

На правах рукописи

**ГОХБЕРГ
Яэль Александровна**

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

3.1.4. Акушерство и гинекология

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

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

Научный руководитель:

Калинина Елена Анатольевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова Института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Тапильская Наталья Игоревна — доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» Минобрнауки России, заведующий отделом репродуктологии.

Калугина Алла Станиславовна — доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии.

Ведущая организация

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «21» ноября 2023 г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Gokhberg%20YA%20-%20disser..pdf?302706200>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета доктор
медицинских наук, профессор

Е.А. Калинина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время бесплодие остается важной медицинской и социально значимой проблемой. В Российской Федерации частота встречаемости бесплодия колеблется от 17,2 до 24,0% в различных регионах (Долгушина Н.В. и др., 2021; Краснопольская К.В. и др., 2022). Одной из главных причин отсутствия беременности в циклах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является нарушение имплантации эмбриона в полости матки. Несмотря на обширные исследования в области репродуктологии, понимание того, как взаимодействуют эмбрион и эндометрий посредством окружающей микросреды, содержащей множественные биологические молекулы, до сих пор остается неясным. Для определения рецептивности эндометрия были разработаны различные технологии, включая инструментальные и инвазивные методы исследования. Согласно последним научным данным, специфичность и/или чувствительность инструментальных методов исследования по анализу толщины, размера, структуры эндометрия, кровотока в эндометрии не позволяют достоверно оценить рецептивность эндометрия с целью прогнозирования наступления беременности в программах ВРТ (Калугина А.С. и др., 2020; Eisman L. et al., 2021; He A. et al., 2023).

Современный тренд в репродуктивной медицине — изучение роли малых некодирующих РНК (мнкРНК) в имплантации эмбрионов, среди которых наибольший интерес представляют: микроРНК и пивиРНК (Тимофеева А.В. и др., 2021; Тапильская Н.И. и др., 2021; Шамина М.А. и др., 2022; Craciunas L. et al., 2019). Использование метода транскриптомного анализа биоптата эндометрия (мРНК и микроРНК) позволило выявлять смещение окна имплантации, повысить частоту наступления беременности, особенно в группе с повторными неудачами имплантации при лечении бесплодия методами ВРТ (Tan Q. et al., 2020). Несмотря на большую

информативность и точность метода транскриптомного анализа биоптата эндометрия, его дороговизна и инвазивность является препятствием для рутинного применения в клинической практике.

Альтернативным методом оценки состояния эндометрия является исследование секрета эндометрия (маточной жидкости), аспирация которой минимально инвазивна, безопасна и может быть выполнена непосредственно перед переносом эмбрионов. Было выявлено изменение паттерна экспрессии мнкРНК секрета эндометрия в рецептивную стадию в сравнении с прорецептивной стадией секреторной фазы естественного менструального цикла и при контролируемой овариальной стимуляции (Giacomini E. et al., 2021). При этом данных по профилю мнкРНК в секрете эндометрия в циклах переноса криоэмбрионов при различных вариантах подготовки эндометрия при наступлении и отсутствии беременности до настоящего времени отсутствуют.

В связи с вышесказанным, представляется перспективным, современным и своевременным изучение молекулярно-биологических свойств эндометрия на основании экспрессии мнкРНК в циклах переноса криоэмбрионов, как модели изучения рецептивности эндометрия. Поиск дополнительного маркера рецептивности эндометрия с помощью неинвазивных методов позволит оптимизировать и персонафицировать подход и тактику лечения бесплодия методами ВРТ, чему посвящена данная диссертационная работа.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

В проведенном диссертационном исследовании представлены и научно обоснованы новые данные о неинвазивном методе аспирации секрета эндометрия для диагностики имплантационного потенциала эндометрия на основании анализа профиля экспрессии двух классов мнкРНК: микроРНК и пивиРНК. При сочетании методов глубокого секвенирования и количественной ПЦР в реальном времени был

идентифицирован ряд внеклеточных мнкРНК в секрете эндометрия в день переноса криоэмбриона, являющихся маркерами рецептивного эндометрия.

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

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

Практическая значимость

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

Разработан прототип тест-системы оценки рецептивности эндометрия по содержанию мнкРНК в секрете эндометрия в день переноса размороженного эмбриона. Тестирование модели показало высокую прогностическую значимость ($p < 0,05$ для всех входящих в модель коэффициентов).

Положения, выносимые на защиту

1. Возраст пациенток в программах ВРТ значимо коррелирует с уровнем АМГ ($p=0,0077$, $r=-0,36$), ФСГ ($p=0,002$, $r=0,47$), прогестерона в лютеиновой фазе цикла ($p=0,03$, $r=-0,29$), количеством зрелых ооцитов

($p=0,002$, $r=-0,4$), зигот ($p=0,008$, $r=-0,36$) и криоконсервированных бластоцист ($p=0,0001$, $r=-0,44$). Представленный клинический портрет обследуемых супружеских пар соответствует общему контингенту пациентов в криоциклах.

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

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

Личный вклад автора

Автор участвовал в определении темы диссертационной работы, в постановке целей и задач, в разработке дизайна настоящего исследования, а также в систематизации литературных данных по теме работы. Автор лично принимал участие в сборе клиничко-анамнестических и лабораторных данных, ведении и сопровождении пациентов на всех этапах лечения бесплодия методами ВРТ. Проводил забор секрета эндометрия для последующей обработки материала и интерпретации молекулярно-биологических данных анализа профиля экспрессии мнкРНК методом высокопроизводительного секвенирования (NGS), в том числе с применением статистической обработки данных. Диссертант

систематизировал полученные результаты и подготовил практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

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

Апробация материалов диссертации

Основные результаты исследования представлены на XXIII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2022) в докладе «Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах ВРТ»; на XXIX Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 2023) в докладе «Новые методы диагностики рецептивности эндометрия»; в конкурсе молодых ученых XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2023) в докладе «Особенности экспрессии мнкРНК в маточном аспирате при изучении рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий» (занял I место); в конкурсе молодых ученых в рамках III Научно-практической конференции с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного» (Санкт-Петербург, 2023) в докладе «Роль малых некодирующих РНК в диагностике рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий» (занял I место). Работа представлена на межклинической конференции сотрудников отделений Института репродуктивной медицины (22.06.2023) и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №8 от 26.06.2023).

