

На правах рукописи

МИРОШКИНА

Мария Игоревна

**ОПТИМИЗАЦИЯ СРОКОВ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ В
ПРОГРАММАХ ВРТ НА ОСНОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЭНДОМЕТРИЯ**

3.1.4 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Корнеева Ирина Евгеньевна
доктор биологических наук Бурменская Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, руководитель.

Вартанян Эмма Врановна - доктор медицинских наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины, доцент кафедры.

Ведущая организация: ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Защита состоится «21» сентября 2021 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Miroshkina%20M.I.-%20disser_3.pdf

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Повторные неудачи имплантации (Recurrent implantation failure (RIF)) остаются одной из глобальных проблем программ ВРТ. RIF — это отсутствие наступления беременности в 3-х и более программах ЭКО при переносе 1 или 2 эмбрионов высокого качества [F.Davari-Tanha, 2016]. Несмотря на усовершенствование технологий программ ЭКО, частота RIF составляет 20%, при этом около 50% бесплодных пар отказываются от проведения дальнейшего лечения уже после 2-3 неудачных попыток лечения [Y.E.M.Koot, 2019].

Нарушение рецептивности эндометрия является причиной одной из 3-х неудачных имплантаций и несет ответственность за низкую результативность программ ЭКО [E. Somigliana, 2018]. При отсутствии очевидных причин RIF (пороки развития внутренних половых органов, полипы эндометрия, интрамуральные миомы матки, «тонкий» эндометрий, анеуплоидии, НГЭ 3-4 степени распространения и др.) вероятная причина неудач может быть связана с нарушением процессов синхронизации развития эндометрия и эмбриона. Одним из возможных подходов к решению данной проблемы является определение персонального «окна имплантации», так как временной промежуток максимальной готовности эндометрия к имплантации не имеет стандартных параметров у данной категории пациентов [J.Tan, 2018].

Современные тенденции исследований предикторов «окна имплантации» направлены на изучение молекулярно-генетических паттернов генов в имплантационном эндометрии. Однако, в настоящее время не существует общепринятых биомаркеров, которые бы имели широкое распространение в клинической практике. Поэтому разработка тест-систем, на основании которых возможен выбор персонального дня для переноса эмбрионов, является актуальной.

Цель исследования: улучшение исходов в программах переноса размороженных эмбрионов путем определения молекулярно-генетических маркеров готовности эндометрия к имплантации эмбриона.

Задачи исследования:

1. Дать клинико-лабораторную характеристику женщин, планирующих реализацию репродуктивной функции в программе переноса размороженных эмбрионов.

2. Провести гистологическое и молекулярно-генетическое исследование эндометрия женщин, планирующих реализацию репродуктивной функции в программе переноса размороженных эмбрионов, в период предполагаемого «окна имплантации» в естественных циклах и на фоне циклической гормональной терапии; определить особенности транскрипционного профиля генов «рецептивного» эндометрия.

3. Провести программу переноса размороженных эмбрионов и оценить исход программы переноса размороженных эмбрионов у пациенток обследуемых групп в зависимости от гистологического и молекулярно-генетического критериев развития эндометрия.

4. Разработать алгоритм интегральной оценки имплантационного потенциала эндометрия для персонализации циклов переноса размороженных эмбрионов.

Научная новизна

На основании результатов исследования экспрессии генов методом ОТ-ПЦР real-time охарактеризован молекулярно-генетический профиль рецептивного эндометрия при подготовке к переносу размороженных эмбрионов, определены маркеры рецептивности эндометрия: *GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, IGFBP1, LIF, IL15, GNLY, NDRG1*.

Предложен принципиально новый подход к оценке рецептивного статуса эндометрия, основанный на выделении дополнительных стадий развития имплантационного эндометрия с помощью определения

транскрипционного профиля генов. Выдвинута гипотеза, согласно которой наилучшая рецептивность эндометрия соответствует переходному периоду между ранней и средней стадиями фазы секреции, а наступление и успешное прогрессирование беременности может произойти как при переносе эмбриона в раннюю, так и в среднюю стадии фазы секреции гистологически датированного эндометрия. Использование молекулярно-генетических маркеров позволило выявить дополнительные стадии в развитии эндометрия, соответствующие переходному периоду между ранней и средней стадиями фазы секреции, оптимальные для переноса эмбриона. Определена прогностическая значимость молекулярно-генетических маркеров как предикторов наступления беременности в криопротоколах.

Практическая значимость

К практическому применению предложена модель для определения рецептивного статуса эндометрия в протоколах подготовки к переносу размороженных эмбрионов на основании оценки экспрессии генов *PAEP*, *IGFBP1*, *GPX3*, *LIF*, *DPP4*, *HLA-DOB* на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ или экспрессию мРНК генов *IMPA2*, *IGFBP1*, *GPX3*, *AQP3*, *LIF*, *GPLY*, *HLA-DOB*, *POSTN* на П+5 на фоне ЦГТ, позволяющая выделить 3 стадии развития имплантационного эндометрия: раннерецептивный, рецептивный, позднерецептивный и определить наиболее благоприятный день для ПЭ.

Разработан алгоритм обследования женщин с RIF и предложена тактика ведения по подготовке к криопереносу эмбрионов, учитывающая состояние транскрипционного профиля эндометрия.

Использование данного алгоритма позволяет повысить эффективность криопротоколов у женщин с повторными неудачными имплантациями.

Положения, выносимые на защиту

1. Повторные неудачи имплантации у обследованных женщин в каждом третьем случае ассоциированы с НГЭ, хроническим эндометритом и потерей беременностей в анамнезе. Реализация перенесенных заболеваний на уровне эндометрия изменяет общепринятые гистологические критерии о

максимальной восприимчивости и готовности эндометрия к имплантации в среднюю стадию фазы секреции. Отражением этих изменений является более высокая частота наступления беременности в раннюю стадию фазы секреции в естественном цикле (31%), а также число живорождений. Полученные данные позволяют пересмотреть целесообразность и информативность гистологического исследования эндометрия для оценки его рецептивного статуса в данной когорте женщин.

2. Транскрипционные профили генов свидетельствуют о гетерогенности функциональных состояний эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации». По мере созревания эндометрия происходит повышение уровня экспрессии мРНК генов *GPX3*, *PAEP*, *LIF*, *DPP4*, *TAGLN*, *HABP2*, *IMPA2*, *AQP3*, *IGFBP1*, *IL15*, *GPLY*, *NDRG1* и снижение уровня экспрессии мРНК генов *HLA-DOB*, *MSX1*, *POSTN*. Наиболее благоприятными для имплантации и пролонгирования беременности являются промежуточные уровни экспрессии генов, соответствующие переходному периоду между ранней и средней стадиями фазы секреции.

