сравнению со значениями в цельной крови [21]. В двойном слепом РКИ ( $n=60$ ) была доказана эффективность орошения полости матки аутологичной PRP пациенткам с «тонким» эндометрием. Внутриматочное введение аутологичной PRP привело к значительному увеличению толщины эндометрия у пациенток в основной группе по сравнению с контрольной, что составило  $7,21 \pm 0,18$  и  $5,76 \pm 0,97$  мм, соответственно [165]. В другом РКИ ( $n=83$ ) внутриматочные инфузии 0,5-1 мл аутологичной PRP на 13й день цикла и через 48ч повторно пациенткам с рефрактерным «тонким» эндометрием привели к увеличению толщины эндометрия, частоты имплантации и наступления клинической беременности по сравнению с контрольной группой, где пациентки получали только заместительную гормональную терапию [166]. С целью обобщения имеющихся в литературе данных об оценке эффективности применения PRP в терапии женщин с «тонким» эндометрием и привычными неудачами имплантации в программах ЭКО был проведен метаанализ, включивший 7 опубликованных работ ( $n=625$ ). Авторы сообщают о том, что внутриматочное введение аутологичной PRP приводит к значительному увеличению толщины эндометрия, частоты наступления имплантации и клинической беременности по сравнению с пациентками из контрольных групп ( $p < 0,001$ ) [167]. Стимулирующее влияние PRP на экспрессию генов LIF, FoxO1 (forkhead box protein O1) и IL1- $\beta$  было показано в экспериментах *in vitro*, что позволило авторам судить о потенциальных механизмах пролиферативного эффекта на эндометрий [168].



Несомненным преимуществом является тот факт, что аутологичную PRP получают из собственной крови пациентки, что сводит к минимуму возможность развития аллергических реакций и иммуногенных осложнений. В отличие от синтетических препаратов, PRP является естественным источником значительного количества факторов роста, не требует весомых финансовых затрат и не обладает токсичными свойствами. Аутологичная PRP стимулирует процессы клеточной пролиферации и регенерации, а также способствует ангиогенезу [169,170]. Применение аутологичной PRP стимулирует рост, миграцию и адгезию мезенхимальных стволовых клеток эндометрия в экспериментах *in vitro* [171]. Факторы роста, содержащиеся в тромбоцитах необходимы для функциональной активности прогениторных клеток эндометрия. Изоформы PDGF стимулируют пролиферацию и миграцию стромальных стволовых клеток эндометрия [172-174]. В экспериментах *in vitro* было показано, что активированная PRP способствует пролиферации, а также адипогенной и остеогенной дифференцировке стволовых клеток, полученных из менструальной крови. При этом применение PRP подавляет апоптоз и повышает экспрессию маркера мезенхимальных стволовых клеток (МСК) CD105 и периваскулярных маркеров SUSD2 и CD146 [168].

### **1.7 Возможности клеточной терапии женщин с маточным фактором бесплодия**

В 2004г. в изолированных культурах эпителиальных и стромальных клеток эндометрия были обнаружены отдельные клетки, способные образовывать колонии, таким образом, было доказано присутствие в эндометрии клеток со свойствами стволовых [175]. Высокий пролиферативный потенциал и способность к самообновлению этих клеток послужили основанием для их дальнейшего изучения.

Значительная способность к регенерации эндометрия в течение каждого менструального цикла основана на существовании в нем эпителиальных, мезенхимальных и эндотелиальных стволовых/прогениторных клеток [176].

Nguyen H. и соавт. (2017 г.) описали популяцию клоногенных, самообновляющихся клеток с высоким пролиферативным потенциалом, которые дифференцируются в железоподобные структуры *in vitro*. Авторы сообщают о преимущественном расположении этих эпителиальных прогениторных клеток в базальном слое эндометрия [177]. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, обладая способностью к дифференцировке, имеют свойства и фенотип схожий с МСК костного мозга и жировой ткани, обеспечивая регенерацию эндометрия в течение каждого менструального цикла женщины [178]. Стволовые клетки эндометрия обладают высоким пролиферативным потенциалом — одна клетка может воспроизводить до  $6 \times 10^{11}$  копий [179]. Снижение количества и функциональной активности стволовых/прогениторных клеток эндометрия может приводить к отсутствию условий в ткани для успешной имплантации эмбриона.

На сегодняшний день потенциальными источниками стволовых клеток с целью их дальнейшего применения в лечении маточного фактора бесплодия являются: костный мозг, жировая ткань, амниотическая жидкость, пупочный канатик, эндометрий и менструальная кровь [180].

В литературе представлены работы по применению МСК костного мозга для регенерации ткани эндометрия перед проведением ЭКО у пациенток с синдромом Ашермана [181]. Многообещающие результаты были получены в исследовании, в котором пациенткам с рефрактерным эндометрием и синдромом Ашермана вводили аутологичные стволовые клетки, полученные из костного мозга, через маточную в спиральные артерии [22]. Однако получение клеток костномозгового происхождения является инвазивным и связано с возможностью развития различных осложнений.

Согласно данным Singh N. и соавт. (2014 г.) применение аутологичных стволовых клеток в дополнение к терапии препаратами эстрогенов является перспективным методом в терапии женщин с рефрактерным эндометрием. Авторы вводили моноклеарные стволовые клетки в субэндометриальную

зону, что привело к восстановлению менструаций и увеличению толщины эндометрия у пациенток с синдромом Ашермана [182].

Наиболее доступным и не требующим инвазивного вмешательства источником получения стволовых клеток служит менструальная кровь женщин. Было показано, что менструальная кровь отличается по своему составу от периферической и может быть определена как отделяемое из раны [183]. Стромальные клетки, полученные из менструальной крови, обладают характеристиками стволовых/прогениторных клеток, высоким пролиферативным потенциалом, клоногенностью и мультипотентностью [184]. Кроме того, эти клетки позитивны в отношении маркеров эмбриональных стволовых клеток OCT-4 и SSEA-3/4 [185,186]. Специалисты из Китая представили результаты исследования, согласно которым им удалось получить и культивировать стромальные стволовые клетки из менструальной крови женщин репродуктивного возраста с синдромом Ашермана (n=7). Внутриматочное введение культивированных аутологичных клеток привело к увеличению толщины эндометрия у 5 пациенток, что позволило провести им ПЭ [187].

Согласно данным, представленным Zhu H. и соавт. (2018 г.), стволовые клетки, полученные из менструальной крови, способствовали восстановлению пролиферативной и миграционной активности поврежденных стромальных клеток эндометрия, ингибировали их апоптоз и повышали экспрессию VEGF и  $\beta$ -катенина путем активации p38 MAPK и АКТ сигнальных путей [26].

В клинических исследованиях был показан терапевтический потенциал стволовых клеток эндометрия для применения их в тканевой инженерии. Представлены данные, согласно которым для стволовых клеток эндометрия характерен в 27 раз более высокий уровень PDGF-BB и в 14 раз более высокий уровень ангиопоэтина. Это указывает на возможность активации ими альтернативных путей ангиогенеза в тканях [188].

Tersoglio A. и соавт. (2020 г.) представили данные своего пилотного исследования (n=29), в которое были включены пациентки с «тонким»

эндометрием и повторными неудачами имплантации. Пациенткам в состоянии седации проводили субэндометриальное введение аутологичных МСК эндометрия в количестве  $2,5-3,6 \times 10^6$ , растворенных в 1 мл аутологичной PRP. Авторы сообщают о значительном увеличении толщины эндометрия с  $5,25 \pm 1,24$  мм до  $9,93 \pm 0,77$  мм у пациенток, при этом у 23 из 29 женщин (79%) наступила клиническая беременность после проведенного вмешательства и ПЭ на фоне гормональной терапии, 10 из которых завершились живорождением (45.5%) [27].

Стволовые клетки эндометрия обладают свойствами МСК из других источников, иммуномоделирующим и противовоспалительным действием. Благодаря минимальной инвазивности способа получения, изученности свойств и доказанной безопасности применения МСК эндометрия могут служить в качестве альтернативного лечения у пациенток с нарушением репродуктивной функции, обусловленным маточным фактором, рефрактерным к известным методам терапии.

### **1.8 Суррогатное материнство**

Проблемы репродукции являются не только медицинскими, но социальными и культурными. Зачастую единственной возможностью для пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием иметь детей становится суррогатное материнство, однако это связано не только с колоссальными финансовыми затратами, но и является тяжелым, а в ряде случаев неприемлемым с моральной и психологической точки зрения способом для некоторых женщин. Первые упоминания о бесплодном браке и суррогатном материнстве обнаружены на 4000-летней глиняной табличке брачного контракта, относящейся к ассирийскому периоду, что только подтверждает давность данной проблемы для человечества [189].

С совершенствованием ВРТ в развитых странах растет количество суррогатных беременностей. Обзор представленных в литературе работ

показал, что суррогатное материнство является потенциальным путем решения проблемы бесплодия, однако, сопряженным с риском для суррогатной матери и плода. К рискам, связанным с суррогатным материнством, относятся многоплодная беременность, преждевременные роды, рождение детей с низкой массой тела. К материнским осложнениям, связанным с суррогатной беременностью, относят развитие гипертонических нарушений во время беременности, гестационного сахарного диабета и послеродовых кровотечений [190].

### **Заключение**

Несмотря на развитие ВРТ, появление новых подходов к терапии, представленные выше методы, не имеют значительного эффекта у части пациенток, а некоторые являются неприемлемыми для них, что обуславливает необходимость поиска эффективных и безопасных подходов в лечении женщин с бесплодием и рефрактерным «тонким» эндометрием. Следует отметить, что, несмотря на многочисленные исследования, посвященные поиску новых способов увеличения эффективности программ ВРТ путем повышения рецептивности «тонкого» эндометрия, данная проблема остается спорной и нерешенной. Отсутствие универсального, точного и доступного маркера рецептивности эндометрия, сочетание множества факторов, влияющих на успешность взаимодействия эмбриона и эндометрия в период «окна имплантации», делают сложным анализ и выявление истинных причин репродуктивных неудач. Безусловно, в этих условиях проведение новых исследований по поиску эффективных методов терапии становится важной задачей в восстановлении репродуктивной функции пациенток с «тонким» эндометрием в естественных циклах и в рамках проведения программ ВРТ. С целью повышения эффективности новых методов лечения необходимо определять и учитывать индивидуальный патофизиологический механизм развития процессов, приводящих к недостаточному росту эндометрия, для обеспечения персонифицированного подхода в терапии конкретной пациентки.

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

Исследование проводилось в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Сухих Г.Т.). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия института репродуктивной медицины (руководитель - д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и отделении эстетической гинекологии и реабилитации (руководитель - д.м.н., профессор Аполихина И.А.).

В соответствии с целью исследования и поставленными для ее решения задачами в исследование были включены 115 пациенток репродуктивного возраста, обратившиеся для лечения бесплодия, обусловленного «тонким» эндометрием (толщина эндометрия не более 7 мм в период предполагаемого «окна имплантации»). Проведено проспективное рандомизированное контролируемое исследование. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова.

### **2.1. Материалы исследования**

#### ***Критерии включения:***

1. Возраст пациентки 18-40 лет;
2. Бесплодие, обусловленное «тонким» эндометрием;
3. Толщина эндометрия не более 7 мм в период предполагаемого «окна имплантации»;
4. Наличие не менее 2х витрифицированных бластоцист хорошего качества
5. Регулярный овуляторный менструальный цикл;
6. Нормальный кариотип супругов;
7. Изокоагуляция;
8. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

***Критерии не включения:***

1. Гинекологические заболевания: генитальный эндометриоз III-IV степени, миома матки больших размеров, субмукозная миома матки, аномалии строения внутренних половых органов;
2. Эндокринные причины «тонкого» эндометрия: синдром поликистозных яичников, преждевременная недостаточность яичников;
3. Противопоказания к использованию физических факторов лечения;
4. Выраженная патоспермия у партнера;
5. Уровень гемоглобина менее 100 г/л;
6. Уровень тромбоцитов менее  $150 \times 10^9/\text{л}$ .

***Критерии исключения:***

1. Проведение программ ВРТ с донорским материалом и применение суррогатного материнства;
2. Отказ от участия в исследовании.

Все женщины были разделены на группы путем простой рандомизации (метод конвертов) (Рисунок 1):

**1ю группу** составили 30 женщин, которым в качестве прегравидарной подготовки проводили курс физиотерапии;

**2ю группу** составили 42 пациентки, которым проводили инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа в пролиферативную фазу цикла, предшествующего переносу эмбриона;

**3ю группу** составили 38 пациенток, которым на первом этапе проводили физиотерапию (первый цикл), на втором - инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа в пролиферативную фазу цикла, предшествующего переносу эмбриона в полость матки.

В ходе исследования была сформирована **4я группа** пациенток (n=5), которым проводилось инъекционное введение в эндометрий аутологичной PRP и аутологичных минимально манипулированных клеток эндометрия под контролем гистероскопа в цикле, предшествующем переносу эмбриона в полость матки.

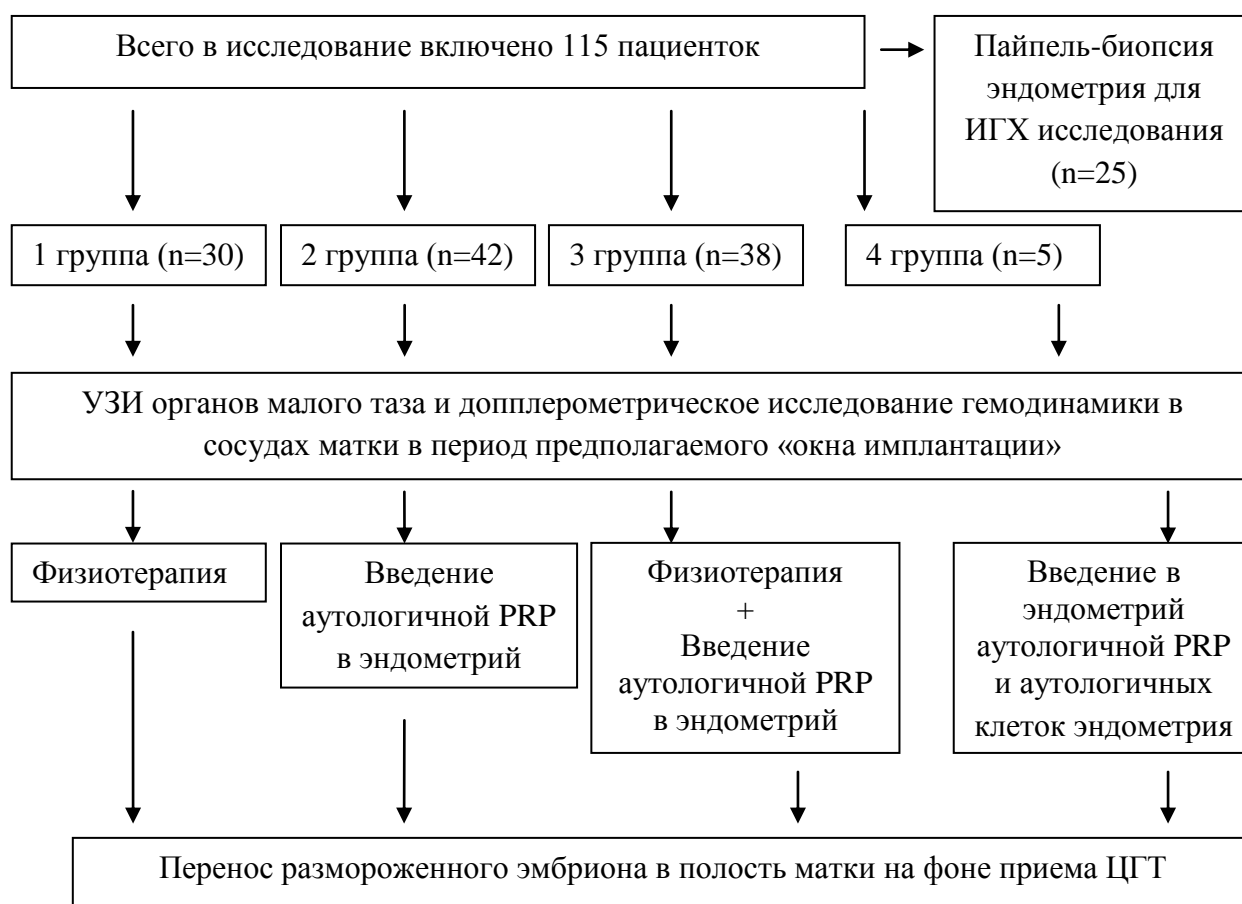


Рисунок 1. Дизайн исследования.

Пациенткам из 1й группы (n=30) проводили курс физиотерапии, который состоял из процедур электроимпульсной терапии на аппарате «BTL-4000 Premium G» с 5-7го дня менструального цикла в течение 10-12 дней. Электроимпульсная терапия проводилась ежедневно, 1 раз в день - программа 1.1 на аппарате «BTL-4000 Premium G». Положение пациентки – лежа на спине, ноги согнуты в коленных и тазобедренных суставах и разведены. Плоский электрод размерами 120 x 80 мм располагали горизонтально в надлобковой области на 0,5-1,0 см выше проекции лобковой кости. Надев презерватив на полостной гинекологический аппликатор, накручивали стерильный



металлический электрод и плавно вводили в задний свод влагалища на глубину 6-7 см до появления сопротивления тканей дальнейшему продвижению. Полярность – положительная, реверсивная с прерываниями. Режим: постоянный ток. Комбинированный импульс. Интенсивность до ощущения выраженной, но безболезненной вибрации под плоским электродом. Продолжительность воздействия 20 минут.

Пациенткам из 2 группы (n=42) в пролиферативную фазу цикла (на 6-9 день), предшествующего ПЭ в полость матки, проводили инъекционное введение 35-40 мл аутологичной PRP в наиболее гипотрофичные участки эндометрия с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопа.

Пациенткам из 3 группы (n=38) подготовку эндометрия к проведению криопротокола проводили в два этапа. На первом проводили курс физиотерапии, аналогично описанному для пациенток из 1й группы. В следующем менструальном цикле в пролиферативную фазу цикла (на 6-9 день) проводили инъекционное введение 35-40 мл аутологичной PRP в наиболее гипотрофичные участки эндометрия с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопа.

Пациенткам из 4 группы в пролиферативную фазу цикла (на 6-9 день), предшествующего ПЭ в полость матки, проводили инъекционное введение в эндометрий аутологичной PRP и минимально манипулированных клеток эндометрия с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопа.

Всем пациенткам, включенным в исследование, на период проводимой терапии рекомендовали механическую контрацепцию. Учитывая эффект последействия физиотерапии, в течение следующего за ней менструального цикла контрацепцию не отменяли. Всем пациенткам до и после проведенного лечения (учитывая период последействия физиотерапии у пациенток 1 и 3 групп) проводили оценку состояния эндометрия с помощью УЗИ органов малого таза и оценку гемодинамики маточных сосудов в период предполагаемого «окна имплантации». Контрольное УЗИ для пациенток 1 и 3 групп проводили через 1 менструальный цикл после проведения физиотерапии.

Пациенткам из 4й группы проводили УЗИ органов малого таза с оценкой состояния полости матки и эндометрия в цикле введения аутологичной PRP и аутологичных клеток эндометрия в середину лютеиновой фазы. Контрольное УЗИ с оценкой гемодинамики маточных сосудов было выполнено в период предполагаемого «окна имплантации» в следующем менструальном цикле в программе криопереноса.

В цикле, предшествующем проведению лечебного воздействия, в период предполагаемого «окна имплантации» (на 5-6 день после овуляции, которая устанавливалась при ультразвуковом контроле и определении пика ЛГ с помощью мочевых тестов) 25 пациенткам была выполнена аспирационная пайпель-биопсия эндометрия для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования образцов эндометрия.

После проведенного лечения пациентки вступали в криопротокол для последующего переноса размороженного эмбриона в полость матки (ПЭ).

## **2.2 Методы исследования**

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" перед вступлением в программу ВРТ. Обследование включало обязательные общеклинические и специальные методы исследования. Все методы обследования в рамках проводимого исследования, за исключением УЗИ органов малого таза и доплерометрии маточных сосудов, проводились однократно.

### **2.2.1 Общеклинические методы исследования**

На первичной консультации проводили детальный сбор анамнестических данных и жалоб у пациенток, который включал возраст, семейное положение, наличие профессиональных вредностей, «вредных привычек». В ходе беседы

обращали внимание на аллергическую предрасположенность, наследственность, перенесенные детские болезни, инфекционные и соматические заболевания, оперативные вмешательства. Полученные данные вносили в индивидуальную карту пациента. В ходе общего осмотра измеряли рост, массу тела пациентки, рассчитывали ИМТ, измеряли артериальное давление и пульс, оценивали тип телосложения. Проводили осмотр и пальпацию молочных желез.

Изучали акушерско-гинекологический анамнез: оценивали характер менструального цикла, его становление (возраст менархе, регулярность и продолжительность цикла, объем, характер и продолжительность менструальных выделений, наличие болезненности, «мажущих» выделений до и после менструации). Изучали возраст начала половой жизни, использование контрацепции (отмечали длительное применение оральных контрацептивов и внутриматочных средств контрацепции в анамнезе), наличие инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) в анамнезе. Подробно оценивали репродуктивный анамнез пациенток: количество беременностей, наступивших естественным путем и с помощью ВРТ, аборт, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся, внематочных беременностей, своевременных и преждевременных родов, физиологических и оперативных родов, наличие осложнений во время беременностей и родов. Выясняли данные о причинах и длительности бесплодия, проведенных диагностических и лечебных мероприятиях. Особое внимание уделяли данным о перенесенных гинекологических заболеваниях, объеме и количестве перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе, наличии осложнений, течении послеоперационного периода и результатам гистологического исследования. Уточняли наличие программ ВРТ в анамнезе, дату проведения, протокол овариальной стимуляции, число полученных ооцитов и эмбрионов, их качество и исход программ ВРТ. При гинекологическом исследовании проводили осмотр наружных половых органов, осмотр влагалища и шейки матки в зеркалах. При бимануальном

исследовании органов малого таза определяли положение, размеры, форму и консистенцию тела матки, ее подвижность, наличие болезненности при пальпации, наличие образований в области придатков матки, спаечного процесса в малом тазу.

### 2.2.2 Специальные методы исследования

*Гормональное исследование* осуществляли в раннюю пролиферативную фазу (2-3 день менструального цикла) с целью оценки функционального состояния эндокринной системы пациенток. Гормональный статус оценивали путем определения концентрации ЛГ, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), E2, пролактина (ПРЛ), тиреотропного гормона (ТТГ), свободной фракции тироксина (Т4св), тестостерона (Т), антимюллерова гормона (АМГ) в крови пациенток. Нормативные показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1

#### Нормативные значения концентрации гормонов в крови у женщин репродуктивного возраста

Гормон	Нормативные значения, единицы измерения
ЛГ	2,3- 15,0 МЕ/л
ФСГ	2,0-10,0 МЕ/л
E2	150-480 пмоль/л
ПРЛ	100-500 мМЕ/л
ТТГ	1,0-3,8 МЕ/л
Т4св	9,0-20 нмоль/л
Тестостерон	1,0-2,5 нмоль/л
АМГ	1,0-2,5 нг/мл

Проводили *исследование клинического анализа крови* с оценкой уровня гемоглобина, цветового показателя, количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, лейкоцитарной формулы для определения наличия противопоказаний к забору крови с целью приготовления аутологичной PRP.

*Исследование системы гемостаза* осуществляли путем оценки концентрации следующих параметров: фибриноген, протромбиновый индекс

(ПТИ), тромбиновое время (ТВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международное нормализованное отношение (МНО) и активность антитромбина III (АТ III) для определения наличия противопоказаний к забору крови с целью заготовки аутологичной PRP.

### **Ультразвуковое исследование органов малого таза**

УЗИ органов малого таза выполнялось в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель - профессор А.И. Гус, ответственный исполнитель – к.м.н. Белоусов Д. М.). Первичное УЗИ проводили в цикле, предшествующем включению в исследование. Оценка ультразвуковых параметров проводилась в I фазу менструального цикла (на 5-8-й день) и в период предполагаемого «окна имплантации» (через 5-7 дней после овуляции). Оценивали размер и структуру тела матки, наличие признаков аденомиоза, толщину и структуру эндометрия, размеры и объем яичников, число антральных фолликулов в обоих яичниках, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза. Овуляция подтверждалась при помощи тестов, чувствительных к пику лютеинизирующего гормона (ЛГ) в моче и во время УЗИ. Особое внимание обращали на состояние эндометрия: срединного маточного эхо (М-эхо), оценивали его толщину, эхогенность, структуру, наличие включений. К нормальным характеристикам М-эха относили однородную структуру, отсутствие гипо- или гиперэхогенных включений, соответствие структуры дню менструального цикла, толщину М-эха в период предполагаемого «окна имплантации» не менее 7 мм. Далее УЗ-мониторинг проводили через 1 месяц после физиотерапии с учетом последствий пациенткам из 1й и 3й групп. Контрольное УЗИ пациенткам из 2й и 4й групп проводили в следующем менструальном цикле после проведенного вмешательства. УЗ-мониторинг проводили при вступлении пациенток в криопротокол, начиная с 4-5 дня менструального цикла для оценки динамики роста эндометрия и своевременной коррекции дозы назначаемых эстрогенов, а также с целью определения даты ПЭ в полость матки при достижении оптимальных значений М-эха. В случае

положительного результата  $\beta$ -ХГ УЗИ органов малого таза выполняли на 21 день после ПЭ в полость матки с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Следующее УЗИ органов малого таза проводили через 5-6 недель после ПЭ в полость матки для определения сердцебиения эмбриона.

УЗИ органов малого таза проводили с использованием ультразвукового сканера экспертного класса Toshiba-Canon Aplio 500 (Япония). Использовали полостной монокристалльный датчик высокой плотности для оценки толщины и структурности эндометрия и доплерометрического исследования гемодинамики маточных сосудов.

### **Допплерометрическое исследование**

Эходопплерометрическое исследование выполняли в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель – профессор А.И. Гус, ответственный исполнитель – к.м.н. Белоусов Д. М.).