Внедрение результатов исследования в практику

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

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

Структура и объем диссертации

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В диссертационной работе обследованы 102 супружеские пары, обратившиеся в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий отделением д.м.н., профессор Е.А. Калинина) для переноса размороженного эмбриона в криоцикле. Перед началом программы были подписаны информированные добровольные согласия на участие в исследовании. Критерии включения: возраст женщин от 23 до 40 лет; нормальный овариальный резерв;

нормозооспермия у партнера или мужской фактор бесплодия без выраженной патозооспермии; наличие криоконсервированного методом витрификации эмбриона от предыдущих циклов ВРТ; перенос строго одной бластоцисты морфологически хорошего качества; отсутствие патологии эндометрия и матки; отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ. Все пациенты прошли полное клинико-лабораторное и инструментальное обследование в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021) и Приказом Минздрава России от 31.07.2020 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Для решения поставленной задачи №1 ретроспективно проводили анализ клинических и эмбриологических данных в циклах ВРТ, в которых был получен эмбрион, в последующем планируемый к переносу в полость матки в криоцикле. Дизайн для решения задачи № 1 представлен на рисунке 1. Пациентки, у которых после переноса нативного эмбриона наступила беременность (n=28), были успешно родоразрешены и вернулись для проведения криоцикла.

На втором этапе проспективного исследования пациентки были разделены на две группы в зависимости от метода подготовки эндометрия в криоцикле: группа 1 (ЦГТ) — пациентки с переносом криоэмбриона на фоне циклической гормональной терапии, n=60; группа 2 (ЕЦ) — женщины с переносом криоэмбриона в естественном цикле, n=42. Дизайн исследования представлен на рисунке 2.

Для выбора оптимального протокола подготовки эндометрия, а также для исключения гинекологической патологии всем пациенткам на 2–3- день менструального цикла выполняли ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза. В случае регулярного менструального цикла и наличия овуляции использовали ЕЦ, в остальных случаях — ЦГТ.

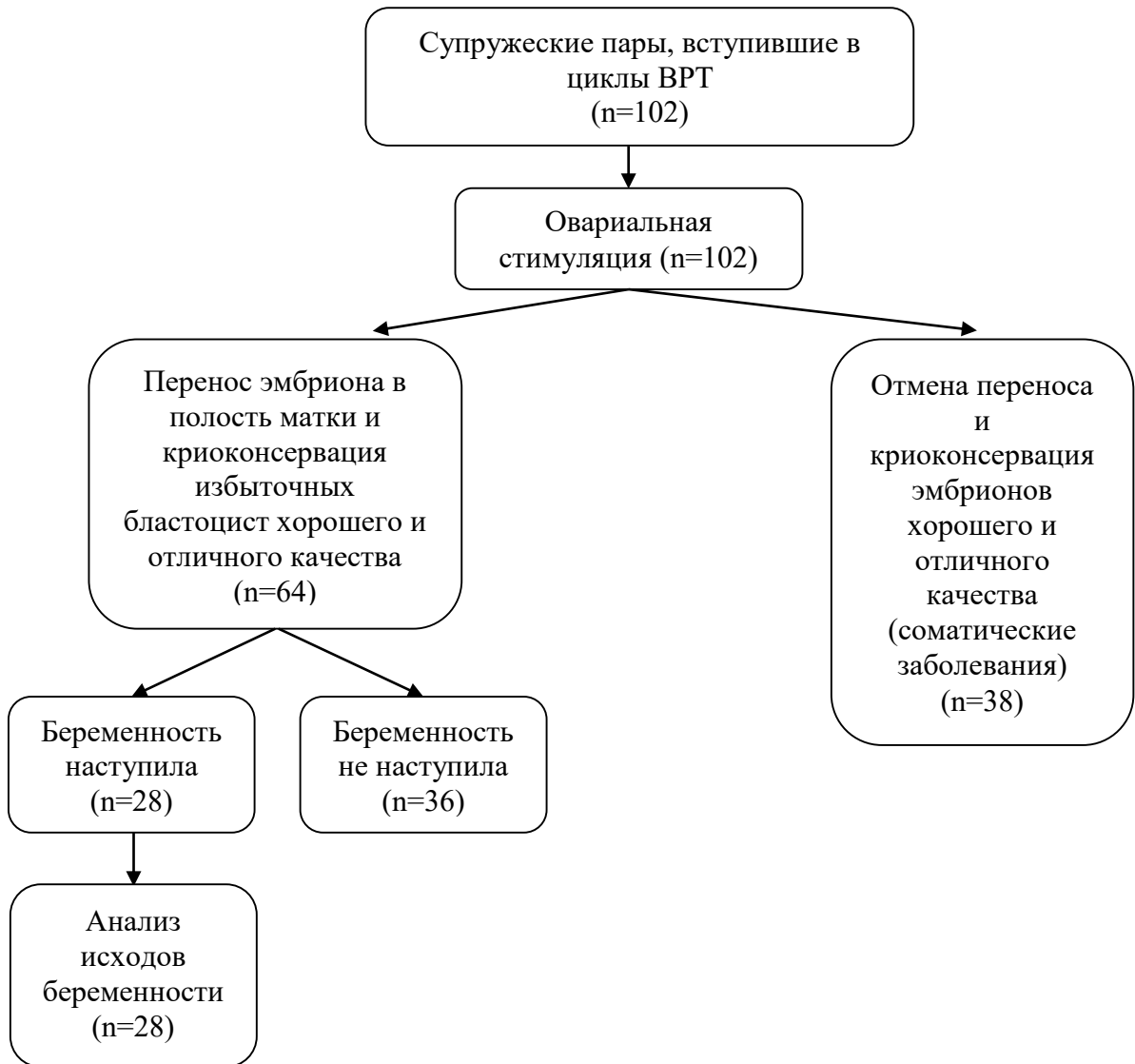


Рис. 1. Дизайн исследования для задачи № 1.

