

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение**  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР**  
**АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ**  
**АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

*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

Диссертационная работа на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

И.Е. Корнеева

доктор биологических наук

О.В. Бурменская

**Москва 2021**

## Содержание

Введение .....	5
Глава 1. Роль рецептивного потенциала эндометрия в структуре повторных неудачных попыток ЭКО. Обзор литературы .....	13
1.1 «Окно имплантации»: что известно .....	14
1.2 Методы оценки рецептивности эндометрия .....	15
1.2.1 Морфологические методы оценки рецептивности эндометрия .....	15
1.2.2 Электронная микроскопия .....	15
1.2.3 Иммуногистохимия .....	16
1.2.4 Неинвазивные методы оценки рецептивности в цервикальном секрете .....	18
1.3 В поисках молекулярно-генетических маркеров рецептивности .....	19
1.4 Генетические детерминанты имплантации эмбрионов .....	21
1.5 Методы повышения рецептивности эндометрия .....	24
1.5.1 Скретчинг эндометрия .....	24
1.5.2 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор роста .....	26
1.5.3 Мононуклеарные клетки периферической крови .....	27
1.5.4 Плазма, обогащенная тромбоцитами .....	28
1.5.5 Персональное «окно имплантации» .....	29
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	33
2.1 Дизайн исследования .....	33
2.2 Методы исследования .....	36
2.2.1 Общеклинические методы исследования .....	36
2.2.2 Специальные методы исследования .....	37
2.2.3 Биоинформатический анализ .....	40

2.3 Подготовка эндометрия к переносу размороженных эмбрионов в полость матки.....	46
2.4 Статистическая обработка полученных данных.....	47
Глава 3. Результаты исследования .....	50
3.1 Клинико-лабораторная характеристика пациенток.....	50
3.2 Результаты клинико-лабораторных обследований.....	58
3.2.1 Особенности гормонального статуса.....	58
3.2.2 Данные ультразвукового исследования органов малого таза .....	60
3.2.3 Патоморфологическое исследование эндометрия.....	61
3.3 Результаты биоинформатического анализа.....	65
3.4 Молекулярно-генетическое исследование .....	68
3.4.1 Результаты кластерного анализа транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия.....	68
3.4.2 Сравнение транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия в кластерах образцов.....	69
3.4.3 Сравнение результатов гистологического исследования и молекулярно-генетического датирования эндометрия в ЕЦ.....	72
3.4.4 Результаты исхода программ ВРТ в зависимости от кластерного разделения образцов эндометрия в ЕЦ .....	74
3.4.5 Результаты кластерного анализа транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия на фоне ЗГТ .....	75
3.4.6 Сравнительный анализ результатов гистологического исследования и молекулярно-генетического датирования эндометрия на фоне ЦГТ .....	79
3.4.7 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от кластерного разделения образцов эндометрия в группе ЦГТ .....	80
3.4.8 Корреляции маркеров .....	81

3.5 Разработка интегрального молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия в ЕЦ.....	85
3.6 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования эндометрия .....	87
3.7 Разработка интегрального молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия на фоне ЦГТ.....	88
3.7.1 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования эндометрия .....	90
Глава 4. Обсуждение полученных результатов .....	95
Выводы .....	112
Практические рекомендации.....	114
Список сокращений .....	115
Список литературы .....	117
Приложение .....	131

## Введение

### Актуальность темы исследования

Повторные неудачные имплантации (Recurrent implantation failure (RIF)) являются одной из нерешенных проблем на пути наступления беременности в программах ВРТ. К RIF относят не менее 3 неудачных циклов ЭКО с переносом одного или двух морфологически нормальных эмбрионов в каждом цикле [102]. По данным опроса IVF-Worldwide, в котором приняли участие 217 клиник ЭКО, 10-30% женщин имели несколько неудачных попыток ЭКО в анамнезе [24]. Около 50% бесплодных пар отказываются от проведения дальнейшего лечения уже после двух безуспешных попыток ЭКО. Наиболее распространенными причинами отказа от продолжения лечения являются финансовые возможности пары, стресс и плохой прогноз лечения [16].

Согласно отчету РАРЧ, за 2016 год было проведено 113976 циклов ЭКО. Из них доля ЭКО составила 27,6%, ИКСИ 35,5% от всех циклов ВРТ. При этом частота наступления беременности в программах ЭКО составила 34,8% ИКСИ 30,8% на программу [3]. Для сравнения, согласно отчету ESHRE, за 2014 год проведено 291235 циклов лечения, частота наступления беременности на перенос составила 35,8% для оплодотворения методом ЭКО и 35,0% для ИКСИ [15]. С каждым годом совершенствуются протоколы овариальной стимуляции, витрификации эмбрионов, методики предимплантационного генетического тестирования (ПГТ), интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ), технологии созревания ооцитов (In Vitro Maturation (IVM)). Однако, даже перенос эуплоидного эмбриона не всегда заканчивается наступлением беременности. В этих случаях главной причиной выступает нарушение процессов взаимодействия между бластоцистой и децидуальным эндометрием, а именно рецептивности эндометрия [80]. На сегодняшний день не существует общепринятой методики оценки рецептивных свойств эндометрия, направленной на определение «окна имплантации» для переноса эмбрионов в полость матки у пациенток с множественными безуспешными попытками ЭКО и ПЭ.

В поисках инструмента, способного преодолеть неудачные имплантации, было предложено использовать в клинической практике стратегию «freeze all» для ПЭ в программе криопротокола, что может повлиять на повышение результативности программ ЭКО у пациенток с RIF [54]. Известно, что стимуляция суперовуляции способствуют ускорению развития слизистой оболочки матки, тем самым нарушая тонкие системы сигналов и взаимодействия между эмбрионом и эндометрием [4,58]. В связи с этим в мировой практике сейчас существует тенденция к принятию данной стратегии с предварительной подготовкой и определением рецептивного потенциала эндометрия [23].

Благодаря развитию молекулярной генетики, изучение особенностей генетического профиля в эндометрии у пациенток с бесплодием является перспективным инструментом на пути к пониманию процессов имплантации. Однако, на сегодняшний день нет ни одного маркера, который мог бы использоваться в рутинной практике для диагностики рецептивного статуса эндометрия. Большой интерес представляет определение стадии развития эндометрия для проведения персонального переноса эмбрионов (personal Embryo Transfer (pET)), так как существует гипотеза, что пациентки с RIF могут иметь сдвиг «окна фертильности» [123]. Оценка рецептивности эндометрия на основании исследования молекулярно-генетических особенностей взаимодействия генов, участвующих в синхронизации процессов между зуплоидной бластоцистой и слизистой оболочкой матки, вероятно, помогло бы в определении потенциальных предикторов успешной имплантации. Благодаря накопленным данным существует понимание о том, что экспрессия генов может изменяться в течение цикла, и последние исследования акцентируют свое внимание именно на периоде «окна имплантации» [65, 87,88,96]. Однако, общей концепции в этом вопросе достигнуто не было.

Вышеизложенное способствовало формированию направления настоящего исследования: поиск молекулярно-генетических маркеров развития эндометрия как предикторов имплантации эмбриона в циклах переноса размороженных эмбрионов.

## **Степень разработанности темы исследования**

Исследование рецепторного аппарата эндометрия является одной из нерешенных задач на пути к успешной имплантации и пролонгированию беременности в клинике ВРТ. Актуальным вопросом остаётся проблема подготовки пациенток к переносу эмбрионов криопротоколе при отсутствии видимой причины повторных неудач. Разработка тест-системы на основании молекулярно-генетического исследования транскриптома в эндометрии, способной определить готовность эндометрия к адгезии трофобласта, поможет в развитии персонализированного подхода к пациенткам с повторными неудачными имплантациями в анамнезе.

**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 у обследуемых женщин.

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**

В результате проведенного исследования установлено, что повторные неудачи имплантации в обследованной когорте женщин 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 фазу стадии секреции. Отражением этих изменений является более высокая частота наступления беременности в раннюю фазу стадии секреции в естественном цикле, а также число живорождений. Полученные данные обосновывают необходимость пересмотра информативности гистологического исследования эндометрия как единственного метода для оценки его рецептивного статуса.

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, GNLV, 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, GNLY, HLA-DOB, POSTN на П+5 на фоне ЦГТ, позволяющая выделить 3 фазы развития имплантационного эндометрия: раннерецептивный, рецептивный, позднерецептивный и определить наиболее удачный день для ПЭ.

Разработан алгоритм обследования женщин с повторными неудачами в имплантации 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 неудачами имплантации.

### **Методология и методы исследования**

Исследование выполнено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (директор – профессор, академик РАН Г.Т. Сухих). Клиническая часть работы и сбор биоматериала были проведены в 1-ом гинекологическом отделении (заведующий отделением к.м.н. А.Н. Абубакиров). Специальные методы исследования: гистологическое исследования эндометрия было выполнено в отделении патологоанатомическом отделении (руководитель – д.м.н. Щеголев А.И.), биоинформатический анализ- в лаборатории биоинформатики (руководитель – Боровиков П.И.), молекулярно-генетическое исследования - на базе института репродуктивной генетики (руководитель – д.б.н. Трофимов Д.Ю.).

В исследование были включены 140 женщин, обратившихся для проведения криопротокола. Все пациентки были обследованы в соответствии с приказом министерства здравоохранения РФ №107н от 30.08.2012 г. Всем пациенткам была произведена пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации». Образцы эндометрия были изучены с помощью гистологического и молекулярно-генетического методов исследования. Особенности экспрессии мРНК генов GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, POSTN, MSX1, IGFBP1, LIF, IL15, GNLY, NDRG1 были определены методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Так же в работе использовались клиничко-лабораторные, инструментальные методы исследования. Статистический анализ данных производился с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистической программы IBM SPSS Statistics v22 (США).

### **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, GNLY, NDRG1 и снижение уровня экспрессии мРНК генов HLA-DOB, MSX1, POSTN. Наиболее благоприятными для имплантации и

продолжения беременности являются промежуточные уровни экспрессии генов, соответствующие переходному периоду между ранней и средней фазами стадии секреции.

3. Интегральная оценка экспрессии мРНК генов PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB, IMPA2, AQP3, GNLY 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 позднеорецептивном 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 и 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. академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ (15 июня 2020 года, протокол № 21).

### **Реализация и внедрение полученных результатов в практику**

Алгоритм ведения пациенток, готовящихся к программе переноса размороженных эмбрионов, сформированный на основании проведенного исследования используется в практической деятельности в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **Публикации результатов исследования**

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, списка литературы и приложения. Работа изложена на 132 страницах компьютерного текста, содержит 11 рисунков и 33 таблицы. Библиографический указатель содержит 124 источника, из них 10 отечественных и 114 зарубежных авторов.

## **Глава 1. Роль рецептивного потенциала эндометрия в структуре повторных неудачных попыток ЭКО. Обзор литературы**

Бесплодие является одной из проблем, с которой сталкивается множество семейных пар. В развитых странах частота бесплодия колеблется от 3,5-16,7% населения, в менее развитых странах этот показатель составил от 6,9-9,3%, около половины из них обращаются за медицинской помощью [68]. Благодаря развитию методов ВРТ для многих бесплодных пар стало возможным достижение долгожданной беременности, однако лишь в 30% программа ЭКО завершается благоприятно. Повторные неудачные имплантации, приводят к тому, что пациенты отказываются от дальнейших попыток, ввиду высокой стоимости и неутешительного прогноза.

RIF – это отсутствие наступления беременности при переносе не менее 4-х эмбрионов в трех последовательных циклах ЭКО или криоциклах у пациенток в возрасте до 40 лет [100]. Известно, что основная причина RIF зависит от двух факторов - качества эмбрионов и состояния рецептивности эндометрия. Проблему низкого качества эмбрионов на сегодняшний день пытаются решить с помощью усовершенствования методов предимплантационного генетического скрининга (ПГС). Частота наступления беременности после ПГС составляет 43,7% на перенос эмбрионов [3]. Однако, лишь в 1/3 случаев за неудачу отвечает эмбрион, в то время как нарушение рецептивности эндометрия выявляют в 2/3 случаев неудачных имплантаций у женщин, планирующих беременность самостоятельно или с помощью ВРТ. Таким образом, вопрос синхронизации развития эмбриона и эндометрия является непреодолимым барьером на пути решения проблемы RIF.

Shapiro B.S. и соавт. (2011г.) провели проспективное исследование, в результате которого сделали вывод о том, что частота наступления беременности после переноса в свежем цикле ЭКО ниже, чем после переноса размороженных эмбрионов в криоциклах (70,8% против 38,9%,  $P < 0,0001$ ), что, возможно, связано с нарушением синхронизации развития эмбриона и эндометрия в циклах стимуляции суперовуляции [51]. Кроме того, ряд исследований показали, что

действие агонистов и антагонистов ГнРГ в циклах стимуляция суперовуляции приводит к ускоренному созреванию эндометрия и опережению его развития на 1-3 дня [4,58]. Решить проблему десинхронизации развития между бластоцистой и эндометрием можно с помощью витрификации эмбрионов с последующим проведением криопротокола с учетом рецептивности эндометрия [4,23,54,58]. Программа криопереноса подразумевает проведение переноса бластоцисты в более «естественных» условиях, с возможным проведением «коррекции» рецептивности эндометрия.

### **1.1 «Окно имплантации»: что известно**

Имплантация включает в себя три этапа: оппозиция – распознавание рецептивного эндометрия, адгезия- взаимодействие сигнатуры эмбриона с рецептивным эндометрием до имплантации и наконец инвазия эмбриона с образованием трофобласта, децидуализация и плацентация [42]. Известно, что бластоциста может имплантироваться в слизистую оболочку матки только в определенный период времени, а именно на 7-8 день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ+7-8) у женщин с 28 дневным циклом, в так называемое «окно имплантации». Таким образом становится понятно, что наступление беременности возможно только в определенный период при взаимодействии бластоцисты высокого качества с рецептивным эндометрием. Этот процесс контролируется иммунными клетками, цитокинами, факторами роста, хемокинами и молекулами адгезии [46]. Поэтому вопрос идентификации максимальной восприимчивости эндометрия к нидации эмбриона на сегодняшний день представляет большой интерес.

Существует множество методов оценки «окна имплантации»: гистологическое исследование, электронная микроскопия, иммуногистохимическое окрашивание ткани, изучение уровня простагландинов в аспирате из полости матки с помощью масс-спектрометрии и молекулярно-генетическое исследование экспрессии мРНК в эндометрии.