Оценку гемодинамики в маточных сосудах проводили в середине второй фазы менструального цикла в период предполагаемого «окна имплантации» до и после проводимого лечения. Допплерометрическое исследование включало в себя цветное доплеровское картирование (ЦДК в режиме SMI) и спектральную доплерометрию.

При доплерометрическом исследовании оценивали степень и симметричность васкуляризации миометрия, визуализацию всех ветвей маточного сосудистого дерева (маточных, аркуатных, радиальных, базальных, спиральных артерий) с оценкой систолической и диастолической составляющих кровотока в исследуемых сосудах; оценивали величину углонезависимых индексов кривых скоростей кровотока: пульсационного индекса (PI), индекса резистентности (RI), систоло-диастолического соотношения (S/D), Ps – максимальную систолическую скорость, Ed - конечную диастолическую скорость. Углонезависимые индексы рассчитывали автоматически по установленным формулам. В качестве нормативных применяли показатели доплерометрии маточных сосудов в середине

лютеиновой фазы менструального цикла у фертильных женщин репродуктивного возраста по данным Д. М. Белоусова (2007), представленные в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

**Показатели ЦДК и доплерометрии сосудов матки, принятые в качестве нормативных**

Сосуд	Параметры			
	Визуализация (%)	Пульсационный индекс	Индекс резистентности	Систолю-диастолическое отношение
Маточные артерии	100%	2,31±0,80	0,83±0,01	7,48±0,50
Аркуатные артерии	100	1,40±0,06	0,64±0,01	3,37±0,13
Радиальные артерии	100%	0,95±0,02	0,59±0,01	2,45±0,05
Базальные артерии	100%	0,71±0,04	0,48±0,02	1,98±0,07
Спиральные артерии	71,4%	0,48±0,04	0,38±0,03	1,75±0,12

Таблица 3

**Скоростные показатели в маточных артериях, принятые в качестве нормативных**

Сосуд	Параметр	
	Ps (м/сек)	Ed (м/сек)
Правая маточная артерия	0,36±0,02	0,09±0,01
Левая маточная артерия	0,39±0,02	0,1±0,01

**Аспирационная биопсия эндометрия**

Пайпель-биопсию эндометрия проводили с помощью аспирационных кюреток Pipelle de Cornier (Франция) в период предполагаемого «окна имплантации» (через 5-7 дней после овуляции на 18-23-й день менструального цикла) цикла, предшествующего началу терапии для проведения гистологического и ИГХ исследований образцов эндометрия. Овуляцию в данном цикле подтверждали при помощи УЗИ и тестов, чувствительных к пику ЛГ в моче.

### **Гистологическое исследование**

Гистологическое исследование эндометрия проводили в 1м патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением - д.м.н. Асатулова А.В., ответственный исполнитель Зайцев Н.В.).

После фиксации образцов эндометрия в 10% нейтральном формалине, материал заливали в парафиновые блоки. Далее готовили серийные срезы ткани толщиной 4-5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивали микроскопическую картину образцов эндометрия (состояние стромы и железистого аппарата, соответствие эндометрия фазе менструального цикла, развитие сосудов стромы эндометрия). Исследование гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа при увеличении от x50 до x400.

### **Иммуногистохимическое исследование**

Иммуногистохимическое исследование эндометрия проводили в 1м патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением - д.м.н. Асатулова А.В., ответственный исполнитель Зайцев Н.В.) по общепринятой методике на серийных парафиновых срезах эндометрия.

Для ИГХ исследования использовали наборы моноклональных антител к эстрогеновым рецепторам- $\alpha$  (CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Antibody) и прогестероновым рецепторам (CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal (IgG)). Протокол окрашивания состоял из депарафинизации, демаскировки антигена, экспозиции первичного антигена при температуре 36° С в течение 16 минут, контрастного окрашивания (Hematoxylin II) в течение 4 минут и последующего контрастного окрашивания (Bluing) в течение 4 минут. Проявление реакции осуществляли при помощи системы визуализации «Ventana BenchMark Ultra». Препараты готовили по стандартному протоколу с использованием иммуногистостейнера «Ventana BenchMark Ultra».



Экспрессию LIF (поликлональные, США, клон bs1058R, 1:100), определяли на мембранах клеток поверхностного эпителия желез эндометрия путем подсчета количества окрашенных клеток в поле зрения при увеличении  $\times 400$ . Экспрессию рецепторов к эстрогенам и прогестеронам, LIF оценивали по 3-балльной шкале (слабая, средняя и выраженная), учитывали количество окрашенных клеток и интенсивность окраски в поверхностном эпителии, железах и строме эндометрия. Для анализа результатов ИГХ реакций использовали метод гистологического счета H-score по формуле:  $HS=1a+2b+3c$ , где  $a$  – % слабо окрашенных клеток,  $b$  – % умеренно окрашенных клеток,  $c$  – % сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах. Степень выраженности экспрессии рецепторов половых стероидов оценивали следующим образом: 0-10 % – отсутствие экспрессии, 11-100 % – слабая экспрессия, 101-200 % – умеренная экспрессия, 201-300 % – выраженная экспрессия.

### **2.2.3 Технология приготовления аутологичной PRP**

Перед сдачей крови для приготовления аутологичной PRP пациентки с результатами анализов крови на RW, ВИЧ, гепатиты В и С, группу крови и резус-фактор, клинический и биохимический анализ крови, гемостазиограмму были проконсультированы трансфузиологом. При отсутствии противопоказаний пациентки допускались к сдаче крови. В пролиферативную фазу менструального цикла (на 5-7 день) пациенткам из 2, 3 и 4 групп проводили забор цельной крови в количестве 10% от объема циркулирующей крови (ОЦК) в отделе трансфузиологии и экстракорпоральной гемокоррекции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель – д.м.н., проф. Федорова Т.А.) для заготовки аутологичной PRP.

После маркировки контейнеров для забора крови фамилией, именем, отчеством аутодонора, датой, группой крови и Rh-принадлежностью, приступали к забору крови в заранее подготовленный полимерный контейнер

«Гемакон 500/300». Необходимый объем крови в среднем составлял около 350-400 мл. По окончании забора крови, систему для внутривенного вливания, предварительно заполненную физиологическим раствором, подсоединяли к игле, находящейся в вене донора, снимали жгут с плеча донора и начинали капельное переливание изотонического раствора хлорида натрия. Полимерный контейнер с кровью помещали в центрифужный стакан, уравнивали. Центрифугирование крови производили при следующем режиме: время - 8 мин, центробежное ускорение в режиме 1971g, температура +22 С°. После окончания центрифугирования контейнер с кровью осторожно, не нарушая границы между эритроцитами и плазмой, переносили в плазмоэкстрактор. Снимали зажим с соединительной трубки между большим и малым контейнерами и плазма, обогащенная тромбоцитами, поступала в малый контейнер. После полного перевода богатой тромбоцитами плазмы в малый контейнер оба контейнера разделяли и герметизировали. Контейнер с эритроцитами, в который вводили перед реинфузией 50 мл изотонического раствора хлорида натрия, после проверки маркировки и сверки устно с аутодонором его фамилии, имени, отчества и группы, присоединяли к системе для внутривенных вливаний, и происходила реинфузия аутоэритроцитов донору. Контейнер с богатой тромбоцитами плазмой опускали в центрифужный стакан, уравнивали и подвергали повторному центрифугированию (с целью концентрирования клеточного состава). Режим центрифугирования: время - 10 мин, центробежное ускорение - 5130g, температура - +22 С°. После окончания центрифугирования контейнер с осевшими на дно тромбоцитами и обедненной тромбоцитами плазмой переносили в плазмоэкстрактор, к нему подсоединяли "Компопласт-300", плазма поступала в третий полимерный контейнер. Когда над слоем тромбоцитов остается 60-70 мл плазмы, необходимой для дальнейшего ресуспендирования тромбоцитов, на соединительную трубку накладывали зажим и контейнер с тромбоцитами извлекали из экстрактора. Контейнеры разделяли и герметизировали, контейнер с тромбоцитами оставляли в течение 1 часа на поверхности при комнатной

температуре (за это время происходит дезагрегация тромбоцитов). При соблюдении описанной методики из 350-400 мл цельной крови в результате двухэтапного центрифугирования получали в среднем 35-45 мл аутологичной PRP (тромбоцитарного концентрата) с содержанием  $0,6-0,7 \times 10^{11}$  тромбоцитов.

Таким образом, приготовление аутологичной PRP включает следующие этапы: 1) забор крови в объеме 350-400 мл в строненный полимерный контейнер «Гемакон 500/300» с антикоагулянтом CPDA -63 ml; 2) центрифугирование контейнера с кровью в рефрижераторной центрифуге «Вестман» в течение 8 минут в режиме 1971g при температуре +22 С°; 3) реинфузия аутоэритроцитов пациентке; 4) повторное центрифугирование второго контейнера с плазмой и тромбоцитами в течение 10 минут с центробежным ускорением 5130g при температуре +22 С°; 5) с помощью плазмоэкстрактора в третий контейнер удалялся верхний слой – это нативная плазма, а нижний слой – сконцентрированные тромбоциты, взвешенные в плазме, перемещались в климатическую камеру на тромбомиксер для перемешивания тромбоцитов LmB Technologie GmbH (производство Германия), где они могут храниться в течение 5 суток при температуре +22-24 С°. Контейнер маркируется и выдается по требованию в день проведения процедуры.

#### **2.2.4 Определение содержания факторов роста VEGF и PDGF BB в PRP**

Для анализа уровня относительной экспрессии белков PDGF BB и VEGF в пробах плазмы и PRP был использован метод Вестерн-блот анализ с детекцией хемилюминисценции. Пробы плазмы и PRP были разведены в 10 раз и смешаны с буфером для нанесения образцов. Разделение белков проводилось методом электрофореза по Лэммли в 10-12,5% полиакриламидном геле. Электрофорез проводили при напряженности поля 80V в концентрирующем геле и 180V в разделяющем геле с дальнейшим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США) (0,35 А, 1 час). Для блокировки сайтов неспецифического связывания антител проводили инкубацию мембраны

в 5% блокировочном буфере на основе обезжиренного молока и трис-солевого буфера, в течение 1 часа при комнатной температуре. Окрашивание белок-специфичными антителами (PDGF BB: ab9704; VEGF: ab46154) проводили в течение 18 часов при +4° С, со вторичными антителами – в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембрану проявляли ECL-субстратом (Invitrogen, США) с детекцией сигнала в документирующей станции ChemiDoc (Biorad, США). Анализ интенсивности сигнала хемилюминесценции проводился в программном обеспечении ImageLab (Biorad, США). Относительную продукцию белков PDGF BB и VEGF определяли, нормируя сигналы хемилюминесценции на концентрацию общего белка в пробе. Содержание белка в пробах определяли, измеряя его концентрацию методом Бредфорд, с помощью спектрофотометра Biorad SmartSpec Plus (Biorad, США). Для этого в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (от 0,2 до 2 мг белка в пробе): по результатам измерений стандартного раствора белка строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности при 595 нм от содержания белка в пробе, по которой определяли концентрацию исследуемого образца.

### **2.2.5 Проточная цитофлуориметрия тромбоцитов PRP**

Иммунофенотипический анализ тромбоцитов PRP проводили методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Образцы PRP разводили фосфатно-солевым буфером в 10 раз и окрашивали антителами против CD61 (557291 BD, США), CD63 (353011, Biolegend, США) и P-селектина (304910, Biolegend, США) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем пробе добавляли 400 мкл фосфатно-солевого буфера и анализировали на цитофлуориметре.

### **2.2.6 Технология инъекционного введения аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа**

После приготовления аутологичной PRP на следующий день (6-9 день менструального цикла) пациенток (из 2, 3 и 4 групп) госпитализировали в дневной стационар ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». Все пациентки подписывали информированные согласия на госпитализацию, медицинское вмешательство и добровольное участие в исследовании. Введение аутологичной PRP в стенки полости матки осуществлялось в операционной в асептических условиях под контролем гистероскопа (Sopro-Comeg, Франция). В качестве среды для расширения полости матки использовали изотонический раствор хлорида натрия. Для инстилляций жидкости с целью регуляции скорости потока и давления использовали аппарат HAMOU ENDOMAT, «Karl Storz». Во время гистероскопии оценивали размер и форму полости матки, наличие деформаций. Особое внимание обращали на состояние эндометрия: оценивали окраску, толщину, наличие складчатости, полиповидных образований, внутриматочных синехий, эндометриоидных ходов. Пациенткам в условиях операционной под внутривенной анестезией проводилось инъекционное введение 35-40 мл аутологичной PRP в наиболее атрофичные участки эндометрия с помощью эндоскопической иглы «МИТ» (производство Россия) диаметром 0,6/1,16 мм на контролируемую глубину 2-3 мм под контролем гистероскопа (Рисунок 2). Длительность вмешательства составляла в среднем 15 минут. За одну процедуру производилось в среднем 6-8 вколов с введением аутологичной PRP в наиболее измененные участки эндометриальной ткани. Помимо инъекционного введения в эндометрий проводили орошение полости матки 2-3 мл аутологичной PRP. После операции наблюдение за пациенткой проводилось в течение 4 часов в палате дневного стационара. При удовлетворительном состоянии пациентку выписывали домой в тот же день с рекомендациями об использовании барьерной контрацепции в течение данного менструального цикла.



Рисунок 2. Гистероскопическая картина введения аутологичной PRP эндоскопической иглой в эндометрий пациентки на контролируемую глубину.

### **2.2.7 Выделение аутологичной культуры клеток эндометрия**

Пациенткам из 4й группы (n=5) для получения аутологичных клеток производили аспирационную биопсию эндометрия с помощью урогенитального зонда типа С (внутриматочный пайпель) в фазе пролиферации (6-8 день менструального цикла) в день госпитализации. Полученный материал помещали в 15 мл пробирку с транспортной средой (F12 с добавлением пенициллина-стрептомицина до 1%) и транспортировали в лабораторию регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» при температуре +4С°. В лаборатории полученный материал отмывали от крови в растворе Хэнкса и измельчали. Все работы проводили в асептических условиях. Далее готовили диссоциирующий раствор: смесь коллагеназ I и IV типов по 500 мкг/мл на среде DMEM. На 1 образец ткани достаточно 2 мл раствора. Материал переносили в диссоциирующий раствор, пробирку с материалом помещали на находящийся внутри СО2-инкубатора орбитальный шейкер (режим 75 обор/мин) и инкубировали 40-60 минут при 37°С. Диссоциацию ткани контролировали визуально. Материал отмывали от ферментов в растворе Хэнкса и осаждали с помощью центрифугирования. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в растворе Хэнкса и пропускали через сеточку для клеток с размером ячейки 40 мкм. Стромальные клетки, прошедшие сквозь

сеточку, и кластеры эпителиальных клеток, не прошедшие через нее, разделяли. Подсчитывали общее количество выделенных стромальных клеток и кластеров эпителиальных клеток. Культивирование не проводили. Процесс занимал 40-45 минут от момента доставки аспирата в лабораторию регенеративной медицины.

### **2.2.8 Фенотипический анализ клеток биопсии эндометрия**

Пациенткам из 4й группы в пролиферативную фазу менструального цикла (6-9 день менструального цикла), предшествовавшего проводимой терапии, проводили аспирационную пайпель-биопсию эндометрия после подписания информированных согласий на медицинское вмешательство и участие в исследовании. Полученный материал помещали в 15 мл пробирку с транспортной средой (F12 с добавлением пенициллина-стрептомицина до 1%) и транспортировали в лабораторию регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» при температуре +4С°.

В условиях лаборатории полученные фрагменты ткани промывали в физиологическом растворе, далее переносили в чашку Петри с 5 мл 0,05% трипсина. Проводили измельчение ткани ножницами и иглой шприца (G21). Затем ферментативную дезагрегацию ткани инактивировали равным объемом Wash buffer (2% FBS/RPMI). После этого проводили центрифугирование в режиме 500 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли, добавляли 5 мл Wash Buffer и проводили фильтрование через 100 мкм сетку. Затем повторно центрифугировали в режиме 500 g в течение 10 мин и удаляли супернатант. Далее клетки ресуспендировали в 200 мкл фосфотно-солевого буфера. Добавляли 800 мкл буфера для лизиса эритроцитов. Инкубировали на льду в течение 10 мин и центрифугировали при 500 g в течение 10 минут. После проводили подсчет клеток. На одну пробу для FACS-анализа брали 100 тыс. клеток.

Иммунофенотипический анализ клеток, полученных из биопсии эндометрия, проводили по общепринятой методике. Для выявления внутриклеточных маркеров (анти-Vimentin: MA1-19656; анти-Ki-67 130-100-

290) клетки были зафиксированы и пермеабелизированы с использованием набора Inside Stain (Miltenyi Biotec, США) в соответствии с протоколом производителя. Для окрашивания поверхностных маркеров  $10^5$  клеток ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера и инкубировали с антителами (анти-CD45: A07785; анти-EpCAM: MA1-10197; анти-CD146: 130-092-851; анти-CD90: 130-117-388) в течение 10 мин на льду. Не связавшиеся антитела отмывали центрифугированием при 500 g в течение 10 минут, затем клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера и анализировали на цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). На основании параметров прямого и бокового рассеяния основная популяция клеток была помещена в область интереса, исключаящую клеточный дебрис. В каждом измерении было проанализировано 10 тыс. клеток.

Для микроскопического метода исследования на одну пробу брали 100 тыс. клеток, полученных из биопсии эндометрия и предварительно фиксированных в 2% параформальдегиде. Для иммуноцитохимического анализа клетки помещали на покровные стекла (Fisher Scientific, США) и промывали фосфатно-солевым буфером. Сайты неспецифического связывания блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином в течение 30 минут. Покровные стекла инкубировали с антителами к EpCAM (sc-66020, Santa-Cruz) и vimentin (ab8978) при 4° C в течение 24 часов. После инкубации покровные стекла промывали PBS, а затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорисцеин изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE) в темноте при комнатной температуре в течение 1ч и впоследствии промывали PBS. Для окрашивания ядер покровные стекла инкубировали с DAPI (0,004 мг/мл) при 37 ° C в течение 10 мин. Затем покровные стекла промывали PBS и наносили Aqua-Poly Mount (Polysciences, США). Фотографии были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия) с программным обеспечением LAS AF v.3.1.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия).



### **2.2.9 Технология инъекционного введения аутологичной PRP и клеток эндометрия под контролем гистероскопа**

Пациенткам из 4й группы (n=5) выделенный материал аутологичных минимально манипулированных клеток добавляли к полученной аутологичной PRP пациентки в стерильных условиях в лаборатории регенеративной медицины. Далее производили транспортировку готового состава в операционную. Введение в эндометрий осуществляли аналогично описанному выше инъекционному введению аутологичной PRP под контролем гистероскопа. После проведенного вмешательства при удовлетворительном состоянии пациентку выписывали в тот же день с рекомендациями об использовании барьерной контрацепции в течение данного менструального цикла. В середину второй фазы данного менструального цикла пациенткам проводили УЗИ. В следующем менструальном цикле пациентки вступали в программу криопереноса размороженного эмбриона в полость матки и проходили контрольное ультразвуковое и доплерометрическое исследование с оценкой толщины эндометрия и показателей гемодинамики маточных сосудов.

### **2.2.10 Криопротокол и ведение посттрансферного периода**

Криопротокол 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. Максимальная доза эстрадиола валерата составила 12 мг/сут. При достижении оптимальных значений толщины эндометрия производили перенос одного размороженного эмбриона хорошего качества на стадии бластоцисты в полость матки. Перенос эмбриона в полость матки выполняли под ультразвуковым контролем на 6-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона.

Ведение посттрансферного периода осуществляли согласно принятым в клинической практике протоколам путем назначения 600 мг в сутки

микронизированного прогестерона вагинально до получения результатов уровня  $\beta$ -хорионического гонадотропина в сыворотке крови.

Наступление биохимической беременности устанавливали при повышении значения уровня  $\beta$ -ХГ более 20 МЕ/л в сыворотке крови через 14 дней, а клинической – при визуализации плодного яйца в полости матки во время УЗИ через 3 недели после ПЭ в полость матки.

### 2.3 Статистический анализ полученных данных

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью таблиц «Microsoft Excel», пакета программ Statistica 10 (США) и языка R 3.6.2. Количественные признаки представляли как среднее и стандартное отклонение, порядковые – как медиану и интерквартильный размах, качественные и бинарные – как абсолютные значения и проценты. Сравнение количественных и порядковых признаков между группами проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса, для бинарных и качественных - с помощью точного критерия Фишера. При обнаружении значимых отклонений от нулевой гипотезы об отсутствии различий поиск различий проводили с помощью множественных сравнений: критерием Даннета для количественных и порядковых признаков и точного критерия Фишера с поправкой Хольма.

Изменение количественных признаков после лечения выявляли с помощью парного критерия Вилкоксона, а для качественных – критерия МакНемара с биномиальным тестом. При этом изменение толщины эндометрия рассматривали как количественный признак, так как оно принимало только неотрицательные значения. Для расчета эффективности лечения рассчитывали 95% биномиальный доверительный интервал Клоппера-Пирсона для доли пациенток, у которых показатель пришел в норму.

Связь между количественными признаками выявляли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для изучения зависимости

вероятности наступления беременности от толщины эндометрия использовали ROC-анализ с подсчетом AUC (площади под ROC-кривой). Пороговое значение толщины эндометрия выявляли по максимальной сумме чувствительности и специфичности. Различия между величинами считали статистически значимыми при уровне достоверности  $p < 0,05$ .

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Клинико-анамнестическая характеристика пациенток с «тонким» эндометрием

В ходе исследования была проанализирована эффективность разных видов лечения пациенток с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия. Эффективность оценивали по динамике клинической картины, показателей УЗИ, доплерометрического исследования, а также репродуктивных исходов.

Всем пациенткам, включенным в исследование, было проведено клинико-лабораторное обследование в амбулаторных условиях. Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил  $34,9 \pm 4,0$  лет. В основном пациентки имели нормальный ИМТ, среднее значение его составило  $22,4 \pm 3,4$  кг/м<sup>2</sup>. Возраст и ИМТ пациенток в исследуемых группах значимо не различались (Таблица 4).

Таблица 4

#### Данные о возрасте и антропометрических показателях пациенток

Показатели	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Возраст женщин, лет	$33,9 \pm 3,7$	$35,1 \pm 4,2$	$35,4 \pm 4,1$	0,2911
ИМТ женщин, кг/м <sup>2</sup>	$21,5 \pm 2,3$	$22,9 \pm 3,9$	$22,4 \pm 3,5$	0,2158

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

Согласно полученным данным у пациенток, включенных в исследование, не было выявлено статистически значимых различий в менархе, длительности цикла и продолжительности менструации. С сопоставимой частотой пациентки указывали на наличие скудных менструальных выделений (63%, 69% и 63% в группах 1, 2 и 3 соответственно). Особенности менструальной функции пациенток представлены в таблице 5.

Таблица 5

#### Характеристика менструальной функции

Показатели	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Менархе*	13,0 (12,25;13,75)	13,0 (12,0;13,75)	13,0 (13,0;13,0)	0,8
Длительность цикла, дней*	28,0 (28,0;28,8)	28,0 (28,0;28,0)	28,0 (28,0;28,0)	0,5

Гипоменорея**	19 (63%)	29 (69%)	24 (63%)	0,8
---------------	----------	----------	----------	-----

\*Данные представлены как медиана и первый и третий квартили, критерий Краскелла-Уоллиса

\*\*Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Исследуемые группы пациенток были сопоставимы при оценке гормонального статуса и не отличались значимо по уровню гормонов в крови. Исходя из полученных данных, среднее значение уровня ФСГ у пациенток составило  $7,7 \pm 1,8$  МЕ/л, ЛГ –  $5,9 \pm 2,9$  МЕ/л, АМГ –  $2,3 \pm 1,7$  нг/мл, Е2 –  $177,7 \pm 92,4$  пмоль/л, ТТГ –  $1,8 \pm 0,9$  МЕ/л, Т4св –  $12,3 \pm 3,8$  пмоль/л, Т –  $1,03 \pm 0,7$  нмоль/л. Уровень пролактина у всех пациенток был в пределах нормальных значений.

У пациенток, включенных в исследование, была выявлена невысокая частота экстрагенитальных заболеваний. Заболевания дыхательных путей были представлены хроническим тонзиллитом, заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) - хроническим гастритом и холециститом, а также синдромом раздраженного кишечника, заболевания мочевыделительной системы - хроническим циститом и мочекаменной болезнью, эндокринные заболевания – аутоиммунным гипотиреозом. Согласно представленным данным, среди пациенток были наиболее распространены заболевания эндокринной системы. У всех пациенток соматические заболевания на момент вступления в исследование были в состоянии стойкой ремиссии или компенсации. Структура и частота соматической заболеваемости у пациенток представлена в таблице 6.

Таблица 6

**Структура и частота экстрагенитальных заболеваний у пациенток**

Заболевания	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Заболевания дыхательных путей	3 (10%)	5 (12%)	1 (8%)	0,29
Заболевания ЖКТ	4 (13%)	7 (16%)	3 (18,4%)	0,57
Заболевания мочевыделительной системы	4 (13%)	4 (9,5%)	5 (13%)	0,81
Эндокринные заболевания	7 (23%)	8 (19%)	14 (36%)	0,21
Заболевания нервной системы	2 (6,6%)	3 (7%)	3 (8%)	1

Заболевания зрительной системы	5 (16%)	4 (9,5%)	6 (16%)	0,64
--------------------------------	---------	----------	---------	------

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Структура гинекологической заболеваемости пациенток была представлена наличием аденомиоза 1-2 стадии и наружного генитального эндометриоза (НГЭ), интрамуральной миомой матки малых размеров, полипами эндометрия в анамнезе и перенесенным хламидиозом в анамнезе. Обращает внимание высокая распространенность полипов эндометрия и гистологически подтвержденного хронического эндометрита у пациенток во всех группах. По частоте и структуре перенесенных гинекологических заболеваний пациентки были сопоставимы в группах (Таблица 7).