Пациенткам в криоциклах с ЦГТ, согласно инструкции к препарату, назначали эстрадиол валерат в дозировке 2 мг ежедневно до момента переноса эмбриона с корректировкой дозы при необходимости. На 15–16-й день цикла проводили трансвагинальное УЗИ и оценивали толщину и структуру эндометрия. При достижении толщины эндометрия 7–8 мм назначали микронизированный прогестерон по 200 мг 3 раза в сутки согласно инструкции производителя. В группе ЕЦ на 8–10-й день менструального цикла проводился мониторинг роста доминантного фолликула и овуляции. На 14–15-й день после подтверждения спонтанной овуляции (УЗИ или мочевого тест на овуляцию) назначали

микронизированный прогестерон по 200 мг 3 раза в сутки согласно инструкции к препарату с целью поддержания лютеиновой фазы менструального цикла и посттрансферного периода. Эмбрионы размораживали средами Kitazato (Япония) и переносили 1 бластоцисту в полость матки в асептических условиях под контролем УЗИ с помощью одноразового стерильного катетера компании СООК (Ирландия). Диагностика наступления беременности проводилась путем определения положительного результата β -ХГЧ через 14 дней после переноса. При получении данных о положительном результате β -ХГЧ на 21-й день выполняли УЗИ органов малого таза для визуализации плодного яйца в полости матки.

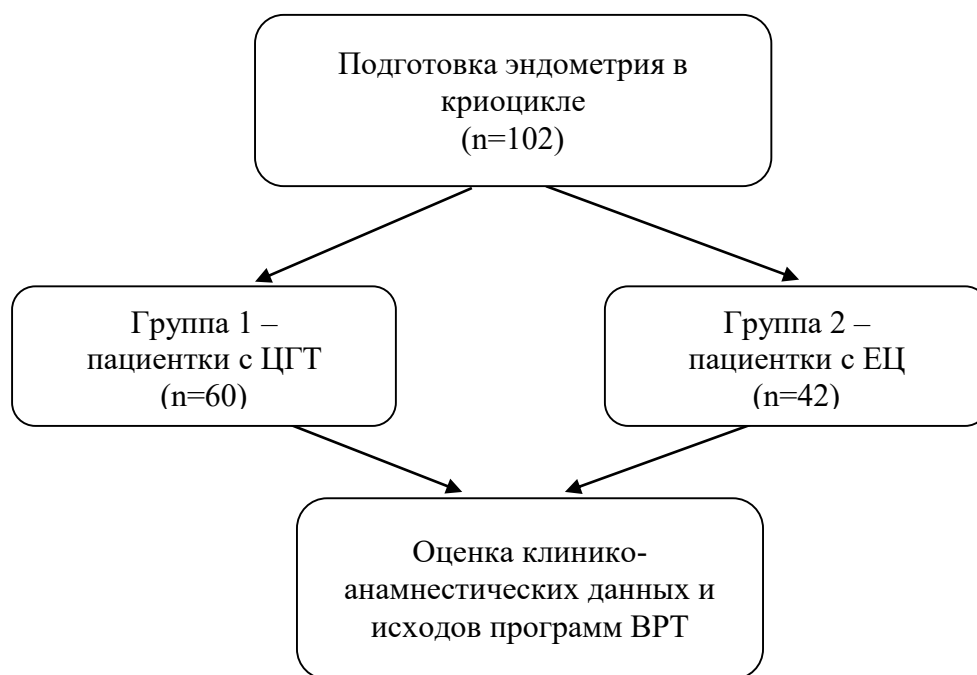


Рис. 2. Дизайн исследования для задачи № 2.

На третьем этапе работы для изучения особенностей экспрессии мнкРНК в аспирате секрета эндометрия и оценки корреляции с исходами ВРТ было проведено проспективное исследование, дизайн которого представлен на рисунке 3. Аспирация секрета эндометрия осуществлялась непосредственно перед переносом эмбриона атравматичным способом с

помощью одноразового гибкого катетера для переноса эмбрионов, соединенного со шприцем (1 мл) под УЗИ контролем. Полученный секрет эндометрия анализировали методом глубокого секвенирования колоночным способом с последующим ПЦР исследованием в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева).