## **1.2 Методы оценки рецептивности эндометрия**

### **1.2.1 Морфологические методы оценки рецептивности эндометрия**

Первым и в течение долгого времени остававшийся «золотым стандартом» рецептивности эндометрия был гистологический метод исследования эндометрия. Noyes R.W. были разработаны критерии оценки ткани эндометрия, для определения «фазы созревания» эндометрия [26]. При несовпадении развития эндометрия у пациенток с бесплодием предполагали наличие недостаточности лютеиновой фазы (НЛФ).

Исследования, проведенные в последующем, показали, что гистологическая оценка эндометрия, согласно критериям Noyes, не всегда позволяет дифференцировать эндометрий фертильных женщин от бесплодных, поэтому, морфологические признаки рецептивных свойств эндометрия, выявленные с помощью этого метода, были поставлены под сомнение, что в свою очередь привело к развитию дальнейших методов [11,90].

### **1.2.2 Электронная микроскопия**

Дальнейшие поиски маркеров «окна имплантации» привели к развитию электронной микроскопии, в ходе которой были выявлены микровыросты на поверхности эндометрия - пиноподии. Установлено, что пиноподии появляются с середины лютеиновой фазы, когда происходит увеличение уровня прогестерона. Zhioua A и соавт. (2012г.), изучая эндометрий средней фазы стадии секреции с помощью электронной микроскопии, провели анализ клеточных компонентов, составляющих эпителий эндометрия. Авторы описали 4 типа клеток, которые идентифицируются в разных пропорциях в эндометрии. Только пиноподии были выявлены на протяжении всего периода «окна имплантации» [89].

В исследовании 2018 года проводили изучение роли пиноподий в качестве маркера рецептивности эндометрия у пациенток с RIF. Установлено что, частота клинической беременности была выше у женщин, ПЭ которым производили с

учетом индекса пиноподий  $>85$ , по сравнению со стандартным (33,82% против 8,11%,  $p=0,004$ ). Исследователи делают вывод о значительной роли идентификации пиноподий в качестве предиктора наступления беременности у пациенток с RIF. Однако не всегда низкая экспрессия пиноподий ассоциируется с неудачной имплантацией. Авторы полагают, что сочетание методов ПГС с определением индекса пиноподий и индивидуальный ПЭ могут сыграть благоприятную роль в частоте наступления беременности у пациенток с RIF [21].

В то же время ряд проведенных исследований указывает на неустановленную роль пиноподий в идентификации рецептивности эндометрия [91,112]. Поэтому работы, направленные на поиски новых методов исследования оценки предикторов «окна имплантации», были продолжены.

### **1.2.3 Иммуногистохимия**

Так как эндометрий подвергается циклическому изменению в течении цикла под действием стероидных гормонов, в частности E2 и П, которые отвечают за трансформацию эндометрия, был произведен поиск характерного для «окна имплантации» изменения уровня экспрессии рецепторов к этим стероидам (progesterone and estrogen receptor (PR, ER)). Установлено, что снижение экспрессии рецепторов к E2 и П в эндометрии совпадает с повышением уровня этих гормонов в крови и достигает своего максимума в период высокой рецептивности эндометрия, что в свою очередь сопровождается появлением на поверхности эндометрия белков адгезии (интегринов) и увеличению чувствительности к факторам роста [75].

Проведенные ранее исследования показали, что у пациенток с неудачными имплантациями есть нарушение соотношения экспрессии PR, ER в сочетании со снижением уровнем лейкемия ингибирующего фактора роста (LIF) в эндометрии в период предполагаемого «окна имплантации». В то же время в группе контроля данная закономерность не прослеживалась: была отмечена умеренная экспрессия LIF и нормальное соотношение PR, ER с 20 по 22 дни менструального цикла [6,8]. Таким образом, можно сделать вывод, что у данной когорты пациенток причина



нарушения рецептивности эндометрия может быть связана с нарушением чувствительности эндометрия к половым стероидам. Однако, иммуногистохимическое метод исследования является довольно субъективным и во многом зависит от специалиста, проводящего окрашивание и оценку экспрессии данных маркеров.

LIF еще один кандидат на роль высокоинформативного маркера рецептивности эндометрия. LIF — это гликопротеид из семейства интерлейкина-6. Известно, что LIF взаимодействует со специфическим рецептором LIF-R, расположенным на бластоцисте. Существует множество работ по изучению экспрессии LIF в период средней стадии фазы секреции эндометрия у пациенток с бесплодием [5,6,76,98].

При проведении сравнения уровня экспрессии LIF и LIF- R у бесплодных и фертильных женщин, выявлено значительное снижение этих показателей в эпителиальных клетках у пациенток с бесплодием ( $p=0,05$  и  $p=0,006$  соответственно). Однако не было выявлено статистически значимых различий между группами в экспрессии LIF в строме. LIF-R был повышен в стромальных клетках фертильных пациенток, но полученные данные, были недостоверны ( $p=0,10$ ). Таким образом, авторы делают вывод о том, что при снижении рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием отмечается выраженное снижение экспрессии LIF и LIF – R только в эпителиальных клетках [76].

Парамонова Н.Б. и соавт. (2018г.) изучали рецептивность эндометрия у женщин с бесплодием и НГЭ с помощью клинико-морфологического, ИГХ и молекулярно-генетического методов исследования. Авторы проводили сравнение 90 женщин с бесплодием в сочетании с эндометриозом (аденомиоз 1-2 стадии и НГЭ) и 54 женщины с ТПБ и успешной реализацией программы ЭКО. В результате исследования авторы делают вывод о снижении количества пиноподий при морфологическом исследовании, о снижении уровня интегрин  $\alpha v \beta 3$ , LIF, гликоделина А, НОХА-10, об увеличении синтеза ароматазы и дисбалансе экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в строме эндометрия женщин с бесплодием и НГЭ, выявляемых иммуногистохимически. Результаты

молекулярно-генетического исследования подтвердили данные ИГХ. Исследование показало снижение уровня экспрессии мРНК генов HOXA-10, LIF-R и PR. Таким образом, авторы приходят к выводу, что у женщин с бесплодием в сочетании с эндометриозом для идентификации нарушения рецептивности эндометрия рекомендовано сочетание всех трех методов исследования: морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического [5].

#### **1.2.4 Неинвазивные методы оценки рецептивности в цервикальном секрете**

Перспективным направлением являются неинвазивные методы исследования цервикального слизи для определения рецептивности эндометрия. Сеидова и соавт. (2015г.) проводили исследование уровней LIF, LIF-R и эстрина в цервикальной слизи (ЦС) с помощью иммуноферментного метода в сопоставлении с гистологическим исследованием биоптатов эндометрия в среднюю фазу стадии секреции. В результате исследования установлено, что пациентки с бесплодием имели достоверно более низкие значения этих маркеров в ЦС, чем фертильные пациентки группы контроля ( $p < 0,05$ ). Так же авторы выявили умеренную корреляцию между уровнем исследуемых биомаркеров в ЦС и биоптатах эндометрия, что позволило предложить данный метод в качестве неинвазивного теста оценки рецептивности эндометрия в программе ЭКО. Однако авторы отмечают, что у пациенток с РИФ необходимо исследовать рецептивность эндометрия как неинвазивным, так и инвазивным методами [9].

Учитывая весьма разноречивые данные о роли вышеописанных маркеров и методах исследования «окна фертильности» эндометрия, развитие молекулярно-генетических методов изучения экспрессии генов, выполняющих различные функции в процессе имплантации, позволило получить новую обширную информацию о рецептивном эндометрии.

### **1.3 В поисках молекулярно-генетических маркеров рецептивности**

Следующим этапом поиска маркеров «окна имплантации» стало развитие технологии «omics». Для идентификации биомаркеров рецептивности эндометрия проведено много исследований в естественном цикле (ЕЦ), сравнивающих особенности экспрессии генов в раннюю и среднюю стадию фазы секреции. Первые работы в этом направлении появились еще в 2004 году, когда была предпринята попытка прогнозирования гистологического развития эндометрия на основании молекулярно-генетических особенностей эндометрия в течение менструального цикла у здоровых женщин с регулярным менструальным циклом [87,88].

Эти исследования были основополагающими в формировании направления дальнейших работ по изучению транскриптома эндометрия именно в период «окна имплантации».

Naouzi D. И соавторы (2009г.), одним из первых проводили сравнение молекулярно-генетических особенностей экспрессии генов в биоптатах эндометрия, полученных в раннюю и среднюю стадии фазы секреции, на 2-й и 7-й дни после пика ЛГ (ЛГ+2 и ЛГ+7). Установлено статистически значимое повышение экспрессии 945 генов и понижение 67 генов. Были выявлены 5 новых биомаркеров: LAMB3, MFAP5, ANGPTL1, EG-VEGF и NLF2. На основании проведенного исследования разработан Win-Test, который авторы предлагают использовать для определения наибольшей рецептивности эндометрия в циклах лечения бесплодия на основании оценки уровня экспрессии 12 генов: APOD, APOL1, DKK1, MSX2, CLDN4, SPP1, COMP, FBLN1, LAMB3, DPP4, IL15, GPX3 [65].

В 2011 году работа испанских ученых легла в основу разработки еще одной тест-системы - «Endometrial Receptivity Array» (ERA), которая заключается в изучении уровня экспрессии 238 генов с помощью микроматричного анализа. Согласно проведенному исследованию, система ERA позволяет определить

персональное «окно имплантации» у пациенток с RIF с чувствительностью 99% и специфичностью 88%. При этом авторы рекомендуют использовать данный тест перед проведением цикла переноса размороженных эмбрионов как в ЕЦ, так и на фоне циклической гормональной терапии (ЦГТ) [80,96].

Разработка еще одной тест-системы ER Map® / ER Grade®, заключалась в изучении особенностей экспрессии мРНК 184 генов методом от ПЦР. В исследовании участвовали 2 группы пациенток: группа А фертильные доноры (n=96) и группа В бесплодные пациентки (n=120). Пациентам группы А была произведена пайпель-биопсия эндометрия на ЛГ+2 и ЛГ +7 в одном и том же менструальном цикле. В группе В пайпель был произведен на П+5 в цикле ЦГТ. Так же образцы пациенток группы В были проанализированы с помощью теста ERA. В результате исследования 100% образцов из первой группы были правильно отнесены к пререцептивному состоянию (ЛГ+2) и рецептивному (ЛГ+7) с помощью ER Map® / ER Grade®. В группе пациенток с бесплодием в 97,59% случаев установлено соответствие образцов ER Map® / ER Grade® с тестом ERA в тренировочном наборе и в 91,67 % в тестовом наборе [31].

По данным крупного мета-анализа, в который были включены 9 исследований, посвящённых изучению особенностей экспрессии генов в период «окна имплантации», были выделены 57 генов, которые имели схожие изменения в уровне экспрессии и могут играть важную роль в процессе имплантации бластоцисты. Из 52 генов, экспрессия которых была повышена, в нашем исследовании были изучены 9 из них: PAEP, GPX3, IL15, GNLY, DPP4, IGFBP1, AQP3, NDRG1, HABP2 [85].

Так как данные тест системы являются достаточно дорогостоящими и не применяются в рутинной клинической практике в России, актуальным остается вопрос разработки аналогов данных исследований, которые могли бы быть доступны для нашей страны.

## 1.4 Генетические детерминанты имплантации эмбрионов

Имплантация эмбриона состоит из ряда последовательных событий, благодаря которым устанавливается связь между тканью матери и бластоцистой. Они включают в себя этапы аппозиции, адгезии и инвазии. Необходимым условием для успешной инвазии является процесс децидуализации, в результате которого происходит секреторная трансформация маточных желез, приток и дифференцировка клеток иммунитета (натуральных киллеров и макрофагов), ремоделирование сосудов, а также трансформация стромальных клеток в специализированные децидуальные [25].

Ключевыми факторами в инвазии трофобласта являются цитокины и факторы роста [72]. В эксперименте *in vitro* было выявлено специфическое изменение 17 факторов из 27 в децидуальных клетках по сравнению со стромальными в эндометрии женщин: IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, Eotaxin CCL11, G-CSF, IP-10, RANTES и VEGF [27].

IL-6 - ген кодирует цитокин, который участвует в процессе воспаления и формирования В- клеток. Белок в основном секретируется в участке воспаления в сыворотке и индуцирует транскрипционный воспалительный ответ через альфа-рецептор IL-6. IL-6 совместно с LIF стимулируют инвазию первичного трофобласта [67].

IL-15 - ген кодирующий цитокин, который активирует Т-клетки, натуральные киллеры и процессы пролиферации. По своей структуре и функциям он похож на IL-2 [20]. Было выявлено повышение уровня IL-15 в стромальных, а затем в децидуальных клетках эндометрия под действием прогестерона по мере перехода эндометрия от стадии пролиферации к средней стадии фазы секреции и в первом триместре беременности [66].

Децидуальные клетки способны увеличивать экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММР-2, -3, -7, -9) для активации процессов разрушения внеклеточного матрикса, что способствует инвазии трофобласта. Для ограничения и контролирования этого процесса децидуальные клетки, наряду с ММР,

продуцируют тканевые ингибиторы металлопротеиназ. Таким образом становится понятно, что процесс инвазии трофобласта является высокоспециализированным, так как недостаточность инвазии трофобласта может привести к неприятным последствиям для пролонгирования беременности, а также чрезмерная инвазия может способствовать такому грозному осложнению, как вращание плаценты [27].

ММР-2,-7 являются членами семейства матричных металлопротеиназ (ММР), способных разрушать внеклеточный матрикс и компоненты участвующие в передаче сигнала в процессе имплантации бластоцисты у человека. В работах, проведенных ранее установлено повышение уровня экспрессии этих генов под действием E2 в фазу пролиферации и снижение в секреторной фазе менструального цикла [81,82,88]

Среди генов, которые контролируют процесс децидуализации клеток, важное место занимают гены семейства гомеобокса. Гены семейства гомеобокса (НОХА10, НОХА11) обнаружены в кластерах, имеющих название А, В, С, D, расположенных на четырех разных хромосомах. Экспрессия этих генов регулируют развитие эмбриона в пространстве и времени после попадания в полость матки [28,29].