Таблица 7

#### Структура и частота гинекологических заболеваний у пациенток

Заболевание	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Аденомиоз	12 (40%)	10 (24%)	18 (47%)	0,081
Наружный генитальный эндометриоз	9 (30%)	6 (14%)	10 (26%)	0,2
Миома матки	6 (20%)	8 (19%)	10 (26%)	0,7
ИППП в анамнезе	6 (20%)	9 (21%)	9 (24%)	>0,9
Полип эндометрия в анамнезе	19 (63%)	26 (62%)	16 (42%)	0,12
Хронический эндометрит	21 (71%)	36 (87%)	34 (89%)	0,08

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Необходимо отметить, что большинство пациенток указывали на скудные менструальные выделения, связывая изменение их характера с проведением внутриматочных оперативных вмешательств в анамнезе. Согласно представленным данным, наиболее частыми оперативными вмешательствами в исследуемой популяции пациенток были: гистероскопии с РДВ стенок полости матки и цервикального канала, внутриматочные вмешательства с целью удаления полипа эндометрия и диагностические лапароскопии. Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по частоте встречаемости вышеуказанных операций. Неоднородными исследуемые группы пациенток были по частоте проведенных выскабливаний полости матки после

неразвивающихся беременностей. В контрольной группе данное вмешательство проводилось значимо реже ( $p=0,013$ ). Структура и частота диагностических и лечебных оперативных вмешательств представлена в таблице 8.

Таблица 8

**Структура и частота оперативных вмешательств у пациенток**

Операция	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Диагностическая гистероскопия, РДВ	27 (90%)	32 (76%)	28 (74%)	0,2
Гистероскопия, удаление полипа эндометрия	19 (63%)	26 (62%)	16 (42%)	0,12
Выскабливание полости матки после НБ	9 (30%)	22 (52%)	24 (63%)	0,013
Повторное выскабливание полости матки по поводу плацентарного полипа	4 (13%)	10 (24%)	11 (29%)	0,3
Гистерорезектоскопия, разделение внутриматочных синехий	4 (13%)	11 (26%)	11 (29%)	0,3
Миомэктомия лапароскопическим доступом	1 (3,3%)	5 (12%)	6 (16%)	0,3
Диагностическая лапароскопия	13 (43%)	19 (45%)	14 (37%)	0,7
Операции на яичниках лапароскопическим доступом	6 (20%)	8 (19%)	6 (16%)	0,9

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по частоте в анамнезе родов, внематочных беременностей и абортов. Статистически значимые различия при оценке акушерского анамнеза были выявлены в частоте НБ среди пациенток. Так, в контрольной группе (n=30) НБ встречались у 33% пациенток, во второй группе (n=42) у 55% и в третьей (n=38) – у 63% соответственно ( $p=0,045$ ). Кроме того, обращает внимание низкий паритет у всех пациенток, включенных в исследование. Исходы и частота предыдущих беременностей представлены в таблице 9.

Таблица 9

**Характеристика репродуктивной функции пациенток**

Событие	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Роды	7 (23%)	6 (14%)	9 (24%)	0,5
Кесарево сечение	3 (10%)	3 (7,1%)	5 (13%)	0,7
Неразвивающаяся беременность	10 (33%)	23 (55%)	24 (63%)	0,045
Внематочная беременность	1 (3,3%)	6 (14%)	7 (18%)	0,2
Аборт	3 (10%)	12 (29%)	7 (18%)	0,14

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Всем пациенткам, включенным в исследование, ранее проводили лечение бесплодия, в том числе с применением ЭКО. При этом у подавляющего большинства пациенток в анамнезе были выявлены неудачи имплантации после ЭКО и отмены циклов криопереноса эмбриона в полость матки в связи с недостаточным ростом эндометрия. Длительность бесплодия во всех группах была сопоставима и составила в среднем  $4,7 \pm 3,2$  лет. Статистически значимо исследуемые группы пациенток различались по структуре бесплодия. Так, половина пациенток в 1й группе имела вторичное бесплодие, во 2й и 3й группах данный показатель составил 79% ( $p=0,013$ ), что также связано с более высокой частотой внутриматочных вмешательств в данных группах (Таблица 10).

Таблица 10

#### Данные о применении программ ВРТ и длительности бесплодия

Характеристика бесплодия	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Первичное бесплодие*	15 (50%)	9 (21%)	8 (21%)	0,013
Вторичное бесплодие*	15 (50%)	33 (79%)	30 (79%)	0,013
Длительность бесплодия, лет**	4,5 (3; 7)	4 (3; 6)	3 (2; 6,75)	0,3
Циклы ЭКО в анамнезе*	26 (87%)	30 (71%)	34 (89%)	0,081
Неудачи имплантации после ЭКО и отмены ПЭ*	25 (83%)	31 (74%)	34 (89%)	0,4
Число отмен криопереносов эмбриона**	1,5 (1; 2,75)	1,5 (0,25; 3)	2 (1; 3)	0,5

\*Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

\*\*Данные представлены как медиана и первый и третий квартили, критерий Краскелла-Уоллиса



Все пациентки, включенные в исследование, ранее получали терапию, направленную на увеличение толщины эндометрия перед проведением программ ВРТ без значимого эффекта. Важно отметить, что помимо традиционной гормональной терапии пациентки получали и дополнительные новые методы, например, внутриматочные инфузии G-CSF и аутологичной PRP в объеме 0,5-1 мл (Таблица 11), однако, без значимого эффекта.

Таблица 11

### Виды ранее проводимого лечения «тонкого» эндометрия

Вид терапии	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
Физиотерапия	26 (87%)	40 (95%)	31 (82%)	0,14
Гирудотерапия, применение силденафила цитрата	26 (87%)	38 (90%)	30 (79%)	0,4
Внутриматочные инфузии G-CSF, аутологичной PRP	20 (66,6%)	32 (76,2%)	27 (71%)	0,66

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

### 3.2 Динамика клинических симптомов у пациенток с «тонким» эндометрием

Всем пациенткам, включенным в исследование, было проведено лечение, направленное на подготовку эндометрия к проведению программ ВРТ. После проведения терапии было выполнено контрольное обследование и оценка изучаемых параметров. Длительность менструального цикла не менялась на фоне проводимой терапии по сравнению с исходной. С сопоставимой частотой пациентки указывали на наличие скудных менструальных выделений (63%, 69% и 63% в группах 1, 2 и 3 соответственно). У всех пациенток отмечалось укорочение дней менструальных выделений. Более того, практически все пациентки могли точно назвать временной период, когда начались изменения в характере менструаций и чаще всего связывали их с проведением внутриматочных оперативных вмешательств. Динамика характеристик

менструальной функции пациенток в процессе лечения по группам представлена в таблице 12.

На фоне лечения во всех группах отмечалось статистически значимое снижение частоты встречаемости скудных менструаций у пациенток. Наиболее выраженная положительная динамика была отмечена у пациенток во 2й (с 69% до 14,3%) и 3й (с 63% до 10,5%) группах ( $p=3 \times 10^{-7}$  и  $p=2 \times 10^{-6}$  соответственно).

Таблица 12

### Характеристика менструальной функции пациенток в динамике

Показатели	Группа 1 (n=30)		Группа 2 (n=42)		Группа 3 (n=38)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Длительность менструации, дней*	3,5±0,45	4,1±0,37	2,9±0,4	3,8±0,37	3,3±0,3	4,1±0,3
Гипоменорея**	19 (63%)	7 (23,3%)	29 (69%)	6 (14,3%)	24 (63%)	4 (10,5%)

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

\*\*Данные представлены как абсолютные числа и %

Во всех группах пациентки отмечали субъективное улучшение качества менструации, увеличение объема теряемой крови и увеличение дней менструации. Таким образом, независимо от вида терапии, во всех группах отмечалась статистически значимое снижение частоты встречаемости гипоменореи, а также увеличение количества дней менструации у пациенток с «тонким эндометрием».

### 3.3 Данные ультразвукового исследования

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилось 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±1,2 мм, во 2й группе (n=42) 5,3±1,5 мм, в 3й (n=38) – 5,4±1,4 мм.

По результатам контрольного УЗИ было выявлено, что во всех группах толщина эндометрия увеличилась статистически значимо по сравнению с

исходными значениями, независимо от вида проводимой терапии ( $p < 0,00001$ ). При этом толщина эндометрия в 1й группе после проведения физиотерапии составила в среднем  $7,4 \pm 1,2$  мм (95% доверительный интервал (ДИ) для прироста 1,26-1,74). Толщина эндометрия при проведении контрольного УЗИ у пациенток 2й группы после проведения им инъекционного введения аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа составила в среднем  $7,4 \pm 1,8$  мм (95% ДИ для прироста 1,61-2,39). В третьей группе пациенток после проведения двухэтапной терапии толщина эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» в среднем составила  $7,9 \pm 1,6$  мм (95% ДИ для прироста 2,06-2,94). Динамика толщины эндометрия на фоне проводимой терапии представлена в таблице 13.

Таблица 13

### Динамика толщины эндометрия на фоне терапии

Группа	Исходная толщина эндометрия, мм	Толщина эндометрия после терапии, мм	Прирост толщины эндометрия, мм
1я (n=30)	$5,9 \pm 1,2$	$7,4 \pm 1,2$	$1,5 \pm 0,6$ (0-3)
2я (n=42)	$5,3 \pm 1,5$	$7,4 \pm 1,8$	$2 \pm 1,2$ (0-4)
3я (n=38)	$5,4 \pm 1,4$	$7,9 \pm 1,6$	$2,5 \pm 1,3$ (0-6)

Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (мин-макс)

Исходя из полученных данных, была отмечена более выраженная динамика толщины эндометрия после проведенного лечения у пациенток 2й и 3й групп по сравнению с 1й группой. При этом, различия в приросте эндометрия после терапии между 1й и 3й группами были статистически значимыми ( $p = 0,003$ ) (Рисунок 3).

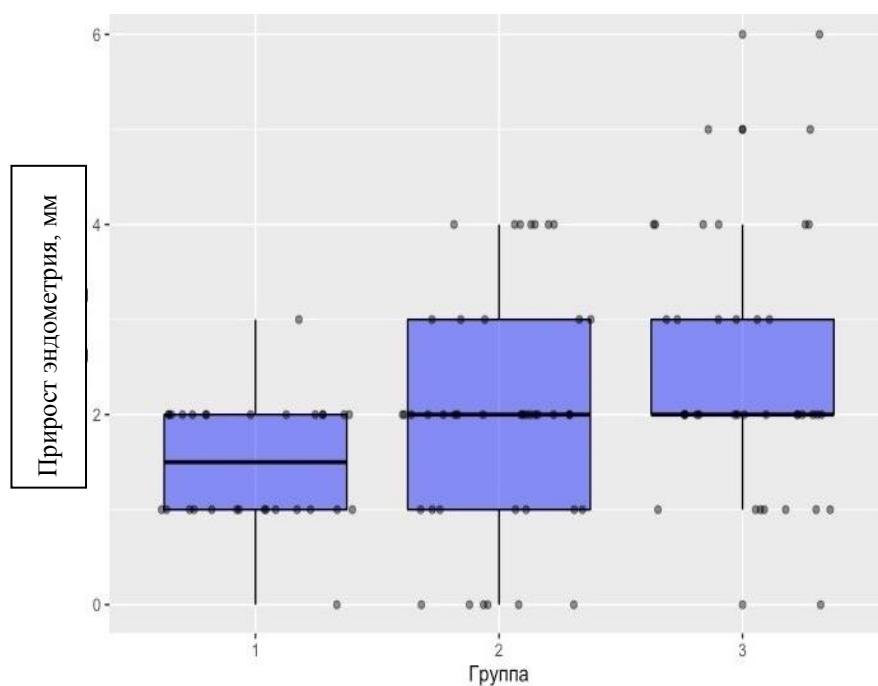


Рисунок 3. Прирост толщины эндометрия на фоне лечения в трех группах. Статистически значимые различия получены между 1й и 3й группами ( $p=0,003$ ). Тест Краскела-Уоллиса.

### 3.4 Данные цветового доплеровского картирования и спектральной доплерометрии

Всем пациенткам настоящего исследования было выполнено доплерометрическое исследование для оценки показателей гемодинамики в сосудах матки в период предполагаемого «окна имплантации» до и после лечения. Во время исходного доплерометрического исследования аркуатные артерии визуализировались у всех пациенток на момент включения в исследование, также при контрольной оценке. Среди всех пациенток отсутствие визуализации радиальных артерий во время исходного ЦДК было отмечено у одной пациентки из 2й группы, после же проведения лечения была отмечена положительная динамика с визуализацией кровотока в сосудах.

На этапе включения в исследование было отмечено снижение частоты визуализации концевых маточных артерий во всех группах по сравнению с показателями у здоровых женщин. Частота визуализации базальных артерий в 1й группе пациенток была на 23,4% ниже, чем у фертильных женщин, что статистически значимо ( $p=0,03$ ), во 2й группе – на 12% ( $p=0,15$ ) и в 3й – на

15,8% ( $p=0,07$ ). После проведения лечения у всех женщин было отмечено увеличение частоты визуализации базальных артерий по сравнению с исходными показателями, при этом в 1й и 3й группе частота визуализации достигла 100% и имела статистически значимые различия по сравнению с показателями до лечения (Таблица 14).

Таблица 14

**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)

Спиральные артерии у женщин с «тонким» эндометрием визуализировались на 14,8% реже в 1й группе ( $p=0,3808$ ), на 28,6% реже – во второй ( $p=0,0373$ ) и на 29,3% - в 3й ( $p=0,055$ ) по сравнению с показателями у здоровых женщин. При проведении контрольного доплерометрического исследования было выявлено статистически значимое увеличение частоты визуализации спиральных артерий по сравнению с исходными значениями во 2й и 3й группах ( $p=0,0002$  и  $p=0,0005$  соответственно). В 1й группе динамика частоты визуализации спиральных артерий не была статистически значимой (Таблица 15).

Таблица 15

**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)

Далее была проанализирована динамика параметров кровотока в сосудах матки на всех уровнях у пациенток с «тонким» эндометрием. Согласно полученным результатам, были выявлены изменения параметров гемодинамики у пациенток с «тонким» эндометрием по сравнению с нормативными значениями.

У всех пациенток, включенных в исследование, скоростные характеристики кровотока в правой и левой маточных артериях были статистически значимо снижены по данным исходного доплерометрического исследования по сравнению с нормативными показателями, полученными у фертильных женщин. По данным контрольной оценки было отмечено увеличение максимальной систолической скорости ( $P_s$ ) в маточных артериях во всех группах, независимо от проводимой терапии. Наиболее выраженная динамика была отмечена в динамике максимальной систолической скорости левой маточной артерии в 3й группе пациенток после двухэтапного лечения ( $p < 0,05$ ). Для конечной диастолической скорости ( $E_d$ ) не было получено значимых различий.

Оценка показателей спектральной доплерометрии по сосудам показала, что у пациенток 1й группы на фоне проведенного физиолечения было отмечено статистически значимое снижение показателей пульсационного ( $p < 0,01$ ) и индекса резистентности ( $p < 0,05$ ) в правой маточной артерии, для систоло-диастолического отношения не было отмечено различий. У пациенток из 2й группы была отмечена положительная динамика для всех индексов, наиболее значительная динамика до и после введения аутологичной PRP была для показателей  $PI$  и  $RI$  ( $p < 0,001$ ). У пациенток 3й группы были выявлены статистически значимые различия до и после лечения для всех показателей уголнезависимых индексов, наиболее значимая динамика была для показателей  $RI$  и  $S/D$  ( $p < 0,001$ ). При этом снижение  $RI$  в правой маточной артерии было статистически значимым по сравнению с динамикой  $RI$  в 1й группе ( $p < 0,05$ ). Динамика показателей доплерометрии для правой маточной артерии до и после лечения представлена в таблице 16.

Таблица 16

**Динамика показателей доплерометрии в правой маточной артерии**

Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	2,38±0,52	2,21±0,7**	0,83±0,05	0,81±0,06*	6,5±2,2	6,3±2,5
2я (n=42)	2,14±0,59	1,98±0,57***	0,78±0,06	0,76±0,05***	5,3±1,8	4,6±1,2**
3я (n=38)	2,17±0,49	1,95±0,67**	0,79±0,1	0,74±0,09***	5,7±1,9	4,6±1,2***

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, парный критерий Вилкоксона  
\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателями до лечения

При анализе влияния различных видов лечения на параметры гемодинамики в левой маточной артерии было выявлено, что физиотерапия привела к статистически значимому снижению только пульсационного индекса, при этом показатели RI и S/D не различались до и после терапии в 1й группе пациенток. Введение аутологичной PRP привело к статистически значимому снижению показателей всех индексов у пациенток 2й группы по сравнению с исходными. В 3й группе пациенток на фоне комплексной терапии была отмечена наиболее выраженное снижение показателей, при этом динамика всех индексов была статистически значима (p<0,001). Кроме того снижение S/D было статистически значимым по сравнению с аналогичным параметром в 1й группе (p<0,05) при изолированном применении физиотерапии (Таблица 17).

Таблица 17

**Динамика показателей доплерометрии в левой маточной артерии**

Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	2,2±0,67	2,11±0,7***	0,82±0,08	0,8±0,08	7,3±5,1	7,1±5,2
2я (n=42)	2,3±0,5	2,12±0,45**	0,8±0,05	0,76±0,04***	5,7±1,9	5±1,3**
3я (n=38)	2,13±0,45	1,9±0,46***	0,8±0,04	0,76±0,04***	5,3±1,1	4,4±0,9***

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, парный критерий Вилкоксона  
\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателями до лечения

Динамика показателей кровотока в аркуатных артериях матки в период предполагаемого «окна имплантации» на фоне лечения представлена в таблице 18. В 1й группе пациенток на фоне проводимой терапии было выявлено

статистически значимое снижение только показателя RI ( $p<0,01$ ), для PI и S/D значимых различий не было выявлено. Для 2й группы пациенток было отмечено статистически значимое снижение значений PI и S/D по сравнению с исходными ( $p<0,01$ ), а динамика показателей RI была наиболее выражена ( $p<0,001$ ). В 3й группе пациенток на фоне комплексной терапии было отмечено статистически значимое снижение показателей RI ( $p<0,01$ ) и S/D ( $p<0,05$ ) по сравнению с исходными. После проведенной терапии у всех пациенток показатели гемодинамики соответствовали принятым нормативным значениям.

Таблица 18

**Динамика показателей доплерометрии в аркуатных артериях**

Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	0,92±0,3	0,86±0,28	0,55±0,11	0,52±0,11**	2,4±0,86	2,28±0,8
2я (n=42)	1,03±0,39	0,88±0,35**	0,57±0,12	0,51±0,11***	2,48±0,78	2,25±0,75**
3я (n=38)	0,93±0,3	0,88±0,32	0,56±0,12	0,52±0,1**	2,42±0,91	2,1±0,5*

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, парный критерий Вилкоксона  
\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  по сравнению с показателями до лечения

Параметры гемодинамики в радиальных артериях матки на фоне различных видов лечения представлены в таблице 19. В радиальных артериях у пациенток в нашем исследовании были значительно повышены PI и S/D до лечения по сравнению с нормативными значениями. На фоне физиотерапии в 1й группе произошло статистически значимое снижение только RI ( $p<0,05$ ), PI и S/D остались без изменений. Во 2й группе пациенток было выявлено выраженное статистически значимое снижение показателей всех изучаемых индексов по сравнению с исходными значениями ( $p<0,001$ ). В 3й группе пациенток на фоне комплексной терапии было также отмечено статистически значимое снижение всех индексов по сравнению с исходными данными, а снижение показателя RI было , статистически значимым по сравнению с динамикой его в 1й группе ( $p<0,05$ ).

Таблица 19

**Динамика показателей доплерометрии в радиальных артериях**



Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	1,14±0,49	1,06±0,53	0,58±0,12	0,55±0,14*	2,7±1,1	2,71±1,2
2я (n=42)	1,02±0,36	0,76±0,22***	0,57±0,12	0,46±0,07***	2,62±1,1	1,93±0,41***
3я (n=38)	1±0,41	0,75±0,19***	0,56±0,11	0,46±0,08**	2,58±1,2	1,89±0,27***

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, парный критерий Вилкоксона  
\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателями до лечения

У пациенток в нашем исследовании исходные показатели углозависимых индексов в базальных артериях превышали значения, принятые за норму. На фоне проводимого лечения во всех группах отмечалось статистически значимое снижение PI, RI и S/D по сравнению с исходными значениями (p<0,01). Однако, уровни значимости были различными в группах. Динамика показателей кровотока в базальных артериях матки в период предполагаемого «окна имплантации» на фоне лечения представлена в таблице 20.

Таблица 20

#### Динамика показателей доплерометрии в базальных артериях

Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	0,78 (0,69;1,14)	0,74** (0,59; 0,98)	0,48 (0,44; 0,8)	0,45** (0,4; 0,49)	1,94 (1,74;2,2)	1,83** (1,67; 1,96)
2я (n=42)	0,67 (0,59;0,94)	0,61*** (0,58; 0,69)	0,46 (0,41; 0,53)	0,43*** (0,39; 0,47)	1,83 (1,68; 2)	1,75*** (1,62; 1,88)
3я (n=38)	0,71 (0,62; 0,84)	0,61** (0,6; 0,72)	0,46 (0,43;0,53)	0,44*** (0,4; 0,45)	1,87 (1,75; 2,13)	1,79*** (1,72; 1,89)

Данные представлены как медиана и первый и третий квартили, парный критерий Вилкоксона  
\* p<0,05 ;\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателями до лечения

Согласно вышеописанным данным в нашем исследовании частота визуализации спиральных артерий у пациенток была ниже, чем у фертильных женщин. В 1й группе визуализировались на 14,8% реже (p=0,3808), во второй - на 28,6% реже (p=0,0373) и в 3й - на 29,3% (p=0,055) по сравнению с показателями, принятыми за норму. У пациенток с визуализируемыми

спиральными артериями значения углозависимых индексов превышали значения, принятые за нормативные. Проведенная физиотерапия в 1й группе пациенток не привела к значимой динамике показателей кровотока в спиральных артериях матки. В 2й группе пациенток введение аутологичной PRP привело к статистически значимому снижению PI, RI и S/D ( $p < 0,001$ ), а также появлению визуализации сосудов после лечения. При сравнении значений PI, RI и S/D после комплексной терапии в 3й группе пациенток были получены статистически значимые различия для всех индексов по сравнению с исходными ( $p < 0,01$ ). Динамика показателей кровотока в спиральных артериях матки в период предполагаемого «окна имплантации» на фоне лечения представлена в таблице 21.

Таблица 21

**Динамика показателей доплерометрии в спиральных артериях**

Группа	PI		RI		S/D	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1я (n=30)	0,79 (0,54; нет виз)	0,57 (0,49; нет виз)	0,49 (0,38; нет виз)	0,42 (0,38; нет виз)	1,96 (1,73; нет виз)	1,81 (1,60; нет виз)
2я (n=42)	нет виз (0,60; нет виз)	0,60*** (0,48; нет виз)	нет виз (0,40; нет виз)	0,43*** (0,35; нет виз)	нет виз (1,66; нет виз)	1,73*** (1,57; нет виз)
3я (n=38)	нет виз (0,65; нет виз)	0,61** (0,46; нет виз)	нет виз (0,43; нет виз)	0,41** (0,35; нет виз)	нет виз (1,78; нет виз)	1,72** (1,50; нет виз)

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с показателями до лечения, парный критерий Вилкоксона  
«Нет виз» – отсутствие визуализации сосуда при исследовании (считалось как максимальное (бесконечное) сопротивление кровотоку)

При оценке влияния различных методов терапии на нормализацию параметров гемодинамики в матке было выявлено, что наиболее выраженная положительная динамика отмечалась при проведении комплексной терапии в 3й группе пациенток ( $p = 0,00003$ ) (Таблица 22).

Таблица 22

**Частота встречаемости показателей гемодинамики в пределах нормальных значений на фоне лечения**

Группа	До лечения	После лечения	p-value
--------	------------	---------------	---------

1я (n=30)	11 (37%)	17 (57%)	0,0312
2я (n=42)	29 (69%)	37 (88%)	0,0078
3я (n=38)	19 (50%)	35 (92%)	0,00003

Данные представлены как абсолютные числа и %, биномиальный тест

С целью выявления связи между различными диагностическими критериями был проведен корреляционный анализ между показателями толщины эндометрия и параметрами гемодинамики в сосудах матки у пациенток с «тонким» эндометрием. Согласно полученным результатам, была выявлена значимая корреляционная связь между толщиной эндометрия и показателями уголнезависимых индексов на уровне концевых артерий матки. Так, показана обратная зависимость между значениями М-эхо и PI (коэффициент корреляции  $-0,5$ ;  $p < 0,05$ ), между толщиной эндометрия и значениями RI (коэффициент корреляции  $-0,52$ ;  $p < 0,05$ ), а также между значениями М-эхо и показателями S/D (коэффициент корреляции  $-0,53$ ;  $p < 0,05$ ), в спиральных артериях матки. Кроме того была 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 коэффициент корреляции составил  $-0,22$  ( $p < 0,05$ ), а для S/D  $-0,22$  ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также была обнаружена зависимость между толщиной эндометрия и значениями RI на уровне радиальных артерий и левой маточной артерии (коэффициент корреляции  $-0,24$  и  $-0,23$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно.

### **3.5 Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования**

Из 115 пациенток 25 пациенткам была выполнена аспирационная пайпель-биопсия эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» цикла, предшествующего проведению терапии. Среди 25 пациенток, которым было выполнено гистологическое и иммуногистохимическое исследование, беременность наступила у 13, у 12 – не наступила. В зависимости от

наступления беременности пациентки были разделены на 2 группы. Группу А (n=13) составили пациентки, у которых беременность наступила, в группу Б (n=12) вошли пациентки, у которых беременность не наступила.

Были проанализированы клиничко-анамнестические данные в указанных группах пациенток. Согласно полученным данным, пациентки статистически значимо различались в группах по возрасту и антропометрическим показателям. В основном пациентки были репродуктивного возраста и имели нормальный ИМТ, однако в группе Б пациентки были значимо более старшего возраста и имели более высокий ИМТ (Таблица 23).

Таблица 23

**Данные о возрасте и антропометрических показателях пациенток групп А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Возраст	31,7 ±3,95	35,8 ±2,82	0,011
ИМТ	21,1 ±1,80	24,4 ±5,66	0,012

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

При анализе гинекологической заболеваемости были выявлены статистически значимые различия в частоте встречаемости полипа эндометрия (p=0,004) и хронического эндометрита (p=0,04) у пациенток в исследуемых группах. При этом по частоте встречаемости аденомиоза, НГЭ и миомы матки указанные группы были сопоставимы (Таблица 24).