3. Интегральная оценка экспрессии мРНК генов *PAEP*, *IGFBP1*, *GPX3*, *LIF*, *DPP4*, *HLA-DOB*, *IMPA2*, *AQP3*, *GPLY* и *POSTN* позволяет оценить рецептивный статус эндометрия и скорректировать сроки криопереноса эмбриона. При раннерецептивном статусе эндометрия возможен сдвиг ПЭ в цикле ЦГТ П+6 или в ЕЦ ЛГ +9, при позднерецептивном статусе эндометрия возможен сдвиг ПЭ в цикле ЦГТ П+4 или в ЕЦ ЛГ+6.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе направления исследования, разработке цели и задач, обобщении, анализе, статистической обработке полученных результатов. Автором лично произведены: обследование пациенток, УЗИ мониторинг эндометрия, пайпель-биопсия эндометрия. Автор принимал участие во всех этапах лечения методом ЭКО, в анализе и интерпретации полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация

Апробация диссертации была проведена на межклинической конференции (05 июня 2020 года) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России (15 июня 2020 года, протокол № 21).

Внедрение результатов работы в практику

Алгоритм ведения пациенток, готовящихся к программе переноса размороженных эмбрионов, сформированный на основании проведенного исследования используется в практической деятельности в отделении сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, 4 из них входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Результаты диссертационной работы представлены на XX Юбилейном Всероссийском научно-образовательном форуме Мать и Дитя (Москва, 2019).

Структура и объем диссертации

Структура диссертации состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 132 страницах компьютерного текста, содержит 11 рисунков и 33 таблицы. Библиографический указатель содержит 124 источников, из них 10 отечественных и 114 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для решения поставленных задач было обследовано 140 женщин репродуктивного возраста с неудачными попытками ЭКО в анамнезе, обратившихся для проведения программы переноса размороженных эмбрионов в отделение сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2016 по 2018 г.г.

Критерии включения: возраст не более 45 лет; ТПБ; овуляторный менструальный цикл; сохраненный овариальный резерв; наличие криоконсервированных эмбрионов.

Критерии исключения: отсутствие овуляции; пороки развития внутренних половых органов; миома матки размером более 3 см; эндометриоз III-IV стадии; противопоказания для проведения программы переноса размороженных эмбрионов.

На этапе подготовки все обследуемые были разделены на 2 группы методом неравномерной рандомизации: 1 группу составили 104 пациентки, которым пайпель-биопсия эндометрия была проведена на 7-8 день после пика ЛГ в естественном менструальном цикле (ЕЦ); во 2 группу были включены 36 женщин, использующих циклическую гормональную терапию (ЦГТ), пайпель-биопсия эндометрия которым была проведена на 6 день назначения микронизированного прогестерона. Гормональную подготовку эндометрия начинали с назначения препаратов эстрадиола валерата с 2-3 дня цикла в дозе 2-4 мг с увеличением до 6-8 мг под контролем УЗИ мониторинга. На 13-14 дни цикла при величине М-ЭХО не менее 8 мм добавляли микронизированный прогестерон в дозе 600 мг в сутки вагинально. Стадию созревания эндометрия в полученных биоптатах оценивали на основании результатов гистологического и молекулярно-генетического исследования методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с определением экспрессии мРНК 15 генов

GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, IGFBP1, LIF, IL15, GNLV, NDRG1.

После оценки состояния эндометрия всем женщинам была произведена программа переноса размороженных эмбрионов: в 22 случаях был произведен перенос эмбриона (ПЭ) в ЕЦ, остальные 118 переносов осуществляли на фоне назначения ЦГТ. Всем пациентам была перенесена 1 бластоциста. Показанием для переноса на фоне ЦГТ были проведенные ранее безуспешные программы переноса эмбрионов в естественном цикле.

Заключительным этапом исследования была оценка исходов программ ВРТ и разработка модели оценки рецептивности эндометрия на основании полученных результатов. Оценку исходов лечения производили путем определения уровня β -ХГ в сыворотке крови через 14 дней после переноса. Положительным считался уровень β -ХГ более 20 МЕ/л. Заключение об успешной имплантации (клиническая беременность) было установлено после верификации сердцебиения эмбриона в полости матки при сроке беременности 5-6 недель.

Обработка данных проводилась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистической программы SPSS Statistics 22 (США). Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Результаты клинико-лабораторного обследования показали, что пациентки обеих групп были сопоставимы по возрасту ($34 \pm 4,4$ лет и $36 \pm 4,5$ лет) и ИМТ ($22,3 \pm 3,0$ и $21,8 \pm 3,4$). Все обследованные женщины имели регулярный менструальный цикл и сохраненный овариальный резерв. Все 140 пациенток на момент исследования имели не менее 2-х витрифицированных эмбрионов хорошего качества ($3,7 \pm 2,5$ и $2,7 \pm 1,4$).

Частота первичного и вторичного бесплодия в группах не различалась и составила соответственно в 1 группе 48,1% и 51,9%, во 2 группе – 38,9% и 61,1%. Отмечена высокая частота ранних репродуктивных потерь в анамнезе у пациенток обследованных групп: 70,3%- в 1 группе и 65,1%- во второй.

Пациентки обследованных групп были сопоставимы по частоте и структуре перенесенных гинекологических заболеваний. У каждой третьей женщины, из числа обследованных, в анамнезе были отмечены хронический эндометрит (30,8% и 16,7% в 1 и 2 группах) и полипы эндометрия (11,5% и 27,8%).

Гистероскопия и РДВ с целью оценки состояния полости матки и эндометрия были ранее произведены у каждой второй женщины (57,7% и 44,4%) из числа обследованных.

На лапароскопию в анамнезе указали 46,2% женщин 1 группы и 66,7% 2 группы. Наиболее частым показанием для лапароскопии явился НГЭ: при этом резекция яичников по поводу эндометриоидных кист была выполнена в каждом третьем случае (37,5% и 41,6% в 1 и 2 группах).

Гормональный статус всех обследованных женщин указывал на сохраненный овариальный резерв и не отличался от аналогичных показателей женщин фертильной популяции.

Результаты УЗИ не выявили различий в размере матки и объеме яичников у пациенток обеих групп. Толщина эндометрия в среднюю стадию фазы секреции значимо не различалась и составила в среднем $9,0 \pm 1,6$ и $8,9 \pm 1,5$ мм.