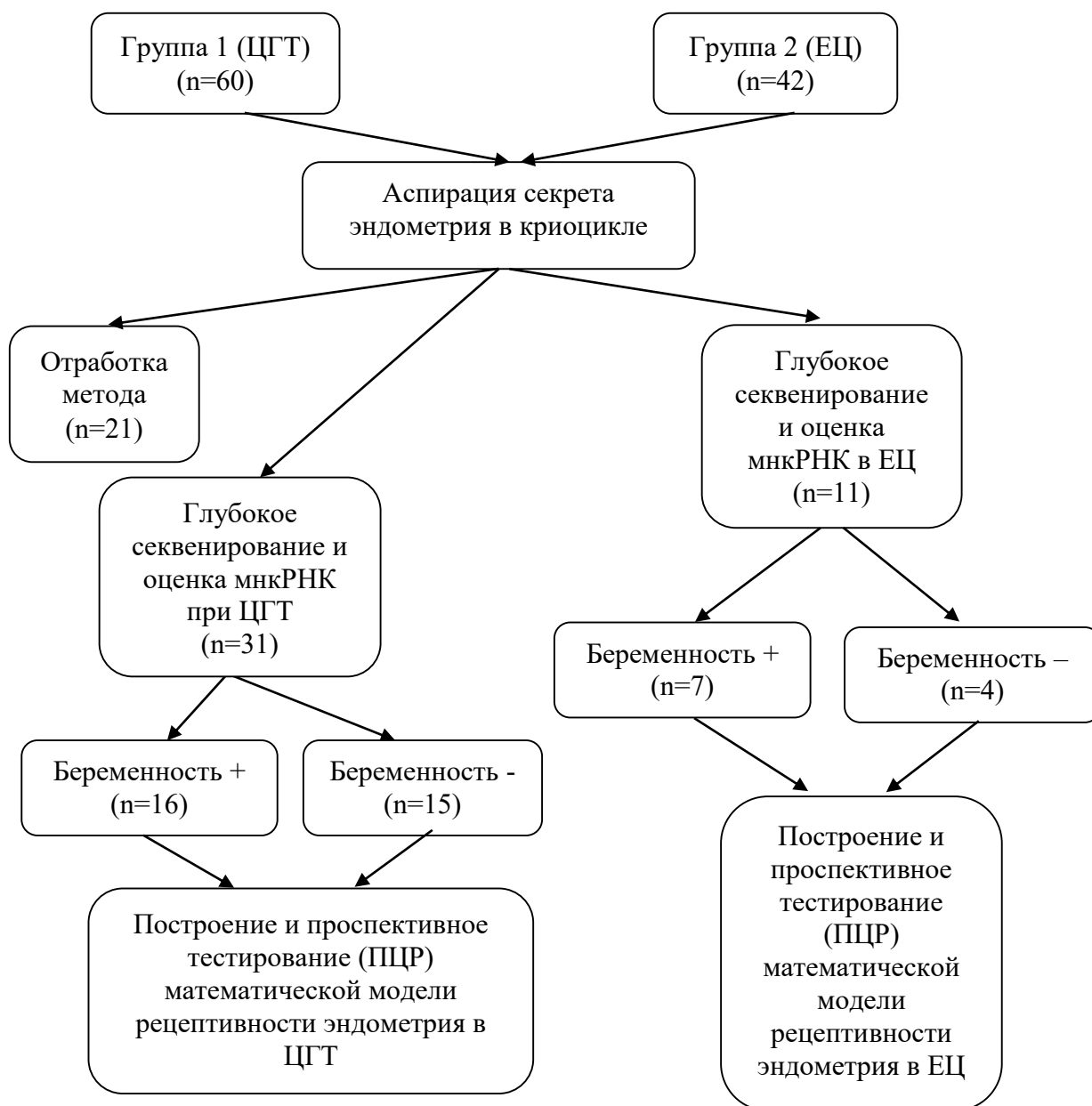


Рис. 3. Дизайн исследования для оценки эффективности криоцикла в зависимости от метода подготовки эндометрия и уровня экспрессии малых некодирующих РНК в маточном аспирате

Статистический анализ проводили с помощью теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Для сравнения категориальных данных статистический анализ проводили с помощью критерия χ^2 . Для анализа зависимости количественных признаков применяли ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Модели логистической регрессии разрабатывали с использованием программы RStudio путем поэтапного включения и исключения мнКРНК-предикторов рецептивного эндометрия в соответствии с их вкладом в модель. Прогностическую способность модели оценивали методом ROC-анализа по величине AUC, статистической значимости, уровню специфичности и чувствительности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования были проанализированы клиничко-анамнестические данные обследуемых пациенток (таблица 1). Средний возраст в группе ЦГТ составил 34 года (26–40 лет), в группе ЕЦ — 33 года (23–40 лет). По репродуктивным и антропометрическим показателям достоверных различий в группах обнаружено не было.

Таблица 1. Клиничко-анамнестические данные пациенток в исследовании

Параметры	Группа 1 (ЦГТ) (n=60)	Группа 2 (ЕЦ) (n=42)	p-уровень значимости
Возраст пациенток, лет*	34 (29,25;38)	33 (32;37)	0,836
Возраст партнеров, лет*	37,5 (33;42)	35 (32,5;40,5)	0,251
Рост, см*	165 (161;168,75)	167 (163;171)	0,093
ИМТ, кг/м ² *	22 (21;25)	21,3 (20;23)	0,089
Продолжительность бесплодия, лет*	4 (2;5)	3,5 (2,25;5)	0,933
Первичное бесплодие**	24 (40,0%)	18 (42,9%)	0,466

Вторичное бесплодие**	36 (60,0%)	24 (57,1%)	0,150
-----------------------	------------	------------	-------

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

Характеристики менструального цикла и сексуальной функции статистически значимо не отличались. У всех обследованных женщин средняя продолжительность менструального цикла была 28 дней (p=0,964), длительность составила 5 дней (p=0,627). Возраст начала половой жизни не различался в обеих группах и составил в группе ЦГТ — 18 лет (18;19), в группе ЕЦ — 19 лет (18;20), p=0,378 (таблица 2).

Таблица 2. Данные менструальной и половой функции пациенток, включенных в исследование

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

Примечание: * Me (Q1;Q3); **абс (%)

В ходе изучения репродуктивного анамнеза пациенток были оценены причины бесплодия. В группе ЦГТ изолированный трубно-перитонеальный фактор (ТПФ) встречался у 16,7% пациенток, изолированный мужской фактор (МФ) — в 60,0% случаев, сочетанный фактор бесплодия — 20,0%, бесплодие, обусловленное НГЭ — 3,3%, тогда как в группе ЕЦ — ТПФ составлял 21,4%, МФ — 61,9%, сочетанное бесплодие — 11,9%, НГЭ — 4,8% (таблица 3).

Таблица 3. Характеристика репродуктивного анамнеза у пациенток, включенных в исследование

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n=60)	Группа 2 (ЕЦ) (n=42)	p-уровень значимости
Трубно-перитонеальный фактор (ТПФ)	10 (16,7%)	9 (21,4%)	0,161
НГЭ	2 (3,3%)	2 (4,8%)	0,547
Мужской фактор (МФ)	36 (60,0%)	26 (61,9%)	0,506
Сочетанный фактор	12 (20,0%)	5 (11,9%)	0,419

Примечание: *abc (%)

При анализе гормонального фона также не было выявлено значимых различий между пациентками двух групп. Все показатели находились в рамках референсных значений (таблица 4).