Таблица 24

**Данные о гинекологической заболеваемости у пациенток групп А и Б**

Заболевание	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Аденомиоз	2 (15,4%)	4 (33,3%)	0,37
Наружный генитальный эндометриоз	2 (15,4%)	1 (8,3%)	1
Миома матки	0	1 (8,3%)	0,48
Полип эндометрия	2 (15,4%)	9 (75%)	0,004
Хронический эндометрит	5 (38,4%)	10 (83,3%)	0,04

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

При анализе хирургических вмешательств, выполненных пациенткам ранее, было выявлено, что исследуемые группы статистически значимо различались по частоте выполнения хирургических вмешательств с целью удаления полипа эндометрия ( $p=0,004$ ). При этом обращали внимание различия между группами по частоте повторных выскабливаний стенок полости матки по поводу плацентарного полипа после НБ и гистерорезектоскопий с разделением внутриматочных синехий, но они не были статистически значимыми (Таблица 25).

Таблица 25

**Структура и частота оперативных вмешательств у пациенток групп А и Б**

Операции	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Диагностическая гистероскопия с РДВ	8 (61.5%)	9 (75%)	0,64
Гистероскопия, удаление полипа эндометрия	2 (15.4%)	9 (75%)	0,004
Выскабливание полости матки после НБ	8 (61.5%)	7 (58.3%)	1
Повторное выскабливание полости матки по поводу плацентарного полипа	0	3 (25%)	0,09
Гистерорезектоскопия, разделение внутриматочных синехий	1 (7.7%)	4 (33.3%)	0,16
Миомэктомия лапароскопическим доступом	1 (7.7%)	1 (8.3%)	1

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

В основном пациентки обращались с целью терапии вторичного бесплодия. При разделении на группы в зависимости от наступления беременности была выявлена статистически значимая разница в длительности бесплодия ( $p=0,03$ ). При этом отсутствовали значимые различия между исследуемыми подгруппами по частоте родов, НБ, внематочных беременностей и аборт в анамнезе (Таблица 26).

Таблица 26

**Характеристика репродуктивной функции пациенток групп А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Первичное	3 (23%)	1 (8.3%)	

бесплодие*			0,59
Вторичное бесплодие*	10 (77%)	11 (91,7%)	
Длительность бесплодия, лет**	3,62±2,40	5,67±2,64	0,03
Роды*	3 (23%)	2 (16,6%)	1
Неразвивающаяся беременность*	7 (53,8%)	7 (58,3)	1
Внематочная беременность *	1 (7,7%)	4 (33,3%)	0,16
Аборт*	6 (46,1%)	3 (25%)	0,41

\*Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

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

*Данные гистологического исследования эндометрия.* При гистологическом исследовании образцов эндометрий в 18 случаях соответствовал ранней и средней фазе секреции, в 7 случаях – недостаточности фазы секреции. Эндометриальные железы были представлены в небольшом количестве, извитые, разной формы и величины, при этом были описаны очаги фиброза стромы вокруг желез и их атрофия (Рисунок 4). Для пациенток с «тонким» эндометрием было характерно обеднение сосудистого рисунка. В основном сосуды были представлены мелкими спиральными артериями и тонкостенными венулами. У 4х пациенток была описана лимфоидная инфильтрация вокруг сосудов. По данным гистологического исследования не было выявлено значимых различий между исследуемыми группами. Результаты гистологического исследования пациенток по группам представлены в таблице 27.

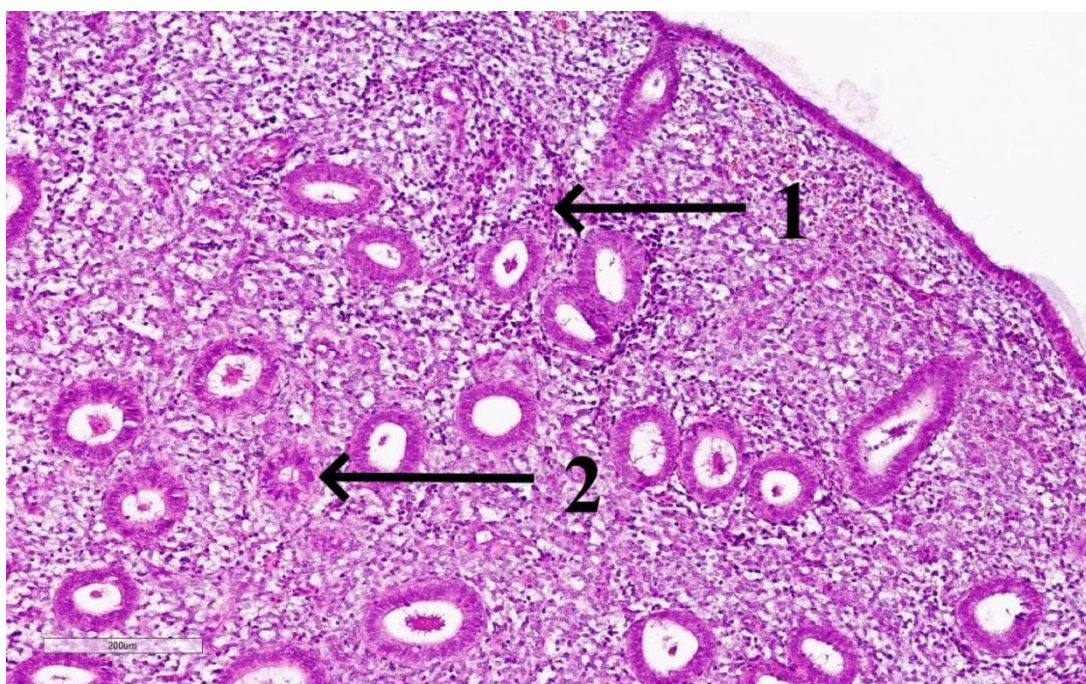


Рисунок 4. Фрагмент эндометрия с признаками фиброза и атрофии. 1 – очаги фиброза стромы вокруг эндометриальных желёз; 2 – атрофия эндометриальной железы. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 10х. Окуляр 10х.

Таблица 27

**Данные гистологического исследования эндометрия пациенток в группах А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Ранняя и средняя фаза секреции	9 (69,3%)	9 (75%)	1
Недостаточность фазы секреции	4 (30,7%)	3 (25%)	

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

*Данные иммуногистохимического исследования рецептивности эндометрия.*

Нами проведена оценка рецептивности эндометрия в указанных группах. Необходимо отметить, что не было выявлено статистически значимых различий в оцениваемых ИГХ параметрах рецептивности эндометрия в зависимости от наступления беременности у пациенток ( $p > 0,05$ ).

*Экспрессия ER-а* отмечалась как в железах, так и в строме эндометрия и находилась в диапазоне от 70% до 300%. Уровень экспрессии ER был выше в железах эндометрия по сравнению с уровнем экспрессии в строме. При

сравнении уровней экспрессии между группами не было выявлено значимых различий (Таблица 28).

Таблица 28

### Экспрессия ER-а у пациенток групп А и Б

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Железы эндометрия (%), (минимум-максимум)	270,6±45,5 (180-300)	268,9±56,0 (150-300)	0,842
Строма эндометрия (%), (минимум-максимум)	253±75,9 (70-300)	267,1±47,8 (180-300)	0,887

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

*Экспрессия PR* также отмечалась в железах и строме эндометрия и находилась в диапазоне от 3% до 300%. При этом минимальный уровень экспрессии был выявлен в железистом эпителии, кроме того, были описаны фрагменты эндометрия с отсутствием экспрессии PR в железах пациенток (Рисунок 5). Статистически значимых различий между уровнем экспрессии PR между группами в зависимости от наступления беременности не было выявлено (Таблица 29).

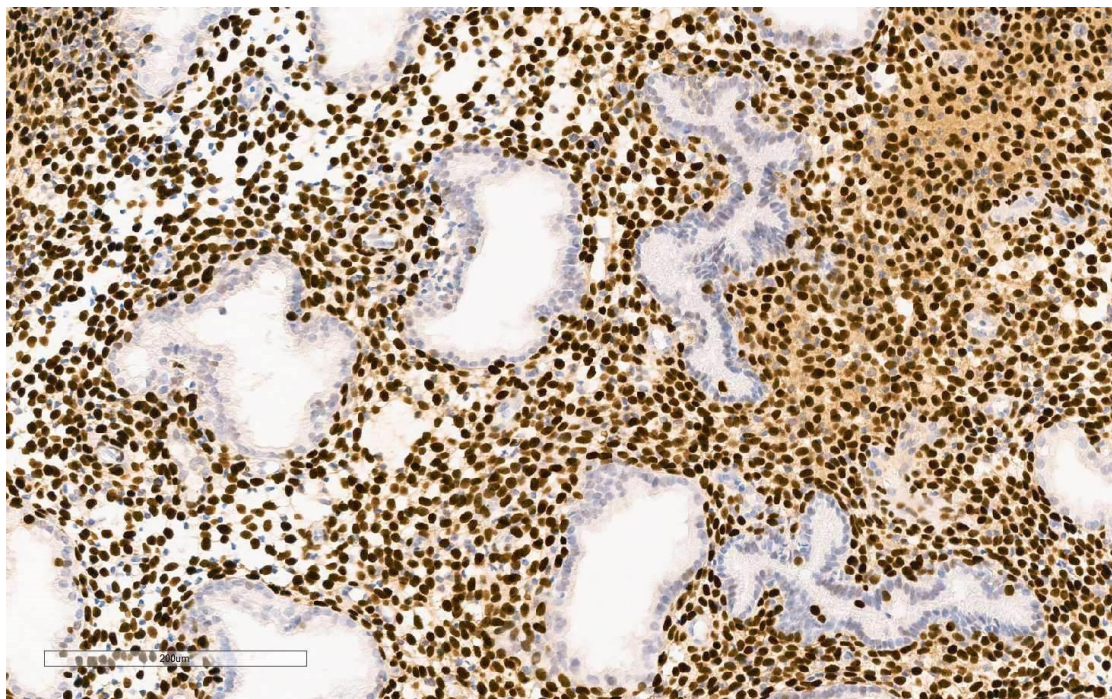


Рисунок 5. Фрагмент эндометрия с отсутствием экспрессии PR в железах. Иммуногистохимическая окраска. Объектив 10х. Окуляр 10х.

Соотношение уровней экспрессии PR/ER в указанных группах было представлено в диапазоне от 0,81 до 4,24 и было выше в строме по сравнению с



железами эндометрия. Не было выявлено статистически значимых различий данных показателей в зависимости от наступления беременности между группами (Таблица 29).

Таблица 29

**Экспрессия PR и соотношение уровней экспрессии PR/ER-а у пациенток групп А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
Железы эндометрия (%), (минимум-максимум)	242,5±96,9 (3-300)	270,4±56,8 (130-300)	0,629
Строма 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

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

*Уровень экспрессии LIF* в клетках эндометрия варьировал от 170% до 300% и не имел значимых различий между исследуемыми группами (Таблица 30).

Таблица 30

**Экспрессия LIF у пациенток групп А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
LIF (%)	265,2±49,3	230,2±86,2	0,318

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

После оценки клинико-лабораторных данных была проведена оценка параметров УЗИ в зависимости от наступления беременности в указанных группах. Исходная толщина эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» на момент включения в исследование не имела значимых различий в указанных группах. При этом было выявлено, что толщина эндометрия после проведенной терапии у пациенток с наступившей беременностью была статистически значимо больше по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила ( $p=0,00003$ ). Также было выявлено, что у пациенток с наступившей беременностью, прирост толщины эндометрия после проведенного лечения был статистически значимо выше по

сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила ( $p=0,0002$ ) (Таблица 31).

Таблица 31

**Динамика толщины эндометрия у пациенток групп А и Б**

Показатели	Группа А (n=13)	Группа Б (n=12)	p-value
М-Эхо до лечения, мм	5,77±1,48	4,92±1,88	0,29
М-эхо после лечения, мм	8,23±1,24	6,33±2,50	0,00003
Прирост толщины эндометрия, мм	2,46±1,27	1,42±1.38	0,0002

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

Таким образом, в указанных группах пациенток факторами, влияющими на наступление беременности, были: возраст, ИМТ, длительность бесплодия, частота выполненных вмешательств по поводу полипов эндометрия в анамнезе, толщина и прирост толщины эндометрия после проведения лечения. При оценке ИГХ параметров рецептивности эндометрия было показано, что уровни экспрессии ER-а, PR, LIF, а также соотношение уровней экспрессии PR/ER-а не имели значимых различий при разделении групп в зависимости от наступления беременности.

### **3.6 Исходы программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием**

После завершения лечения с учетом периода последействия все пациентки в течение следующих 3 месяцев вступали в программы ВРТ с целью переноса размороженных эмбрионов в полость матки. Необходимо отметить, что у части пациенток в связи с отсутствием роста эндометрия после проведенной терапии циклы переноса размороженных эмбрионов были отменены до момента достижения значений М-эхо более 7 мм. Среди пациенток 1й группы у 23,3% (n=7) толщина эндометрия не достигла 7 мм после лечения, во 2й группе данный показатель составил 14,3% (n=6), в 3й – 15,7% (n=6). Частота отмен программ ВРТ после проведенного лечения была выше в 1й группе по сравнению со 2й и 3й, но эти различия не были

статистически значимыми ( $p=0,77$ ). Репродуктивные исходы программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием представлены в таблице 32.

Таблица 32

**Репродуктивные исходы после проведения лечения**

Показатели	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=38)	p-value
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	4 (13,3%)	9 (21,4%)	9 (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.

Исходя из полученных данных, частота наступления клинической беременности и живорождения не имели статистически значимых различий между группами. При этом 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. При анализе показателей живорождения после ПЭ, была отмечена большая частота живорождения у пациенток 2й и 3й групп по сравнению с 1й, кроме того 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 в зависимости от наступления беременности 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. Относительно ИМТ значимых различий в указанных группах выявлено не было (Таблица 33).

Таблица 33

**Данные о возрасте и антропометрических показателях в зависимости от наступления беременности**

Группа	Возраст, лет	p-value	ИМТ	p-value
1А (n=6)	29,7±2,0	0,0006	22±0,9	0,2728

1Б (n=24)	35,0±3,2		21,4±2,6	
2А (n=14)	33±4,7	0,0305	22,3±2,8	0,6828
2Б (n=28)	36,3±3,5		23,3±4,4	
3А (n=12)	33,4±4,6	0,0253	22,9±3,3	0,3274
3Б (n=26)	36,4±3,7		22,2±3,6	

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

При анализе гинекологической заболеваемости были отмечены различия в частоте встречаемости полипа эндометрия во всех группах при сравнении пациенток с наступившей беременностью с теми, у кого беременность не наступила. Частота встречаемости полипа эндометрия в 1А подгруппе составила 16,6% против 75% в 1Б, что статистически значимо ( $p=0,0156$ ), во 2А подгруппе данный показатель составил 35,7% против 75% во 2Б, что также статистически значимо ( $p=0,0201$ ). В 3Б подгруппе частота встречаемости полипов эндометрия также была выше, чем в 3А (50% против 38,4% соответственно), но различия не были статистически значимыми ( $p=0,7249$ ). Статистически значимых различий по частоте встречаемости аденомиоза, НГЭ, миомы матки и хронического эндометрита в зависимости от наступления беременности не было выявлено.

При анализе перенесенных хирургических вмешательств, было выявлено, что в зависимости от наступления беременности исследуемые подгруппы статистически значимо различались по частоте выполнения операций с целью удаления полипа эндометрия, как описано выше. При этом обращали внимание различия между группами в зависимости от наступления беременности по частоте проведения диагностических гистероскопий с РДВ: 66,6% в 1А подгруппе против 96% в 1Б ( $p=0,0936$ ), 64% в 2А против 82% в 2Б ( $p=0,2586$ ) и 69% в 3А против 83% в 3Б ( $p=0,4528$ ), но они не были статистически значимыми.

При оценке репродуктивного анамнеза в указанных подгруппах не было отмечено статистически значимых различий в частоте первичного и вторичного бесплодия, родов, внематочных беременностей и абортов в анамнезе. Однако были выявлены выраженные различия в длительности бесплодия и частоте

неудачных программ ВРТ в анамнезе в зависимости от наступления беременности. Длительность бесплодия у пациенток в 1А подгруппе в среднем составила  $2,8 \pm 1,3$  лет, в 1Б подгруппе  $5,6 \pm 3,3$  лет ( $p=0,06$ ), в 3А подгруппе -  $3,1 \pm 3,7$  лет против  $4,9 \pm 3$  в 3Б ( $p=0,05$ ). Во 2й группе пациентки с наступившей беременностью в среднем имели также меньшую длительность бесплодия, чем те, у кого беременность не наступила, но эти различия не были выраженными. При анализе частоты неудачных программ ВРТ в анамнезе обращала внимание более высокая частота их в анамнезе у пациенток с не наступившей беременностью по сравнению с теми, у кого беременность наступила, при этом для 2й группы эти значения были статистически значимыми (89,3% в 2Б против 42,8% в 2А,  $p=0,0025$ ). Для пациенток из 1й (87,5% в 1Б против 66,6% в 1А,  $p=0,2543$ ) и 3й групп (92,3% в 3Б против 83,3% в 3А,  $p=0,5773$ ) отмечалась аналогичная тенденция, но различия не достигали статистически значимых значений.

При анализе параметров УЗИ в зависимости от наступления беременности было отмечено, что исходная толщина эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» не имела значимых различий в группах 2А и 3А по сравнению с группами 2Б и 3Б соответственно. Однако, в группе 1 исходная толщина эндометрия была значимо выше у пациенток с наступившей беременностью по сравнению с теми, у которых беременность не наступила ( $p=0,04$ ). При анализе данных контрольного УЗИ было отмечено, что в 1й и 3й группах толщина эндометрия 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 второй группе при разделении пациенток в зависимости от наступления беременности была отмечена аналогичная тенденция различий в толщине эндометрия, но они не были статистически значимыми. В дополнение к вышеизложенному было показано, что прирост толщины эндометрия после проведенного лечения у пациенток с наступившей беременностью во всех группах выше по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила, но эти различия не были

статистически значимыми в группах. Динамика толщины эндометрия в зависимости от наступления беременности представлена в таблице 34.

Таблица 34

**Динамика толщины эндометрия в зависимости от наступления беременности**

Показатели	Группа 1А (n=6)	Группа 1Б (n=24)	Группа 2А (n=14)	Группа 2Б (n=28)	Группа 3А (n=12)	Группа 3Б (n=26)
М-Эхо до лечения, мм	6,8±0,4*	5,6±1,2	5,3±1,2	5,3±1,5	5,5±1,6	5,3±1,2
М-эхо после лечения, мм	8,8±0,4*	7±1	7,85±1,5	7,1±1,9	8,75±1,7*	7,5±1,4
Прирост толщины эндометрия, мм	2±0,6	1,3±0,5	2,5±1,2	1,75±1,2	3,1±1,4	2,2±1,2

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, критерий Манна-Уитни, \* p<0,05

При анализе параметров маточной гемодинамики в зависимости от наступления беременности было отмечено, что во всех подгруппах с наступившей беременностью у 100% пациенток показатели соответствовали нормативным значениям. В подгруппах пациенток с не наступившей беременностью также отмечалась положительная динамика по данным ЦДК, однако, она была менее выражена (Таблица 35).

Таблица 35

**Данные гемодинамики в сосудах матки в зависимости от наступления беременности**

Гемодинамика	Группа 1А (n=6)	Группа 1Б (n=24)	Группа 2А (n=14)	Группа 2Б (n=28)	Группа 3А(n=12)	Группа 3Б(n=26)
Нормальные показатели до лечения	2 (33,3%)	9 (37,5%)	10 (64%)	19 (67,8%)	8 (66,6%)	11 (42,3%)
Нормальные показатели после лечения	6 (100%)	11 (45,8%)	14 (100%)	23 (82%)	12 (100%)	23 (88,4%)

Данные представлены как абсолютные числа и %, точный критерий Фишера

Далее был проведен ROC-анализ для определения порогового значения толщины эндометрия, при котором вероятность наступления беременности был выше (Рисунок 6). Проведенный ROC-анализ показал, что 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.

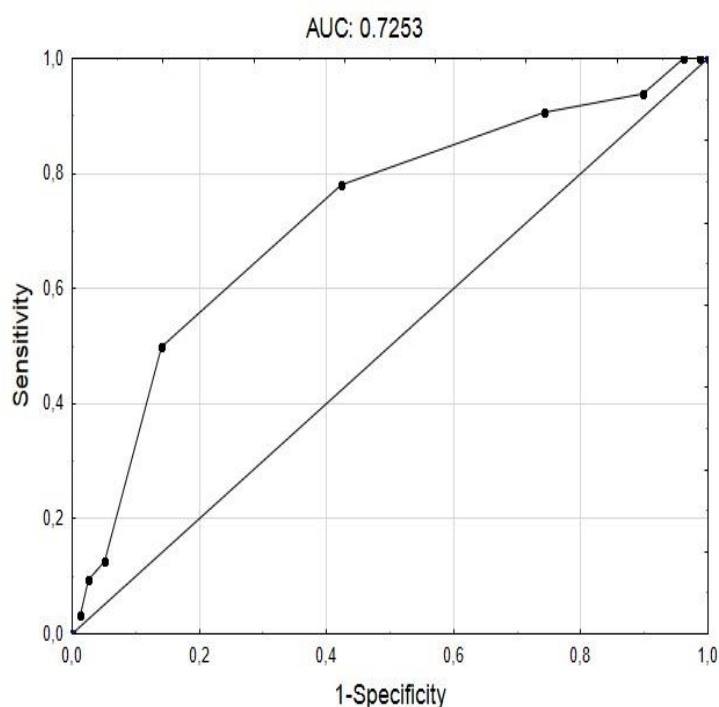


Рисунок 6. ROC-кривая зависимости наступления беременности от толщины эндометрия.

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 после проведения лечения.

### 3.7 Характеристика состава гранул и активации тромбоцитов в PRP

Для характеристики состава полученной от пациенток PRP мы анализировали содержание в пробах белков PDGF BB и VEGF. В качестве образцов сравнения была взята обычная плазма крови тех же пациенток. При проведении вестерн-блот анализа образцов PRP и плазмы было выявлено, что все образцы содержали анализируемые белки (Рисунок 7). Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) – это семейство факторов роста, состоящее из пяти димеров: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC и PDGF-DD. PDGF



относится к одним из главных митогенов для клеток мезенхимального происхождения [191]. PDGF сигналинг участвует в регуляции клеточной пролиферации, ангиогенеза, клеточной миграции, перестройке цитоскелета и индукции синтеза внеклеточного матрикса [192]. Основными источниками PDGF являются тромбоциты, фибробласты, МСК, остеобласты, хондроциты, эндотелиоциты, макрофаги, моноциты, гладкомышечные клетки [193]. Статистический анализ показал, что в образцах PRP по сравнению с плазмой относительный уровень PDGF BB, нормализованный на общий уровень белка, больше в 2,8 раза (Рисунок 7А). Полученные различия между PRP и плазмой были статистически значимыми ( $p = 0,0012$ ). Следствием такого увеличенного содержания белка PDGF BB является более эффективное стимулирование регенерации и ангиогенеза в тканях [192].

При вестерн-блот анализе содержания белка VEGF на мембране в ряде проб детектировано несколько полос (Рисунок 7В). Как известно, белок VEGF представляет собой димер, состоящий из двух мономеров [194]. В связи с этим, можно предположить, что на мембране нижней полосой может являться фракция мономеров VEGF. В данной работе было проанализировано содержание цельной формы белка VEGF, обнаруженной в каждой пробе. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, в частности VEGF-A) является членом большого семейства белков, отнесенным к группам VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D [195]. VEGF-A играет важную роль в ангиогенезе, а именно регулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, проницаемость сосудов. Запускаемый VEGF-A сигналинг также регулирует гомеостаз органов и тканей, способствует их ускоренной репарации при повреждении [196].

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 между PRP и плазмой были статистически значимыми ( $p=0,0343$ ). Основываясь на собственных данных, можно предположить, что эффективность действия PRP обусловлена

стимуляцией ангиогенеза и репарации ткани за счет повышенного содержания в ней PDGF BB и VEGF.

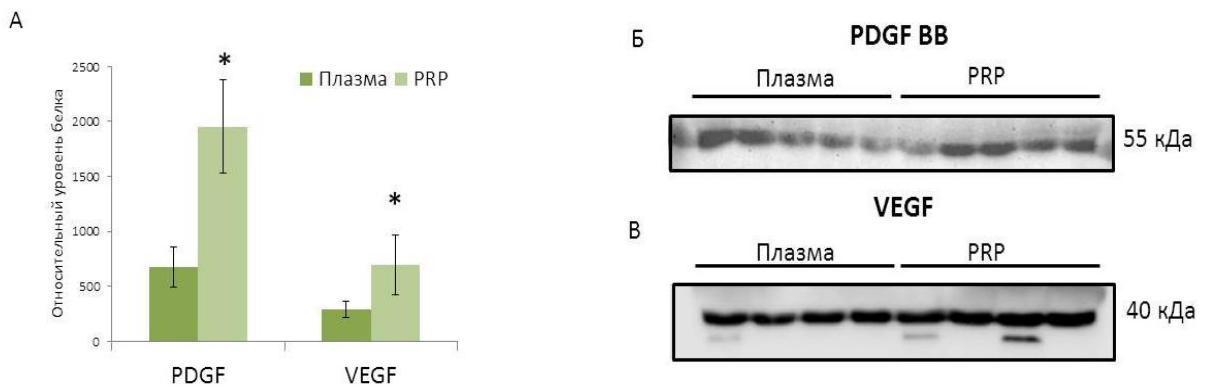


Рисунок 7. Относительный уровень белков PDGF BB и VEGF в плазме и PRP, нормализованный на общий уровень белка (А). Репрезентативные изображения мембран, окрашенных антителами против PDGF BB (Б) и VEGF (В) с нанесенными образцами плазмы и PRP пациенток. \* -  $p < 0,05$  относительно контроля.