Гены НОХА10, НОХА11 относятся к кластеру А на хромосоме 7 и кодируют фактор транскрипции, которые отвечают за морфогенез и дифференцировку эмбрионов. Вероятно, эти гены участвуют в процессах фертильности и жизнеспособности эмбрионов. Известно, что у позвоночных НОХА10 участвует в формировании и развитии матки, а НОХА11 - в нижней части матки и шейки матки в эмбриональном периоде. В эксперименте на мышах было показано, что при отсутствии или дефекте гена НОХА10 не происходило полноценной децидуализации клеток эндометрия, в результате чего наблюдались нарушения в процессе имплантации эмбриона, либо происходила остановка развития эмбриона после имплантации. Одной из важнейших функций генов НОХА10, НОХА11 является контроль за экспрессией рецепторов прогестерона и обеспечение его функциональной активности [84,114].

MSX1 (msh homeobox1). Этот ген кодирует белки, которые относятся к мышечному сегменту семейства гомеобокса, контролирует функцию белка, ранее известного как гомеобокс 7 (HOXA7). Как репрессор транскрипции в период эмбриогенеза, он так же играет роль в контроле процессов формирования конечностей и одонтогенеза у плода. С момента попадания бластоцисты в полость матки экспрессия гена MSX1 снижается. Причем уровень экспрессии MSX1 под действием П сохраняется, однако, уровень его начинает снижаться по мере увеличения уровня E2 или LIF, что говорит о косвенном воздействии E2 через индукцию LIF [22,83].

Кроме того, процесс децидуализации связан с экспрессией пролактина и инсулиноподобного фактора роста-связывающего белок 1 (IGFBP1) [25,73].

Как уже изложено ранее, для успешной имплантации эмбриона необходимо, чтобы стромальные клетки трансформировались в децидуальные. Период децидуализации, как правило, соответствует средней стадии фазы секреции эндометрия, когда происходит стимуляция уровня экспрессии гена PAEP под действием прогестерона. PAEP — это гликопротеин, также известный как гликоделин А, у человека встречается в секреторном эндометрии, околоплодных водах, и семенной жидкости. В эндометрии PAEP секретируется железами децидуального эпителия и способствует процессу прикрепления бластоцисты к эндометрию, а затем формированию трофобласта [61,111]. В ряде исследований показано повышение уровня PAEP в период «окна имплантации» [31,88,96].

Одним из основных медиаторов действия E2 является LIF, член семейства IL-6. Отмечено достоверное повышение уровня экспрессии гена LIF в период «окна фертильности» у здоровых женщин. Интересным является то, что при удалении этого гена в эксперименте у мышей имплантация бластоцисты не происходит [36].

NDRG1 является членом семейства NDRG, подавляемого N-Мус, относящийся к надсемейству альфа/бета-гидролазы, которое содержит 4 члена. NDRG1 кодирует белок, участвующий в реакции на стресс, ответа на гормоны, клеточного роста и дифференцировки. Также кодируемый этим геном белок необходим для p53- опосредованной активации каспазы и апоптоза. Проведенные

ранее работы показывают, что NDRG1 реагирует на гомоцистеин в эндометрии [64]. Кроме того, установлено значительное повышение уровня экспрессии мРНК этого гена в эндометрии в среднюю фазу стадии секреции как в эпителиальных, так и в стромальных клетках по сравнению с другими фазами менструального цикла [30,60,].

TAGLN (трансгелин). Этот ген кодирует изменение формы белка актина и дифференцировки гладких миоцитов сосудистой стенки и висцеральной ткани. Встречается в эндометрии, мочевом пузыре, простате и ряде других органов. Точная функция этого гена не установлена, однако есть данные, которые показывают его участие в дифференцировке клеток, миграции клеток, в формировании подосом, а также инвазии тканей и ремоделировании клеточного матрикса [13,52,53,86].

HLA-DOB (главный комплекс гистосовместимости класс II DO бета) кодирует бета цепь белка. Локализуется во внутриклеточных везикулах. HLA-DOB участвует в презентации антигена [63].

IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1) кодирует белок, который имеет сходную структуру с инсулином и участвует в процессах роста и развития. В исследовании на мышцах показано, что, вероятно, IGF1 под действием E2 участвует в процессе перехода эндометрия из рецептивного в рефрактерное состояние, т.е. в «закрытии окна имплантации» [116].

## **1.5 Методы повышения рецептивности эндометрия**

Так как до сих пор не известны точные механизмы, отвечающие за успешную имплантацию, для повышения результативности программ ЭКО и ПЭ у пациенток с RIF предложены методы повышения рецептивных свойств эндометрия, основанные на фундаментальных знаниях.

### **1.5.1 Скретчинг эндометрия**

Скретчинг (от английского scratch- царапина) – повреждение эндометрия, производимое с помощью пайпеля либо кюретки во время проведения



гистероскопии. Данный метод предложен для повышения рецептивных свойств эндометрия у пациенток с RIF [79]. Четкого понимания механизма действия скретчинга на сегодняшний день не существует. Одна из теорий, получивших наибольшее распространение является теория воспаления, согласно которой под действием локального повреждения слизистой оболочки матки происходит каскад воспалительных реакций. В результате чего повышается уровень провоспалительных цитокинов, таких как белок воспаления макрофагов 1 В (MIP), фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), остеопонтин (SPP1) и IL15, которые участвуют в процессе имплантации бластоцисты [78].

Существует множество работ, которые подтверждают положительное влияние скретчинга на частоту наступления беременности (ЧНБ) и частоту живорождения у пациенток с RIF [1,34,43,44,48,107]. В тоже время в ряде работ не было выявлено увеличения ЧНБ и родов между пациентами с проведением и без проведения скретчинга [37,108,109].

В 2015 году был проведён интернет-опрос среди 189 ЭКО центров в Австралии, Новой Зеландии и Англии, посвященный использованию скретчинга в практике клинициста. Оказалось, что 83% опрошенных рекомендовали использовать локальное повреждение эндометрия перед проведением программы ВРТ. Причем 92% респондентов считали, что скретчинг целесообразно проводить только у пациенток с RIF, в то же время 6% участников опроса проводили эту процедуру даже перед 1-ой попыткой ЭКО. Несмотря на то, что многие врачи используют данную методику в своей практике, убедительных данных за высокую эффективность этой процедуры нет [47].

По данным мета-анализа 2019 года, который включал в себя 14 РКИ и общей сложностью 2537 участников, не было установлено статистической значимой разницы по ЧНБ, частоте клинической беременности и частоте живорождений среди пациенток, которым скретчинг проводился и нет. Авторы делают заключение о том, что скретчинг эндометрия не рекомендуется к использованию в рутинной практике, до тех пор, пока не будут проведены качественные исследования, доказывающие обратное [49].

## 1.5.2 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор роста

Внутриматочное введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (G-CSF) также было предложено к использованию у пациенток с RIF и тонким эндометрием [103]. Предположительный механизм действия заключается в воздействии колониестимулирующих факторов роста на процесс ремоделирования сосудов, на активацию клеточных путей адгезии и на формирование иммунного ответа в эндометрии. Однако, точный механизм действия остается неясным.

В двойном слепом плацебо контролируемом исследовании, было включено 100 пациенток с RIF. 1-ю группу составили 40 женщин, которым в день забора ооцитов в полость матки вводили 300мкг/1 мл G-CSF в «свежем» цикле ЭКО или в день начала назначения П в криоцикле. Во 2-ой группе (n=40) вводили физиологический раствор, 3-я группа - плацебо (n=20). После проведенного лечения положительный уровень  $\beta$ -ХГ был установлен в 17 случаях: у 10 пациенток (25%) в группе с G-CSF; у 5 пациенток (12,5%) во 2 группе и у 2-х (10%) из группы плацебо. Частота самопроизвольных выкидышей составила 17,6% (3 случая), два из них в первой группе и один во 2-ой группе. При этом частота клинических беременностей в группе с G-CSF составила 80% (8 случаев), в группе с инфузией физиологического раствора- 80% (в 5 случаях) и в группе плацебо- 100 % (в 2 случаях). Авторы делают вывод о том, что применение G-CSF у пациенток с RIF способствует повышению ЧНБ, однако не влияет на частоту выкидышей и клинических беременностей [113].

Мета-анализ, посвященный влиянию G-CSF на ЧНБ у пациенток с RIF и(или) тонким эндометрием, включал в себя анализ 10 работ, с общим количеством протоколов ЭКО и ПЭ 1016 (521 цикл с применением G-CSF и 495 контрольных циклов лечения), в которых проводилось сравнение эффекта от внутриматочного или подкожного введения G-CSF с группой плацебо. В результате анализа было установлено повышение ЧНБ в группе, где применялся G-CSF (ОР 1,89; 95% ДИ

1,53–2,33,  $P = 0,001$ ). В то же время не было установлено увеличение частоты имплантации между группами (ОР 1,84;95% ДИ 0,84–4,03,  $P = 0,13$ ) [117].

Исследование Kunicki M. и соавт. (2017г.) было посвящено изучению влияния G-CSF у пациенток с тонким эндометрием в цикле переноса размороженных эмбрионов. Было выделено две группы пациенток: 1-ая группа ( $n=29$ ) женщины, которым проводилась внутриматочная инфузия колониестимулирующего фактора роста; 2-ая контрольная группа- без лечения ( $n=33$ ). Пациентки имели сопоставимые параметры М-ЭХО: 6,50мм (5,50-6,80мм) в 1группе и 6,40мм (5,50-7,0мм) в группе контроля. В результате было отмечено увеличение толщины эндометрия после внутриматочного введения G-CSF до 7,90 мм (6,58-8,70), а в контрольной группе - до 6,90 мм (6,0-7,75)  $p = 0,01$ . В то же время не было установлено статистически значимой разницы по частоте наступления клинической беременности и родов живым плодом: клиническая беременность наступила у 5 пациенток (17,24%) в группе, получавшей G-CSF, и у 5 (15,15%) в контрольной группе ( $p > 0,05$ ). Частота родов составила 2 случая (6,89%) в группе G-CSF и 2 (6,06%) в контрольной группе ( $p > 0,05$ ). Таким образом, авторы пришли к заключению о том, что применение G-CSF благоприятно влияет на рост эндометрия, однако не оказывает влияние на исходы программ криопереноса [62].

Так как существуют весьма разноречивые данные о результатах применения G-CSF, а также ограничения по его применению в гинекологии в России, данный препарат не получил широкого распространения и в настоящее время работы в этом направлении продолжаются.

### **1.5.3 Мононуклеарные клетки периферической крови**

Существует гипотеза о том, что мононуклеарные клетки наряду с ХГЧ способствует формированию диалога между бластоцистой и эндометрием. Известно, что в процессе децидуализации количество иммунных клеток резко возрастает, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) взаимодействуют непосредственно с трофобластом в процессе адгезии и инвазии, после чего возвращаются в системный кровоток матери. На основании того, что во

время имплантации эмбрион окружен МКПК, было предложено использовать метод внутриматочного введения МКПК для повышения рецептивных свойств эндометрия у пациенток с повторными неудачами [33].

Введение МКПК повышает эффективность программы ЭКО у пациенток с RIF, к такому выводу пришли исследователи после проведения сравнения влияние на частоту наступления беременности, частоту имплантации и частоту выкидышей среди пациенток с тремя и более отрицательными результатами лечения с помощью ВРТ в анамнезе. В исследовании было включено 240 циклов ПЭ. Все пациенты были разделены на две группы: пациенткам первой группы (n=93) за 1 день до переноса эмбрионов, была произведена внутриматочная инфузия МКПК, которые были получены из периферической крови пациенток, после культивирования с ХГЧ. В контрольную группу были включены 105 женщин. Частота наступления клинической беременности и частота имплантации в первой группе была значительно выше, чем во второй, и составила 46,24% и 23,66%, против 20,95% и 11,43% соответственно ( $p < 0.05$ ) [69].

Внутриматочное введение МКПК считается перспективным методом повышения результативности программы ЭКО и ПЭ у пациенток с двумя и более неудачными имплантациями, что было подтверждено рядом исследований [10,70,71].

В то же время трудности в изоляции и культивировании МКПК ограничивают использование данного метода в ряде клиник.

#### **1.5.4 Плазма, обогащенная тромбоцитами**

Внутриматочное введение плазмы, обогащенной тромбоцитами, еще один из способов, предложенных в качестве методов повышения вероятности имплантации у женщин с тонким эндометрием и RIF. При взаимодействии плазмы с эндометрием происходит высвобождение биологически активных веществ, цитокинов, факторов роста, включая фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VGEF), трансформирующий фактор роста (TGF), инсулиноподобный фактор роста I, II

(IGF-I, II), фактор роста соединительной ткани (CTGF) и интерлейкин 8 (IL-8) [19,94].

Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, положительно влияет на частоту наступления и пролонгирования беременности в цикле криопереноса у пациенток с субоптимальным эндометрием – к такому заключению пришли исследователи после проведения этого метода перед ПЭ. Авторы отметили положительную динамику роста эндометрия по УЗИ с 5 до 7,2мм ( $p < 0,00001$  при ДИ 95%) после введения плазмы, обогащенной тромбоцитами. Кроме того, было отмечено позитивное влияние этой процедуры на внутриматочный кровоток при доплерографии. Из 64 ПЭ положительный  $\beta$ -ХГ был установлен в 60,93% (у 39 пациенток). Частота клинической беременности составила 45,31%. Таким образом, использование плазмы, обогащенной тромбоцитами, помогло бы снизить частоту отмены переноса в связи с улучшением толщины эндометрия и повысить эффективность программ криопереноса [18].

Влияние плазмы, обогащённой тромбоцитами, для улучшения исходов программы ЭКО, на рефрактерный эндометрий отмечено также и в ряде других работ [7,39,93,120]. Однако, необходимость проведения более масштабных и качественных работ для подтверждения целесообразности применения данного метода остается очевидной.

### **1.5.5 Персональное «окно имплантации»**

Так как одним из основных условий успешной имплантации является синхронное развитие эндометрия и эмбриона, метод определения персонального «окна имплантации» с последующим выбором наилучшего дня для переноса эмбрионов так же получило свое распространение у пациенток с RIF.