Таблица 4. Характеристика гормонального статуса пациенток, включенных в исследование

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

Примечание: *Me (Q1;Q3)

Далее была проведена оценка показателей фолликулогенеза, оогенеза, эмбриогенеза и сперматогенеза в циклах овариальной стимуляции, в которых выполнена криоконсервация эмбрионов (таблица 5). Было обнаружено отсутствие статистически значимых отличий между двумя группами по таким показателям, как суммарная доза препарата, день начала стимуляции, введение триггера и непосредственно оптимальный выбор дня трансвагинальной пункции. Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5. Показатели фолликулогенеза, оогенеза, сперматогенеза и эмбриогенеза в циклах овариальной стимуляции

Параметры*	Группа 1 (ЦГТ) (n=60)	Группа 2 (ЕЦ) (n=42)	p-уровень значимости
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	1500 (1200;1875)	1350 (1087;1650)	0,089
Число полученных ооцитов в день ТВП	10 (6;15)	10 (6;16)	0,965
Количество ОКК	10 (6;15)	10 (6;16)	0,990
Количество зрелых ооцитов МП	8 (6;11)	8 (4,5;12)	0,990
Количество зигот	7 (5;10)	7 (4;10)	0,630
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл в день ТВП, млн	57 (27,25;78,75)	42 (21;65,5)	0,159
% прогрессивно подвижных сперматозоидов	47 (27,5;60)	42 (28,5;55)	0,417
% морфологически нормальных сперматозоидов	2 (2;3)	2 (1;3)	0,073

Примечание: * Me (Q1; Q3)

При последующем анализе групп пациенток в рамках проведения переноса криоконсервированного эмбриона были выявлены статистически значимые отличия параметров группы ЦГТ и группы ЕЦ по толщине эндометрия в день переноса эмбриона ($p < 0,001$) (таблица 6).

Таблица 6. Характеристика анализируемых групп при проведении переноса криоконсервированного эмбриона

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

Примечание: * Me (Q1; Q3)

При изучении исходов криопереносов в настоящем исследовании в группе ЦГТ беременность наступила у 24/60 (40,0%) пациенток, в группе ЕЦ — у 19/42 (45,2%) ($p = 0,14$). Особенности репродуктивных исходов криопереноса показаны в таблице 7.

Таблица 7. Характеристика исходов переноса размороженного эмбриона у пациенток, включенных в исследование

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

Примечание: *abc (%)

Таким образом, частота наступления беременности в криоциклах сопоставима между группами независимо от метода подготовки эндометрия.

На следующем этапе работы был выполнен корреляционный анализ клинических переменных в группе ЦГТ. Выявлена статистически значимая отрицательная направленность корреляционных связей между возрастом пациенток и уровнем АМГ ($p=0,0077$, коэффициент корреляции $r=-0,36$), прогестерона ($p=0,03$, $r=-0,29$), количеством зрелых ооцитов ($p=0,002$, $r=-0,4$), зигот ($p=0,008$, $r=-0,36$).

Выявлена статистически значимая отрицательная направленность корреляционных связей между уровнем ФСГ с уровнем АМГ ($p=0,0002$, $r=-0,48$), количеством зрелых ооцитов ($p=0,0217$, $r=-0,31$), зигот ($p=0,05$, $r=-0,26$), а также с числом криоконсервированных эмбрионов ($p=0,0026$, $r=-0,4$). Уровень АМГ отрицательно коррелирует с количеством беременностей в анамнезе ($p=0,0124$, $r=-0,34$). Мужской фактор бесплодия

отрицательно коррелирует с % морфологически нормальных сперматозоидов ($p=0,002$, $r=-0,4$) и с % прогрессивно-подвижных сперматозоидов. Количество криоконсервированных эмбрионов отрицательно коррелирует с возрастом пациенток ($p=0,0001$, $r=-0,44$), с возрастом партнеров ($p=0,0076$, $r=-0,36$), с уровнем ФСГ ($p=0,0026$, $r=-0,4$). День менструального цикла при переносе эмбриона напрямую коррелировал с продолжительностью цикла ($p=0,0457$, $r=0,27$), а толщина эндометрия в день переноса эмбриона — с уровнем прогестерона ($p=0,04$, $r=0,28$). В ходе сравнения групп пациенток с наступлением беременности и отсутствием беременности, были найдены статистически значимые отличия: по уровню прогестерона ($p<0,001$), тестостерона ($p=0,02$) и толщине эндометрия в день переноса эмбриона ($p<0,001$) (рисунок 4).

В группе ЕЦ возраст женщин, вступивших в криоперенос эмбриона, имел статистически значимую положительную направленность с уровнем ФСГ, с количеством попыток ЭКО и зрелых ооцитов в анамнезе. Уровень АМГ имел статистически значимую прямую направленность с количеством полученных ОКК, зигот, криоконсервированных эмбрионов. Также выявлена прямая корреляционная связь дня начала подготовки эндометрия с выбором оптимального дня для переноса размороженного эмбриона ($p=0,007$).