По результатам гистологического исследования биоптатов эндометрия установлено статистически значимое увеличение частоты выявления эндометрия средней стадии фазы секреции у женщин 1 группы в ЕЦ - 69,2% против 33,3% во 2 группе на фоне ЦГТ. При этом эндометрий ранней стадии фазы секреции был выявлен в 2 раза чаще в цикле с гормональной поддержкой - 66,7% против 30,8% без нее (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты гистологического исследования

Гистологическое заключение	1 группа(n=104)		2 группа(n=36)		p
	абс.	%	абс.	%	
Ранняя стадия фазы секреции	32	30,8%	24	66,7%	p<0,05
Средняя стадия фазы секреции	72	69,2%	12	33,3%	p<0,05

Анализ исходов криопротоколов в зависимости от результатов гистологического исследования показал, что клиническая беременность в 2 раза чаще наступала при переносе эмбриона в раннюю стадию фазы секреции в ЕЦ и составила 31,3%, в то время как аналогичный показатель в среднюю стадию фазы секреции не превышал 19,4%. Все беременности, наступившие в раннюю стадию фазы секреции, завершились родами живым плодом. Для средней стадии фазы секреции этот показатель составил 16,6%. Частота наступления беременности, а также родов живым плодом у женщин на фоне ЦГТ составили 16,6% и 16,7% и не различались по стадиям зрелости секреторного эндометрия (таблица 2).

На следующем этапе работы перед проведением молекулярно-генетического исследования эндометрия, для выбора потенциальных маркеров рецептивности был проведен биоинформатический анализ баз данных микроматричного анализа образцов нормального эндометрия ранней и средней стадий фазы секреции. В результате были выбраны 15 генов: *GPX3*, *PAEP*, *DPP4*, *TAGLN*, *HABP2*, *IMPA2*, *AQP3*, *HLA-DOB*, *POSTN*, *MSX1*, *IGFBP1*, *LIF*, *IL15*, *GPLY*, *NDRG1*-дифференциально экспрессируемых на ранней и средней стадиях фазы секреции. 14 из этих 15 генов входят в состав чипа теста ERA, который используется в клинической практике в некоторых странах для определения персонального «окна имплантации».

Таблица 2 – Исходы программы криопротокола у пациенток 1 и 2 групп с учетом гистологического статуса эндометрия

Исход беременности	Группа 1А (N=32)	Группа 1Б (N=72)	Группа 2А (N=24)	Группа 2Б (N=12)	p
	Ранняя стадия фазы секреции	Средняя стадия фазы секреции	Ранняя стадия фазы секреции	Средняя стадия фазы секреции	
Число и частота клинических беременностей	10(31,3%)	14(19,4%)	4(16,6%)	2(16,7%)	ns
Число и частота выкидышей	0	2(2,7%)	0	0	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	10(31,3%)	12(16,6%)	4(16,6%)	2(16,7%)	ns
Число и частота родов живым плодом	10(31,3%)	12(16,6%)	4(16,6%)	2(16,7%)	ns

Результаты молекулярно-генетического исследования биоптатов эндометрия были проанализированы с помощью кластерного анализа независимо от гистологической стадии развития эндометрия. Было установлено, что образцы эндометрия гетерогенны, но могут быть разделены на несколько групп. В результате были выделены 4 кластера образцов (кластеры А-Д), отличающихся дифференциальной экспрессией генов. Результаты кластерного анализа представлены в виде тепловых карт профилей экспрессии генов (рисунок 1,2).

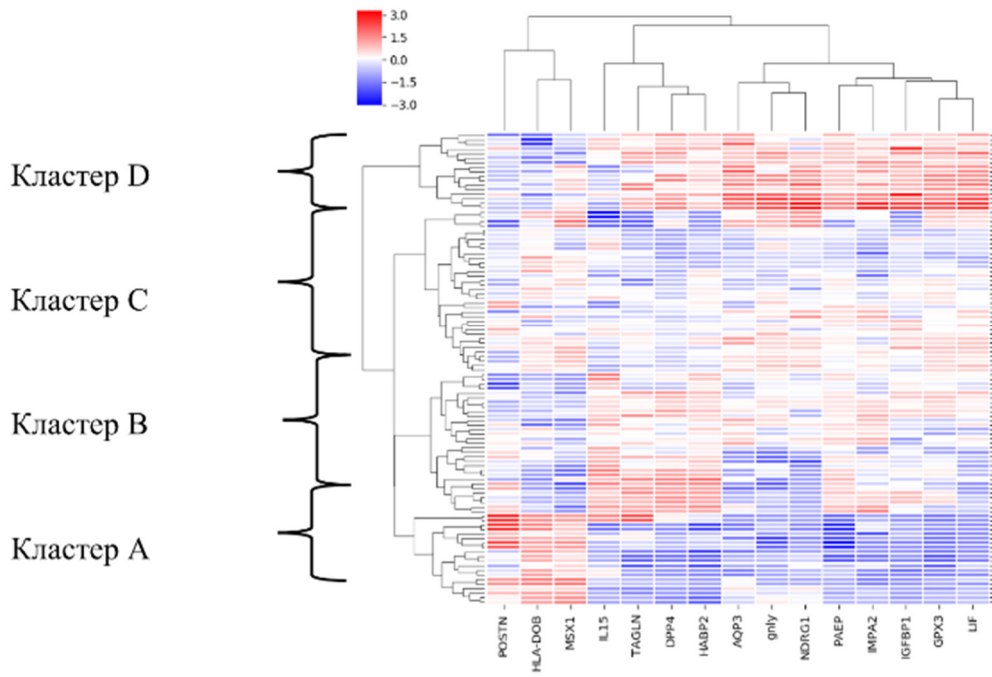


Рис. 1 – Тепловая карта транскрипционных профилей генов в образцах тканей эндометрия в день забора пайпель-биопсии ЛГ+7-8