С помощью системы ERA в 2013 году проведено исследование, в которое были включены 85 пациенток с RIF, имеющих  $4,8 \pm 2,0$  отрицательных ПЭ в стандартном протоколе, а также 25 пациенток контрольной группы. После проведения пайпель-биопсии эндометрия был произведен перенос эмбрионов в соответствии с параметрами рецептивности. В результате установлено, что

рецептивный статус эндометрия выявлен в 74,1% у пациенток с RIF и у 88% женщин контрольной группы. Беременность наступила в 51,7% случаев (29 пациенток в группе RIF) после ПЭ с учетом данных ERA. Нерекцептивный эндометрий был установлен у 22 женщин в основной группе, после повторного исследования у 15 из них был выявлен «сдвиг окна имплантации». После проведения персонального переноса эмбрионов у 8 женщин основной группы в 50% случаев наступила беременность. Таким образом, авторы делают заключение о том, что, вероятно, период готовности эндометрия к имплантации бластоцисты не является универсальным для всех пациенток, и что у каждой четвертой женщины с RIF существует риск сдвига «окна фертильности» на 2 дня. Поэтому наиболее оптимальным методом повышения эффективности программ ПЭ авторы считают определение персонального рецептивного статуса эндометрия на основании теста ERA [123].

Nashimoto T и соавт. в 2017 году с целью оценки диагностической ценности теста ERA проведено ретроспективное исследование. У 50 пациенток была произведена оценка рецептивности эндометрия в соответствии с протоколом. Нерекцептивный эндометрий был выявлен у 24% женщин с RIF. Было произведено 44 переноса в соответствии с рецептивностью эндометрия. Частота наступления беременности составила 58,5 % на пациентку, 35,3% на первый перенос у женщин с рецептивным эндометрием и 50% на пациентку и на первый перенос у женщин с изначально нерекцептивным эндометрием при коррекции дня переноса эмбрионов. После проведенного исследования авторы пришли к заключению, что применение ERA у пациенток с RIF в сочетании с переносом эуплоидных эмбрионов повышает вероятность наступления беременности [41].

В настоящее время проведен ряд исследований, демонстрирующих позитивный вклад системы ERA в оценку персонального «окна имплантации» у пациенток с RIF [99,115].

В исследовании Sebastian-Leon P (2018) была предложена новая таксономия причин RIF. Проведя анализ 16 работ, посвященных изучению экспрессионных генных сигнатур эндометрия периода «окна имплантации», авторы отметили, что

возможной причиной неудач является не только сдвиг «окна имплантации», но также наличие молекулярных нарушений в структуре эндометрия. Авторы предложили алгоритм ведения пациенток в зависимости от выявленной причины RIF (рисунок 1 [17]).

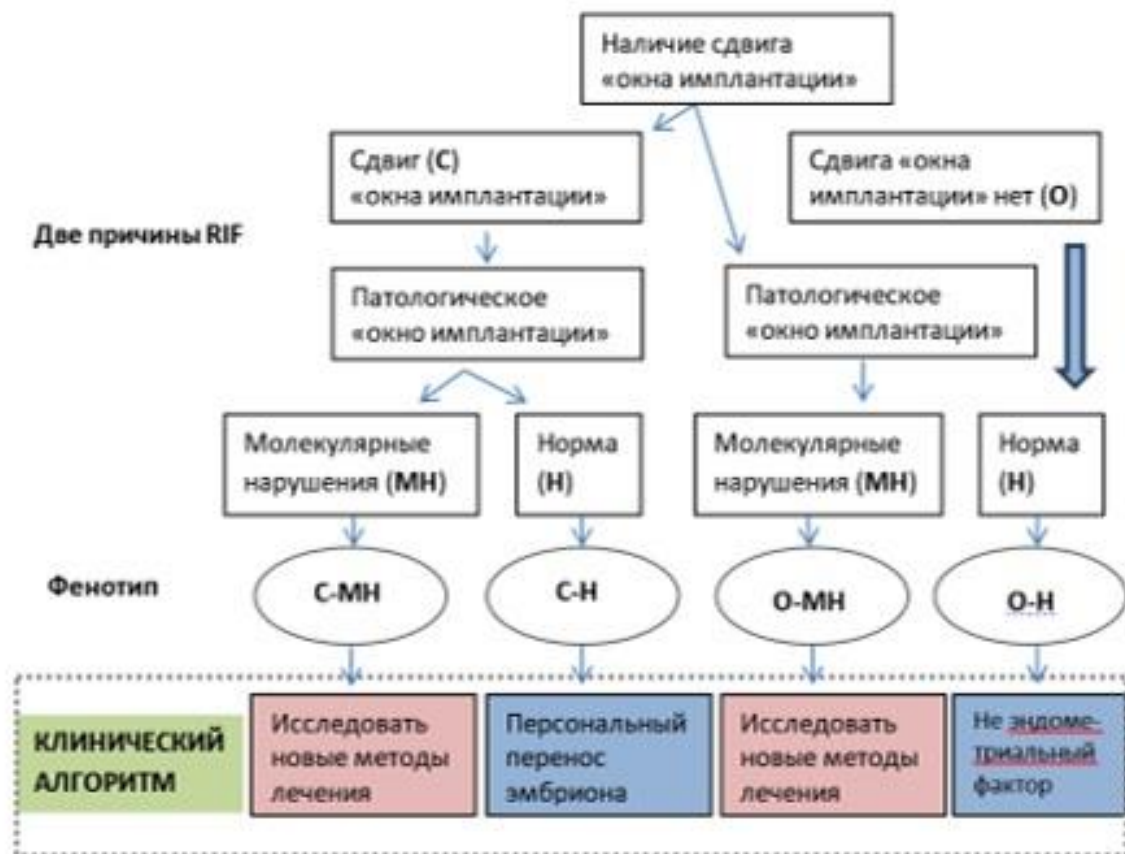


Рисунок 1 – Алгоритм ведения пациенток в зависимости от причины RIF

Согласно, представленному алгоритму, авторы предлагают выбирать соответствующую тактику ведения пациенток с RIF. Так, в случае выявления сдвига «окна имплантации» и молекулярных нарушений в эндометрии или наличии только молекулярных нарушений без сдвига необходимо предложить пациентке новое лечение в программе ЭКО. При наличии только признаков сдвига «окна» необходимо проведение персонального переноса эмбрионов. Если же у пациентки не установлены молекулярные нарушения и сдвига «окна имплантации» нет, следует считать, что у таких женщин причина неудачи не в рецептивности эндометрия. Таким пациенткам необходимо проведение дополнительных методов обследования. Возможно, именно в данном случае будет целесообразно

использование донорских ооцитов, спермы, проведение предимплантационного генетического скрининга эмбрионов. В случае патологических молекулярных нарушений в структуре эндометрия, как со сдвигом, так и без сдвига персонального «окна имплантации», могут оказаться полезными представленные в данном обзоре методы терапии пациенток с повторными безуспешными попытками ЭКО (скретчинг эндометрия, внутриматочное введение G-CSF, плазмы, обогащенной тромбоцитами, мононуклеаров периферической крови) [17].

В настоящее время клиницисты разных стран пытаются преодолеть проблему повторных неудачных программ ЭКО, применяя различные схемы в обследовании и лечении пациенток. Однако убедительных данных в пользу применения того или иного метода дополнительной подготовки эндометрия в настоящее время не получено. Возможно, разработка и внедрение в широкую клиническую практику тест-систем, оценивающих персональное «окно имплантации» с позиции сдвига «окна имплантации» и молекулярных нарушений, позволят оптимизировать решение этой проблемы.



## Глава 2. Материалы и методы исследования

### 2.1 Дизайн исследования

Обследовано 140 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, планирующих цикл с переносом размороженного эмбриона.

Исследование выполнено на базе 1-го гинекологического отделения ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства гинекологии и перинатологии им. Академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ с декабря 2016 по декабрь 2018. (Заведующий отделением к.м.н. А.Н. Абубакиров).

Для решения поставленных задач пациентки методом простой рандомизации с неравномерным распределением (методом конвертов) были разделены на 2 группы: 1-ю группу составили 104 женщины, которым пайпель-биопсия эндометрия была произведена в ЕЦ на 7-8-й дни после пика ЛГ (ЛГ+7-8); 2-ю группу – 36 пациенток, которым забор материала проводился на фоне ЦГТ на 6-й день назначения прогестерона (П+5).

Проведено гистологическое и молекулярно-генетическое исследование, полученных образцов эндометрия. После оценки состояния эндометрия всем пациенткам была произведена программа переноса размороженного эмбриона: в 22 случаях был произведен ПЭ в ЕЦ, а остальные 118 переносов осуществлялись на фоне назначения ЦГТ. Показанием для переноса на фоне ЦГТ были поведенные ранее безуспешные программы ПЭ в ЕЦ.

Все женщины на момент включения в настоящее исследование имели более 2-х криоконсервированных эмбрионов хорошего качества (в среднем  $3,5 \pm 2,3$ ). Выборка пациентов осуществлялась на основании критериев включения и исключения.

Заключительным этапом исследования была оценка исходов программ ВРТ и разработка модели оценки рецептивности эндометрия на основании полученных результатов.

Проведение данного исследования было одобрено комитетом по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»

Минздрава РФ. Пациенткам была предоставлена полная информация по поводу цели и методов исследования, также подробно освещены вопросы о возможных рисках и предполагаемой пользе от участия в исследовании. Все женщины получили и подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании (рисунок 2).

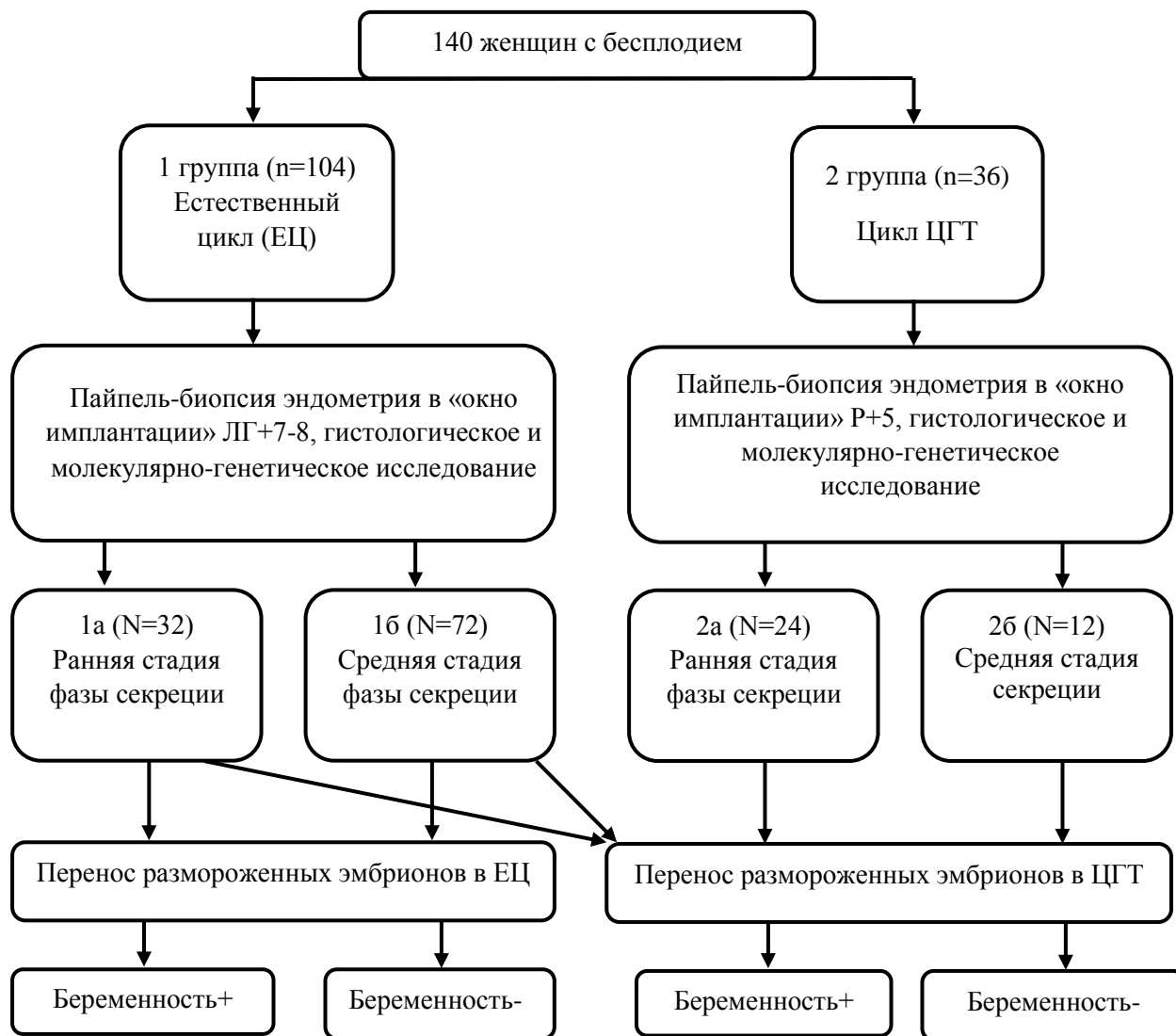


Рисунок 2 – Дизайн исследования

*Критерии включения:*

- Возраст женщин <45 лет;
- Регулярный менструальный цикл (21-35 дней);
- Трубно-перитонеальный фактор бесплодия;
- Базальная концентрация ФСГ <12 мМЕ/мл;

- Наличие криоконсервированных эмбрионов;
- Нормальный кариотип обоих супругов;
- Информированное согласие на участие в исследовании.

*Критерии исключения:*

- Бесплодие, связанное с отсутствием овуляции;
- Пороки развития внутренних половых органов, включая состояния после хирургической коррекции пороков развития внутренних половых органов;
- Приобретенные деформации полости матки, при которых невозможна имплантация эмбрионов или вынашивание беременности;
- Наружный и внутренний эндометриоз III-IV стадии;
- Интерстициальная или субсерозная миома матки размером более 3 см;
- Противопоказания к проведению программы криопереноса и вынашиванию беременности:
  - Соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов;
  - Острые воспалительные заболевания любой локализации;
  - Хронические заболевания любой локализации в стадии обострения;
  - Доброкачественные новообразования яичников;
  - Злокачественные новообразования любой локализации, в том числе в анамнезе.

Женщины, ранее включенные в исследование, у которых попытка ЭКО оказалась безуспешной и вновь обратившиеся для лечения, были включены в исследование повторно.