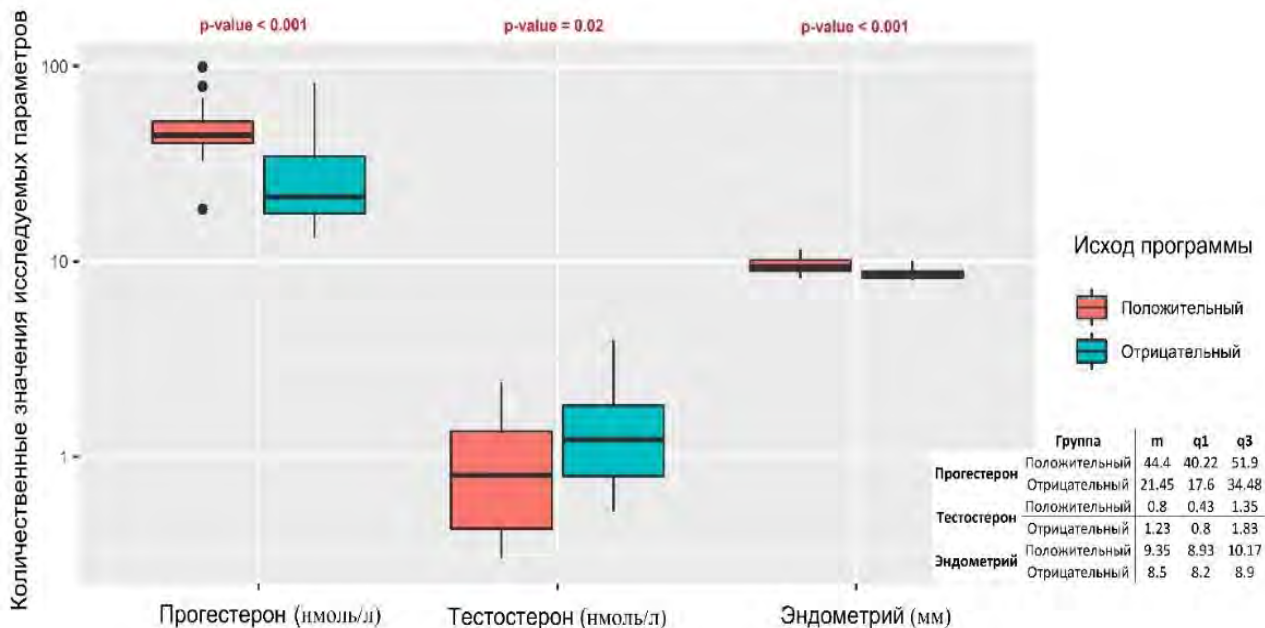


Рис. 4. Бокс-диаграмма зависимости исходов криоциклов от толщины эндометрия, базовых уровней прогестерона и тестостерона на фоне ЦГТ.

В группе ЕЦ были установлены статистически значимые отличия по уровню прогестерона между пациентками с наступившей беременностью и отрицательным результатом криопереноса ($p < 0,001$). Данные представлены на рисунке 5.

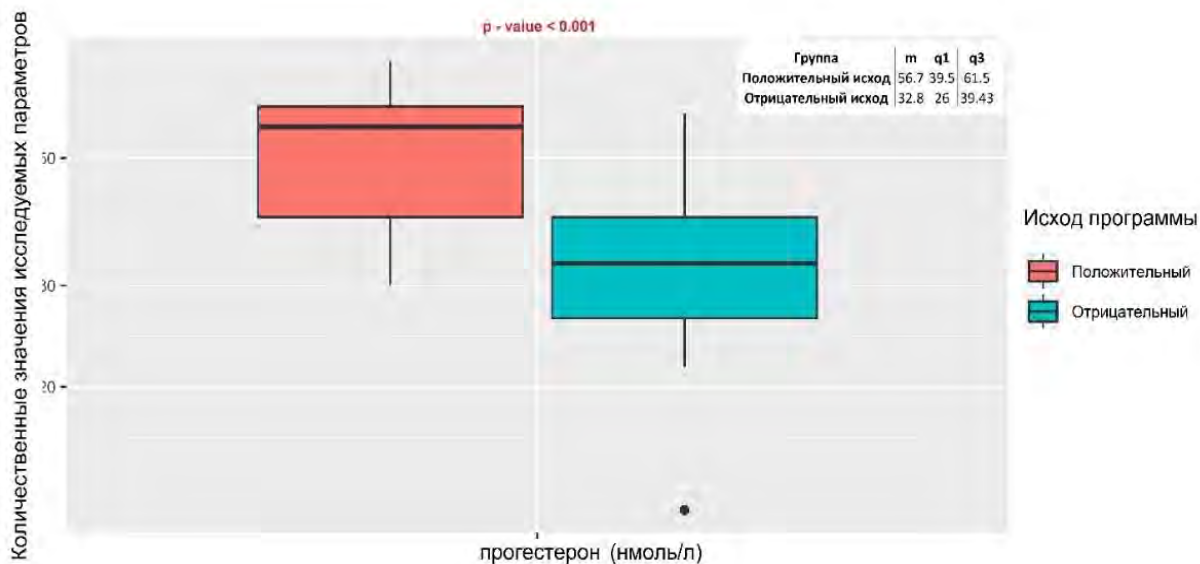


Рис. 5. Бокс-диаграмма зависимости исходов криоцикла от уровня прогестерона на фоне ЕЦ.

Таким образом, представленный клинический портрет обследованных супружеских пар соответствует общему контингенту пациентов, вступающих в криоциклы при ВРТ.

На следующем этапе исследования в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий лабораторией к.б.н. А.В. Тимофеева) методом глубокого секвенирования была проведена количественная оценка мнкРНК (микроРНК и пивиРНК) 31 образца секрета эндометрия в группе ЦГТ. У 15 женщин беременность не наступила, у 16 – беременность наступила. Было идентифицировано 289 микроРНК и 488 пивиРНК. Из данного списка мнкРНК путем поэтапного включения и исключения каждой молекулы были найдены оптимальные комбинации мнкРНК-маркеров рецептивного эндометрия в соответствии с их вкладом в построение моделей логистической регрессии, где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала рецептивность эндометрия (0 – имплантация, 1 – отсутствие имплантации). Все модели, построенные по содержанию микроРНК и пивиРНК, были статистически значимы и обладали высокой специфичностью (84–100%), а значит высокой диагностической ценностью. Далее была найдена комбинация из семи наиболее значимых мнкРНК и толщины эндометрия, имеющая наибольшую площадь под кривой ($AUC=0,89$). Методом обратного исключения, для оптимизации и удобства использования на практике, из модели 1 рисунка 6 пошагово удаляли по одной самой незначимой объясняющей переменной с получением моделей 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, где каждая последующая модель является производной от предыдущей. В результате была выделена наиболее оптимальная модель (номер 7), в которой переменные оказались статистически значимыми и независимыми по данным корреляционного анализа по Спирмену ($r=0,02$, $p=0,9$). Специфичность и чувствительность модели 7 составила 88 и 71%, соответственно, что говорит о высокой диагностической значимости сочетанного измерения уровня miR-1180-3p в

секрете и толщины эндометрия в рецептивности эндометрия. Формула расчета вероятности рецептивного эндометрия для модели 7 рисунка 6 представлена ниже:

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

После этого для практического использования модель 7 была проспективно валидирована на 8 образцах аспирата секрета эндометрия пациенток в криоцикле на фоне ЦГТ и показала высокую вероятность прогнозирования успешной имплантации эмбриона и рецептивности эндометрия (8/8).