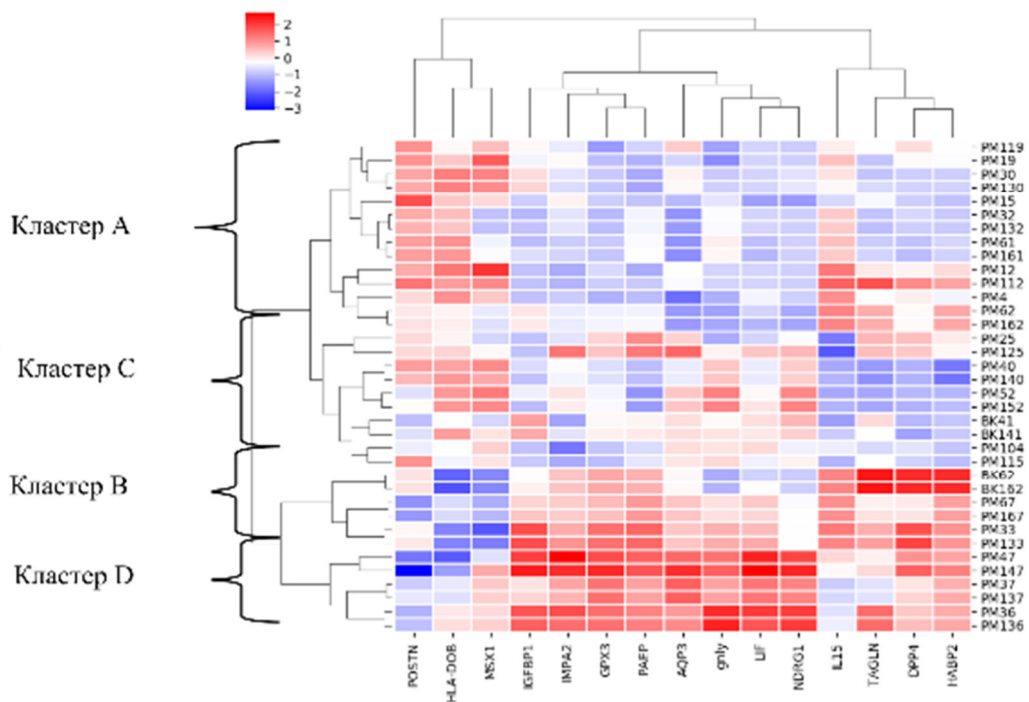


Рис. 2 – Тепловая карта транскрипционных профилей генов в образцах тканей эндометрия в день забора пайпель-биопсии P+5

Так как ведущую роль в трансформации эндометрия играют стероидные гормоны, под действием которых, вероятно, происходит повышение экспрессии гена *PAEP*, нами предложен метод стадирования эндометрия в соответствии с ранее описанными кластерами на основании изменения экспрессии этого гена. Была разработана кластерная градация стадий созревания эндометрия $A \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow D$. При изучении особенностей изменения уровня экспрессии генов показано, что кластеру А соответствует высокий уровень экспрессии мРНК генов *POSTN*, *HLA-DOB*, *MSX1* и низкий уровень экспрессии мРНК генов *LIF*, *GPX3*, *AQP3*, *NDRG1*, *GNLY*, *IMPA2*, *PAEP*, *IGFBP1*, *HABP2*, *DPP4* и *TAGLN*. Кластеры В и С характеризовались промежуточным уровнем экспрессии мРНК изученных генов. В кластере D особенности экспрессии мРНК генов были прямо противоположны кластеру А; отмечена высокая экспрессия генов *LIF*, *GPX3*, *AQP3*, *NDRG1*, *GNLY*, *IMPA2*, *PAEP*, *IGFBP1*, *HABP2*, *DPP4* и *TAGLN* и низкая экспрессия генов *POSTN*, *HLA-DOB*, *MSX1* (рисунок 3).

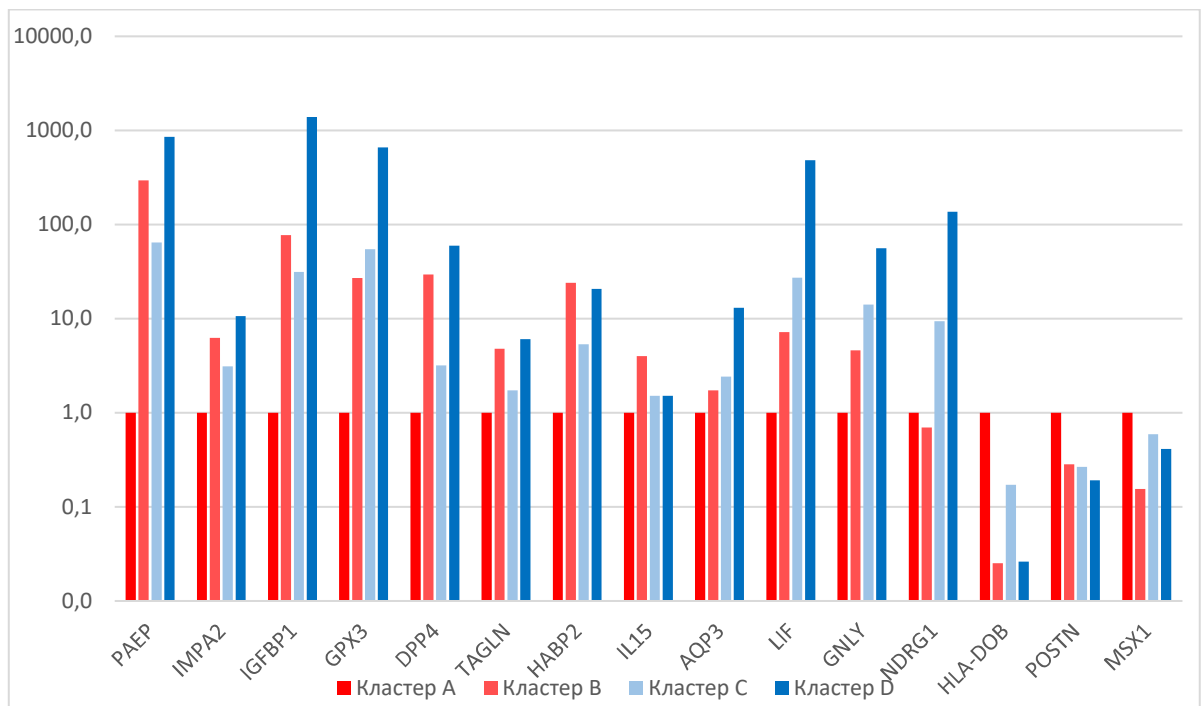


Рис. 3 — Динамика изменения уровня экспрессии мРНК по мере развития эндометрия на стадиях ранней и средней фаз секреции в ЕЦ.

Особенности изменения уровня экспрессии генов во 2 группе имели похожую тенденцию от кластера А к кластеру D (рисунок 4).