Следующим этапом характеристики PRP стал иммунофенотипический анализ образцов методом проточной цитофлуориметрии. Образцы PRP были окрашены антителами против тромбоцитарного маркера CD61 (гликопротеин тромбоцитов Ша), маркеров активации тромбоцитов CD63 (член суперсемейства тетраспанинов) и молекулы клеточной адгезии Р-селектина (Рисунок 8). Окрашивание против маркера CD61 (Рисунок 8Д) позволило правильно гейтировать тромбоциты и в дальнейшем проанализировать сигнал от антител против CD63 и Р-селектина только на клетках, попавших в область интереса (Рисунок 8Д, обозначен овалом). Использование анти-CD61 флуоресцентно меченых антител в настоящее время является золотым стандартом для идентификации тромбоцитов на дот-плот диаграмме. Гликопротеиновый комплекс, в состав которого входит CD61, связывает белки плазмы, такие как фибриноген, фибронектин, фактор фон Виллебранда, витронектин и играет важную роль в агрегации тромбоцитов.

Для характеристики активации тромбоцитов, то есть их дегрануляции, в образцах PRP были выбраны маркеры CD63 и Р-селектин. CD63 был впервые обнаружен как маркер активации тромбоцитов, чей уровень увеличивался на их поверхности после высвобождения гранул.

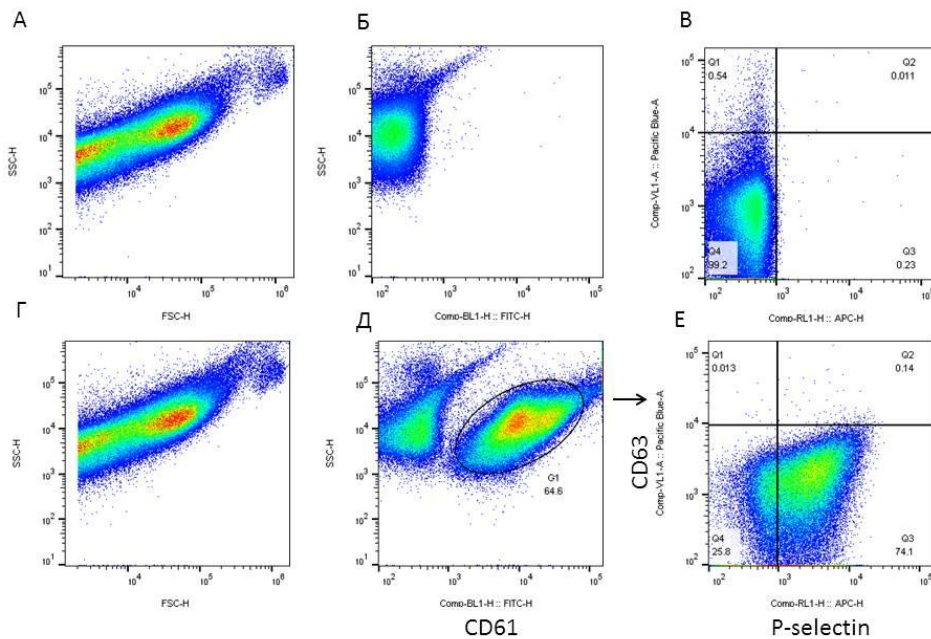


Рисунок 8. Данные проточной цитофлуориметрии. Репрезентативные дот-плот диаграммы прямого и бокового рассеяния образцов PRP (А, Г). Контроль окрашивания (Б, В). Репрезентативные дот-плот диаграммы клеток, окрашенных антителами к CD61 (Д), CD63 и P-selectin (Е). Процент положительно окрашенных клеток в соответствующем квадранте.

По данным проточной цитофлуориметрии было выяснено, что количество тромбоцитов, положительных по CD63, составило менее 1% (Рисунок 8Е, левый верхний квадрант). Это указывает на то, что дегрануляция последних еще не произошла. В то же время было получено, что процент тромбоцитов, окрашенных антителами к Р-селектину, составил в среднем  $56,7 \pm 11,5\%$  (Рисунок 8Е, правый нижний квадрант). После активации тромбоцитов Р-селектин перемещается из внутриклеточных гранул на внешнюю мембрану, в то время как фибриноген, связывая гликопротеин (GP) IIb/IIIa между соседними тромбоцитами, активирует их. Повышение содержания Р-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.

### 3.8 Иммунофенотипический анализ клеток биопсии эндометрия

Иммунофенотипический анализ изолированной культуры клеток биоптата эндометрия был проведен с помощью метода проточной

цитофлуориметрии. При выборе региона интереса были проанализированы параметры прямого и бокового светорассеяния, отражающие размер и гранулярность клеток, соответственно. На дот-блот диаграмме FSC-SSC был выбран наиболее многочисленный пул клеток (Рисунок 9А). Анализируемая культура клеток биопсии эндометрия в целом была отрицательна по CD146. В среднем лишь 2,7% клеток несли на поверхности маркер CD146 (Рисунок 10). CD146 – это гликопротеин, молекула межклеточной адгезии, которая экспрессируется на плазматической мембране эндотелиальных и гладкомышечных клеток, а также перицитах. Также было показано, что примерно 1% мононуклеарных клеток крови, включая Т- и В-лимфоциты, а также NK-клетки продуцируют CD146 [197].

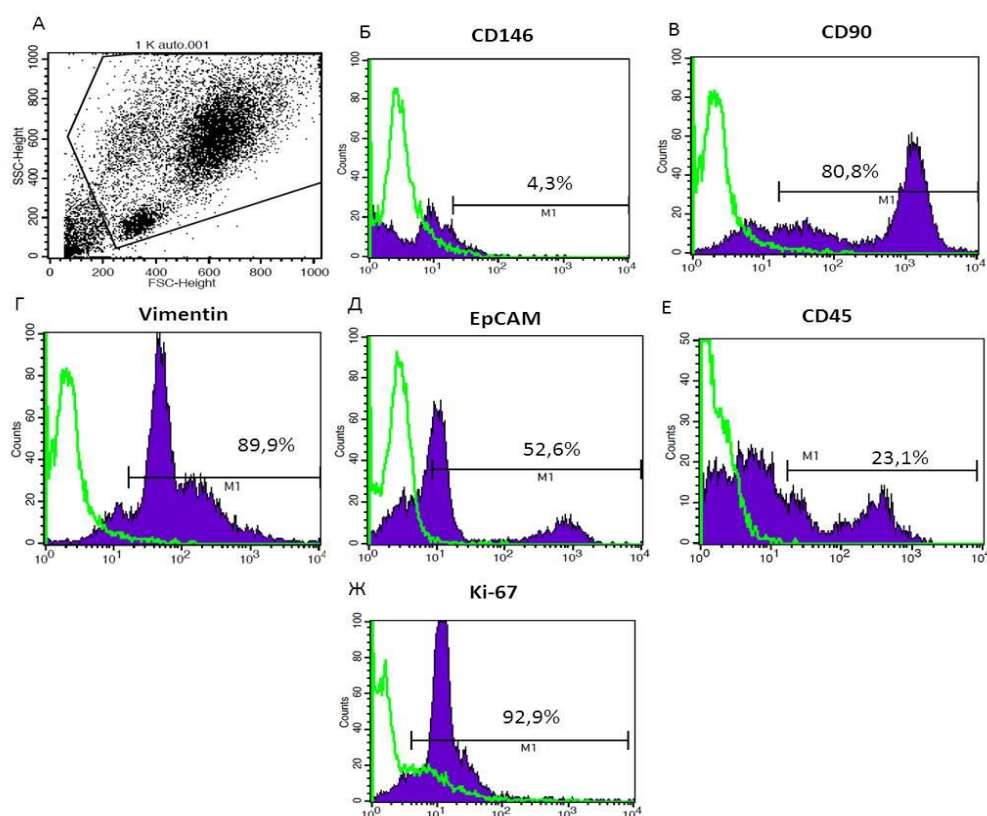


Рисунок 9. Данные проточной цитофлуориметрии. Дот-плот диаграмма прямого и бокового рассеяния изолированных клеток биопсии эндометрия (А). Область обозначена контуром. Репрезентативные гистограммы клеток, окрашенных антителами к CD146 (Б), CD90 (В), Vimentin (Г), EpCAM (Д) (синие гистограммы). Зеленый контур - контроль окрашивания. Процент положительно окрашенных клеток указан над отрезком. Диаграмма бокового рассеяния изолированных клеток биопсии эндометрия, окрашенных антителами к CD45. Процент положительно окрашенных клеток указан в правом квадранте.

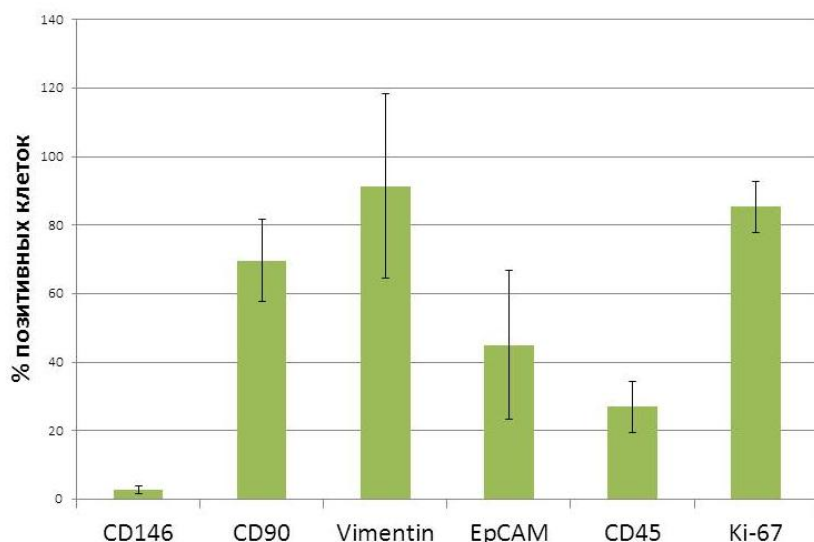


Рисунок 10. Содержание положительно окрашенных клеток, выделенных из биопсии эндометрия по данным проточной цитофлуориметрии.

Было показано, что полученная культура положительна по CD90 (69,7% CD90+) и vimentin (91,3% vimentin+), оба белка являются маркерами МСК (Рисунок 9В, Г, Рисунок 10). CD90 (Thy-1) – это белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, связанный на мембране с гликозилфосфатидилом. CD90 экспрессируется на поверхности МСК, фибробластов, эндотелиальных клеток и запускает различные каскады в клетках [198]. Vimentin является промежуточным филаментом клеток мезенхимального происхождения [199]. Анализируемая культура была также положительна по EpCAM (45,0 % EpCAM+) (Рисунок 9Д, 10). EpCAM относится к трансмембранным гликопротеинам, является  $Ca^{2+}$ -независимой молекулой межклеточной адгезии, также участвует в важных для клетки каскадах реакций. EpCAM экспрессируется на эпителиальных клетках и является маркером некоторых стволовых клеток [200].

Положительный фенотип клеток по маркерам EpCAM и vimentin был также подтвержден иммуноцитохимическим анализом (Рисунок 11Б) с использованием флуоресцентной микроскопии.

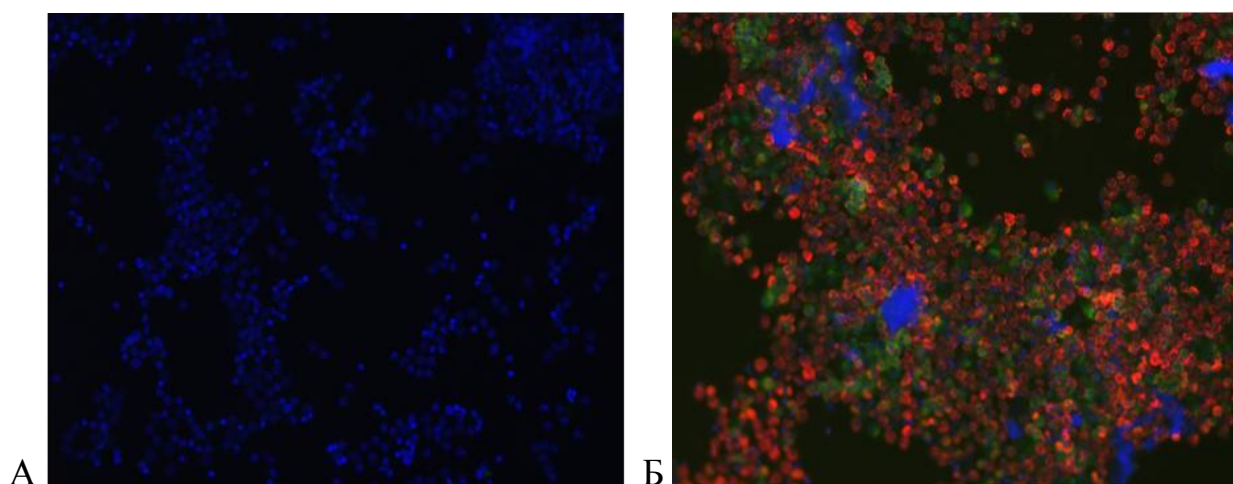


Рисунок 11. Иммуноцитохимический анализ. Отрицательный контроль (только вторичные антитела) (А). Окрашивание клеток, полученных из биоптата эндометрия против виментина (красный) и EpCAM (зеленый), ядра, окрашенные с помощью DAPI (синий) (Б). Увеличение x200.

В качестве маркера лейкоцитов был выбран маркер CD45 (общий лейкоцитарный антиген). Было обнаружено, что в среднем 27,1% выделенных клеток были CD45+ (Рисунок 9Е, 10). Таким образом, выделенная культура клеток из биоптата эндометрия представляет собой гетерогенную популяцию клеток, содержащую МСК, эпителиальные, стромальные клетки и лейкоциты. Так как эндометрий содержит кровеносные сосуды, то существует незначительная примесь эндотелиальных (CD146+ клетки) клеток.

Определение уровня пролиферации выделенной культуры проводили также методом проточной цитофлуориметрии. Использовали маркер клеточной пролиферации Ki-67. Это ядерный белок, экспрессия которого в клетке не постоянна, а его ингибирование приводит к остановке деления [201]. Так выделенная культура содержала в среднем 85,3% Ki-67+ клеток, что указывает на их активную пролиферацию и жизнеспособность (Рисунок 9Ж, 10).

Данное исследование демонстрирует техническую возможность выделения жизнеспособных стромальных и эпителиальных клеток базального слоя эндометрия из биопсийного материала для обратной трансплантации. 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 его восстановление.

### **3.9 Результаты, полученные в группе пациенток с применением аутологичной PRP и аутологичных клеток эндометрия**

В ходе исследования была сформирована *4я группа* пациенток (n=5), которым проводили инъекционное введение в эндометрий аутологичной PRP и аутологичных минимально манипулированных эпителиальных и стромальных клеток эндометрия в пролиферативную фазу цикла (на 6-9 день), предшествующего ПЭ, с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопа. Возраст пациенток варьировал от 31 до 40 и в среднем составил  $35,0 \pm 4,0$  лет. Индекс массы тела у пациенток в данной группе варьировал от 18 до  $22 \text{ кг/м}^2$  и в среднем составил  $20,2 \pm 1,7$ . Из сопутствующих соматических заболеваний у 1й пациентки был диагностирован гипотиреоз, у 1 – хронический пиелонефрит, у 1 – мигрень и желчнокаменная болезнь с холецистэктомией в анамнезе. Показатели гормонального статуса не отличались внутри исследуемой группы, уровень ФСГ в среднем составил  $6,8 \pm 1,3$  МЕ/л, ЛГ -  $5,2 \pm 0,8$  МЕ/л, АМГ -  $2,6 \pm 0,8$  нг/мл, ТТГ -  $1,8 \pm 0,8$  МЕ/л, Т4св -  $12,2 \pm 1,8$  нмоль/л, Е2 -  $246 \pm 110$  пмоль/л и Пролактин -  $230 \pm 91$  мМЕ/л.

В данной группе 4 пациентки из 5 отмечали крайне скудный характер менструальных выделений, наличие перименструальных выделений «мажущего» характера на момент включения в исследование. Длительность менструальных выделений у пациенток составляла от 3 до 5 дней. Цикл был регулярным у всех женщин, длительность его составляла от 28 до 32 дней. Ни одна из пациенток данной группы ранее не принимала комбинированные оральные контрацептивы и не использовала внутриматочные средства контрацепции.

Гинекологическая заболеваемость пациенток данной группы была представлена полипом эндометрия (n=1), аденомиозом (n=1), НГЭ (n=1) и хламидиозом в анамнезе (n=1). Ни у одной из пациенток не было выявлено

миомы матки и внутриматочных синехий в анамнезе. Оперативные вмешательства на органах малого таза с диагностической и лечебной целью были представлены гистероскопией с РДВ (n=5), вакуум-аспирацией содержимого полости матки по поводу НБ (n=5), повторным выскабливанием стенок полости матки по поводу плацентарного полипа после НБ (n=3), удалением полипа эндометрия (n=1), диагностической лапароскопией (n=3). У одной из пациенток гистероскопия с РДВ и вакуум-аспирация содержимого полости матки после НБ проводились неоднократно.

Продолжительность бесплодия у пациенток варьировала от 1 до 6 лет и в среднем составила  $3,2 \pm 1,9$  лет. У всех пациенток (n=5) бесплодие было вторичным. Количество беременностей у пациенток в анамнезе варьировало от 1 до 3 и в среднем составило  $2 \pm 0,7$ . У всех пациенток в анамнезе было отмечено по 1 случаю НБ. Внематочная беременность была отмечена в анамнезе у 1й пациентки, аборт также у 1й. У трех пациенток в анамнезе были роды, среди них 1 путем кесарева сечения.

Возраст супругов пациенток варьировал от 30 до 45 лет и в среднем составил  $36,8 \pm 6$  лет. Показатели спермограммы мужчин соответствовали нормативным значениям. До начала исследования все пациентки данной группы обращались в клиники для лечения бесплодия методами ВРТ без желаемого эффекта. Число безуспешных программ ВРТ варьировало от 2 до 5 и в среднем составило  $2,6 \pm 1,3$  попыток. Отмены программ переноса размороженных эмбрионов полость матки в анамнезе отмечены у всех пациенток в связи с недостаточной толщиной эндометрия для ПЭ в полость матки, несмотря на проводимую терапию.

Все пациентки с целью прегравидарной подготовки эндометрия до включения в исследование получали препараты эстрогенов в трансдермальной и пероральной формах в высоких дозах, а также неоднократные курсы физиотерапии. Внутриматочное орошение аутологичной PRP проводилось ранее трем пациенткам, внутриматочное введение препарата гранулоцитарного фактора роста проводилось четырем пациенткам в данной группе без значимого



эффекта. 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.

В следующем менструальном цикле после проведения инъекционного введения аутологичной PRP и аутологичных минимально манипулированных клеток эндометрия под контролем гистероскопа все пациентки (n=5) отметили увеличение объема теряемой менструальной крови и отсутствие перименструальных выделений «мажущего» характера.

После проведенного вмешательства толщина эндометрия в новом менструальном цикле на фоне приема гормональной терапии статистически значимо ( $p=0,0431$ ) увеличилась у всех пациенток и в период «окна имплантации» составила в среднем  $9,6 \pm 1,14$  мм. Данные о динамике толщины эндометрия представлены в таблице 36.

Таблица 36

**Данные о динамике толщины эндометрия в период «окна имплантации» у пациенток 4й группы (n=5)**

Пациентка, №	Толщина до лечения, мм	Толщина в цикле терапии, мм	P (парный критерий Вилкоксона)
1	6	8	0,0431
2	6	10	
3	5	11	
4	5	9	
5	6	10	
Среднее	$5,6 \pm 0,54$	$9,6 \pm 1,14$	

Несмотря на различия в размере выборок, при сравнении прироста толщины эндометрия у пациенток в данной группе были выявлены статистически значимые различия по сравнению с приростом в 1й ( $p=0,0051$ ) и 2й группах ( $p=0,0366$ ). Различия в приросте между 4й и 3й группами не достигли статистической значимости ( $p=0,1773$ ) (Рисунок 12).

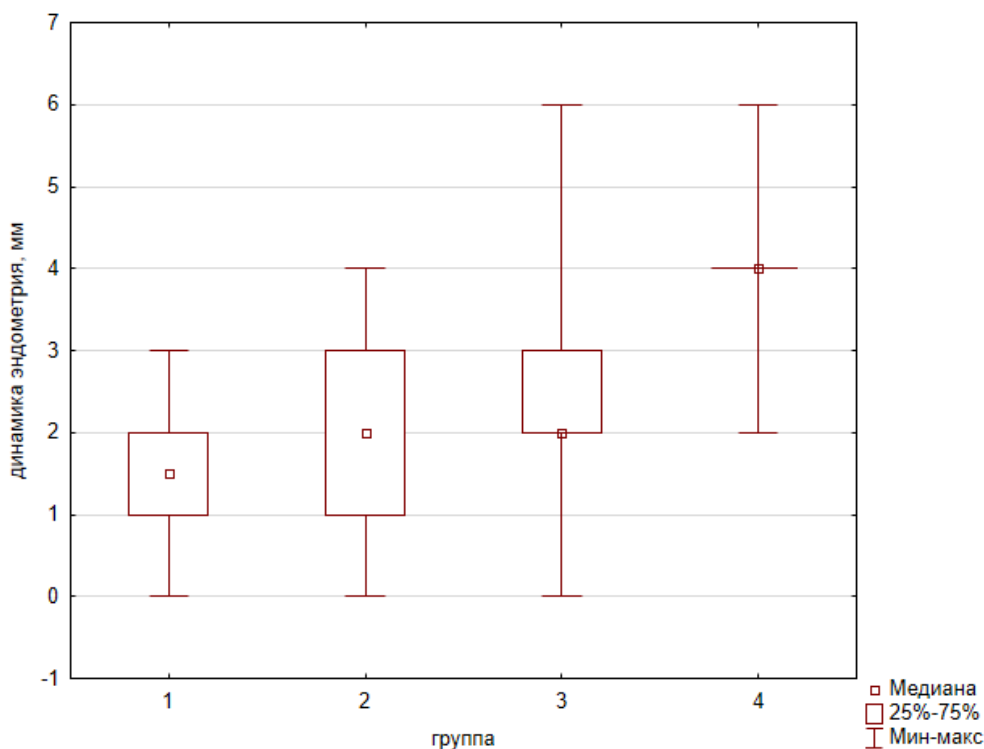


Рисунок 12. Прирост толщины эндометрия после проведенной терапии в группах.

Контрольная оценка гемодинамики в сосудах матки была проведена всем пациенткам в период предполагаемого «окна имплантации» в следующем после терапии менструальном цикле. Следует отметить, что базальные артерии визуализировались у всех пациенток данной группы до и после лечения, что соответствует нормативным показателям. Что касается спиральных артерий, то визуализация на момент включения в исследование отмечалась у 2х пациенток, а при контрольном доплерометрическом исследовании визуализация наблюдалась у всех 5.

Исходные значения пульсационного индекса в правой маточной артерии у пациенток превышали значения, принятые в качестве нормативных. При контрольной оценке гемодинамики у пациенток после лечения было выявлено статистически значимое снижение PI, RI и S/D в правой маточной артерии по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ). В левой маточной артерии было выявлено статистически значимое снижение PI и S/D по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ). В аркуатных артериях была отмечена статистически значимая положительная динамика индекса резистентности по

сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ). В радиальных и базальных артериях было отмечено снижение уголнезависимых индексов, но различия в динамике не были статистически значимыми. Динамика показателей кровотока в артериях матки в период предполагаемого «окна имплантации» на фоне лечения представлена в таблице 37.

Таблица 37

**Динамика показателей доплерометрии в сосудах матки**

Показатель		Правая маточная артерия	Левая маточная артерия	Аркуатные артерии	Радиальные артерии	Базальные артерии
Сосуд						
PI	До лечения	2,5±0,5	2,23±0,37	0,96±0,29	0,72±0,16	0,66±0,15
	После лечения	1,9±0,55*	1,76±0,37*	0,83±0,3	0,64±0,13	0,62±0,14
RI	До лечения	0,82±0,04	0,81±0,04	0,58±0,15	0,47±0,08	0,43±0,09
	После лечения	0,74±0,09*	0,76±0,04	0,5±0,13*	0,42±0,07	0,41±0,06
S/D	До лечения	5,86±1,6	5,62±1,7	2,49±0,7	1,97±0,29	1,75±0,22
	После лечения	4,35±1,2*	4±0,48*	2,14±0,6	1,8±0,28	1,68±0,23

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, парный критерий Вилкоксона

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями до лечения

Криопротокол проводили на фоне гормональной подготовки эндометрия с применением эстрадиола валерата и микронизированного прогестерона под динамическим ультразвуковым контролем по описанной схеме. Необходимо отметить, что после проведения вмешательства пациенткам данной группы потребовались значительно более низкие дозы эстрогенов по сравнению с 1-3 группами для достижения оптимальных значений М-эха. Максимальная суточная доза назначаемого эстрадиола валерата составила 6 мг. У всех пациенток эндометрий достиг оптимальных значений и всем был произведен перенос в полость матки одного размороженного эмбриона хорошего качества на стадии бластоцисты. Перенос эмбриона в полость матки производили под ультразвуковым контролем на 6-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона. Ведение посттрансферного периода осуществляли согласно описанной схеме.

Беременность наступила у 3х пациенток в данной группе после ПЭ в полость матки и завершилась рождением здоровых детей в срок. Ни у одной из пациенток не было отмечено нежелательных явлений ни во время самого терапевтического вмешательства, ни после него в период наблюдения, который составил 1 год.

#### **Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Пациентки с маточным фактором бесплодия относятся к особой категории, так как на сегодняшний день нет общепринятых эффективных подходов к решению данной проблемы репродуктивной медицины. Известно, что для наступления беременности необходимо наличие полноценного функционально активного эндометрия и эмбриона хорошего качества. Однако современная наука ограничена в возможностях воздействия на эмбриональный фактор. Таким образом, современные методы терапии в репродукции в основном направлены на повышение рецептивности эндометрия. Кроме того, повышенный интерес к исследованию новых методов лечения маточной формы бесплодия, в том числе у пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием, обусловлен отсутствием альтернатив у данной группы женщин реализовать свой репродуктивный потенциал помимо суррогатного материнства.