Предварительное обследование на амбулаторном этапе проведено всем 140 супружеским парам согласно приказу Минздрава-РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Общеклинические методы исследования

При отборе пациентов для проведения исследования был произведен подробный анализ анамнеза жизни (семейного анамнеза, перенесенных заболеваний и оперативных вмешательств). Гинекологический анамнез включал в себя установление возраста начала менархе, регулярность, длительность менструального цикла, использование гормональных препаратов, количество и вид гинекологических оперативных вмешательств, наличие ИППП, патологии эндометрия (гиперплазии, полипов эндометрия, хронического эндометрита, внутриматочных синехий, внутриматочной перегородки). Также особое внимание было уделено изучению репродуктивной функции женщин, а именно количеству и исходам беременностей, родов, длительности и причинам бесплодия, количеству попыток ЭКО в анамнезе, наличию криоконсервированных эмбрионов на момент обследования.

При проведении общего осмотра у всех пациенток были определены рост и вес, вычислен индекс массы тела по формуле:  $ИМТ = \text{масса тела} / \text{рост}^2$  (кг/м<sup>2</sup>). Нормальным считался ИМТ от 18,5-24,9, избыточная масса тела – 25-30, значение ИМТ более 30 расценивалась как ожирение.

При гинекологическом осмотре была произведена оценка состояния и развития наружных половых органов, шейки матки, слизистой оболочки влагалища. После бимануального обследования оценивали размер, расположение, подвижность, болезненность матки и придатков, а также наличие патологических образований в области малого таза.

При осмотре молочных желез оценивали степень развития по шкале J. Tanner, наличие или отсутствие уплотнений, выделений из сосков.

### 2.2.2 Специальные методы исследования

Исследование гормонального профиля проводили на 2-3-й день менструального цикла, оценивался уровень следующих гормонов: фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола (Е2), тиреотропного гормона (ТТГ), пролактина (ПРЛ), тестостерона (Т).

Уровни Е2 и прогестерона (П) также оценивали в день пайпель-биопсии эндометрия: у пациенток 1 группы в ЕЦ на день ЛГ+7-8, у женщин 2 группы на день назначения микронизированного прогестерона.

Исследование гормонального профиля было проведено на иммунохемилюминесцентном автоматическом анализаторе Immulite 2000 (Siemens, США) с использованием реагентов этой же фирмы. Концентрацию гормонов в плазме крови выражали в системе СИ.

Оценку овариального резерва проводили путем определения уровня антимюллерова гормона (АМГ) в сыворотке крови на 2-3-й день менструального цикла методом ИФА. Использовали иммуноферментный набор АМН GEN II ELISA для определения MIS/АМН (антимюллеров гормон/фактор регрессии Мюллерова канала). Значение АМГ менее 1,0 нг/мл расценивали как низкий овариальный резерв, от 1,5 до 2,5 – как нормальный и более 2,5 – высокий овариальный резерв.

В качестве нормативных параметров гормонального статуса использовали референсные значения, полученные для здоровых женщин репродуктивного возраста в научно – диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ - руководитель лаборатории – д.м.н. Иванец Т.Ю. (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Концентрация гормонов в сыворотке крови у фертильных женщин репродуктивного возраста

Гормон, ед. измерения	Референсный интервал для женщин репродуктивного возраста
ФСГ, МЕ/л	3,0-8,0
ЛГ, МЕ/л	3,0- 10,0
Е2, пмоль/л	150-450
ТТГ, мМЕ/л	1,0-3,0
Прл, мМЕ/л	120-500
Тестостерон, нмоль/л	1,0-2,5
АМГ, нг/мл	1,0–2,5

Таблица 2 – Концентрация Е2 и прогестерона в сыворотке крови различные фазы менструального цикла у фертильных женщин репродуктивного возраста

Гормон, ед. измерения	Фолликулиновая фаза	Лютеиновая фаза
	Референсный интервал для женщин репродуктивного возраста	Референсный интервал для женщин репродуктивного возраста
Эстрадиол, пмоль/л	150-480	280-940
Прогестерон, нмоль/л	1,8-2,2	9-83

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

УЗИ органов малого таза производили на аппарате «Flex Focus 400» («ВК Medical», Дания) трансвагинальным датчиком с частотой 6,5 МГц. на 2-5-й дни менструального цикла с целью выявления противопоказаний для участия в исследовании: отсутствие патологии эндометрия, миомы матки, аденомиоза, гидросальпинкса, кистозных образований в яичниках. Повторное исследование производили во 2 фазу цикла на 7-9-й дни после пика ЛГ или на 6-й день после назначения прогестерона в цикле ЦГТ для оценки срединного маточного М-ЭХО: соответствие толщины, эндометрия дню менструального цикла (не менее 8 мм), однородности эндометрия, отсутствие расширения полости в матке, гипо-гиперэхогенных включений.

В протоколе криопереноса на фоне подготовки эндометрия гормональными препаратами УЗИ производили на 2-3-й дни менструального цикла для оценки величины М-ЭХО и выбора стартовой дозы препаратов эстрадиола, далее на 8-10-й дни цикла для коррекции суточной дозы препаратов эстрадиола и определения дня назначения препаратов микронизированного прогестерона, а также в день ПЭ в полость матки.

При проведении криопереноса в ЕЦ УЗИ производили на 2-3-й дни менструального цикла, далее мониторировали доминантный фолликул с целью определения дня овуляции, следующее УЗИ выполняли в день ПЭ в полость матки.

При положительном тесте на беременность независимо от протокола подготовки эндометрия УЗИ выполняли на 20-21-й дни после ПЭ в полость матки для определения локализации плодного яйца и далее при сроке беременности 5-6 недель, для визуализации сердцебиения эмбриона.

### ***Пайпель-биопсия эндометрия***

Биопсию эндометрия производили на 7-8 дни после пика ЛГ (ЛГ+7-8) или на 6-й день назначения прогестерона (П+5) с помощью аспирационной кюретки «Pipelle de Cornier» (Laboratoire C.C.D.), Франция). Пик ЛГ устанавливали с помощью мочевого теста на овуляцию Clear Blue (Unipath Ltd, Великобритания). Все образцы были разделены на 2 части. Первую часть образцов подвергали гистологическому исследованию. Вторая часть образцов помещалась в специальную транспортную среду для стабилизации РНК в биопробах («Стор-экс» производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и хранилась при температуре минус 20°C в течение 1 месяца до проведения исследования транскрипционного профиля генов методом ПЦР в режиме реального времени с предварительной обратной транскрипцией.

Пайпель-биопсию проводили в амбулаторных условиях на базе отделения сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава РФ (руководитель. к.м.н. Абубакиров А.Н.)

**Гистологическое исследование** материала было произведено путем фиксации в 10%-м нейтральном формалине в течение 24 часов с фосфатным буфером, обрабатывали в аппарате гистологической проводки тканей фирмы «Pool Scientific Instruments» (Швейцария) и заключали в парафин. Затем готовились парафиновые срезы толщиной не более 4 – 5 микрон. Срезы фиксировали на предметные стекла, покрытые адгезивом (полилизин, APES) и инкубировали в термостате при 370°С в течение 12 часов. Далее срезы депарафинировали и обезвоживали в батарее из 3-х ксилолов, 2-х абсолютных спиртов, 2-х 95% спиртов, 80% и 70% спирта и дистиллированной воды, после чего производили окрашивание гематоксилин-эозином. Впоследствии с помощью светового микроскопа при увеличении от х50 до х400 проводили исследование гистологических препаратов. Исследование выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ (руководитель – д.м.н. Щеголев А.И.)

### **2.2.3 Биоинформатический анализ**

Прежде чем приступить к молекулярно-генетическому исследованию образцов эндометрия мы провели поиск генов, участвующих в процессах созревания эндометрия и приобретения им рецептивности. Поскольку принято считать, что “окно имплантации” соответствует средней стадии фазы секреции, был проведен анализ результатов микроматричного анализа, имеющихся в свободном доступе, об изменении экспрессии генов в эндометрии в течение менструального цикла. Поиск данных был осуществлен в базе данных ArrayExpress [14]. В строке поиска вводились следующие ключевые слова: «эндометрий» и «человек» («endometrium» and «Homo sapiens»). Работы, которые отвечали заданным параметрам, представлены в таблице 3.



Таблица 3 – Исследования посвящённое изменению уровня экспрессии генов в течении менструального цикла

Параметр	Название работы	Количество образцов	Дата
E-MTAB-3732	A comprehensive human expression map	27871	23.07.2015
E-GEOD-7307	Transcription profiling by array of human samples with various different diseases	677	20.06.2008
E-GEOD-51981	Molecular Classification of Endometriosis and Disease Stage Using High-Dimensional Genomic Data	148	01.10.2014
E-GEOD-57545	Complement Roles Revealed by Immune Gene Profiling in Endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Cancer	119	07.01.2015
E-GEOD-77688	Expression Quantitative Trait Locus Mapping Studies in Mid-Secretory Phase Endometrial Cells Identifies HLA-F and TAP2 as Fecundability-Associated Genes	88	09.02.2016
E-GEOD-46735	Plasma microRNA profiles in women with and without endometriosis at different menstrual cycle phases	83	09.05.2013
E-GEOD-35287	Unique Transcriptome, Pathways, and Networks in the Human Endometrial Fibroblast Response to Progesterone in Endometriosis	80	24.01.2012
E-MTAB-694	Transcription profiling by array of human peritoneum, peritoneal endometriosis lesion and eutopic endometrium from endometriosis patients	57	06.12.2012
E-GEOD-6364	Transcription profiling of human endometrium from patients with a history of endometriosis vs. normal controls sampled at a range of menstrual cycle timepoints	37	09.04.2008
E-GEOD-37837	Genome-wide expression analysis of autologous eutopic and ectopic endometrium from fertile Indian women with endometriosis	36	30.09.2012
E-GEOD-25628	Endometriosis transcription profiling	22	30.11.2013
E-GEOD-23339	Gene expression profiles of endometriosis	19	09.05.2011
E-GEOD-47361	Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells	18	07.09.2013

Параметр	Название работы	Количество образцов	Дата
E-GEOD-19834	Reciprocal communication between endometrial stromal cells and macrophages	18	21.07.2010
E-GEOD-11768	Transcription profiling of mouse (nude) model of endometriosis	18	02.01.2009
E-GEOD-11691	Transcription profiling of human paired eutopic and ectopic human endometrium from 9 individuals (endometriosis)	18	02.01.2009
E-GEOD-44207	CCAAT/enhancer-binding protein alpha is epigenetically silenced by histone acetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis: a novel therapeutic target	16	21.10.2013
E-GEOD-40186	miRNA expression profiles in endometriotic cyst stromal cells (ECSCs)	16	06.02.2013
E-MEXP-1251	Transcription profiling by array of vessels from endometriotic nodules and control endometrial and myometrial tissue	12	30.09.2007
E-GEOD-58178	Endometriosis: Normal endometrial stromal cells and endometriotic stromal cells	12	01.08.2014
E-GEOD-40007	TNFalpha and IL1beta stimulate differential gene expression in endometrial stromal cells	12	01.08.2014
E-GEOD-31683	Krüppel-like Factor 9 and Progesterone Receptor Co-Regulation of Decidualizing Endometrial Stromal Cells: Implications for its Loss in the Pathogenesis of Endometriosis	10	03.04.2012
E-GEOD-7846	Transcription profiling of human endometrial endothelial cells of eutopic endometrium of patients with endometriosis compared with control	10	15.06.2008

Для дальнейшего исследования был выбран набор данных E-GEOD-6364 [119] (таблица 4).

Таблица 4 – Данные для обработки из E-GEOD-6364

Номер образца	Номер сканирования	Сопутствующие заболевания	Гистологическое стадия развития эндометрия
GSM150214	MSE_D_543	endometriosis	mid secretory phase
GSM150221	MSE_N_617	normal	mid secretory phase
GSM150216	MSE_D_678	endometriosis	mid secretory phase
GSM150195	PE_D_651	endometriosis	proliferative phase
GSM150210	ESE_N_664	normal	early secretory phase
GSM150193	PE_D_594	endometriosis	proliferative phase
GSM150211	MSE_D_33A	endometriosis	mid secretory phase
GSM150222	MSE_N_626	normal	mid secretory phase
GSM150219	MSE_D_G73A	endometriosis	mid secretory phase
GSM150207	ESE_D_599	endometriosis	early secretory phase
GSM150205	ESE_D_517	endometriosis	early secretory phase
GSM150225	MSE_N_M153	normal	mid secretory phase
GSM150191	PE_D_508	endometriosis	proliferative phase
GSM150192	PE_D_587	endometriosis	proliferative phase
GSM150198	PE_N_M165	normal	proliferative phase
GSM150220	MSE_N_610	normal	mid secretory phase
GSM150208	ESE_N_629	normal	early secretory phase
GSM150227	MSE_N_M163	normal	mid secretory phase
GSM150194	PE_D_647	endometriosis	proliferative phase
GSM150213	MSE_D_540	endometriosis	mid secretory phase
GSM150206	ESE_D_575	endometriosis	early secretory phase
GSM150197	PE_N_598	normal	proliferative phase
GSM150201	PE_N_M182	normal	proliferative phase
GSM150223	MSE_N_659	normal	mid secretory phase
GSM150217	MSE_D_97A	endometriosis	mid secretory phase

Номер образца	Номер сканирования	Сопутствующие заболевания	Гистологическое стадия развития эндометрия
GSM150218	MSE_D_G72A	endometriosis	mid secretory phase
GSM150196	PE_N_562	normal	proliferative phase
GSM150203	ESE_D_489	endometriosis	early secretory phase
GSM150215	MSE_D_645	endometriosis	mid secretory phase
GSM150199	PE_N_M169	normal	proliferative phase
GSM150209	ESE_N_650	normal	early secretory phase
GSM150212	MSE_D_516	endometriosis	mid secretory phase
GSM150224	MSE_N_G98A	normal	mid secretory phase
GSM150190	PE_D_26A	endometriosis	proliferative phase
GSM150204	ESE_D_496	endometriosis	early secretory phase
GSM150226	MSE_N_M158	normal	mid secretory phase
GSM150202	ESE_D_27A	endometriosis	early secretory phase

Далее, имеющиеся результаты были введены в среду R [106], данные были нормализованы с помощью метода квантильной нормализации, реализованной в пакете *limma* [77]. Чтобы оценить расположение образцов и наличие в выборке выбросов, к матрице экспрессий был применен метод главных компонент только в данных эндометрия здоровых женщин [121].