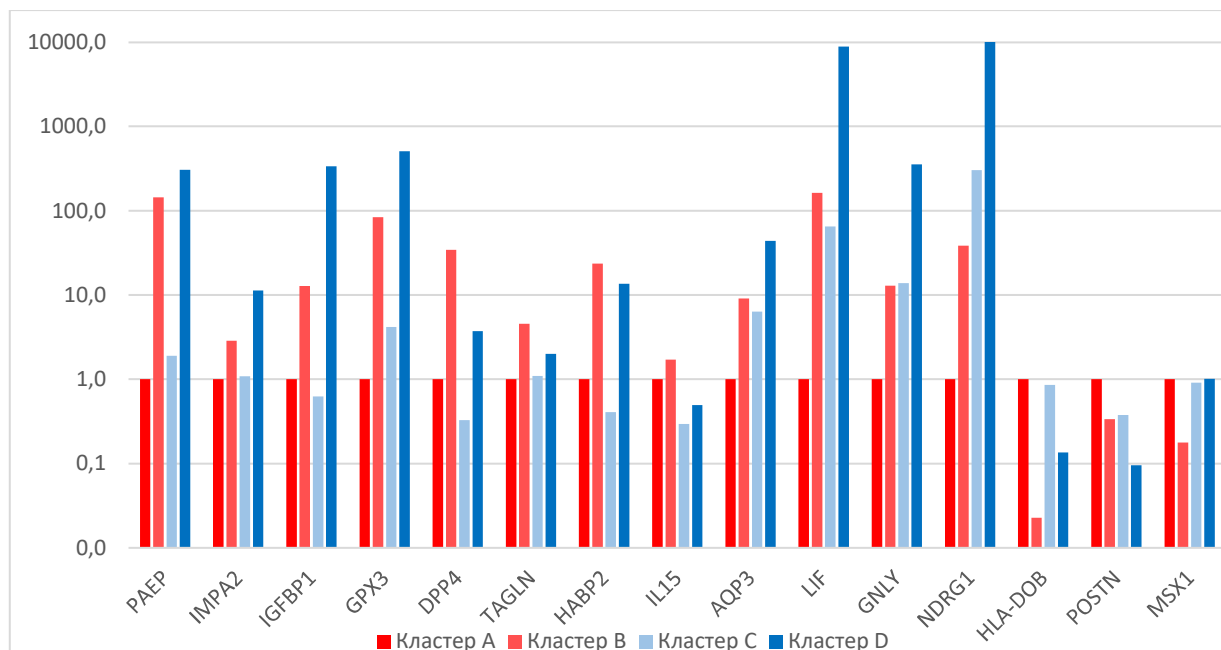


Рис. 4 – Динамика изменения уровня экспрессии мРНК по мере развития эндометрия на стадиях ранней и средней фазы секрета на фоне ЦГТ.

При сопоставлении кластерного анализа с результатами гистологического исследования в ЕЦ установлено постепенное увеличение количества образцов с морфологическими признаками средней стадии фазы секрета от кластера А к кластеру D. В кластере А (n=10) 50% образцов соответствовали ранней и средней стадиям фазы секрета. В кластере С - 33,3% образцов (n=12) соответствовали ранней стадии фазы секрета, и 67,7% (n=24) - средней стадии фазы секрета. Для кластера В (n=25) в 80,6% образцов были выявлены морфологические признаки средней стадии фазы секрета, в 19,4% – ранней стадии фазы секрета. В преобладающем большинстве (88,2%) образцов кластера D была установлена средняя стадия фазы секрета (n=15), в 11,8% - ранняя стадия фазы секрета (таблица 3).

Таблица 3 – Сопоставление кластерного анализа с гистологическим исследованием

Кластер	Гистологическое исследование			
	Ранняя стадия фазы секреции (n=30)		Средняя стадия фазы секреции (N=74)	
	Количество	%	Количество	%
A (n=20)	10	50,0%	10	50,0%
C (n=36)	12	33,3%	24	67,7%
B (n=31)	6	19,4%	25	80,6%
D (n=17)	2	11,8%	15	88,2%
Всего B+D (n=48)	8	16,7%	40	83,3%

При сопоставлении результатов кластерного анализа с данными гистологического исследования на фоне ЦГТ была выявлена более выраженная гетерогенность образцов: так в 100% (n=14) образцов кластера А и 80 % (n=8) кластера С установлена ранняя стадия фазы секреции. Средняя стадия фазы секреции выявлена только в 20% (n=2) образцов кластера С. Морфологические признаки средней стадии фазы секреции имели 66,7% (n=4) образцов кластера В и 100% (n=6) образцов кластера D (таблица 4).

Таблица 4 – Сопоставление кластерного анализа с гистологическим исследованием

Кластер	Гистологическое исследование			
	Ранняя стадия фазы секреции (n=24)		Средняя стадия фазы секреции (N=12)	
	Количество	%	Количество	%
A (n=14)	14	100,0%	0	0
C (n=10)	8	80,0%	2	20,0%
B (n=6)	2	33,3%	4	66,7%
D (n=6)	0	0%	6	100,0%
Всего B+D (n=12)	2	16,7%	10	83,3%

Анализ исходов криопротоколов в ЕЦ по частоте получения положительных результатов β -ХГ значимых различий не выявил.

В кластере А частота положительных результатов β -ХГ составила 40%, при этом во всех случаях беременность завершилась ранними репродуктивными потерями. Оценка исходов в кластере D показала, что частота биохимических беременностей в естественном цикле составила 23,5% (n=4), при этом прогрессирующие беременности, завершившиеся живорождением, были подтверждены у 3-х из 4-х пациенток в ЕЦ.

Полученные результаты позволяют предположить недостаточность инвазии цитотрофобласта в слизистую оболочку матки, вероятно ввиду его «недозревшего» или «перезревшего» состояния. Возможно, что в данном случае коррекция дня переноса эмбрионов с учетом статуса эндометрия может повысить частоту наступления беременности и снизить ранние репродуктивные потери.

Среди женщин, эндометрий которых соответствовал кластерам В и С, была установлена самая высокая частота прогрессирующих беременностей и родов - 29% и 27,8%. Однако, статистически значимые различия были установлены только между кластерами А, В и С ($p_{a-b}=0,008$, $p_{a-c}=0,010$). Полученные результаты позволили предположить, что наиболее благоприятным для имплантации и прогрессирования беременности является эндометрий, соответствующий кластерам В и С, то есть на стыке ранней и средней стадий фазы секреции (таблица 5).