Вышеизложенное определило цель данной работы: повышение эффективности программ ВРТ у пациенток с маточной формой бесплодия, обусловленного «тонким» эндометрием, с помощью новых подходов прегравидарной подготовки.

В наше исследование вошли 115 пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием, которые не отвечали на проводимую ранее терапию с использованием эстрогенов, препаратов, направленных на улучшение кровообращения в органах малого таза, физиолечение, а также современные методы, в том числе внутриматочные инфузии препаратов гранулоцитарного фактора роста и аутологичной PRP в объеме 1-2 мл. Последние виды вмешательства относят к так называемым дополнительным методам терапии (add-on treatment), направленным на повышение эффективности программ ВРТ, путем повышения рецептивности эндометрия и на сегодняшний день набирающим доказательную базу.

Изначально все пациентки были разделены на группы путем простой рандомизации. В 1ю группу вошли 30 пациенток, которым проводилось физиолечение перед вступлением в программы ВРТ. Вторую группу пациенток составили 42 женщины, которым проводили инъекционное введение 35-40 мл аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа в цикле, предшествующем ПЭ в полость матки. В 3ю группу вошли 38 пациенток, которым проводили комплексное лечение: физиотерапия, а затем введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа. В ходе исследования была сформирована 4я группа пациенток (n=5), которым проводили введение в эндометрий аутологичной PRP и аутологичных минимально манипулированных клеток эндометрия с помощью эндоскопической иглы в цикле, предшествующем ПЭ в полость матки.

Пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и антропометрическим данным. Большинство пациенток при сборе анамнеза указывали на изменение характера менструальной функции. В основном это касалось укорочения дней менструации, а также крайне скудного объема теряемой менструальной крови с перименструальными мажущими выделениями, что характерно для пациенток с «тонким» эндометрием [99]. Важно отметить, что после проведения терапии, независимо от ее вида, была отмечена положительная динамика и статистически значимое снижение частоты гипоменструального синдрома во всех группах пациенток. Оценка гормонального профиля пациенток показала соответствие уровней всех исследуемых гормонов нормативным значениям. Не было выявлено связи между уровнем гормонов и значениями М-эхо, несмотря на то, что некоторые исследования сообщают о существовании корреляции уровня E2 и толщины эндометрия [58].

Исследуемая популяция пациенток имела невысокую частоту экстрагенитальных заболеваний, в основном характерны были заболевания щитовидной железы в стадии медикаментозной компенсации. Известно, что

урогенитальные инфекции являются фактором риска развития воспалительных процессов в органах малого таза [53]. В нашем исследовании ИППП были выявлены у 20% пациенток в 1й группе, 21% - во 2й и 24% - в третьей. При этом отмечена высокая частота заболеваемости хроническим эндометритом (71% в 1й группе, 87% - во 2й и 89% - в 3й) и полипами эндометрия (63% в 1й группе, 62% - во 2й и 42% - в 3й) у пациенток, что подтверждает взаимосвязь между ИППП и возникновением воспалительных процессов в органах малого таза.

Пациентки, вошедшие в исследование, в основном обращались с проблемой вторичного бесплодия. Распространенность его в 1й группе составила 50%, для 2й и 3й групп показатель составил 79%. При анализе репродуктивной функции у пациенток обращала внимание высокая частота НБ с последующими внутриматочными вмешательствами. Для 1й группы показатель составил 33%, для 2й – 55% и 63% для 3й группы. Необходимо отметить, что у части пациенток имели место повторные НБ с неоднократными вмешательствами в полость матки. Таким образом, формируется замкнутый круг из череды вмешательств с выскабливанием стенок полости матки, который неизбежно приводит к развитию воспалительных процессов в матке, повреждению базального слоя с исходом в локальную атрофию эндометрия, склеротические изменения и формирование «тонкого» эндометрия.

В основном пациентки с «тонким» эндометрием – это женщины репродуктивного возраста с неоднократными внутриматочными вмешательствами в анамнезе, сопровождающимися механическим повреждением стенок полости матки [37]. Среди пациенток, включенных в работу, длительность бесплодия в среднем составляла  $4,7 \pm 3,2$  лет, таким образом, у большинства к моменту вступления в исследование имели место оперативные вмешательства на органах малого таза. Наиболее распространенными операциями у пациенток с «тонким» эндометрием в нашем исследовании были диагностические гистероскопии с РДВ (90% - в 1й, 76% -

во 2й и 74% в 3й группе соответственно), вмешательства с целью удаления полипа эндометрия, а также выскабливания стенок полости матки по поводу НБ (30% - в 1й, 52% - во 2й и 63% в 3й группе соответственно), что согласуется с данными литературы [37,50]. Кроме того обращала внимание высокая частота диагностических лапароскопий и гистерорезектоскопий с разделением внутриматочных синехий в анамнезе. Повторные внутриматочные вмешательства с диагностической и лечебной целью у пациенток с репродуктивными неудачами, назначение нескольких препаратов одного действия в дозировках, превышающих рекомендованные, приводит к формированию вторичного бесплодия, обусловленного рефрактерным «тонким» эндометрием, не поддающимся известным методам лечения.

Изучение роли эндометрия в нарушении репродуктивной функции привело к более глубокому пониманию механизмов взаимодействия его с эмбрионом. Концепция об эндометрии как естественном биосенсоре связывает неудачи имплантации как с нарушением развития самого эмбриона, так и с нарушением процессов восприимчивости и селективности в эндометрии [63]. Одной из причин формирования бесплодия у пациенток с «тонким» эндометрием являются структурно-функциональные изменения ткани с нарушением рецептивности, которые приводят к невозможности полноценной имплантации эмбриона. Однако, несмотря на проведение многочисленных исследований, направленных на поиск и разработку новых методов диагностики, изучение различных маркеров, до сих пор не существует универсального высокоточного теста, способного определить рецептивность эндометрия, выбрать метод коррекции нарушений и спрогнозировать исход программ ВРТ [5].

В клинической практике наиболее доступным методом для оценки рецептивности эндометрия является УЗИ с оценкой толщины и структурных характеристик эндометрия в период «окна имплантации». Известно, что толщина эндометрия менее 7 мм у пациенток в программах ВРТ ассоциирована



с повторными неудачами имплантации, снижением частоты наступления беременности и живорождения [2,6,37,38]. Однако нужно отметить, что «тонкий» эндометрий не исключает возможность наступления беременности и живорождения [7,8].

Рассматривая толщину эндометрия как важный прогностический фактор, определяющий вероятность наступления беременности, разные авторы в своих исследованиях пытались определить пороговую величину значения М-Эхо. На сегодняшний день в литературе представлены различные данные о минимально необходимой толщине эндометрия в период «окна имплантации» для наступления беременности. Большинство же исследователей «тонким» и недостаточным в отношении наступления беременности считают эндометрий толщиной менее 7 мм [3-5], а значения 8-12 мм определяют как оптимальные для имплантации [35,36]. Проведенный нами ROC-анализ показал, что толщина эндометрия влияет на вероятность наступления беременности в исследуемой популяции пациенток ( $AUC=0,725$ ), а вероятность наступления беременности была выше при толщине эндометрия 9 мм, что может быть использовано как пороговое значение после проведенной терапии для пациенток с исходно «тонким» эндометрием.

В нашем исследовании подавляющее большинство пациенток имели в анамнезе неудачные программы ВРТ (83% в 1й группе, 74% - во 2й и 89% - в 3й) и отмены циклов переноса в связи с отсутствием условий для имплантации, что совпадает с данными литературы [11]. Рассматривая «тонкий» эндометрий в период предполагаемого «окна имплантации» в качестве негативного прогностического фактора при проведении программ ВРТ [13], в нашем исследовании у пациенток с отсутствием эффекта от проведенного лечения были отменены циклы ПЭ до достижения оптимальных значений М-эха. Наиболее часто отменяли циклы переноса у пациенток из 1й группы (23,3%), которым проводили только физиолечение перед вступлением в программу ВРТ.

Помимо негативного влияния на частоту наступления беременности «тонкий» эндометрий ассоциирован с возникновением осложнений во время беременности и развитием неблагоприятных репродуктивных исходов [45,46]. В нашем исследовании после проведения ПЭ в полость матки у 33,3% пациенток в 1й группе, 28,5% - во 2й и 16,6% - в 3й была констатирована НБ в первом триместре. По 1й пациентки во 2й и 3й группах имели самопроизвольное прерывание беременности во втором триместре в связи с ИЦН. Таким образом, показатель живорождения у пациенток с «тонким» эндометрием в нашем исследовании в зависимости от проводимой терапии составил 13,3% для 1й группы, 21,4% - для 2й и 23,7% для 3й группы.

Одной из причин формирования «тонкого» эндометрия считают нарушение субэндометриального кровотока. В нашем исследовании у пациенток с «тонким» эндометрием исходно отмечалось снижение частоты визуализации базальных и спиральных артерий матки по сравнению с нормативными значениями, что согласуется с данными других исследований [15]. В литературе представлены данные о повышении индекса резистентности у пациенток с "тонким" эндометрием в радиальных артериях матки [3]. Результаты нашего исследования подтверждают повышение уголнезависимых индексов у этих пациенток, а именно повышение PI и S/D. По другим данным для пациенток с «тонким» эндометрием характерно высокое сопротивление в маточных артериях [85], однако данные показатели у наших пациенток существенно не отличались от показателей, принятых за нормативные. Таким образом, у пациенток с «тонким» эндометрием было отмечено нарушение кровообращения в маточных сосудах мелкого калибра.

В литературе имеются работы, в которых отслеживается четкая связь между толщиной эндометрия и параметрами гемодинамики в сосудах матки [15,79,82]. Мы в своем исследовании получили схожие данные о четкой корреляции между значениями M-эха и показателями PI, RI, S/D в спиральных артериях. Кроме того, была выявлена обратная связь между толщиной

эндометрия и показателями PI и RI в базальных артериях, между толщиной эндометрия и значениями RI в радиальных и левой маточной артерии. Можно сделать вывод о том, что высокий индекс сопротивления в сосудах матки ассоциирован с недостаточным ростом эндометрия даже на фоне приема гормональной терапии. В то же время некоторые исследователи в своих работах не отмечали существование связи между толщиной эндометрия у пациенток в программах ВРТ и параметрами маточной гемодинамики [83].

Для более глубокого понимания рецептивности «тонкого» эндометрия следующим этапом были проведены гистологическое и ИГХ исследования образцов эндометрия, полученных путем аспирационной биопсии, в период предполагаемого «окна имплантации». Согласно полученным нами данным морфологического исследования для пациенток с «тонким» эндометрием было характерно ухудшение роста железистого эпителия с участками атрофии и фиброза стромы вокруг желез, а также обеднение сосудистого рисунка с истончением стенок сосудов, что полностью согласуется с описанным патогенезом формирования «тонкого» эндометрия [3].

Известно, что экспрессия рецепторов к половым стероидам может меняться в зависимости от различных физиологических и патологических состояний [107]. Согласно данным литературы повторные неудачи имплантации ассоциированы с дисбалансом экспрессии ER $\alpha$  эндометрии. Кроме того, представлены данные о том, что в «тонком» эндометрии экспрессия ER $\alpha$  в строме и в железистых клетках значительно снижена, по сравнению с нормальным эндометрием [109]. В нашем исследовании не было получено значимых различий уровня экспрессии ER $\alpha$  у забеременевших пациенток по сравнению с теми, у кого беременность не наступила. Значения были сопоставимы как в эпителиальном, так и стромальном компоненте эндометрия в зависимости от наступления беременности. В целом отмечался достаточно высокий уровень экспрессии ER $\alpha$  у пациенток с «тонким»

эндометрием, при этом уровень экспрессии в железах эндометрия был выше по сравнению с уровнем экспрессии в строме.

Предполагается, что снижение уровня экспрессии рецепторов к прогестерону в клетках эндометрия приводит к нарушению процессов имплантации и децидуализации и связано с репродуктивными неудачами [107]. Однако другие авторы указывают на отсутствие статистически значимых различий в экспрессии PR между пациентками с компрометированным эндометрием и фертильными женщинами [109]. По нашим данным у пациенток с «тонким» эндометрием минимальный уровень экспрессии PR был выявлен в железистом эпителии по сравнению со стромой, более того, были описаны фрагменты эндометрия с отсутствием экспрессии PR в железах эндометрия. Статистически значимых различий между уровнем экспрессии PR в зависимости от наступления беременности мы не выявили. Более того отмечалась тенденция к более высоким значениям экспрессии у пациенток, у которых беременность не наступила. В своем исследовании мы получили неоднозначные данные. Что касается соотношения уровней экспрессии PR/ER $\alpha$ , то согласно полученным данным в целом значения были довольно низкими и не имели значимых различий в зависимости от наступления беременности. В эпителии соотношение PR/ER $\alpha$  было несколько выше у пациенток с отсутствием наступления беременности, при этом в строме соотношение было выше у пациенток с наступившей беременностью.

Учитывая вышеизложенное, мы пришли к выводу, что у пациенток с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием, имеет место нарушение рецептивности, а экспрессия рецепторов к половым гормонам неинформативна в качестве прогностического фактора наступления беременности у данной группы пациенток.

Одним из наиболее значимых по данным литературы маркеров рецептивности эндометрия является экспрессия LIF. Считается, что для пациенток с «тонким» эндометрием и репродуктивными неудачами в анамнезе

характерно снижение экспрессии LIF в период «окна имплантации» по сравнению с фертильными женщинами [103,104]. В нашем исследовании анализ экспрессии LIF в эпителии не выявил значимых различий у пациенток в зависимости от наступления беременности, хотя в группе с наступившей беременностью отмечались более высокие значения. Таким образом, наши результаты согласуются с выводами метаанализа об отсутствии убедительных доказательств обоснованности применения экспрессии LIF в клинической практике в качестве маркера рецептивности эндометрия и прогнозирования исходов программ ВРТ [65].

Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании в группе пациенток, которым проводили ИГХ исследование эндометрия толщина, а также прирост толщины эндометрия после терапии влияли на наступление беременности после ПЭ, что согласуется с данными литературы [2,38]. Толщина эндометрия у пациенток с наступившей беременностью после лечения в среднем составила  $8,23 \pm 1,24$  мм, а у пациенток с отсутствием наступления беременности  $6,33 \pm 2,5$  мм ( $p=0,00003$ ). Что касается прироста толщины эндометрия, также были выявлены статистически значимые различия в зависимости от наступления беременности  $2,46 \pm 1,27$  мм против  $1,42 \pm 1,38$  мм соответственно ( $p=0,0002$ ). Проведенный нами анализ данных экспрессии ER $\alpha$ , PR и LIF в эндометрии не выявил значимых различий изученных маркеров рецептивности в зависимости от наступления беременности. Крайне важно, что проведение морфологической и ИГХ диагностики рецептивности эндометрия требует инвазивных вмешательств с целью забора образца ткани. Именно поэтому, учитывая отягощенный анамнез у пациенток с «тонким» эндометрием, наличие репродуктивных неудач, отсутствие влияния полученных данных на выбор тактики лечения, мы посчитали невозможным проведение повторных биопсий для оценки влияния различных видов терапии, а также выполнение биопсии в пролиферативную фазу цикла для выявления признаков хронического эндометрита.

На сегодняшний день с точки зрения доказательной медицины не существует единого эффективного подхода к терапии женщин с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием. К сожалению, применение эстрогенов не всегда эффективно, а назначение их в дозировках, превышающих рекомендованные, часто имеет обратное действие [127]. Пролиферативный эффект эстрогенов обусловлен взаимодействием с ER- $\alpha$  клеток эндометрия с последующим выделением факторов роста [124]. Возможно, одной из причин отсутствия эффекта от гормональной терапии является нарушение экспрессии рецепторов к половым гормонам у женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием. Поиску других эффективных способов лечения бесплодия, обусловленного «тонким» эндометрием, посвящено большое количество работ по изучению применения силденафила цитрата вагинально [141], L-аргинина [142], пентоксифиллина и витамина E [17]. Однако, данные методы не позволяют значительно повысить эффективность программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием.

Широко распространенным видом лечения маточного фактора бесплодия в нашей стране является физиотерапия [15,131]. Одним из наиболее изученных методов является электроимпульсная терапия на этапе прегравидарной подготовки женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием. Механизм действия электростимуляции связан с изменением биоэлектрической активности мышечных элементов и нервов, сокращением и расслаблением мышечных волокон, что приводит к улучшению гемодинамики посредством расширения периферических сосудов [132]. Данные Волковой Е.Ю. (2012 г.) подтверждают, что электроимпульсная терапия в комплексном лечении женщин с «тонким» эндометрием восстанавливает перфузию в маточных сосудах, увеличивает толщину эндометрия и частоту наступления беременности в протоколах ЭКО [15].

Нормализация кровообращения в сосудах матки является важным условием для восстановления морфофункциональных свойств эндометрия. В

связи с этим нами было выбрано воздействие физическим факторами в качестве терапии для 1й группы пациенток. Важно отметить, что подавляющее большинство пациенток, включенных в наше исследование, ранее получали неоднократные курсы физиолечения в разных клиниках с целью прегравидарной подготовки эндометрия, однако без значительного эффекта. В 1й группе физиолечение ранее получали 87% пациенток, во 2й – 95%, в 3й – 82%. Положительное влияние физиотерапии на характер менструации и состояние эндометрия обусловлено снижением периферического сопротивления сосудов и увеличением числа функционирующих субэндометриальных сосудов [135]. В нашей работе было показано статистически значимое уменьшение частоты гипоменореи у пациенток с «тонким эндометрием» после физиотерапии, аналогичная динамика отмечалась и в других группах независимо от вида терапии.

Одной из конечных точек в нашем исследовании было изменение толщины эндометрия после лечения. У пациенток 1й группы после проведения физиотерапии также, как и в других группах, была отмечена положительная динамика в отношении увеличения толщины эндометрия (с  $5,9 \pm 1,2$  до  $7,4 \pm 1,2$ ;  $p < 0,0001$ ). Однако, при сравнении прироста эндометрия у пациенток, получавших только физиотерапию с динамикой в 3й группе, где пациентки получали физиотерапию и введение аутологичной PRP, было выявлено, что статистически значимо прирост был выше в 3й группе пациенток.

На фоне терапии у пациенток всех групп оценивали динамику параметров кровотока в сосудах матки. Физиотерапия в нашем исследовании приводила к статистически значимому увеличению частоты визуализации базальных артерий ( $p = 0,0156$ ) матки. Однако не было выявлено такой динамики в отношении спиральных артерий ( $p = 0,3808$ ). Кроме того мы проводили оценку динамики параметров кровотока для сосудов матки. Анализ показал, что после физиотерапии у пациенток статистически значимо снижались значения PI в правой и левой маточных и базальных артериях. В радиальных, аркуатных и

спиральных артериях не было выявлено значимого снижения RI по сравнению с исходными значениями. Наиболее выраженное действие физиотерапия оказывала на снижение RI в сосудах матки. Статистически значимая динамика индекса была выявлена на всех уровнях, кроме левой маточной артерии. Наименьший эффект физиотерапия оказывала на снижение показателя S/D, статистически значимые различия на фоне лечения были получены только в базальных артериях матки. Для спиральных артерий не было выявлено статистически значимой динамики ни для одного из изучаемых индексов. Таким образом, по нашим данным электроимпульсная терапия приводит к улучшению показателей гемодинамики в маточных сосудах более крупного калибра и не влияет на параметры гемодинамики и частоту визуализации концевых спиральных артерий матки.

В качестве одной из конечных точек исследования мы оценивали частоту наступления беременности. Согласно данным литературы электроимпульсная терапия приводит к увеличению толщины эндометрия путем улучшения кровообращения и улучшает репродуктивные исходы у пациенток с «тонким» эндометрием [135]. В нашем исследовании частота наступления беременности после физиотерапии составила 20%, частота живорождения – 13,3%, что было ниже, чем в других группах. Анализируя полученные результаты, мы пришли к выводу, что низкая эффективность физиотерапии в отношении повышения эффективности программ ВРТ по сравнению с другими видами терапии обусловлена формированием рефрактерного «тонкого» эндометрия в исследуемой популяции пациенток. Более того, основная часть пациенток, включенных в исследование, ранее получала повторные курсы физиотерапии, которые не имели значимого эффекта. К сожалению, формирование рефрактерного «тонкого» эндометрия у пациенток приводит к отсутствию эффекта от известных методов терапии и обуславливает необходимость разработки новых методов лечения, повышающих рецептивность эндометрия и исходы программ ВРТ у таких пациенток.



Одним из таких перспективных методов является применение PRP, полученной из собственной крови пациенток. Высвобождение факторов роста из тромбоцитов при их дегрануляции приводит к терапевтическому эффекту за счет запуска процессов биологического синтеза и регенерации в поврежденных тканях. Кроме того, факторы роста регулируют процессы клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки [156]. В терапии женщин с бесплодием, обусловленным рефрактерным «тонким» эндометрием, аутологичная PRP впервые была применена в 2015 году. Авторы показали, что внутриматочные инфузии аутологичной PRP на фоне приема ЗГТ 5 пациенткам с толщиной эндометрия менее 7 мм в период «окна имплантации» увеличивают толщину эндометрия и приводит к наступлению беременности у всех женщин после ПЭ [23]. За последние несколько лет появились работы, которые подтверждают эффективность внутриматочного применения аутологичной PRP у пациенток с «тонким» эндометрием путем увеличения толщины эндометрия и повышения частоты наступления клинической беременности по сравнению с пациентками, которые получают только гормональную терапию перед ПЭ [25,21,165,166].

Согласно данным метаанализа (n=625) внутриматочное введение аутологичной PRP приводит к значимому увеличению толщины эндометрия, частоты наступления имплантации и клинической беременности по сравнению с пациентками из контрольных групп ( $p<0,001$ ) [167]. В нашем исследовании у пациенток во 2й группе введение аутологичной PRP в эндометрий под контролем гистероскопа привело к статистически значимому росту толщины эндометрия с  $5,3\pm 1,5$  до  $7,4\pm 1,8$  ( $p<0,00001$ ), что подтверждает вышеуказанные данные. При этом прирост толщины эндометрия в среднем составил  $2\pm 1,2$  мм. Tandulwadkar S. и соавт. (2017 г.) в своей работе показали, что внутриматочное применение аутологичной PRP способствует увеличению толщины эндометрия и улучшению показателей внутриматочного кровотока [24]. При оценке влияния инъекционного введения PRP в эндометрий пациенток 2й группы на параметры гемодинамики, мы также получили результаты, подтверждающие улучшение кровообращения сосудах матки. Так,

было выявлено статистически значимое увеличение частоты визуализации спиральных артерий матки по сравнению с исходными значениями ( $p=0,0002$ ). Кроме того, инъекционное введение аутологичной PRP в эндометрий привело к статистически значимому снижению PI, RI и S/D на всех уровнях оцениваемых сосудов матки по сравнению с показателями до лечения.

Помимо влияния на толщину эндометрия представленные в литературе исследования сообщают о повышении эффективности программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием на фоне применения аутологичной PRP [21]. Так, авторы схожих исследований сообщают о более высокой частоте наступления беременности у пациенток после внутриматочных инфузий PRP перед ПЭ по сравнению с контрольной группой [25,21,166]. В нашем исследовании частота наступления беременности была самой высокой в группе пациенток с применением аутологичной PRP и составила 33,3%. Показатель живорождения в этой группе составил 21,4%. Таким образом, повышение эффективности программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием с помощью аутологичной PRP обусловлено улучшением кровотока в концевых маточных артериях, снижением уголнезависимых индексов на всех уровнях маточных сосудов и увеличением толщины эндометрия. Важно отметить, что в данном исследовании пациентки имели рефрактерный «тонкий» эндометрий, который не отвечал на ранее проводимую гормональную и физиотерапию, а также орошение полости матки аутологичной PRP и G-CSF.

Крайне важным преимуществом является приготовление аутологичной PRP из собственной крови женщины, что делает ее естественным источником факторов роста и сводит к минимуму возможность развития аллергических реакций и нежелательных явлений. В описанных выше работах [25,165] авторы указывают на отсутствие токсичных свойств и нежелательных явлений у пациенток после введения PRP, Наши данные полностью согласуются с ними и подтверждают отсутствие негативного влияния аутологичной PRP на организм

пациенток. Ни у одной пациентки не было отмечено нежелательных явлений ни во время самих вмешательств с целью введения PRP, ни после них.

Необходимо отметить, что во всех опубликованных работах используется методика внутриматочного орошения аутологичной PRP, которая имеет ряд ограничений. Среди них наиболее важным является отсутствие визуального контроля зоны введения PRP. Кроме того врач, производящий манипуляцию, может ввести только ограниченный объем (1-2 мл) в полость матки, что приводит к необходимости проведения повторных процедур забора крови, приготовления PRP и внутриматочных манипуляций с целью вливания PRP для достижения терапевтического эффекта. Предложенная и разработанная нами технология инъекционного введения PRP проводится под визуальным контролем слизистой матки, позволяет прицельно вводить значимый объем (35-40 мл) аутологичной PRP непосредственно в измененные участки эндометрия, что обеспечивает отсутствие необходимости в проведении повторных вмешательств для достижения терапевтического эффекта.

Учитывая отсутствие эффекта от ранее проведенных курсов физиотерапии у пациенток в нашем исследовании, было решено в одной из групп пациенток провести комплексную терапию, состоящую из физиотерапии на 1м этапе и введения аутологичной PRP под контролем гистероскопа на втором. В литературе отсутствуют работы с подобным подходом в терапии женщин с бесплодием, обусловленным «тонким» эндометрием, однако представлено значительное количество работ по применению физиотерапии и орошения PRP изолированно [15,135,21,165]. При оценке динамики толщины эндометрия на фоне комплексной терапии было отмечено статистически значимое увеличение толщины эндометрия по сравнению с исходными значениями (с  $5,4 \pm 1,4$  до  $7,9 \pm 1,6$ ;  $p < 0,0001$ ), как и в других группах. При сравнении прироста эндометрия между группами было показано, что у пациенток 3й группы динамика была статистически значимой по сравнению с приростом в 1й группе пациенток, которые получали только физиотерапию.