Задача состояла в определении генов, которые наиболее значимо изменяют экспрессию на стадии средней фазы секреции эндометрия. Для решения этой задачи были проведен кластерный анализ по методу Варда.

В анализ были включены образцы эндометрия фертильных женщин на трех стадиях созревания эндометрия: поздней пролиферации ( $n = 5$ ), ранней секреции ( $n = 3$ ) и средней секреции ( $n = 8$ ), полученные до начала проведения исследования [118].

Биоинформатический анализ выполнен в лаборатории биоинформатики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ (руководитель – Боровиков П.И.).

### *Молекулярно-генетическое исследование*

Исследование экспрессии мРНК генов GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, IGFBP1, IL15, GNLY, NDRG1 в биоптатах эндометрия проводили методом ПЦР в режиме реального времени с предварительной обратной транскрипцией.

Образцы тканей размораживали при комнатной температуре, удаляли транспортную среду и выделяли РНК с использованием QIAzol Lysis Reagent и RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

Для постановки обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) использовали реактивы, оригинальные олигонуклеотиды и детектирующий амплификатор «ДТПрайм» производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия).

Для постановки ПЦР были подобраны специфичные в отношении мРНК олигонуклеотиды и флуоресцентно-меченные пробы, не отжигающиеся на матрице геномной ДНК.

В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Обратную транскрипцию проводили стандартным методом с использованием AMV-обратной транскриптазы с 10 х буфером для обратной транскрипции (состав: 500 mM Tris-HCl (pH 8.5 при 25°C), 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl, 10 mM DTT). В состав ОТ-смеси входили дНТФ в конечной концентрации 0,2 mM каждого и смесь специфичных праймеров конечной концентрации 0,5 pM.

Аmplификацию осуществляли в режиме “реального времени” в объеме 12 мкл на детектирующем амплификаторе «ДТПрайм» по следующей программе: 15 циклов - 80°C 5 сек, 94°C 5 сек; 1 цикл - 94°C 5 мин; 50 циклов - 94°C 20 сек, 64°C 20 сек; 10°C - хранение. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C по каналу флуоресценции FAM. Для повышения

чувствительности и специфичности ПЦР применяли «горячий старт», который обеспечивался полимеразой с антителами (TechnoTaq). Активация фермента происходила только после прогрева амплификационной смеси при 95°C в течение 5 минут. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки.

При работе с исследуемыми образцами нормировка проводилась по трем референсным генам B2M, TBP и GUSB. Обработка результатов осуществлялась с помощью программы EXCEL на основании данных, полученных с помощью прибора. Использован метод сравнения индикаторных циклов (метод  $\Delta C_t$ ). Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов измерялся в относительных единицах (о.е.), отражающих представленность транскрипта гена относительно нормировочного фактора, рассчитанного на основе уровня экспрессии мРНК референсных генов.

Транскрипционные профили образцов были отображены при помощи тепловой карты. Проводились  $\log$ -трансформация и нормировка данных стандартным способом z-оценки. На основании этих показателей был реализован кластерный анализ методом полной связи с использованием евклидового расстояния. Тепловая карта и сопутствующие вычисления были выполнены при помощи программных разработок на языке Python 2.7 и его библиотек: Sklearn, Skipy, Pandas, Matplotlib, Seaborn.

Исследование выполнено на базе на базе института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ (руководитель – д.б.н. Трофимов Д.Ю.).

## **2.3 Подготовка эндометрия к переносу размороженных эмбрионов в полость матки**

### ***Подготовка эндометрия при переносе размороженных эмбрионов в ЕЦ***

22 пациенткам, планирующим ПЭ размороженного эмбриона в ЕЦ, было произведено УЗИ малого таза на 2-3-й день менструального цикла, далее был проведен УЗИ мониторинг для оценки величины М-ЭХО и трансформации

эндометрия, а также установления овуляции. Со следующего дня после овуляции назначали микронизированный прогестерон в дозе 600 мг в сутки вагинально для поддержки лютеиновой фазы. ПЭ был произведен на день ЛГ+7-8-й под контролем УЗИ с помощью катетера Соок (Австралия). Прием микронизированного прогестерона продолжали в течение 14 дней с последующим тестом на диагностику беременности.

### ***Гормональная подготовка эндометрия при переносе размороженных эмбрионов***

Гормональную подготовку эндометрия 118 пациенткам начинали с назначения препаратов  $17\beta$ -эстрадиола валерата с 2-3-го 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. ПЭ в полость матки производили на 6-й день назначения прогестерона (П+5) под контролем УЗИ с помощью катетера Соок (Австралия). Прием гормональных препаратов продолжали в течение 14 дней с последующим тестом на диагностику беременности.

Оценку исходов лечения производили путем определения уровня  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови через 14 дней после переноса. Положительным считался уровень  $\beta$ -ХГ более 20 МЕ/л. Заключение об успешной имплантации (клиническая беременность) было установлено после верификации сердцебиения эмбриона в полости матки при сроке беременности 4-5 недель.

## **2.4 Статистическая обработка полученных данных**

Статистическая обработка данных выполнялась на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистической программы IBM SPSS Statistics v22 (США).

При анализе количественных данных, подчиняющихся нормальному распределению, определяли среднее значение (М), среднеквадратичное

отклонение ( $\delta$ ), ошибку среднего ( $m$ ), 95% доверительный интервал. Для оценки межгрупповых различий количественных анамнестических данных использовали методы вариационной статистики (t-критерий Стьюдента).

При анализе количественных признаков, не подчиняющихся нормальному распределению, была определена медиана ( $Me$ ), а также межквартильный интервал (верхний ( $H$ ) и нижний квантили ( $L$ )); для оценки различий между группами использовались методы непараметрической статистики (тест Манна-Уитни, критерий Краскела - Уоллиса).

Качественные данные анализировались путем определения частоты признака (%). Для оценки значимости различий между группами в частоте встречаемости качественных признаков использовали тест  $\chi^2$ . Отношение шансов и значимость различий в частоте встречаемости качественных признаков рассчитывали с помощью свободно-распространяемого программного продукта WINPEPI версии 11.30. Отношение шансов ( $OR$ ) приведено с 95% доверительным интервалом ( $CI$ ).

Для определения групп в зависимости от изменения экспрессии генов использовался кластерный анализ.

Учитывая небольшой объем выборки, для выявления различий по частоте наступления беременности и родов использовался точный критерий Фишера.

Корреляционные связи устанавливали с использованием критерия Спирмена. Сила предполагаемой взаимосвязи между величинами определялась по значению коэффициента корреляции и уровню статистической значимости корреляции ( $p < 0,05$ ). При оценке силы связи коэффициентов корреляции использовали шкалу Чеддока и учитывали слабые (от 0,3 до 0,5), средние (от 0,5 до 0,7), высокие (от 0,7 до 0,9) и очень высокие (более 0,9) положительные корреляционные связи. При отрицательной корреляции значения силы связи между переменными соответственно меняли на противоположные.

Статистически значимыми считались различия между, полученными данными при  $p \leq 0,05$ .

Для разработки молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия использовался дискриминантный анализ.



Для определения принадлежности образца эндометрия к кластеру использовали уравнение канонической линейной дискриминантной функции:  $KЛДФ = k_1 * x_1 + k_2 * x_2 + \dots + k_n * x_n + const$ , где  $k_1, k_2, k_n$  – коэффициенты функции,  $const$  – константа,  $x_1, x_2, x_3$  – относительные уровни экспрессии генов или другие параметры.

## Глава 3. Результаты исследования

### 3.1 Клинико-лабораторная характеристика пациенток

140 женщин, планирующих цикл переноса размороженного эмбриона в полость матки, были разделены на две группы: 1-я группа (N=104) – женщины, которым пайпель-биопсия эндометрия была произведена в ЕЦ, и 2-я группа (N=36) – пациентки, которым был проведен забор материала на фоне ЦГТ.

Средний возраст пациенток не имел межгрупповых различий и составил  $34 \pm 4,4$  лет у женщин 1-й группы и  $35 \pm 4,5$  лет у пациенток 2-й группы. Значения ИМТ составили  $22,3 \pm 3,0$  и  $21,8 \pm 3,4$  соответственно и также не различался между группами. В среднем длительность бесплодия составила  $3,9 \pm 2,7$  лет и  $5,0 \pm 2,7$  лет в 1 и 2 группах соответственно при колебаниях от 1 до 15 лет.

При объективном осмотре молочных желез установлено их умеренное развитие у всех обследуемых женщин, соответствующее 3-5 степеням по Tanner, выделений из сосков не отмечено.

При гинекологическом осмотре не выявлено изменений со стороны шейки матки, формы и подвижности матки. Объемные образования в области придатков и малого таза отсутствовали.

#### *Соматические заболевания*

Частота и особенности перенесенных соматических заболеваний у 140 обследованных женщин представлены в таблице 5. В обеих группах преобладали заболевания желудочно-кишечного тракта (21,2% и 16,7% соответственно), на втором месте по частоте встречаемости были заболевания молочных желез (15,4 % и 5,6%) и заболевания мочевыделительной системы (15,4% и 5,6%). Не было выявлено статистически значимой разницы в частоте встречаемости соматических заболеваний.

Таблица 5 – Ранее перенесенные соматические заболевания (n=140)

Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест

Заболевание	Группа 1(n=104)		Группа 2(n=36)		p
	абс.	%	абс.	%	
Заболевания ЖКТ	22	21,2%	6	16,7%	ns
Заболевания молочных желез	16	15,4%	2	5,6%	ns
Заболевания мочевыделительной системы	16	15,4%	2	5,6%	ns
Заболевания дыхательной системы	6	7,7%	2	5,6%	ns
Заболевания сердечно-сосудистой системы	2	1,9%	2	5,6%	ns

### *Гинекологический анамнез*

При изучении гинекологического анамнеза 140 женщин, включенных в исследование, было выявлено, что возраст менархе не имел статистически-значимых отличий и составил в среднем  $13 \pm 1,2$  лет и  $13 \pm 1,4$  лет в 1-й и 2-й группах соответственно. Раннее менархе было установлено в 3 раза чаще у пациенток второй группы по сравнению аналогичным показателем женщин первой группы (7,7% и 22,2%) ( $p < 0,05$ ).

Все пациентки имели регулярный менструальный цикл  $28 \pm 2,1$  дней и  $28 \pm 3,5$  дней, при средней продолжительности менструального кровотечения  $4,8 \pm 1$  день (таблица 6).

Таблица 6 – Особенности менструального цикла

\* Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест\*\* среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

Особенности менструального цикла	Группа 1 (n=104)		Группа 2(n=36)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Возраст менархе					
11 лет*	8	7,7%	8	22,2%	<0.05
12-14 лет*	82	78,8%	24	66,7%	ns
Старше 14 лет*	14	13,5%	4	11,1%	ns
Средний возраст менархе**	13,1 $\pm$ 1,2		13,0 $\pm$ 1,4		ns
Продолжительность менструального цикла					
25 дней и менее*	14	13,5%	2	5,6%	ns
26-29 дней*	66	63,5%	30	83,3%	ns
30-34 дня*	24	23,0%	4	11,1%	ns
Средняя продолжительность цикла**	28,0 $\pm$ 2,1		28,4 $\pm$ 3,5		ns
Длительность кровотечения (дней)					
От 2-5 дней*	84	80,8%	32	88,9%	ns
Более 5 дней*	20	19,2%	4	11,1%	ns
Среднее количество дней кровотечения**	4,8 $\pm$ 1,0		4,8 $\pm$ 1,0		ns

Данные о перенесенных гинекологических заболеваниях представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Гинекологические заболевания (n=140)

Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест

Гинекологические заболевания	Группа 1(n=104)		Группа 2(n=36)		p
	абс.	%	абс.	%	
Эктопия шейки матки	38	36,5%	10	27,8%	ns
Хронический эндометрит	32	30,8%	6	16,7%	ns
НГЭ	26	25,0%	14	38,9%	ns
Урогенитальный инфекции	18	17,3%	10	27,8%	ns
Хронический сальпингоофорит	16	15,4%	6	16,7%	ns
Миома матки	16	15,4%	0	0%	p <0.05
Полип эндометрия	12	11,5%	10	27,8%	p <0.05

В структуре гинекологических заболеваний ведущее место занимала эктопия шейки матки, диагностируемая ранее у 36% и 27,8% женщин 1-й и 2-й групп соответственно, хронический эндометрит перенесли 30,8% и 16,7% пациенток, НГЭ – 25% и 38,9%, урогенитальные инфекции – 17,3% и 27,8%, хронический сальпингоофорит – 15,4% и 16,7%. Полип эндометрия в 2 раза чаще ранее был диагностирован у женщин 2-й группы (27,8%), по сравнению с пациентками 1-й группы (11,5%). Миома матки была диагностирована чаще у пациенток 1-й группы и составила 15,4%, во 2-й группе не было выявлено ни одного случая данной патологии.

Таким образом, в структуре перенесенных гинекологических заболеваний преобладали хронические воспалительные заболевания органов малого таза, в числе которых хронический эндометрит и полип эндометрия встречались у каждой 3-4 женщины обследованных групп.

Частоты и вид перенесенных гинекологических оперативных вмешательств представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Частота проведенных гинекологических оперативных вмешательств (n=140)

Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  – тест

Вид оперативного вмешательства	Группа 1 (n=104)		Группа 2 (n=36)		p
	абс.	%	абс.	%	
Гистероскопия +РДВ	60	57,7%	16	44,4%	ns
Лапароскопия	48	46,2%	24	66,7%	<0.05
Из них:					
Резекция яичников по поводу эндометриоидных кист	18	37,5%	10	41,6%	ns
Резекция яичников по поводу функциональных и дермоидных кист	4	7,7%	0	0%	<0.05
Коагуляция иссечение очагов эндометриоза	18	37,5%	12	50%	ns
Тубэктомия односторонняя	14	26,9%	10	35,7%	ns
Консервативная миомэктомия	8	15,4%	0	0%	<0.05
Двусторонняя тубэктомия	2	3,8%	8	28,6%	<0.05

Гистероскопия с РДВ по поводу патологии эндометрия ранее были произведены у 60 женщин (57,7%) 1-й группы и у 16 (44,4%) 2-й группы.

На лапароскопию в анамнезе указали 48 пациенток (46,2%) 1-й группы и 24 пациентки (66,7%) 2-й группы.