Таблица 5 – Исходы программы криопереноса в зависимости от молекулярно-генетической кластеризации образцов эндометрия

*точный критерий Фишера

Исход беременности	Кластер А n=20	Кластер В n=31	Кластер С n=36	Кластер D n=17	p-уровень
Число и частота биохимических беременностей	8 (40,0%)	12 (38,7%)	10 (27,8%)	4 (23,5%)	ns
Число и частота клинических беременностей	4 (20,0%)	11 (35,5%)	10 (27,8%)	3 (17,6%)	ns

Исход беременности	Кластер А n=20	Кластер В n=31	Кластер С n=36	Кластер D n=17	р-уровень
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	9 (29,0%)	10 (27,8%)	3 (17,6%)	$p_{a-b}=0,008$ $p_{a-c}=0,010$
Число и частота родов живым плодом	0	9 (29,0%)	10 (27,8%)	3 (17,6%)	$p_{a-b}=0,008$ $p_{a-c}=0,010$

Аналогичная тенденция прослеживалась при оценке исходов криопереносов во 2 группе (на фоне ЦГТ). Частота положительных β -ХГ в кластере А составила 28,6%(n=4), в кластере D - 33,3% (n=2), при этом ни в одном случае не были диагностированы клинические и прогрессирующие беременности. Однако, установлена статистически значимая разница по частоте прогрессирующих беременностей и родов живым плодом между кластерами А, В и D ($p_{a-b}=0,003$, $p_{b-d}=0,030$). В кластере С также была выявлена более высокая частота прогрессирующих беременностей и родов живым плодом по сравнению с аналогичными показателями кластера А. Однако, результаты не были статистически значимы, вероятно, из-за малочисленности выборки (таблица 6).

Таблица 6 – Исходы программы криопереноса в зависимости от молекулярно-генетической кластеризации образцов эндометрия

*точный критерий Фишера

Исход беременности	Кластер А n=14	Кластер В n=6	Кластер С n=10	Кластер D n=6	р-уровень
Число и частота биохимических беременностей	4 (28,6%)	4 (66,7%)	4(40%)	2 (33,3%)	ns
Число и частота клинических беременностей	0	4 (66,7%)	2 (20%)	0	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	4 (66,7%)	2 (20%)	0	$p_{a-b}=0,003$ $p_{a-c}=0,163$ $p_{b-d}=0,030$
Число и частота родов живым плодом	0	4 (66,7%)	2 (20%)	0	$p_{a-b}=0,003$ $p_{a-c}=0,163$ $p_{b-d}=0,030$

Таким образом, предложенная нами классификация, условно делящая эндометрий на 3 рецептивные состояния: раннерецептивный (кластер А),

рецептивный (кластеры В и С) и позднерецептивный (кластер D), подтверждена оценкой исходов криопротоколов.

Следующим этапом была разработка модели кластеризации образцов на основании дискриминантного анализа интегрального молекулярно-генетического критерия оценки степени зрелости эндометрия на основании уровня экспрессии мРНК генов: *PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB* в ЕЦ и экспрессии мРНК генов *IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLV, HLA-DOB, POSTN* на фоне ЦГТ (приложение 1,2). Предложенная модель важна для клинической практики, так как позволяет определить степень развития эндометрия и выбрать оптимальный день для переноса эмбриона.

На основании данной модели были выделены три стадии развития эндометрия: раннерецептивной (кластер 1), рецептивной (кластер 2) и позднерецептивной (кластер 3), отражающие молекулярно-генетическую гетерогенность изменения эндометрия в период «окна имплантации».

Было установлено, что 21 из 104 образцов (20,2%) принадлежит кластеру позднерецептивного эндометрия, 68 из 104 образцов (65,4%) – кластеру рецептивного эндометрия, 15 из 104 образцов (14,4%) – кластеру раннерецептивного эндометрия (рисунок 5).

Анализ исходов криопротоколов в ЕЦ показал, что у женщин, эндометрий которых соответствовал раннерецептивному состоянию, частота биохимических беременностей составила 40%. При этом не подтверждено ни одного случая прогрессирующей беременности, что вероятно может свидетельствовать о молекулярно-генетической неполноценности эндометрия и нарушении процессов инвазии цитотрофобласта, несмотря на успешную попытку адгезии.

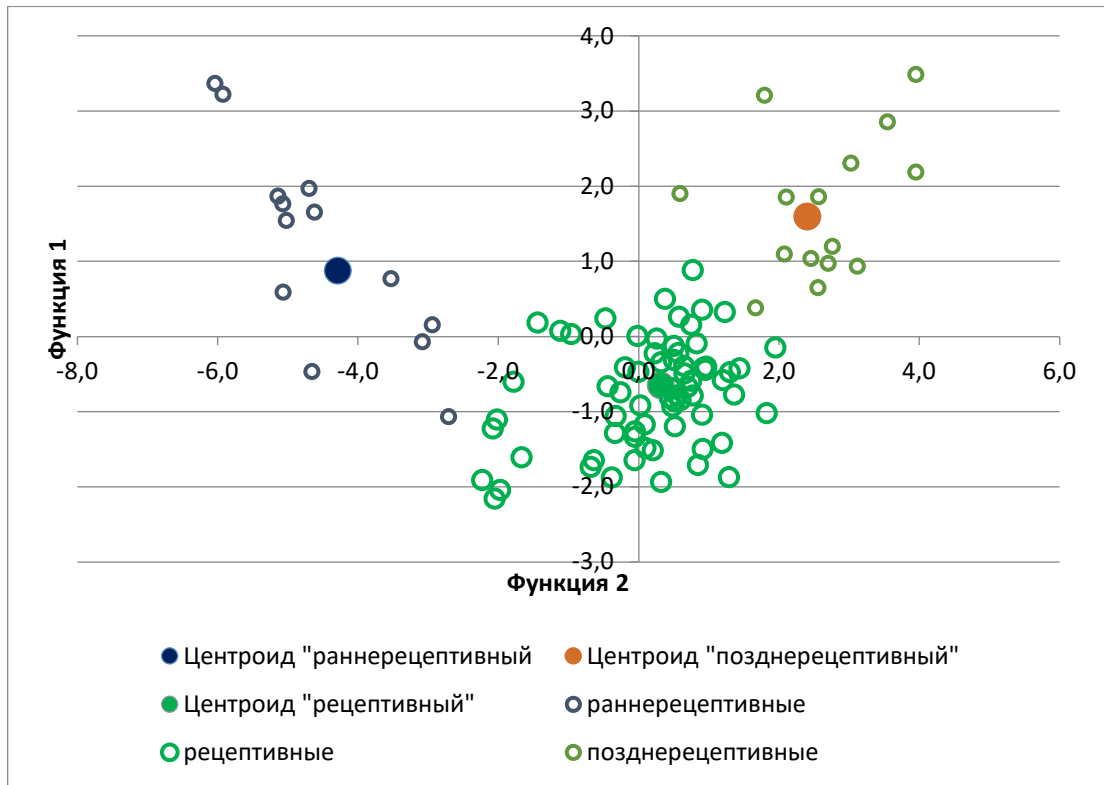


Рис. 5 – Распределение образцов эндометрия в 1 группе (n=104)

Установлены значимые различия по частоте прогрессирующих беременностей и частоте родов живым плодом между раннерецептивным и рецептивным эндометрием. При рецептивном эндометрии частота прогрессирующих беременностей и родов живым плодом составила 29,4% (таблица 7).