Особый интерес представляют полученные данные в 3й группе о влиянии комплексной терапии на параметры кровотока в сосудах матки, учитывая различную эффективность в этом отношении изолированного применения физиопроцедур и введения PRP. По нашим данным физиотерапия приводила к статистически значимому увеличению частоты визуализации базальных артерий ( $p=0,0156$ ) матки по сравнению с исходным уровнем, но не влияла на частоту визуализации спиральных. Инъекционное введение аутологичной PRP, наоборот, оказывало статистически значимый эффект на визуализацию сосудов наиболее мелкого калибра. Использование двухэтапного комплексного подхода у пациенток в 3й группе привело к статистически значимому увеличению частоты визуализации как базальных ( $p=0,0312$ ), так и спиральных артерий ( $p=0,0005$ ) матки. Анализ динамики уголнезависимых индексов у пациенток 3й группы показал статистически значимое снижение RI и S/D на всех уровнях маточных сосудов на фоне терапии в отличие от изолированного применения физиотерапии. А статистически значимое снижение PI было зафиксировано во всех исследуемых сосудах кроме аркуатных артерий. Для спиральных артерий выявлено не только статистически значимое увеличение частоты визуализации сосудов после лечения, но и статистически значимое снижение PI, RI и S/D. Таким образом, комплексный подход с поэтапным применением физиотерапии и аутологичной PRP по нашим данным приводит к увеличению частоты визуализации концевых артерий матки, снижению показателей уголнезависимых индексов на всех уровнях маточных сосудов в отличие от изолированного применения физиотерапии.

При оценке влияния комплексной терапии пациенток с рефрактерным «тонким» эндометрием на эффективность программ ВРТ были полученные обнадеживающие результаты. Частота наступления беременности в этой группе составила 31,6%, а показатель живорождения был самым высоким и составил 23,7%. Из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что повышение эффективности программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием с помощью двухэтапной терапии обусловлено улучшением микроциркуляции в

концевых маточных артериях, снижением уголнезависимых индексов на всех уровнях, увеличением числа функционирующих сосудов мелкого калибра и увеличением толщины эндометрия.

Механизм действия PRP связан со способностью факторов роста и медиаторов, содержащихся в гранулах тромбоцитов, оказывать пролиферативное и антиапоптотическое действие в отношении клеток эндотелия и способствовать формированию капиллярopodobных структур, тем самым неоангиогенезу [25].

Несмотря на повышенный интерес к применению PRP в современной медицине, отсутствие единого стандарта приготовления PRP, контроля концентрации тромбоцитов и клеточного состава полученной плазмы существенно затрудняет сравнительный анализ этих работ и понимание механизма действия препарата крови. Мы провели анализ готовой PRP на содержание основных факторов роста. Проведенный нами вестерн-блот анализ показал, что в образцах PRP по сравнению с обычной плазмой крови относительный уровень PDGF BB выше в 2,8 раза ( $p=0,0012$ ). Таким образом, повышенное содержание PDGF BB способствует более эффективной репарации ткани при использовании PRP. Полученные нами данные согласуются с результатами другого исследования, свидетельствующими о более высокой концентрации тромбоцитов, а также PDGF-BB в PRP по сравнению с их значениями в цельной крови [21]. Кроме того, в нашем исследовании вестерн-блот анализ показал, что в пробах PRP относительный уровень белка VEGF больше в 2,4 раза, чем в обычной плазме ( $p=0,0343$ ). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что эффективность действия PRP на гемодинамику обусловлена стимуляцией ангиогенеза и репарации ткани за счет повышенного содержания в ней PDGF BB и VEGF.

Крайне важным для достижения эффективности терапии является сохранение жизнеспособности тромбоцитов и предотвращение их активации с выбросом факторов роста до введения PRP в ткани. Проведенный нами

иммунофенотипический анализ образцов PRP показал, что количество тромбоцитов, положительных по CD63 (маркер активации), составило менее 1%, то есть дегрануляция их до введения в ткань не происходила.

В 2004г. было доказано присутствие в изолированных культурах эпителиальных и стромальных клеток эндометрия клеток со свойствами стволовых [175]. Дальнейшее изучение показало, что способность эндометрия к регенерации в течение каждого менструального цикла основана на существовании в нем эпителиальных, мезенхимальных и эндотелиальных стволовых/прогениторных клеток [176]. Nguyen H. и соавт. (2017 г.) в своей работе описали популяцию клоногенных, самообновляющихся эпителиальных прогениторных клеток, преимущественно расположенных в базальном слое эндометрия, которые дифференцируются в железоподобные структуры *in vitro* [177].

С целью анализа клеточного состава биоптата эндометрия, мы провели иммунофенотипический анализ методом проточной цитофлуориметрии, а также иммуноцитохимический анализ с использованием флуоресцентной микроскопии. Было показано, что полученная культура положительна по CD90 (в среднем 69,7% CD90+) и vimentin (91,3% vimentin+), которые являются маркерами МСК [198, 199]. Анализируемая культура была также положительна по EpCAM (45,0 % EpCAM+), который экспрессируется на эпителиальных клетках и является маркером некоторых стволовых клеток [200]. Таким образом, в настоящем исследовании выделенная культура клеток из биоптата эндометрия представляла собой гетерогенную популяцию клеток, содержащую МСК, эпителиальные клетки и лейкоциты. При анализе уровня пролиферации выделенной культуры использовали маркер клеточной пролиферации Ki-67 - ядерный белок, экспрессия которого в клетке не постоянна, а его ингибирование приводит к остановке деления [201]. Так, выделенная культура содержала в среднем 85,3% Ki-67+ клеток, что указывает на их активную пролиферацию и жизнеспособность.

В экспериментах *in vitro* показано пролиферативное действие, а также способствование PRP ангиогенезу, росту, миграции и адгезии мезенхимальных стволовых клеток эндометрия [169,171]. Факторы роста, содержащиеся в тромбоцитах необходимы для функциональной активности прогениторных клеток эндометрия. В литературе представлены данные о том, что изоформы PDGF стимулируют пролиферацию и миграцию стромальных стволовых клеток эндометрия [172-174]. В экспериментах *in vitro* было показано, что PRP способствует пролиферации и дифференцировке стволовых клеток, полученных из менструальной крови. Кроме того, применение PRP подавляет апоптоз и повышает экспрессию маркера мезенхимальных стволовых клеток (МСК) CD105 и периваскулярных маркеров SUSD2 и CD146 [168]. Современный уровень медицины позволил изучить действие стволовых клеток в терапевтических целях при самых трудно поддающихся лечению заболеваниях. Стволовые клетки эндометрия могут служить в качестве аутологичного материала для альтернативного лечения пациенток с маточной формой бесплодия, обусловленной «тонким» эндометрием, рефрактерным к известным методам терапии. Так, Tersoglio A. и соавт. (2020 г.) представили результаты своего исследования (n=29), в которое были включены пациентки с «тонким» эндометрием и повторными неудачами имплантации. Пациенткам проводили субэндометриальное введение аутологичных МСК эндометрия, растворенных в 1 мл аутологичной PRP. Авторы сообщают о значительном увеличении толщины эндометрия с  $5,25 \pm 1,24$  мм до  $9,93 \pm 0,77$  мм у пациенток, при этом у 23 из 29 женщин (79%) наступила клиническая беременность после проведенного вмешательства и ПЭ, 10 из которых завершились живорождением (45,5%) [27]. Все вышеизложенное, а также отсутствие эффективной терапии и недоступность суррогатного материнства для большинства женщин с маточным фактором бесплодия, послужило формированию в нашем исследовании 4й группы пациенток (n=5), которым в качестве лечебного воздействия впервые вводили в эндометрий под контролем

гистеросокопа аутологичную PRP и аутологичные минимально манипулированные клетки эндометрия.

При оценке динамики толщины эндометрия было отмечено статистически значимое увеличение значений М-эха по сравнению с исходными значениями (с  $5,6 \pm 0,54$  до  $9,6 \pm 1,4$ ;  $p=0,0431$ ), что согласуется с данными других исследований [27,182]. Более того, прирост толщины эндометрия в 4й группе был статистически значимо больше по сравнению с приростом в 1й ( $p=0,0051$ ) и 2й группах ( $p=0,0366$ ). Крайне важно отметить, что пациенткам в данной группе назначались минимальные дозы эстрогенов, так как наблюдалась значительная положительная динамика толщины эндометрия после проведенного вмешательства.

При анализе влияния аутологичной PRP и минимально манипулированных аутологичных клеток эндометрия на гемодинамику было отмечено увеличение частоты визуализации спиральных артерий на фоне лечения. Также было отмечено статистически значимое снижение PI, RI и S/D в правой маточной артерии, PI и S/D в левой маточной артерии и RI в аркуатных артериях по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ).

Другой конечной точкой в нашей работе была частота наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием. Из 5 у 3 женщин после ПЭ в полость матки в течение 3 месяцев после проведенных вмешательств наступила беременность и завершилась живорождением, что подтверждает данные о высоком терапевтическом потенциале клеточной терапии у данной категории пациенток [27].

В нашем исследовании был продемонстрирован положительный эффект клеточной терапии на увеличение толщины эндометрия, снижение уголнезависимых индексов и восстановление нормальной микроциркуляции в концевых артериях матки, способствование ангиогенезу, что приводит к повышению рецептивности эндометрия и улучшению исходов в программах ВРТ. Таким образом, применение аутологичной PRP и аутологичных стволовых



клеток в дополнение к гормональной терапии является перспективным методом лечения женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием и представляет научный интерес для проведения исследований с большими выборками.

Сочетание множества факторов, влияющих на успешность взаимодействия эмбриона и эндометрия в период «окна имплантации», а также отсутствие универсального и доступного маркера рецептивности эндометрия, делают сложным выявление истинных причин репродуктивных неудач. В этих условиях становится очевидной необходимость проведения исследований по разработке новых эффективных методов терапии для восстановления репродуктивной функции пациенток с бесплодием, обусловленным рефрактерным «тонким» эндометрием.

## 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АМГ - антимюллеров гормон
- АЧТВ - активированное парциальное тромбопластиновое время
- а-ГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ВМИ - внутриматочная инсеминация
- ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
- ДИ – доверительный интервал
- Е2 - эстрадиол
- ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
- ЗГТ - заместительная гормональная терапия
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИКСИ - (от *англ.* – intracytoplasmic sperm injection, ICSI)  
интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
- ИМТ - индекс массы тела
- ИППП - инфекции, передаваемые половым путем
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- ММП - матриксные металлопротеиназы
- МНО - международное нормализованное отношение
- МСК - мезенхимальные стволовые клетки
- НБ – неразвивающаяся беременность
- НГЭ – наружный генитальный эндометриоз
- ОШ – отношение шансов
- ПРЛ - пролактин
- ПТИ – протромбиновый индекс
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ПЭ - перенос эмбрионов
- РКИ – рандомизированное контролируемое исследование
- РДВ - раздельное диагностическое выскабливание
- Т - тестостерон

ТВ - тромбиновое время  
ТВП – трансвагинальная пункция яичников  
ТТГ - тиреотропный гормон  
Т4св – свободная фракция тироксина  
УЗИ - ультразвуковое исследование  
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон  
ФНО – фактор некроза опухолей  
β-ХГ - β-субъединица хорионического гонадотропина  
ХГЧ - хорионический гонадотропин человека  
ХЭ – хронический эндометрит  
ЦДК - цветное доплеровское картирование  
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение  
АКТ (PKB) – (от англ. protein kinase B) - протеин киназа B  
AUC – (от англ. area under the curve) - площадь под кривой  
EGF - (от англ. epidermal growth factor) - эпидермальный фактор роста  
ER – рецептор к эстрогену  
EDG – (от англ. endothelial differentiation gen ) – ген дифференцировки эндотелия  
ERA – тест эндометриальной восприимчивости  
FGF - (от англ. fibroblast growth factor) - фактор роста фибробластов  
FOXO1 – (от англ. forkhead box protein O1) – фактор транскрипции  
G-CSF – (от англ. granulocyte colony-stimulating factor) - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор роста  
HGF - (от англ. hepatocyte growth factor) - фактор роста гепатоцитов  
HIF – (от англ. hypoxia-inducible factor) – гипоксия индуцибельный фактор  
IGF - (от англ. insulin-like growth factor) - инсулиноподобный фактор роста  
IntB3 - интегрин бета-3  
LIF – (от англ. leukemia inhibitory factor) - лейкемия ингибирующий фактор  
L-PRP - (от англ. leucocyte and platelet-rich plasma) – плазма, обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами

МАРК – (от англ. mitogen-activated protein kinase) - митоген-активированная протеин киназа

RI – (от англ. resistance index ) - индекс резистентности

RIF – (от англ. reccurent implantation failure) – повторные неудачи имплантации

PI - (от англ pulsatility index) - пульсационный индекс

PDGF - (от англ. platelet-delivered growth factor) тромбоцитарный фактор роста

PPP - (от англ. platelet-poor plasma) – плазма, обедненная тромбоцитами

PR - рецептор к прогестерону

PRP – (от англ. platelet-rich plasma) – плазма, обогащенная тромбоцитами

S/D – (от англ. systolic / diastolic ratio) - систоло-диастолическое соотношение

TGF – (от англ. transforming growth factor) - трансформирующий фактор роста

VEGF - (от англ. vascular endothelial growth factor) - сосудисто-эндотелиальный фактор роста

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Edwards, R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? / R.G. Edwards // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. - N 13. – P. 887-904.
2. Thin endometrium transcriptome analysis reveals a potential mechanism of implantation failure / R. Maekawa, T. Taketani, Y. Mihara [et al.] // *Reprod. Med. Biol.* – 2017. - N 16. – P. 206-227.
3. Pathophysiologic features of «thin» endometrium / I. Miwa, H. Tamura, A. Takasaki [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2009. - N 91. – P. 998—1004.
4. Endometrial thickness affects the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in normal responders after GnRH antagonist administration / Y. Wu, X. Gao, X. Lu [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2014. - N 12. – P. 96.
5. Revel, A. Defective endometrial receptivity / A. Revel // *Fertil. Steril.* – 2012. - N 97 (5). – P. 1028-1032.
6. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers / K.E. Liu, M. Hartman, A. Hartman [ et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. - N 33 (10). – P.1883-1888.
7. Amui, J. Successful twin pregnancy in a donor oocyte recipient despite a maximum endometrial thickness in the late proliferative phase of 4 mm / J. Amui, J.H. Check, R. Cohen // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2011. - N 38. – P. 328-329.
8. Check, J.H. Live fetus following embryo transfer in a woman with diminished egg reserve whose maximal endometrial thickness was less than 4 mm / J.H. Check, R. Cohen // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2011. - N 38. - P. 330–332.
9. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: A systematic review and meta-analysis / A. Kasius, J.G. Smit, H.L. Torrance [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2014. - N 20. – P. 530-541.
10. Should we continue to measure endometrial thickness in modern-day medicine? The effect on live birth rates and birth weight / V.C. Ribeiro, S. Santos-



Ribeiro, N. De Munck [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2018. - N 36 (4). – P. 416-426.

11. Liu, K.E. Management of thin endometrium in assisted reproduction: a clinical practice guideline from the Canadian Fertility and Andrology Society / K.E. Liu, M. Hartman, A. Hartman // *Reprod. Biomed. Online.* – 2019. - N 39 (1). – P. 49-62.

12. Relationship between endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound and pregnancy after intrauterine insemination / A. Kim, J.E. Han, T.K. Yoon [et al] // *Fertil. Steril.* – 2010. – N 94. – P. 747-752.

13. Thin Endometrium Is Also Associated With Lower Clinical Pregnancy Rate in Unstimulated Menstrual Cycles: A Study Based on Natural Cycle IVF / M. Von Wolff, M. Fäh, M. Roumet [et al.] // *Front. Endocrinol.* – 2018. - N 9. – P. -776.

14. Embryo transfer strategy and therapeutic options in infertile patients with thin endometrium: a systematic review / N. Ranisavljevic, J. Raad, T. Anahory [et al] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2019. - N 36 (11). - P. 2217-2231.

15. Влияние физиотерапии на гемодинамику матки у женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием / Е.Ю. Волкова, Е.С. Силантьева, В.Н. Серов [и др.] // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2012. - № 3. – С. 50-54.

16. Low-dose aspirin and omega-3 fatty acids improve uterine artery blood flow velocity in women with recurrent miscarriage due to impaired uterine perfusion / N. Lazzarin, E. Vaquero, C. Exacoustos [et al] // *Fertil. Steril.* – 2009. - N 92. – P. 296-300.

17. Acharya, S. The use of a combination of pentoxifylline and tocopherol in women with a thin endometrium undergoing assisted conception therapies-a report of 20 cases / S. Acharya, E. Yasmin, A.H. Balen. // *Hum. Fertil. (Camb).* – 2009. – N 12 (4). – P. 198-203.

18. Влияние на эффективность ЭКО эндометриального скретчинга, назначаемого пациенткам с ультразвуковыми признаками экстремально

"тонкого" эндометрия / К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, А.А. Федоров [и др.] // Медицинский алфавит. - 2016. - № 27 (3). - С. 39-43.

19. Davar, R. Effect of adding human chorionic gonadotropin to frozen thawed embryo transfer cycles with history of thin endometrium / R. Davar, S. Miraj, M. Farid Mojtahedi // *Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd)*. – 2016. - N 14 (1). – P. 53-56.

20. Mouhayar, Y. G-CSF and stem cell therapy for the treatment of refractory thin lining in assisted reproductive technology / Y. Mouhayar, F.I. Sharara // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2017. - N 34. – P. 831-837.

21. Autologous platelet-rich plasma infusion improves clinical pregnancy rate in frozen embryo transfer cycles for women with thin endometrium / Y. Chang, J. Li, L. Wei // *Medicine*. – 2019. - N 98 (3). - P. (e14062).

22. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells from refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study / X. Santamaria, S. Cabanillas, I. Cervello [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2016. – N 31 (5). – P. 1087-1096.

23. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization / Y. Chang, J. Li, Y. Chen [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. - N 5. – P. 1286-1290.

24. Autologous Intrauterine Platelet-Rich Plasma Instillation for Suboptimal Endometrium in Frozen Embryo Transfer Cycles: a Pilot Study/ S.R. Tandulwadkar, M.V. Naralkar, A.D. Surana [et al.] // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2017. - N 10 (3). - P 208–212.

25. Platelet-rich plasma as an adjuvant in the endometrial preparation of patients with refractory endometrium / A. Molina, J. Sánchez, W. Sánchez [et al.] // *JBRA Assist. Reprod.* – 2018. – N 22 (1). – P. 42–48.

26. Human menstrual blood-derived stem cells promote the repair of impaired endometrial stromal cells by activating the p38 MAPK and AKT signaling pathways / H. Zhu, Y. Jiang, Y. Pan [et al.] // *Reprod. Biol.* – 2018. N 18. – P. 274–281.

27. Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure. A novel strategy / A.E. Tersoglio, S.

- Tersoglio, D.R. Salatino [et al.] // *JBRA Assist. Reprod.* – 2020. – N 24 (2). – P. 118-127.
28. Inhorn, M. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century / M.C. Inhorn, P. Patrizio // *Hum. Reprod. Update.* – 2015. - N 21(4). – P. 411-426.
29. Кулаков, В.И. Современные подходы к диагностике и лечению женского бесплодия / В.И. Кулаков, И.Е. Корнеева, Е.А. Калинина // *Акушерство и гинекология.* – 2002. - № 2. - С. 56-59.
30. Recurrent implantation failure: definition and management / C. Coughlan, W. Ledger, Q. Wang [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2014. - N 28(1). - P. 14-38.
31. Molecular cues to implantation / S.K. Dey, H. Lim, S.K. Das [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2004. – N 25 (3). – P. 341-373.
32. Ovarian response is a better predictor of clinical pregnancy rate following embryo transfer than is thin endometrium or presence of an endometrioma / M.A. Coelho Neto, W.P. Martins, M.L.S. Lima [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2015. - N 46. – P. 501-505.
33. Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology / W. Amir, B. Micha, H. Ariel [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. - N 87. – P. 799-804.
34. A retrospective cross-sectional study: fresh cycle endometrial thickness is a sensitive predictor of inadequate endometrial thickness in frozen embryo transfer cycles / P.T. Jimenez, S.B. Schon, R.R. Odem [et al.] // *Reprod. Biol. and Endocrin.* – 2013. - N 11. – P. 35.
35. Кулаков, В.И. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / В.И. Кулаков, Б.В. Леонов, Л.Н. Кузьмичев. - М.: Медицинское информационное агенство, 2005. – С. 373-384.
36. Ginsburg, E.S. *In Vitro Fertilization: A comprehensive guide* / E.S. Ginsburg, C. Racowsky (eds). - NY: Springer + Business Media. – 2012.

37. Thin unresponsive endometrium – a possible complication of surgical curettage compromising ART outcome / Y. Shufaro, A. Simon, N. Laufer [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008. - N 25. – P. 421-425.
38. Evaluation of cycle-to-cycle variation of endometrial responsiveness using transvaginal sonography in women undergoing assisted reproduction / G.S. Basir, W.S. O, W.W. So [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2002. - N 19 (5). – P. 484-489.
39. Dix, E. Successful pregnancies following embryo transfer despite very thin late proliferative endometrium / E. Dix, J.H. Check // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* - 2010. - Vol.37 N1. - P.15-16.
40. Very thin endometrial in the late proliferative phase is more associated with poor pregnancy rates following controlled ovarian hyperstimulation than graduated estradiol regimens used for frozen embryo transfer / J.H. Check, R. Cohen, C. Wilson [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2014. – N 101. – P. e21.
41. Endometrial thickness in women undergoing IUI with ovarian stimulation. How thick is too thin? A systematic review and meta-analysis / N.S. Weiss, M.N. van Vliet, J. Limpens [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2017. – N 32. – P. 1009–1018.
42. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: a retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst / T. Zhang, Z. Li, X. Ren [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. - 2018. - N 97 (4). – P. e9689.
43. Song, J. Endometrial but not Ovarian Response is Associated With Clinical Outcomes and can be Improved by Prolonged Pituitary Downregulation in Patients With Thin and Medium Endometrium / J. Song, X. Sun, K. Qian // *Reprod. Sci.* – 2019. – N 26 (11). – P. 1409-1416.
44. Outcome of assisted reproduction treatment in patients with endometrial thickness less than 7 mm / B. Kumbak, H.F. Erden, S. Tosun [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. - N 18. – P. 79-84.

45. Mouhayar, Y. Obstetrical complications of thin endometrium in assisted reproductive technologies: a systematic review / Y. Mouhayar, J.M. Franasiak, F.I. Sharara // *J. of Assist. Reprod. and Gen.* – 2019. – N 36 (4). – P. 607-611.
46. Endometrial thickness as a predictor of pregnancy outcomes in 10787 fresh IVF-ICSI cycles / X. Yuan, S.H. Saravelos, Q. Wang [et al.] // *Reprod. BioMed. Online.* - 2016. – N 33. – P. 197–205.
47. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles with morphological good-quality blastocyst: A retrospective cohort study / W. Yang, T. Zhang, Z. Li [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – N 97 (2). – P. e9577.
48. Letur-Konirsch, H. Successful pregnancies after combined pentoxifylline-tocopherol treatment in women with premature ovarian failure who are resistant to hormone replacement therapy / H. Letur-Konirsch, S. Delanian // *Fertil. Steril.* – 2003. – N 79 (2). - P. 439-441.
49. Gargett, C. Endometrial reconstruction from stem cells / C.E. Gargett, L. Ye // *Fertil. Steril.* – 2012. - N 98. – P. 11-20.
50. Tchente, N. Syndrome d'Asherman. Prise en charge après curetage suite à une rétention placentaire post-natale et revue de la littérature [Asherman's syndrome: management after curettage following a postnatal placental retention and literature review] / N.C. Tchente, G. Brichant, M. Nisolle // *Rev. Med. Liege.* – 2018. – N 73 (10). – P. 508-512.
51. Chronic endometritis and infertility / H. J. Park, Y.S. Kim, T. K. Yoon [et al.] // *Clin. Exp. Reorod. Med.* – 2016. - N 43 (4). –P. 185-192.
52. Тапильская, Н. И. Скрытые причины репродуктивных неудач. Вирусные инфекции в развитии хронического эндометрита / Н. И. Тапильская, А. М. Гзгзян, И. Ю. Коган // *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак.* – 2019. – № 4 (59). – С. 118–124.

53. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization / E.B. Johnston-MacAnanny, J. Hartnett, L.L. Engmann [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. - N 93. – P. 437– 441.
54. The reliability of the histological diagnosis of endometritis in asymptomatic IVF cases: a multicenter observer study / J.C. Kaisus, F.J. Broekmans, D.M. Sie-Go [et al.] // *Human. Reprod.* – 2012. - N 27. – P. 153-158.
55. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome / J.C. Kasius, H.M. Fatemi, C. Bourgain [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. - N 96 (6). – P. 1451-1456.
56. Haritha, S. Follicular growth, endometrial thickness, and serum estradiol levels in spontaneous and clomiphene citrate-induced cycles / S. Haritha, G. Rajagopalan // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 2003. – N 81 (3). – P. 287-292.
57. Casper, R.F. It's time to pay attention to the endometrium / R.F. Casper // *Fertil. Steril.* – 2011. - N 96 (3). – P. 519-521.
58. Боярский, К.Ю. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ (обзор литературы) / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков, Н.А. Пальченко // *Проблемы репродукции.* – 2013. - № 4. – С. 51-60.
59. Yuan, R. A study on the estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphism and its expression in thin endometrium of unknown etiology / R. Yuan and A.W. Le // *Gynecol. Obstet. Invest.* - 2012. - N 74. – P. 13-20.
60. Association of the estrogen receptor- $\beta$  gene RsaI and AluI polymorphisms with human idiopathic thin endometrium / A.W. Le, Z.H. Wang, R. Yuan [et al.] // *Genet. Mol. Res.* - 2013. - N 12. – P. 5978-5985.
61. Rossman, I. The injection of the blood vascular system of the uterus / I. Rossman, G.W. Bartelmez // *Anat. Rec.* – 1957. - N 128. – P. 223-231.
62. Catt, J.W. Toxic effects of oxygen on human embryo development / J.W. Catt, M. Henman // *Hum. Reprod.* – 2000. - N 15 (2). – P. 199-206.
63. Macklon, N.S. The human endometrium as a sensor of embryo quality / N.S. Macklon, J.J. Brosens // *Biol. Reprod.* – 2014. – N 91 (4). – P. 98.