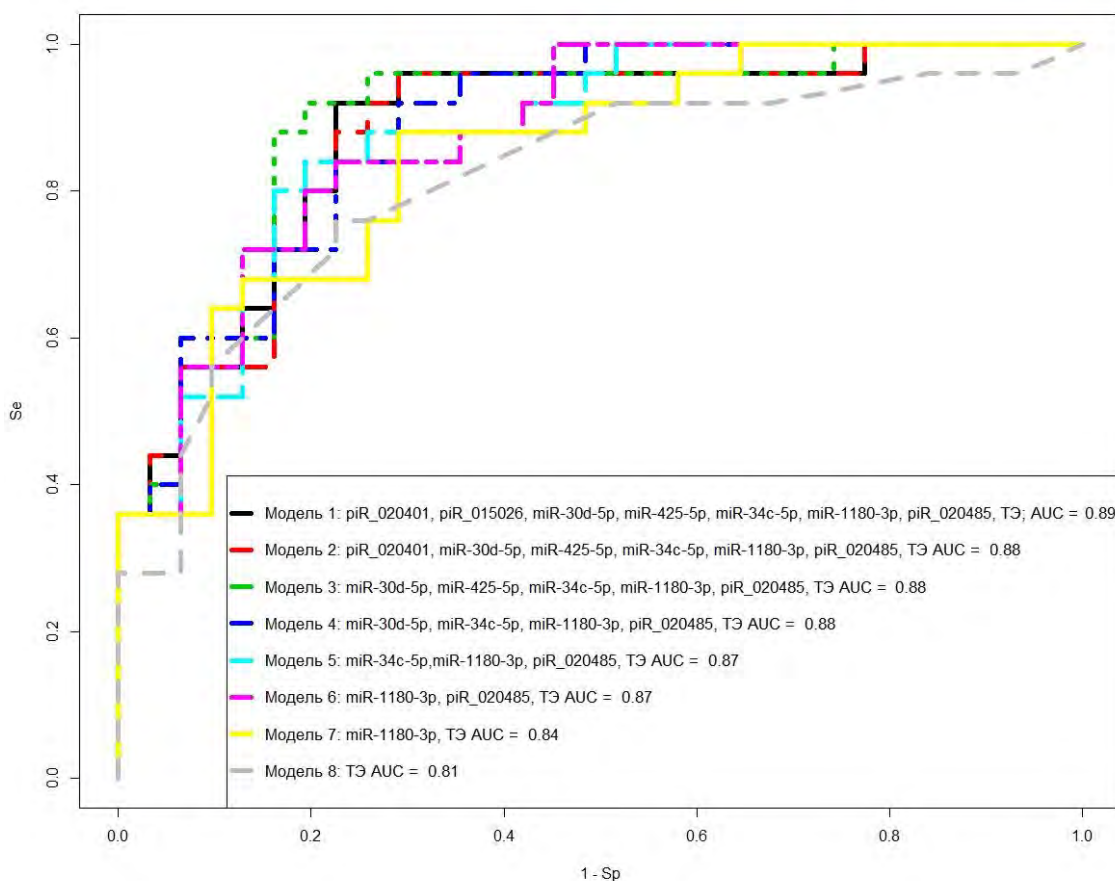


Рис. 6. Модели логистической регрессии определения рецептивности эндометрия в группе 1 на фоне ЦГТ по данным количественной ПЦР в реальном времени. ТЭ – толщина эндометрия, Se – чувствительность, Sp – специфичность

Молекулы мнкРНК, ассоциированные с рецептивностью эндометрия в группе ЦГТ, были проверены на способность диагностировать рецептивность эндометрия в группе ЕЦ. Построены три модели логистической регрессии с наиболее оптимальными комбинациями мнкРНК (рисунок 7) путем поэтапного включения и исключения анализируемых молекул в соответствии с их вкладом в построение модели, где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала толщина эндометрия.