Таблица 7 – Исходы программы криопереноса в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования образцов эндометрия

*точный критерий Фишера

Исход беременности	Кластер 1 раннерецептивного эндометрия (n=15)	Кластер 2 рецептивного эндометрия (n=68)	Кластер 3 позднерецептивного эндометрия (n=21)	p-уровень
Число и частота биохимических беременностей	6 (40%)	20 (29,4%)	4 (19%)	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	20 (29,4%)	2 (9,5%)	$p_{1-2}=0,017$
Число и частота родов живым плодом	0	20 (29,4%)	2 (9,5%)	$p_{1-2}=0,017$

Во 2-ой группе на основании данной модели было установлено, что 6 из 36 образцов (16,7%) принадлежит кластеру поздне рецептивного эндометрия, 13 из 36 образцов (36,1%) – кластеру рецептивного эндометрия, 17 из 36 образцов (47,2%) – кластеру раннего рецептивного эндометрия (рисунок 6).

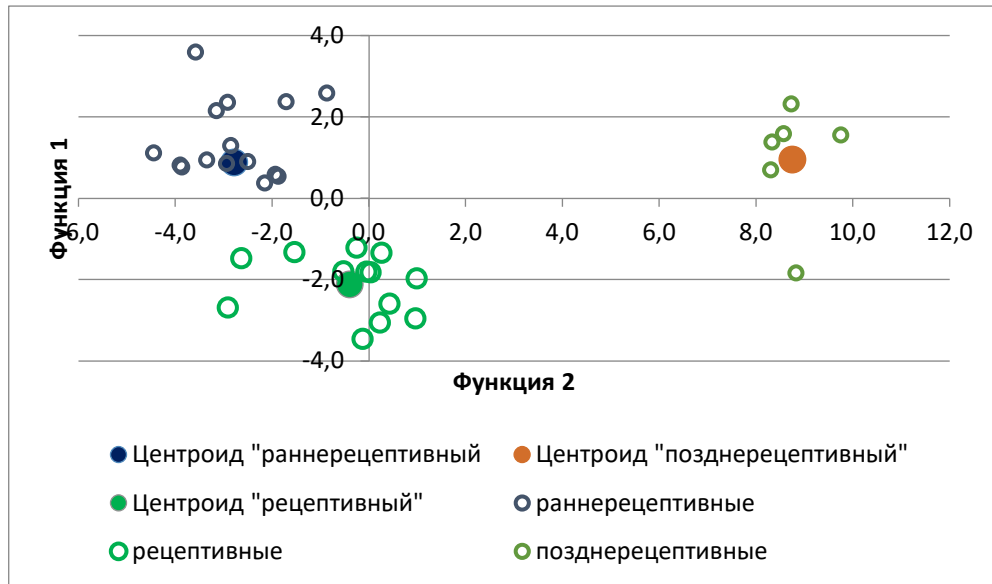


Рис. 6 Распределение образцов эндометрия во 2 группе (n=36)

Анализ исходов криопротоколов на фоне ЦГТ не выявил статистически значимой разницы по частоте положительных результатов В-ХГ.

Однако, по частоте прогрессирующих беременностей и частоте родов живым плодом между раннерецептивным и рецептивным эндометрием установлены статистически значимые различия. Так у пациенток, эндометрий которых соответствовал раннерецептивной стадии, прогрессирующих беременностей не было. В то время, как в период, когда эндометрий соответствовал рецептивному статусу, частота прогрессирующих беременностей и родов живым плодом составила 46,2% и не зарегистрировано ни одного случая репродуктивных потерь. Таким образом, наиболее благоприятным для наступления беременности является соответствие эндометрия рецептивной стадии развития.

Однако, учитывая небольшое количество данных, особенно для группы на фоне циклической гормональной терапии, разработанные модели требуют дальнейшего уточнения на большей выборке (таблица 8).

Таблица 8 – Исходы программы криопереноса в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования образцов эндометрия

*точный критерий Фишера

Исход беременности	Кластер 1 раннерецептивного эндометрия n=17	Кластер 2 рецептивного эндометрия n=13	Кластер 3 позднерецептивного эндометрия n=6	р-уровень
Число и частота биохимических беременностей	6 (35,3%)	6 (46,2%)	0	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	6 (46,2%)	0	p ₁₋₂ =0,003
Число и частота родов живым плодом	0	6 (46,2%)	0	p ₁₋₂ =0,003

На основании полученных результатов нами разработан алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации, проходящих подготовку к криопереносу (приложение 3).

ВЫВОДЫ

1. Анамнестическими особенностями женщин с повторными неудачами имплантации являются: НГЭ (28,6%), хронический эндометрит (27,1%), полипы эндометрия (15,7%), а также неудачные беременности, завершившиеся ранними репродуктивными потерями (85,8% случаев) у пациенток с вторичным бесплодием.

2. Результаты гистологического исследования биоптатов эндометрия установили значимое увеличение частоты выявления эндометрия ранней стадии фазы секреции на фоне ЦГТ по сравнению с ЕЦ (66,7% против 30,8%, p < 0,05). Эндометрий средней стадии фазы секреции в 2 раза чаще был выявлен у женщин 1 группы по сравнению с аналогичными параметрами во 2 группе (69,2% против 33,3%, p < 0,05).

3. Молекулярно-генетический профиль «зрелого» эндометрия характеризовался высоким уровнем экспрессии мРНК генов *GPX3*, *PAEP*, *DPP4*, *TAGLN*, *HABP2*, *IMPA2*, *AQP3*, *IGFBP1*, *LIF*, *IL15*, *GNLY*, *NDRG1* в сочетании с низким уровнем экспрессии мРНК генов *HLA-DOB* и *MSX1*, *POSTN*. Для эндометрия ранней стадии фазы секреции (или так называемого «незрелого эндометрия») установлены противоположные характеристики: высокий уровень экспрессии мРНК генов *HLA-DOB* и *MSX1*, *POSTN* и низкий уровень экспрессии мРНК генов *GPX3*, *PAEP*, *DPP4*, *TAGLN*, *HABP2*, *IMPA2*, *AQP3*, *IGFBP1*, *LIF*, *IL15*, *GNLY*, *NDRG1*.