64. Makker, A. Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility / A. Makker, M.M. Singh. // *Med. Res. Rev.* -2006. – N 26 (6). P. - 699-746.
65. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / L. Craciunas, I. Gallos, J. Chu [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2019. – N 25 (2). – P. 202-223.
66. Check, J.H. The importance of sonographic endometrial parameters in influencing success following embryo transfer in the modern era and therapeutic options-part 1: the importance of late proliferative phase endometrial thickness / J.H. Check // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2011. – N 38 (3). – P.197-200.
67. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome? / L.T. Merce, M.J. Barco, S. Bau [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. - N 89. – P. 111-117.
68. Ng, E.H. Endometrial and subendometrial vascularity are significantly lower in patients with endometrial volume 2.5 ml or less / E.H. Ng, W.S. Yeung, P.C. Ho. // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – N 18 (2). – P. 262-268.
69. Mahajan, N. Endometrial receptivity array: clinical application / N. Mahajan // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2015. - N. – 8 (3). – P. 121–129.
70. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study / S.L. Chen, F.R. Wu, C. Luo [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2010. - N 24. – P. 30.
71. The changing pattern of uterine contractions before and after fresh embryo transfer and its relation to clinical outcome / C.H. Chung, A.W. Wong, C.P. Chan [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2017. - N 34 (3). – P. 240-247.
72. Uterine peristalsis before embryo transfer affects the chance of clinical pregnancy in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles / L. Zhu, H.S. Che, L. Xiao [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – N 29 (6). – P. 1238-1243.
73. Pierson, R. Personal Communication / R. Pierson // - 2018.

74. Follicular and luteal phase endometrial thickness and echogenic pattern and pregnancy outcome in oocyte donation cycles / M.A. Barker, L.M. Boehnlein, P. Kovacs [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2009. - N 26. – P. 243-249.
75. Delisle, M.F. Measurement of endometrial thickness with transvaginal ultrasonography: is it reproducible? / M.F. Delisle, M. Villeneuve, M. Boulvain // *J. Ultrasound Med.* – 1998. – N 17 (8). – P. 481-486.
76. Yaman, C. Three-dimensional ultrasound as a predictor of pregnancy in patients undergoing ART / C. Yaman, R. Mayer // *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* - 2012. – N 13 (2). – P. 128-134.
77. Alcázar, J.L. Three-dimensional ultrasound assessment of endometrial receptivity: a review / J.L. Alcázar // *Reprod. Biol. Endocrin.* – 2006. – N 4. – P. 56.
78. Кирющенко, П.А. Принципы подготовки к беременности женщин с синдромом привычной потери беременности в I триместре / П.А. Кирющенко, Д.М. Белоусов, М.С. Алексеева // *Consilium Medicum.* – 2005. - № 7 - С. 566-569.
79. Cycle-to-cycle variation in utero-ovarian hemodynamic indices in ovarian stimulation cycles of the same women and its effects on the outcome of assisted reproduction treatment / G.S. Basir, T.P. Lam, W.S. O [et al.] // *Fertil. Steril.* - 2002. - N 78. – P. 1055-1060.
80. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / L.W. Chien, H.K. Au, P.L. Chen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – N 78 (2). – P. 245-251.
81. Subendometrial resistance and pulsatility index assessment of endometrial receptivity in assisted reproductive technology cycles / R. Silva Martins, A. Helio Oliani, D. Vaz Oliani [et al.] // *Reprod. Biol. and Endocrin.* – 2019. - N 17. – P. 62.
82. The human endometrium as a fertility-determining factor / T. Strowitzki, A. Germeyer, R. Popovici [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2006. – N 12 (5). – P. 617-630.
83. Measurement of endometrial and uterine vascularity by transvaginal ultrasonography in predicting pregnancy outcome during frozen-thawed embryo



transfer cycles / J.B. Son, J.E. Jeong, J.K. Joo [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2014. – N 40 (6). – P.1661-1667.

84. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy / N. Sugino, S. Kashida, A. Karube-Harada [et al.] // Reproduction. – 2002. – N 123. – P. 379-387.

85. Two protocols to treat thin endometrium with granulocyte colonystimulating factor during frozen embryo transfer cycles / B. Xu, Q. Zhang, J. Hao [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2015. - N 30. – P. 349-358.

86. Савельева, Г.М. Гистероскопия: атлас и руководство / Г.М. Савельева, В.Г. Бреусенко, Л.М. Каппушева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - С. 43-44.

87. Inafuku, K. Hysteroscopy in mid-luteal phase of human endometrium evaluation of functional aspect of the endometrium / K. Inafuku // Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. – 1992. - N 44. – P. 79–83.

88. Hysteroscopic appearance of midsecretory endometrium in relation to pinopodes expression and the reproductive outcome in infertile women / S. Li, P. Pan, S. Yao [et al.] // J. Reprod. Contracept. – 2010. - N 21. – P. 17–26.

89. The hysteroscopic view of infertility: the mid-secretory endometrium and treatment success towards pregnancy / A. Santi, R. Felser, N.A. Bersinger [et al.] // Gynecol. Surg. – 2012. – N 9. – P. 147–150.

90. Rock, J. Biopsy studies of human endometrium: criteria of dating and information about amenorrhea, menorrhagia, and time of ovulation / J. Rock, M.K. Bartlett // J. Am. Med. Assoc. – 1937. - N 108 (24). – P. 2022-2028.

91. Quinn, C.E. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity / C.E. Quinn, R.F. Casper // Hum. Reprod. Update. – 2009. - N 15. – P. 229-236.

92. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium / L. Aghajanova, A. Stavreus-Evers, Y. Nikas [et al.] // Fertil. Steril. – 2003. – N 79 (1). – P. 808-814.

93. Quinn, C.E. Pinopodes are present in *Lif* null and *Hoxa10* null mice / C.E. Quinn, J. Detmar, R.F. Casper // *Fertil. Steril.* – 2007. - N 88 (4). – P. 1021-1028.
94. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro / U. Bentin-Ley, A. Sjogren, L. Nilsson [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1999. - N 14. – P. 515-520.
95. Secretary role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF / M. Kabir-Salmani, H. Nikzad, S. Shiokawa [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2005. – N 11 (8). – P. 553-559.
96. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles / X.Y. Jin, L.J. Zhao, D.H. Luo [et al.] // *Hum. Reprod.* 2017. – N 32 (12). – P. 2394-2403.
97. Molecular and morphological aspects of endometrial receptivity disorders at chronic endometritis / E.A. Kogan, T.A. Demura, V. Vodianoï [et al.] // *Arkh. Patol.* – 2012. – N 74 (3). – P. 15-17.
98. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window / C. Quinn, E. Ryan, E.A. Claessens [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. - N 87. – P. 1015-1021.
99. Львова, А.В. Эффективность лечения «тонкого» эндометрия при маточной форме бесплодия и невынашивания беременности / А.В. Львова // Дисс. канд. мед. наук. - М. - 2018.
100. Kimber, S.J. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology / S.J. Kimber // *Reproduction.* – 2005. – N 130 (2). – P. 131-145.
101. The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures / M. Wu, Y. Yin, M. Zhao [et al.] // *Cytokine.* – 2013/ - N 62 (2). – P. 334-339.
102. Insufficient angiogenesis: cause of abnormally thin endometrium in subfertile patients? / J. Alfer, L. Happel, R. Dittrich [et al.] // *Geburtsh Frauenheilk.* – 2017. - N 77. – P. 756-764.

103. Disturbances in the LIF pathway in the endometrium among women with unexplained infertility / L. Aghajanova, S. Altmäe, K. Bjuresten [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2009. – N 91 (6). – P. 2602-2610.
104. Mariee, N. Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells / N. Mariee, T.C. Li, S.M. Laird // *Hum. Reprod.* – 2012. – N 27 (7). – P. 1946-1954.
105. Aghajanova, L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation / L. Aghajanova // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2004. – N 1034. – P. 176-183.
106. Human endometrial leukemia inhibitory factor and interleukin-6: control of secretion by transforming growth factor-beta-related members / S. Perrier d'Hauterive, C. Charlet-Renard, M. Dubois [et al.] // *Neuroimmunomodulation.* – 2005. – N 12 (3). – P. 157-163.
107. Wetendorf, M. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network / M. Wetendorf, F.J. DeMayo // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – N 357 (1-2). – P. 108-118.
108. Принципы индивидуальной гормональной подготовки эндометрия у пациенток с неэффективными попытками ЭКО / Е.В. Дюжева, Е.А. Коган, Е.А. Калинина [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2011. - № 7-2. С. 39-45.
109. Abnormal expression of estrogen receptor is associated with thin endometrium / M. Gao, C. Cao, X. Zhang [et al.] // *Gyn. Endocr.* – 2019. – N 35 (6). – P. 544-547.
110. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy / K.G. Pringle, K.L. Kind, A.N. Sferruzzi-Perri [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – N 16 (4). – P. 415-431.
111. Dunwoodie, S.L. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo / S.L. Dunwoodie // *Dev. Cell.* – 2009. – N 17 (6). – P. 755-773.

112. Mechanism of Hypoxia Inducing factor-1 $\alpha$  in Low Endometrial Receptivity / B.F. Xu, X.X. Sun, Y. [et al.] // *Feng. Zhonghua. Fu Chan. Ke. Za. Zhi.* - 2011. – N 46 (5). – P. 355-359.
113. PI3K, AKT, and P-AKT levels in thin endometrium / A.W. Le, L.L. Shan, X.Y. Dai [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2016. - N 15 (1).
114. Endomucin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration, growth, and morphogenesis by modulating VEGFR2 signaling / C. Park-Windhol, Y.S. Ng, J. Yang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. - N 7 (1). – P. 17138.
115. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature / P. Díaz-Gimeno, J.A. Horcajadas, J.A. Martínez-Conejero [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – N 95 (1). – P. 50–60.
116. Recent advances in understanding endometrial receptivity: molecular basis and clinical applications / C. Von Grothusen, S. Lalitkumar, N.R. Boggavarapu [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2014. – N 72 (2). – P. 148-157.
117. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity / P. Díaz-Gimeno, M. Ruiz-Alonso, D. Blesa [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – N 99 (2). – P. 508–517.
118. 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.] // *Reprod. Med. Biol.* – 2017. – N 16 (3). – P. 290-296.
119. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan, A. Kan, J. Hitkari [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – N 35 (4). – P. 683-692.
120. Endometrial Receptivity Analysis - a tool to increase an implantation rate in assisted reproduction. Endometrial Receptivity Analysis / L. Hromadová, I. Tokareva, K. Veselá [et al.] // *Ceska. Gynekol.* – 2019. – N 84 (3). – P. 177-183.
121. Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? / R. Bassil, R. Casper, N. Samara [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – N 35 (7). – P. 1301-1305.

122. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis / M. Enciso, J.P. Carrascosa, J. Sarasa [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. – N 33 (2). – P. 220-228.
123. Применение эстрогенов в программах ВРТ. Научно-практические рекомендации. РАРЧ. 2015г.
124. Estrogen and progesterone regulation of cell proliferation in the endometrium of muridae and humans. *The Endometrium.* / W. Tong, A. Niklaus, L. Zhu [et al.] // *Molecular, cellular, and clinical perspectives.* 2nd ed. London: Informa Healthcare. - 2008. – P. 99–122.
125. Estrogen rapidly activates the PI3K/AKT pathway and hypoxia-inducible factor 1 and induces vascular endothelial growth factor A expression in luminal epithelial cells of the rat uterus / A.A. Kazi, K.H. Molitoris and R.D. Koos // *Biol. Reprod.* - 2009. - N 81. – P. 378-387.
126. Результаты программ ЭКО с донорскими ооцитами у пациенток с ультразвуковыми признаками «тонкого» эндометрия / К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, Н.И. Сесина [и др.] // *Медицинский алфавит* – 2017. - № 12 (1). - С. 34-38.
127. Estradiol supplementation during the luteal phase in poor responder patients undergoing in vitro fertilization: a randomized clinical trial / M. Aghahosseini, A. Aleyassin, S. Khodaverdi // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2011. – N 28. – P. 785-790.
128. Vaginal versus oral E2 administration: effects on endometrial thickness, uterine perfusion, and contractility / R. Fanchin, C. Righini, L.M. Schonauer [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2001. - N 76. – P. 994-998.
129. Comparison between oral and vaginal estrogen usage in inadequate endometrial patients for frozen-thawed blastocysts transfer / X. Liao, Z. Li, X. Dong [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – N 7 (10). – P. 6992-6997.
130. Vagifem is superior to vaginal Premarin in induction of endometrial thickness in the frozen-thawed cycle patients with refractory endometria: A randomized clinical

trial / J. Zolghadri, H. Haghbin, N. Dadras [et al.] // Iran J. Reprod. Med. – 2014. – N 12 (6). – P. 415-420.

131. Пономаренко, Г.Н. Физиотерапия в репродуктивной гинекологии / Г.Н. Пономаренко, Е.С. Силантьева, Е.Ф. Кондрина // Г.Н.– СПб.: ИИЦ ВМА. - 2008. – С. 118.

132. Гемодинамические аспекты импульсной электротерапии у больных хроническим эндометритом / В.Н. Серов, Е.С. Силантьева, О.Л. Шишканова [и др.] // Журнал РОАГ. – 2006. № 3.

133. Плясунова, М.П. Восстановление морфофункционального состояния эндометрия после повторных неразвивающихся беременностей / М.П. Плясунова // Дисс. канд. мед. наук. М. - 2018.

134. Новые возможности подготовки эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий / К.У. Алиева, Л.Н. Кузьмичева, В.Ю. Смольникова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. - 2007. - Т 14. - № 3. - С. 6-8.

135. Методы физиотерапии в предгестационной подготовке эндометрия / В.Н. Серов, Е.С. Силантьева, Г.Н. Пономаренко [и др.] // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2007. - № 2. – С. 21-26.

136. Новый способ прегравидарной подготовки «тонкого» эндометрия – альтернатива гормональному лечению / Шнейдерман М.Г., Левков Л.А., Калинина Е.А. [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. - № 1. – С. 51-57.

137. Mouhayar, Y. Modern management of thin lining / Y. Mouhayar, F. Sharara // Middle East Fertil. Soc. J. – 2017. - N 22. – P. 1-12.

138. Neuromuscular electrical stimulation and biofeedback therapy may improve endometrial growth for patients with thin endometrium during frozen-thawed embryo transfer: a preliminary report / M.M. Bodbossou-Djobo, C. Zheng, S. Chen [et al.] // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2011. – N 9. – P. 122.

139. Acupuncture in improving endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / Y. Zhong, F. Zeng, W. Liu [et al.] // BMC Complement Altern. Med. 2019. – N 19 (1). – P. 61.

140. Low-dose aspirin for infertile women with thin endometrium receiving intrauterine insemination: a prospective, randomized study / Y.Y. Hsieh, H.D. Tsai, C.C. Chang [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2000. – N 17 (3). – P. 174-177.
141. Effect of sildenafil citrate on endometrial preparation and outcome of frozenthawed embryo transfer cycles: a randomized clinical trial / R. Dehghani Firouzabadi, R. Davar, F. Hojjat [et al.] // *Iran J. Reprod. Med.* – 2013. – N 11. – P. 151–158.
142. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium / A. Takasaki, H. Tamura, I. Miwa [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. - N 93. – P. 1851-1858.
143. Potdar, N. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis / N. Potdar, T. Gelbaya, L.G. Nardo // *Reprod. Biomed. Online.* - 2012. - N 25 (6). – P. 561-571.
144. Granot, I. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome / I. Granot, Y. Gnainsky, N. Dekel // *Reproduction.* – 2012. - N 144 (6). – P. 661-668.
145. Follicular HCG endometrium priming for IVF patients experiencing resisting thin endometrium. A proof of concept study / E.G. Papanikolaou, D. Kyrou, G. Zervakakou [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. - N 30. - P 1341-1345.
146. Luteal phase support with GnRH-a improves implantation and pregnancy rates in IVF cycles with endometrium of / H. Qublan, Z. Amarin, M. Al-Qudah [et al.] // *Hum. Fertil. (Camb).* – 2008. – N 11 (1). – P. 43-47.
147. The Effect of Tamoxifen on Thin Endometrium in Patients Undergoing Frozen–Thawed Embryo Transfer / H. Ke, J. Jiang, M. Xia [et al.] // *Reproductive Sciences.* – 2018. - N 25 (6). – P. 861–866.
148. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium / N. Cui, A.-M. Li, Z.-Y. Luo [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation.* – 2019. - N 42. – P. 27–35.

149. Influence of growth hormone supplementation in patients with thin endometrium undergoing frozen embryo transfer / J.-Y. Yang, H. Li, N. Lu [et al.] // *Reprod. Dev. Med.* – 2019. - N 3. – P. 49–53.
150. Collagen-binding basic fibroblast growth factor improves functional remodeling of scarred endometrium in uterine infertile women: a pilot study / P. Jiang, X. Tang, H. Wang [et al.] // *China Life Sci.* – 2019. - N 62. – P. 1617–1629.
151. Li, J. The effect of G-CSF on infertile women undergoing IVF treatment: A meta-analysis / J. Li, S. Mo, Y. Chen // *Systems Biology in Reproductive Medicine.* – 2017. - N 63 (4). – P. 239-247.
152. Granulocyte colony stimulating factor treatment of resistant thin endometrium in women with frozen-thawed blastocyst transfer / M. Kunicki, K. Łukaszuk, J. Liss [et al.] // *J. Syst. Biol. in Reprod. Med.* – 2017. - N 63 (1). – P. 49-57.
153. Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Persistent Thin Endometrium in Frozen Embryo Transfer Cycles / V.V. Mishra, S. Choudhary, U. Sharma [et al.] // *J. Obstet. Gynecol. India.* – 2016. - N 66. – P. 407–411.
154. Therapeutic role of granulocyte colony-stimulating factor for infertile women under in vitro fertilization and embryo transfer treatment: a meta-analysis / L. Zhang, W. Xu, X. Fu [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics.* – 2018. – N 298. – P. 861–871.
155. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome in randomized controlled clinical trials of cancer chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor: a systematic review / G.H. Lyman, D.C. Dale, D.A. Wolff [et al.] // *J. Clin. Oncol.* - 2010. - N 28. – P. 2914–2924.
156. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors / P.R. Amable, R.B.V. Carias, M.V.T. Teixeira [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. - N 4 (3). – P. 67.
157. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices / J. Magalon, A.L. Chateau, B. Bertrand [et al.] // *BMJ Open Sport Exerc. Med.* – 2016. – N 2. – P. e000060.



158. Ehrenfest, D. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D. Ehrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson // *Trends Biotechnol.* – 2009. – N 27. – P. 158–167.
159. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? / R.E. Marx // *Implant. Dent.* – 2001. - N 10. – P. 225-228.
160. Applications and efficacy of plateletrich plasma in dermatology: a clinical review / M. Zhang, G. Park, B. Zhou J [et al.] // *Cosm. Dermat.* – 2018. – N 17. – P 660–665.
161. Samadi, P. The use of platelet-rich plasma in aesthetic and regenerative medicine: a comprehensive review / P. Samadi, M. Sheykhhasan, H.M. Khoshinani // *Aesthetic Plast. Surg.* – 2019. – N 43. – P. 803–814.
162. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition via HGF / P. Bendinelli, E. Matteucci, G. Dogliotti [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2010. – N 225. – P. 757–766.
163. Dawood, A.S. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: an appraisal of theory and practice / A.S. Dawood, H.A. Salem // *Clin. Exp. Reprod. Med.* – 2018. – N 45. – P. 67–74.
164. Urman, B. Platelet-rich plasma another add-on treatment getting out of hand? How can clinicians preserve the best interest of their patients? / B. Urman, A. Boza, B. Balaban // *Hum. Reprod.* – 2019. – N 34 (11). – P. 2099-2103.
165. Effects of autologous platelet-rich plasma on endometrial expansion in patients undergoing frozen-thawed embryo transfer: A double-blind RCT / L. Nazari, S. Salehpour, S. Hoseini [et al.] // *Int. J. Reprod. BioMed.* – 2019. – N 17. – P. 443–448.
166. Can autologous platelet rich plasma expand endometrial thickness and improve pregnancy rate during frozen-thawed embryo transfer cycle? A randomized clinical trial / M. Eftekhar, N. Neghab, E. Naghshineh [et al.] // *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.* - 2018. – N 57 (6). – P. 810-813.
167. Intrauterine infusion of autologous platelet-rich plasma in women undergoing assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis / A. Maleki-Hajiagha,

M. Razavi, S. Rouholamin [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2020. – N. 137. – P. 103078.

168. Effects of platelet-rich plasma on the activity of human menstrual blood-derived stromal cells in vitro / S. Zhang, P. Li, Z. Yuan [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy.* – 2018. – N 9. – P 48.

169. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration / L. Aghajanova, S. Houshdaran, S. Balayan [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* – 2018. – N 35. – P. 757-770.

170. Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: A pilot study / L. Nazari, S. Salehpour, S. Hoseini [et al.] // *Int. J. Reprod. Biomed.* – 2016. – N 14 (10). – P. 625-628.

171. Investigation of platelet-rich plasma in increasing proliferation and migration of endometrial mesenchymal stem cells and improving pregnancy outcome of patients with thin endometrium / X. Wang, L. Liu, Sh. Mou [et al.] // *J. Cell Biochem.* - 2018. – P. 1-9.

172. Gargett, C.E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells / C.E. Gargett, R.W. Chan, K.E. Schwab // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2008. – N 288 (1–2). – P. 22–29.

173. Regulation of proliferation, motility, and contractility of human endometrial stromal cells by platelet-derived growth factor / H. Matsumoto, K. Nasu, M. Nishida [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – N 90 (6). – P. 3560–3567.

174. Effects of platelet-rich plasma on mesenchymal stem cells isolated from rat uterus / P. Vishnyakova, D. Artemova, A. Elchaninov, Z. Efendieva [et al.] // *PeerJ.* - 2020. – N 8. – P. e10415.

175. Chan, R. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells / R. W. S. Chan, K. E. Schwab, C. E. Gargett // *Biol. Reprod.* – 2004. – N 70 (6). – P. 1738–1750.

176. Endometrial side population cells: potential adult stem/progenitor cells in endometrium / H. Masuda, T. Maruyama, C.E. Gargett [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2015. – N 93 (4). – P. 84.

177. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays / H.P.T. Nguyen, L. Xiao, J.A. Deane [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2017. – N 32 (11). – P. 2254-2268.
178. Gargett, C.E. Adult stem cells in the endometrium / C.E. Gargett, H. Masuda // *Mol. Hum. Reprod.* – 2010. – N 16 (11). – P. 818–834.
179. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium / C.E. Gargett, K.E. Schwab, R.M. Zillwood [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2009. – N 80 (6). – P. 1136–1145.
180. Stem cell therapy in Asherman syndrome and thin endometrium: Stem cellbased therapy / R. Azizi, L. Aghebati-Maleki, M. Nouri [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2018. – N 102. – P. 333–343.
181. Nagori, C.B. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome / C.B. Nagori, S.Y. Panchal, H. Patel // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2011. – N 4 (1). – P. 43–48.
182. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: a novel cell based therapy / N. Singh, S. Mohanty, T. Seth [et al.] // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2014. – N 7 (2). – P. 93.
183. Menstrual blood closely resembles the uterine immune microenvironment and is clearly distinct from peripheral blood / R.G. Van der Molen, J.H. Schutten, B. van Cranenbroek [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – N 29 (2). – P. 303-314.
184. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood / F. Rossignoli, i A. Casell, G. Grisendi [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – P. 901821.
185. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population / X. Meng, T.E. Ichim, J. Zhong [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2007. – N 5. – P. 57.
186. Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood / Y. Li, X. Li, H. Zhao [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – N 22. – P. 1147–1158.

187. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome / J. Tan, P. Li, Q. Wang [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2016. – N 31 (12). – P. 2723–2729.
188. Endometrial stem cells in regenerative medicine / J. Verdi, A. Tan, A. Shoaehassani [et al.] // *J. Biol. Eng.* – 2014. – N 8. – P. 20.
189. Infertility and surrogacy first mentioned on a 4000-year-old Assyrian clay tablet of marriage contract in Turkey / A.B. Turp, I. Guler, N. Bozkurt [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2018. – N 34 (1). – P. 25-27.
190. Surrogacy and Pregnancy / A.M. Phillips, E.F. Magann, J.R. Whittington [et al.] // *Obstet. Gynecol. Surv.* – 2019. – N 74 (9). – P. 539-545.
191. Fredriksson, L. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms / L. Fredriksson, H. Li, U. Eriksson // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004. – N 15 (4). – P. 197-204.
192. Borkham-Kamphorst, E. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis / E. Borkham-Kamphorst and R. Weiskirchen // *Cytokine and Growth Factor Reviews.* – 2016. – N 28. – P. 53–61.
193. Dhurat, R. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective / R. Dhurat, M. Sukesh // *J. Cutan. Aesthet. Surg.* - 2014. – N 7 (4). – P. 189-197.
194. Holmes, D.I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease / D.I. Holmes, I. Zachary // *Genome Biol.* – 2005. – N 6 (2). – P. 209.
195. Apte, R.S. Reducing Treatment Burden in AMD / R.S. Apte // *Cell.* – 2020. – N 180 (6). – P. 1033.
196. Matsumoto, K. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours / K. Matsumoto, E. Masatsugu // *The Journal of Biochemistry.* – 2014. – N 156 (1). – P. 1–10
197. CD146 (Cluster of Differentiation 146) / A.S. Leroyer, M.G. Blin, R. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2019. – N 39 (6). – P. 1026-1033.

198. CD90+ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA / A. Conigliaro, V. Costa, A. Lo Dico [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2015. – N 14. – P. 155.
199. Vimentin on the move: new developments in cell migration / R.A. Battaglia, S. Delic, H. Herrmann [et al.] // *F1000Res*. – 2018. – N 7. – P. 1796.
200. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review) / L. Huang, Y. Yang, F. Yang [et al.] // *Int. J. Mol. Med*. – 2018. – N 42 (4). – P. 1771-1785.
201. Scholzen, T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // *J. Cell. Physiol*. – 2000. – N 182 (3). – P. 311-322.