Наиболее частым показанием к хирургическому лечению явился НГЭ: коагуляция очагов эндометриоза была произведена у 18 женщин 1-й группы (37,5%) и 12 (50%) пациенток 2-й группы, при этом резекция яичников по поводу эндометриоидных кист была выполнена в каждом третьем случае (37,5% и 41,6% соответственно).

Резекция яичников по поводу дермоидных и фолликулярных кист яичников была ранее произведена только у 4 пациенток 1-й группы (7,7%), односторонняя тубэктомия у 14 пациенток первой группы и 10 пациенток второй (26,9% и 35,7%).

Лапароскопия по поводу консервативной миомэктомии была проведена 8 женщинам из 1-й группы (15,4%), во второй группе не было проведено оперативного лечения по поводу данной патологии ( $p < 0.05$ ). Двусторонняя тубэктомия была произведена чаще у пациенток 2-й группы по сравнению с

1-й группой (28,6% и 3,8% соответственно,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, каждая вторая женщина из числа обследованных ранее перенесла гинекологические операции. Показаниями к гистероскопии с РДВ явились хронический эндометрит и полипы эндометрия; показанием к лапароскопии – наружный генитальный эндометриоз, включая эндометриоидные кисты яичников.

### ***Репродуктивная функция***

Длительность бесплодия у 140 женщин, включенных в исследование, варьировала от 1 года до 15 лет и у женщин 2-й группы была почти в 1,5 раза больше чем у пациенток 1-й группы и составила в среднем  $3,9 \pm 2,7$  и  $5,0 \pm 2,7$  лет ( $p < 0.05$ ) (таблица 9).

Таблица 9 – Средняя длительность бесплодия

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Показатель	Группа 1(n=104)	Группа 2 (n=36)	p
Длительность бесплодия	3,9 $\pm$ 2,7лет	5,0 $\pm$ 2,7лет	<0.05

Особенности репродуктивного анамнеза женщин представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Частота первичного и вторичного бесплодия (N=140)

Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест

Бесплодие	Группа 1(n=104)		Группа 2(n=36)		p
Бесплодие 1	50	48,1%	14	38,9%	ns
Бесплодие 2	54	51,9%	22	61,1%	ns

Первичное бесплодие установлено у 50 женщин 1-й группы (48,1%) и у 14 женщин 2-й группы (38,9%), вторичное - у 54 (51,9%) и 22 (61,1%). Представленные данные не имели статистически значимых межгрупповых различий ( $p > 0,05$ ).

Исходы беременностей у 76 пациенток со вторичным бесплодием представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Исходы беременностей среди пациенток со вторичным бесплодием (n =76)

\* Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест

\*\* среднее  $\pm$  стандартное отклонение, t-тест

Исходы беременности	Группа 1(n =54)		Группа 2 (n =22)		Р
Число беременностей*	154		86		
Из них					
	<b>абс.</b>	<b>%</b>	<b>абс.</b>	<b>%</b>	
Своевременные роды*	26	16,9%	8	9,4%	ns
Неразвивающаяся беременность*	30	19,5%	30	34,9%	ns
Трубная беременность*	14	8,9%	14	16,3%	ns
Медицинский аборт*	22	14,3%	6	6,9%	ns
Самопроизвольный выкидыш*	62	40,4%	26	30,2%	ns
Преждевременные роды*	0	0%	2	2,3%	ns
Среднее число беременностей**	2,9 $\pm$ 3,1		2,4 $\pm$ 3,6		ns

Женщины со вторичным бесплодием имели в анамнезе в среднем  $1,8\pm 3,0$  беременности: 54 пациентки 1-й группы –  $2,9\pm 3,1$  беременностей, 24 женщины 2-й группы –  $2,4\pm 3,6$  беременностей.

Согласно представленным данным, своевременными самопроизвольными родами завершились 16,9% беременности у женщин 1 группы и 9,4% случаев у женщин 2 группы. Самопроизвольный выкидыш являлся вторым по частоте исходов беременности: 40,4% и 30,2% в группах (62 и 26 случаях соответственно). Частота неразвивающейся беременности составила 19,5% и 34,9% (30 случаев в обеих группах). Трубная беременность в анамнезе отмечена у 14 пациенток (8,9%) 1 группы и 14 (16,3%) второй. Медицинским абортом завершились беременности в 14,3% и 6,9% случаев. На преждевременные роды в анамнезе указали 2 пациентки 2 группы. Однако, статистически значимых различий выявлено не было.



Таким образом, больше половины женщин со вторичным бесплодием обследуемых групп (55,6% против 66,7%) имели отягощенный анамнез и неудачные исходы беременностей.

### *Ранее проведенное лечение*

На безуспешные попытки ЭКО в анамнезе указали 100 пациенток (71,4%) из 140, включенных в исследование (таблица 12).

Таблица 12 – Предшествующее лечение в программе ЭКО (N=100)

Данные в абсолютных значениях и %,  $\chi^2$  –тест

Попытки ЭКО	Группа 1 (n =76)		Группа 2(n =24)		p
1	40	52,6%	8	33,3%	ns
2	20	26,3%	8	33,3%	ns
3 и более	16	21,1%	8	33,3%	ns

Представленные данные показывают, что пациентки обследуемых групп были сопоставимы по количеству неудачных попыток ЭКО в анамнезе. 40 женщин 1-й группы и 8 пациенток второй (52,6% и 33,3%) имели одну неудачную попытку ЭКО в анамнезе. Две неудачные попытки ЭКО имели 26,3% пациенток 1-й группы и 33,3% 2-й группы, три и более неудач – 21,5% и 33,4% женщин соответствующих групп. Следует отметить, что во всех случаях в полость матки переносили эмбрионы хорошего качества.

У 40 пациенток до начала исследования была проведена программа ЭКО с отменой переноса по показаниям и витрификацией эмбрионов. Таким образом на момент проведения исследования все пациентки имели более 2-х криоконсервированных эмбрионов хорошего качества. Среднее количество эмбрионов в 1 группе составило  $3,7 \pm 2,5$  эмбрионов, во второй  $2,7 \pm 1,4$  эмбрионов, при этом статистически значимые различия не получены (таблица 13).

Таблица 13 – Среднее количество криоконсервированных эмбрионов

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Показатель	Группа 1 (n=104)	Группа 2 (n=36)	p
Среднее количество криоконсервированных эмбрионов	3,7 $\pm$ 2,5	2,7 $\pm$ 1,4	ns

## 3.2 Результаты клинико-лабораторных обследований

### 3.2.1 Особенности гормонального статуса

Гормональный статус пациенток 1-й и 2-й групп представлен в таблице 14. Уровень исследованных гормонов на 2-3 день цикла был в пределах нормативных значений у пациенток обеих групп.

Так средний уровень АМГ составил 3,1 $\pm$ 2,6 МЕ/л и 2,6 $\pm$ 2,2 МЕ/л у пациенток 1-й и 2-й группы соответственно, что свидетельствовало о сохраненном овариальном резерве.

У пациенток 1-й группы средний уровень ФСГ составил 6,8 $\pm$ 1,6 МЕ/л, у пациенток 2-й группы 7,5 $\pm$ 6,4 МЕ/л, уровень ЛГ 5,6 $\pm$ 1,74 МЕ/л и 6,8 $\pm$ 4,5 МЕ/л соответственно и статистически значимых отличий выявлено не было.

Уровень ПРЛ составил 175,6 $\pm$ 141,8 мМЕ/л в 1-й группе и 280,8 $\pm$ 180,1 мМЕ/л во 2-й группе соответственно.

Средний уровень концентрации эстрогена составил 109,2 $\pm$ 97,4 пмоль/л 123,9 $\pm$ 149,7 пмоль/л, что соответствовало нормальной эстрогенной насыщенности.

О сохраненной функции щитовидной железы у пациенток свидетельствовало то, что средний уровень ТТГ составил 1,5 $\pm$ 0,8 мМЕ/л и 1,3  $\pm$ 0,8 мМЕ/л в исследуемых группах соответственно.

Таблица 14 – Особенности гормонального статуса

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Гормон	Группа 1 (n=104)	Группа 2 (n =36)	p
АМГ(МЕ/л)	3,1 $\pm$ 2,6	2,6 $\pm$ 2,2	ns
ФСГ(МЕ/л)	6,8 $\pm$ 1,6	7,5 $\pm$ 6,4	ns
ЛГ(МЕ/л)	5,6 $\pm$ 1,74	6,8 $\pm$ 4,5	ns
Е2(пмоль/л)	109,2 $\pm$ 97,4	123,9 $\pm$ 149,7	ns
ТТГ (мМЕ/л)	1,5 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,8	ns
Тестостерон(нмоль/л)	2,1 $\pm$ 4,5	1,1 $\pm$ 0,02	ns
Пролактин (мМЕ/л)	175,6 $\pm$ 141,8	280,8 $\pm$ 180,1	ns

Данные о концентрации уровней Е2 и П в период предполагаемого «окна имплантации» представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Уровень Е2 и прогестерона в день пайпель-биопсии эндометрия

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Гормон	Группа 1 (n=104)	Группа 2 (n =36)	p
Е2 (пмоль/л)	586,8 $\pm$ 300,0	1174,1 $\pm$ 451,3	p <0,05
Прогестерон (нмоль/л)	38,9 $\pm$ 16,7	39,4 $\pm$ 16,0	ns

Представленные данные показывают, что средний уровень Е2 в день пайпель-биопсии эндометрия у пациенток 2-й группы (1174,1 $\pm$  451,3 пмоль/л) был значимо выше, по сравнению с аналогичным показателем женщин 1-й группы (586,8 $\pm$  300,0 пмоль/л) (p <0,05). В то же время не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий по уровню П (38,9 $\pm$  16,7 и 39,4 $\pm$  16,0 нмоль/л).

Таким образом, уровень результаты гормонального обследования указали на сохраненный овариальный резерв и функцию щитовидной железы у всех

обследованных женщин, и более высокий уровень E2 в период «окна имплантации» у пациенток 2-й группы на фоне ЦГТ ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Данные ультразвукового исследования органов малого таза

Результаты УЗИ органов малого таза представлены в таблице 16. Средняя толщина эндометрия у пациенток 1-й и 2-й групп на 5 день менструального цикла составила  $0,4 \pm 0,2$  см и  $0,4 \pm 0,1$  см соответственно и не имела значимых межгрупповых различий. Размеры матки и объем яичников также соответствовали нормативным значениям женщин данной возрастной группы и значимо не различались.

Таблица 16 – УЗИ малого таза на 5 день менструального цикла

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Параметры	Группа 1 (n=104)	Группа 2 (n=36)	p
М-ЭХО (см)	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	ns
Продольный размер матки (см)	$5,2 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,9$	ns
Поперечный размер матки (см)	$3,8 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,8$	ns
Передне-задний размер матки (см)	$4,6 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,7$	ns
Объем правого яичника (см <sup>3</sup> )	$6,2 \pm 1,6$	$6,3 \pm 0,9$	ns
Объем левого яичника (см <sup>3</sup> )	$6,1 \pm 1,6$	$5,9 \pm 1,7$	ns

При исследовании величины М-ЭХО в день забора пайпель-биопсии эндометрия установлено, что толщина эндометрия была оптимальной у всех обследованных женщин и составила  $9,0 \pm 1,6$  мм и  $8,9 \pm 1,5$  мм в 1-й и 2-й группах соответственно (таблица 17).

Таблица 17 – Толщина эндометрия в день забор пайпель-биопсии эндометрия ЛГ+7-8 или Р+5

Данные в средних  $\pm$  стандартных отклонениях, t-тест

Параметр	Группа 1 (n=104)	Группа 2 (n=36)	p
М-ЭХО (мм)	9,0 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 1,5	ns

Таким образом, результаты УЗИ органов малого таза у женщин обследуемых групп в 1 и 2 фазы менструального цикла соответствовали нормативным значениям и не имели статистически значимых межгрупповых различий.

### 3.2.3 Патоморфологическое исследование эндометрия

Гистологическое исследование биоптатов эндометрия выполнено у всех 140 женщин в период «окна имплантации» (ЛГ+7-8 или Р+5). Данные представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты гистологического исследования

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$  –тест

Гистологическое заключение	Группа 1 (n=104)		Группа 2 (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

По результатам гистологического исследования были выделены следующие подгруппы: 1А (N= 32) – образцы эндометрия соответствовали ранней стадии фазы секреции (30,8%); 1Б (N=72) – образцы эндометрия соответствовали средней стадии фазы секреции (69,2%); 2А (N= 24) – ранняя стадия фазы секреции (66,7%); 2Б (N=12) – средняя стадия фазы секреции (33,3%).

Таким образом, эндометрий средней стадии фазы секреции в 3 раза чаще диагностирован в естественном цикле по сравнению с циклом ЦГТ (p <0,05). В то

же время ранняя стадия фазы секреции встречалась в 2 раза чаще в цикле ЦГТ по сравнению с аналогичными данными в ЕЦ ( $p < 0,05$ )

*Анализируя результаты клинико-лабораторного обследования 140 женщин, включенных в исследование, следует отметить, что пациентки обеих групп были сопоставимы по возрасту ( $34 \pm 4,4$  лет и  $36 \pm 4,5$  лет), ИМТ ( $22,3 \pm 3,0$  и  $21,8 \pm 3,4$ ) и длительности бесплодия ( $3,9 \pm 2,7$  и  $5,0 \pm 2,7$  лет).*

Частота встречаемости соматических заболеваний не отличалась от общепопуляционной: наиболее распространенными были заболевания ЖКТ (21,2% и 16,7%), молочных желез (15,4%) и мочеполовой системы (5,6%).

Каждая третья женщина из числа обследованных, перенесла хронические воспалительные заболевания органов малого таза, отражением которых могли явиться хронический эндометрит (30,8% и 16,7% в 1 и 2 группах) и полипы эндометрия (11,5% и 27,8%) соответственно.

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

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).

Все обследованные женщины имели своевременное менархе и регулярный менструальный цикл со средней длительностью  $28,1 \pm 2,6$  дней и продолжительностью менструального кровотечения  $4,8 \pm 1,05$  дней.

На отсутствие беременностей в анамнезе указали 50% женщин 1-й группы и 33,3% пациенток 2-й группы. Для лечения вторичного бесплодия обратилось более половины обследованных женщин (50% и 66,7%). Анализ исходов беременностей показал, что своевременными самопроизвольными родами завершились лишь 44,4% беременностей у женщин 1-й группы и 33,3% у пациенток 2-й группы. В остальных случаях беременность имела осложненное течение, завершившееся ранними репродуктивными потерями.