4. Эффективность криопротоколов в 2 раза выше в ЕЦ при переносе размороженных эмбрионов в раннюю стадию фазы секреции по сравнению с ПЭ в среднюю стадию фазы секреции (31,3% и 19,4%, $p > 0,05$). Частота наступления беременности у женщин на фоне ЦГТ не различалась в зависимости от стадии развития эндометрия и составила 16,6% и 16,7%.

5. Анализ транскрипционных профилей экспрессии генов эндометрия установил 3 стадии созревания эндометрия: раннерецептивный (кластер 1), рецептивный (кластер 2), позднерецептивный (кластер 3). По мере созревания эндометрия наблюдается повышение уровня экспрессии генов *GPX3*, *PAEP*, *DPP4*, *TAGLN*, *HABP2*, *IMPA2*, *AQP3*, *IGFBP1*, *LIF*, *IL6*, *IL15*, *GNLY*, *NDRG1* при одновременном снижении уровня экспрессии мРНК генов *HLA-DOB* и *MSX1*, *POSTN*. Лучшие показатели клинических беременностей (29,4% и 46,2% группах ЕЦ и ЦГТ соответственно) завершившиеся живорождениями во всех случаях, достигнуты в кластере 2, по сравнению с кластерами 1 и 3, где все беременности наступили только в ЕЦ (13,5% и 9,5% соответственно) и прервались на ранних этапах развития.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Имплантационный потенциал эндометрия в ЕЦ отражает экспрессия мРНК генов *PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB*, на фоне ЦГТ: экспрессия мРНК генов *IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLY, HLA-DOB, POSTN*.

2. Пациенткам с повторными неудачными имплантациями в анамнезе на этапе подготовки к переносу размороженных эмбрионов целесообразно проводить пайпель-биопсию эндометрия на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ с исследованием экспрессии мРНК генов *PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB* в эндометрии, либо на день П+5 на фоне ЦГТ с исследованием экспрессии мРНК генов *IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLY, HLA-DOB, POSTN* и проведением интегральной оценки эндометрия для определения его стадии созревания в цикле перед проведением программы криопереноса (приложение 1-2).

3. При установлении соответствия образца эндометрия раннерецептивному статусу целесообразно сдвинуть перенос размороженного эмбриона на один день позже: на фоне ЦГТ день П+6; в ЕЦ - день ЛГ+9.

4. Если в результате интегральной оценки получен рецептивный статус эндометрия, может быть рекомендован ПЭ на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ или на день П+5 на фоне ЦГТ.

5. При выявлении принадлежности образца эндометрия к позднерецептивному статусу рекомендовать сдвиг ПЭ на 1 день раньше: в цикле ЦГТ – день П+4; в ЕЦ – день ЛГ+6.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Определение рецептивного статуса эндометрия у пациенток, проходящих лечение в программах ВРТ в цикле перед переносом размороженных эмбрионов/ **М.И. Половнева, О.В. Бурменская, И.Е. Корнеева** // Мать и дитя: материалы XVIII Всероссийского научного форума. – 2017. – С.174.

2. Исследование транскрипционного профиля в эндометрии у женщин с бесплодием перед переносом размороженных эмбрионов/ **М.И. Половнева**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская, Л.А.Багдасарян// Материалы XXIV Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы» – 2018. – С.72-73.

3. Современные методы воздействия, направленные на повышение рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными попытками экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) / **М.И. Половнева**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская // **Гинекология**. – 2018. –№ 3.–С.66–70.

4. Современные методы оценки «окна имплантации» у пациенток, проходящих лечение в программе экстракорпорального оплодотворения / **М.И. Половнева**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская // **Акушерство и гинекология**. – 2018. –№ 7.–С.26–31.

5. Новые перспективы в исследовании рецептивности эндометрия на основании молекулярно-генетического кластерного стадирования эндометрия у пациенток перед проведением программы криопереноса/ **М.И. Мирошкина**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская //Тезисы XXVI Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы», Акушерство и гинекология-2020-№4(приложение), с. 150-152.

6. Оценка исходов программ криопереноса в зависимости от транскрипционного профиля генов эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации»/ **М.И. Мирошкина**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская, Н.Д. Мишина// **Акушерство и гинекология**. – 2020. –№ 4.–С.133–139.

7. Эффективность программ криопереноса в зависимости от транскрипционного «портрета» генов рецептивности эндометрия/ **М.И. Мирошкина**, И.Е. Корнеева, О.В. Бурменская, Н.Д. Мишина// **Акушерство и гинекология**. – 2020. –№ 11.–С.85–92.

Приложение 1

Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих стадии созревания эндометрия в ЕЦ

	Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций (КЛДФ)	
	Функция 1	Функция 2
ln [PAEP)	0,520	-0,451
ln [IGFBP1]	0,071	0,303
ln GPX3	0,279	-0,545
ln LIF	0,034	0,727
ln DPP4	-0,493	0,433
ln HLA-DOB	-0,380	-0,106
(Константа)	-0,795	6,572

Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия в ЕЦ

Кластеры	Значения центроидов кластеров	
	Функция 1	Функция 2
Раннерецептивный (кластер 1)	-4,291	0,880
Рецептивный (кластер 2)	0,315	-0,647
Позднерецептивный (кластер 3)	2,403	1,598

Приложение 2

Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих стадии созревания эндометрия на фоне ЦГТ

Маркер	Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций (КЛДФ)	
	Функция 1	Функция 2
In IMPA2	1,128	0,397
In IGFBP1	1,316	0,471
In GPX3	0,109	-0,847
In AQP3	-0,366	-0,996
In LIF	-0,474	0,961
In gnly	0,844	0,321
In HLA-DOB	-0,475	-0,382
In POSTN	0,390	1,300
(Константа)	15,700	10,896

Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия на фоне ЦГТ

Кластеры	Значения центроидов кластеров	
	Функция 1	Функция 2
Раннерцептивный (кластер 1)	-2,786	1,283
Рецептивный (кластер 2)	-0,395	-2,117
Позднерцептивный (кластер 3)	8,749	0,951

Приложение 3

**Алгоритм ведения пациенток, готовящихся к переносу
размороженных эмбрионов**