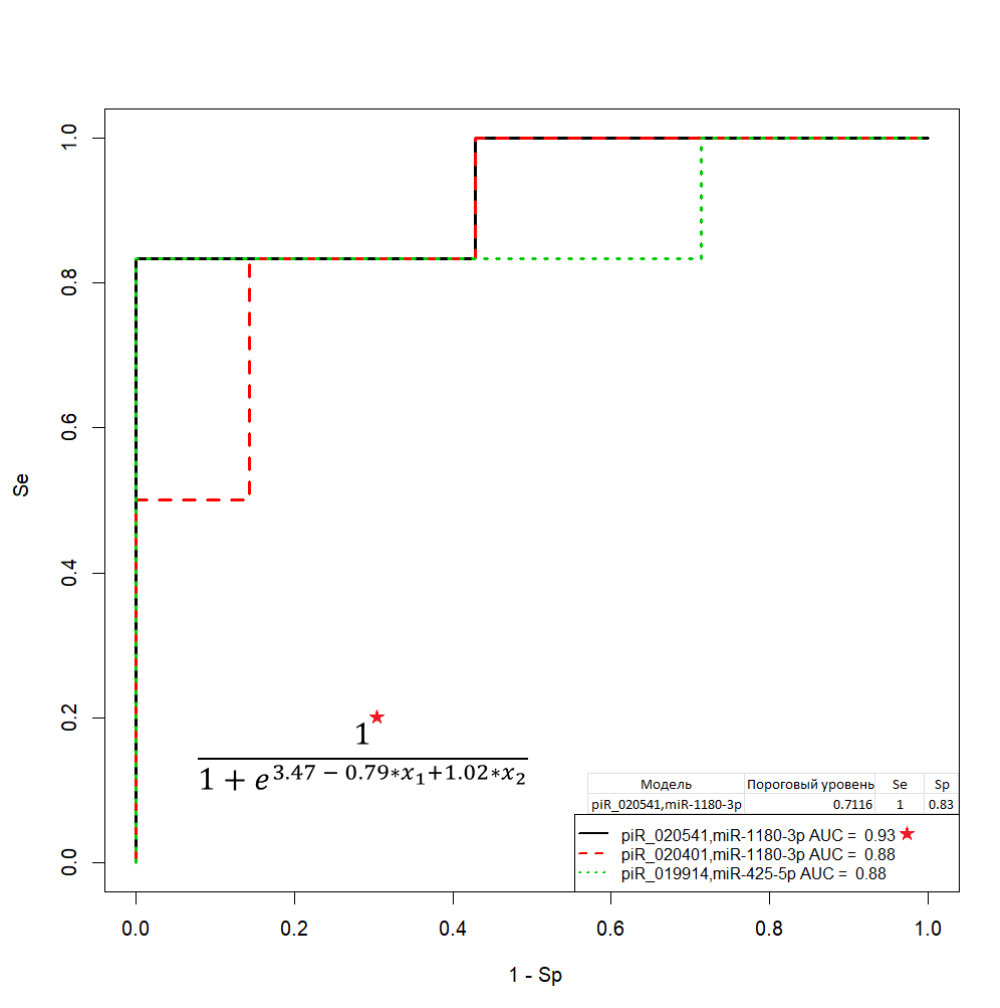


Рис. 7. Модели логистической регрессии определения готовности эндометрия к имплантации криоконсервированного эмбриона в группе 2 на фоне ЕЦ по данным количественной ПЦР в реальном времени. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

При анализе характеристик построенных моделей на рисунке 7 выяснилось, что модель 1 оказалась статистически значимой в плане диагностики рецептивности эндометрия на фоне ЕЦ, при этом чувствительность модели составила 100%, а специфичность – 93%.

Формула модели для ЕЦ:

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

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

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

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

Чувствительность модели – 71 %, специфичность – 88 %.

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

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

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

Чувствительность модели 100 %, специфичность 93 %.

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов / М.В. Кибанов, Г.М. Махмудова, **Я.А. Гохберг** // **Альманах клинической медицины.** – 2019. – Т. 47. – №1. – С. 12-25.
2. Молекулярно-генетическая оценка рецептивности эндометрия у пациенток с нарушением имплантации эмбриона в программах ВРТ / **Я.А. Гохберг**, Г.М. Махмудова, М.В. Кибанов // Сборник тезисов «XII Региональный научно-образовательный форум Мать и дитя». – 2019. С. 66.
3. Роль различных факторов воздействия на эндометрий в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / **Я.А. Гохберг**, Н.П. Макарова, А.А. Бабаян, Е.А. Калинина // **Акушерство и гинекология.** – 2021. – № 1. – С. 28-34.
4. Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Я.А. Гохберг**, А.В.

- Тимофеева, Е.А. Калинина // **Акушерство и гинекология.** – 2021. – № 11. – С. 56-62.
5. Анализ маточной жидкости как новая возможность повышения частоты имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий / А.А. Бабаян, Н.П. Макарова, Н.В. Кондакова, **Я.А. Гохберг**, О.С. Непша, Е.А. Калинина // **Акушерство и Гинекология.** – 2021. – № 1. – № 11. – С. 32-40.
 6. Сравнительный анализ клинико-anamнестических данных супружеских пар при переносе размороженного эмбриона в естественном цикле и в цикле заместительной гормональной терапии / **Я.А. Гохберг**, И.С. Федоров, А.В. Тимофеева, Е.А. Калинина // **Акушерство и гинекология.** – 2022. – № 9. – С. 72-80.
 7. Рецептивность эндометрия и Малые Некодирующие РНК / **Я.А. Гохберг**, А.В. Тимофеева, И.С. Федоров, Е.А. Калинина // Сборник тезисов «XXIII Всероссийский научно-образовательный форум Мать и дитя». – 2022. С. 209.
 8. Оценка рецептивности эндометрия на основании профиля экспрессии малых не кодирующих РНК в программах ВРТ / **Я.А. Гохберг**, А.В. Тимофеева, И.С. Федоров, Е.А. Калинина // Сборник тезисов «XVII Международный конгресс по репродуктивной медицине». – 2023. С. 233-234.
 9. Особенности экспрессии малых не кодирующих РНК в маточном аспирате при изучении рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Я.А. Гохберг**, А.В. Тимофеева, Е.А. Калинина // Сборник тезисов «XVIII Международная (XXVII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция». – 2023. С. 17.

10. Современные подходы в диагностике рецептивности эндометрия / **Я.А. Гохберг**, А.В. Тимофеева, И.С. Федоров, Е.А. Калинина // Сборник тезисов «XXIX Всероссийский конгресс с международным участием "Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы"». – 2023. С. 32-34.
11. Роль малых некодирующих РНК в диагностике рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Я.А. Гохберг**, А.В. Тимофеева, Е.А. Калинина // III Научно-практической конференции с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного». – 2023. С.13-14.
12. Оценка рецептивности эндометрия по уровню малых некодирующих РНК в маточном аспирате у женщин на фоне циклической гормональной терапии / А.В. Тимофеева, И.С. Федоров, **Я.А. Гохберг**, Е. А. Калинина // **Акушерство и гинекология**. – 2023 – № 7. – С. 90-102.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