Безуспешные попытки ЭКО в анамнезе отмечены у 71,4% обследованных женщин. На момент включения в исследование пациентки 1 группы имели  $3,7 \pm 2,5$  криоконсервированных эмбрионов, а женщины 2 группы –  $2,7 \pm 1,4$  криоконсервированных эмбрионов хорошего качества.

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

Выявлено значимое повышение уровня E2 в период предполагаемого «окна имплантации» у женщин 2-й группы на фоне ЦГТ ( $1174,1 \pm 451,3$  пмоль/л против  $586,8 \pm 300,0$  пмоль/л,  $p < 0,05$ ). Концентрация П составила  $38,9 \pm 16,7$  и  $39,4 \pm 16,0$  нмоль/л и не различалась между группами.

Результаты УЗИ не выявили различий в размере матки и объеме яичников у женщин обеих групп. Средняя толщина эндометрия в среднюю стадию фазы секреции значимо не различалась и составила  $9,0 \pm 1,6$  и  $8,9 \pm 1,5$  мм у пациенток 1-й и 2-й групп.

По результатам гистологического исследования биоптатов эндометрия установлено статистически значимое увеличение частоты выявления эндометрия средней стадии фазы секреции у женщин 1-й группы по сравнению с аналогичными данными во 2-й группе более чем в 3 раза ( $69,2\%$  против  $33,3\%$ ,  $p < 0,05$ ). Эндометрий ранней стадии фазы секреции был выявлен в 2 раза чаще в цикле ЦГТ (2-ая группа женщин) по сравнению с результатами женщин 1-й группы в ЕЦ ( $66,7\%$  против  $30,8\%$ ,  $p < 0,05$ ).

### **Исходы криопротocolов с учетом гистологического статуса эндометрия в ЕЦ и на фоне ЦГТ**

Исходы криопротocolов у пациенток 1-й и 2-й групп представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Исходы программы криопротокола у пациенток 1 и 2 групп с учетом гистологического статуса эндометрия

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$  –тест

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 биохимических беременностей	14 (43,8%)	16 (22,2%)	8 (33,3%)	2 (16,7%)	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns
Число и частота клинических беременностей	10 (31,3%)	14 (19,4%)	4 (16,6%)	2 (16,7%)	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns
Число и частота выкидышей	0	2 (2,7%)	0	0	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns
Число и частота внематочных беременностей	2 (6,3%)	0	0	0	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	10 (31,3%)	12 (16,6%)	4 (16,6%)	2 (16,7%)	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns
Число и частота родов живым плодом	10 (31,3%)	12 (16,6%)	4 (16,6%)	2 (16,7%)	p <sub>1А-1Б</sub> = ns p <sub>1А-2А</sub> = ns p <sub>1А-2Б</sub> = ns p <sub>1Б-2А</sub> = ns p <sub>1Б-2Б</sub> = ns

Результаты таблицы 19 показывают, что статистически значимых различий по частоте клинических беременностей, частоте прогрессирующих беременностей, родов живым плодом, а также ранних репродуктивных потерь получено не было. Однако прослеживалась тенденция к увеличению количества беременностей и родов живым плодом при ПЭ у пациенток с диагностированной ранней стадией



фазы секреции в ЕЦ (31,3%), в то время как аналогичный показатель для средней стадии фазы секреции составил 19,4%. Показатели наступления клинических беременностей у женщин на фоне ЦГТ были сопоставимы и составили 16,6% и 16,7% в подгруппах 2А и 2Б.

Перед проведением молекулярно-генетического исследования эндометрия был проведен биоинформатический анализ баз данных для выбора потенциальных маркеров «окна имплантации».

### 3.3 Результаты биоинформатического анализа

В анализ были включены образцы нормального эндометрия стадий поздней пролиферации ( $n = 5$ ), ранней секреции ( $n = 3$ ) и средней секреции ( $n = 8$ ), полученные до начала исследования [118].

При использовании метода главных компонент образцы были разделены на 3 группы в зависимости от фазы менструального цикла (рисунок 3).

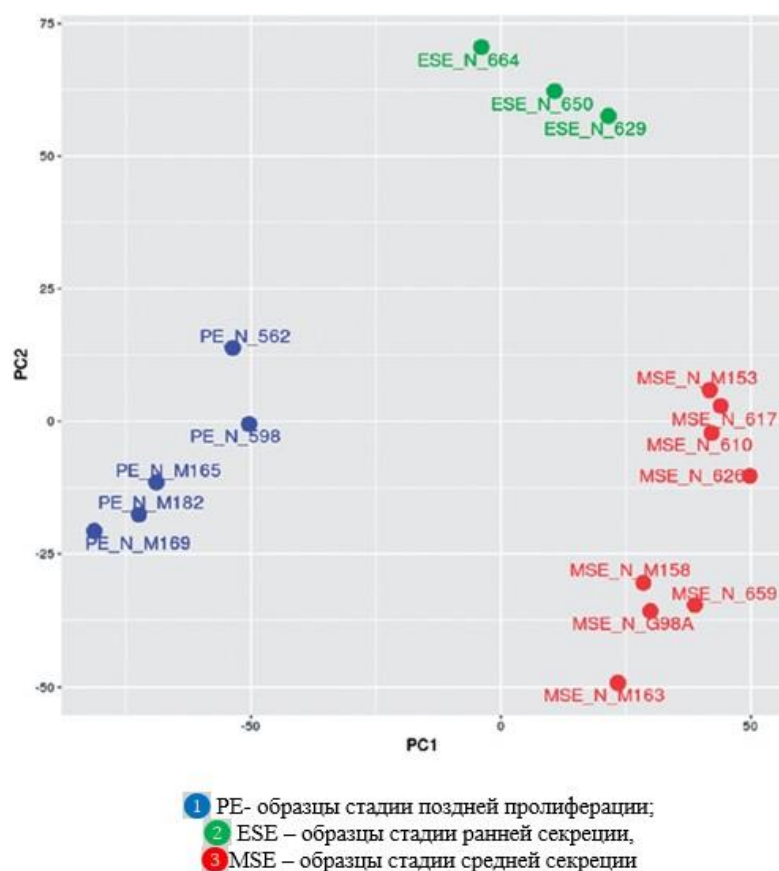


Рисунок 3 – Проекция образцов нормального эндометрия на первые две компоненты при применении метода главных компонент

С помощью кластерного анализа выделены масштабные группы генов (порядка тысячи), дифференциально экспрессируемых на стадиях поздней пролиферации, ранней и средней секреции. Выявлено 8 кластеров: 1 кластер включал 2148 генов, 2 кластер – 1537, 3 кластер – 2830, 4 кластер – 3569, 5 кластер – 3517, 6 кластер – 2513, 7 кластер – 3611 и 8 кластер – 3795 генов (рисунок 4).

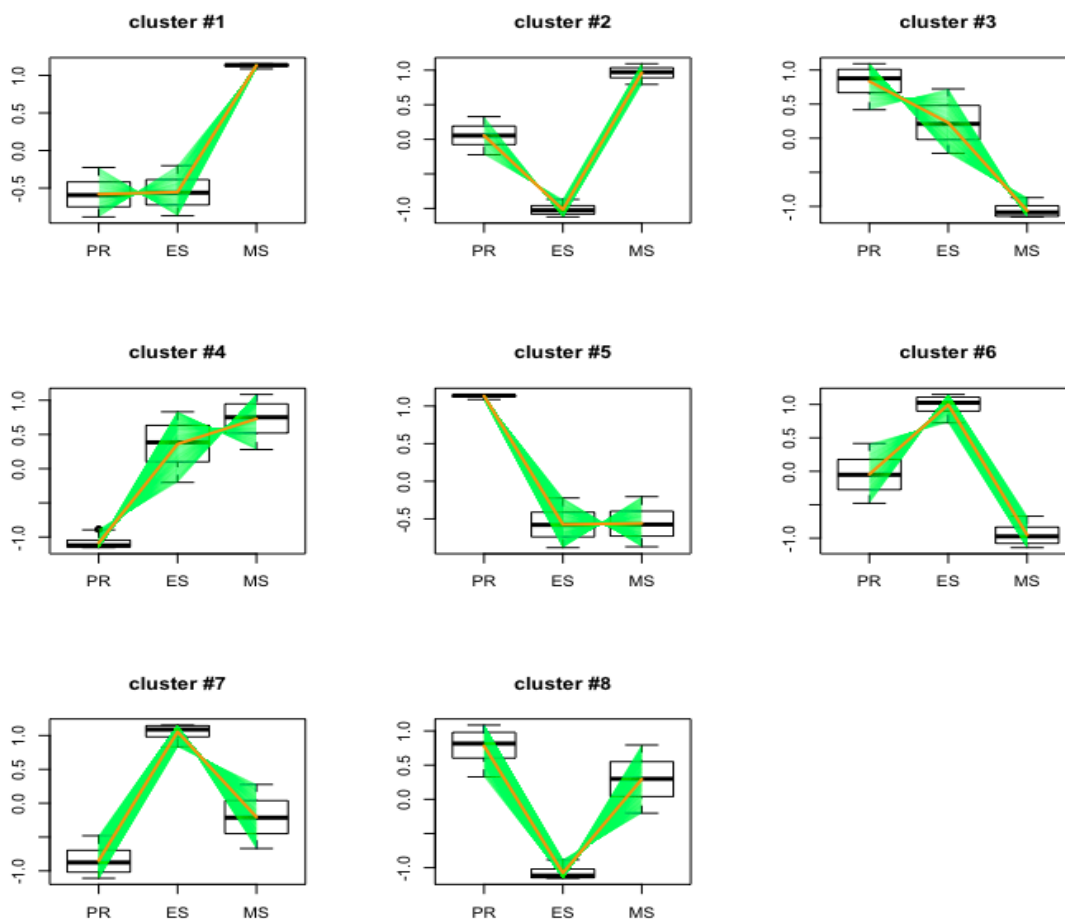


Рисунок 4 – Результаты разделения экспрессии генов на 8 кластеров

Полученные нами данные биоинформатического анализа были сопоставлены с литературными по тесту ERA (Endometrial Receptivity Analysis), который в настоящее время используется в ряде европейских клиник репродукции для определения рецептивности эндометрия [12]. После проведения сравнения полученных кластеров генов с данными ERA были выделены 14 генов (GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HAVP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, IGFBP1, IL15, GNLY), дифференциально экспрессируемых на стадии средней секреции (таблица 20). По результатам биоинформатического анализа и данным

теста ERA экспрессия 11 из этих генов (GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, IGFBP1, IL15, GNLV) была повышена, а 3 генов снижена (HLA-DOB, MSX1, POSTN) на стадии средней секреции по сравнению со стадией ранней секреции. Оба метода имели идентичные результаты по изменению экспрессии генов на стадии средней секреции.

Помимо этого, методом ОТ-ПЦР исследовалась экспрессия еще одного гена NDRG1, отобранного в результате биоинформатического анализа и данных литературы.

Таблица 20 – Список генов, выбранных для молекулярно-генетического исследования

\*Средневзвешенный уровень сигнала в группе (результаты с чипа)

\*\*p-value for Kruskal-Wallis Rank Sum Test

(ранговый критерий Критерий Краскела — Уоллиса)

\*\* Fold Change (linear) – показатель изменения уровня экспрессии в эндометрии стадии средней секреции по сравнению с эндометрием стадией ранней секреции. Со знаком минус – снижение экспрессии, положительное значение – повышение экспрессии (во сколько раз).

Ген	Результаты биоинформатического анализа						Изменение уровня экспрессии*** (ERA)
	Bi-weight Avg Signal* (log2)			p-уровень**	Кластер	Изменение уровня экспрессии***	
	Стадия поздней пролиферации	Стадия ранней секреции	Стадия средней секреции				
GPX3	10,5	9,9	14,8	0,0033	1	29,8	35,5
PAEP	10,1	8,9	15,2	0,0034	1	82,9	31,4
LIF	8,6	6,4	10,1	0,0064	2	12,9	15
DPP4	7,0	6,6	10,3	0,0025	1	12,5	7,7
TAGLN	11,4	11,6	12,2	0,0059	4	1,5	5,7
IGFBP1	5,3	4,3	8,2	0,0067	1	15,1	5,4
AQP3	7,8	10,6	10,9	0,0066	4	1,2	4,6
GNLY	11,9	11,0	13,2	0,0233	2	4,5	4,5
HABP2	8,4	8,4	10,5	0,0034	1	4,3	4,1
IMPA2	9,4	8,5	10,7	0,0031	2	4,6	3,9
IL15	8,2	9,4	10,8	0,0018	4	2,7	3,0
HLA-DOB	7,5	11,6	7,9	0,0300	7	-12,7	-11,1
POSTN	9,9	8,2	7,2	0,0108	5	-1,9	-6,0
MSX1	12,2	12,9	11,5	0,0031	6	-3,5	-3,3

После определения спектра изучаемых генов, было проведено молекулярно-генетическое исследование биоптатов эндометрия методом ОТ-ПЦР.

### **3.4 Молекулярно-генетическое исследование**

#### **3.4.1 Результаты кластерного анализа транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия**

В результате проведённого молекулярно-генетического исследования был проведен анализ 15 генов, уровень экспрессии которых отличался более, чем в 2 раза на стадии средней секреции по сравнению с ранней секрецией в соответствии с тестом ERA или по результатам биоинформатического анализа: GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, IGFBP1, IL15, GNLY, NDRG1.

Результаты по экспрессии генов были проанализированы независимо от гистологического статуса эндометрия методом кластерного анализа (таблица 21).

Результаты кластерного анализа представлены в виде тепловой карты профилей экспрессии 15 генов в образцах эндометрия на рисунке 5. Кластерный анализ позволил выделить 4 кластера образцов (кластеры А-D), отличающихся дифференциальной экспрессией генов.

Кластер А включал 20 образцов и характеризовался повышенной экспрессией мРНК генов POSTN, HLA-DOB, MSX1 и низкой экспрессией мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLY, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN (рисунок 3). Кластеры В (n=31) и С (n=36) характеризовались промежуточными уровнями экспрессии исследованных генов. Кластер D (n=17) характеризовался высокой экспрессией мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLY, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN и низкой экспрессией генов POSTN, HLA-DOB, MSX1.

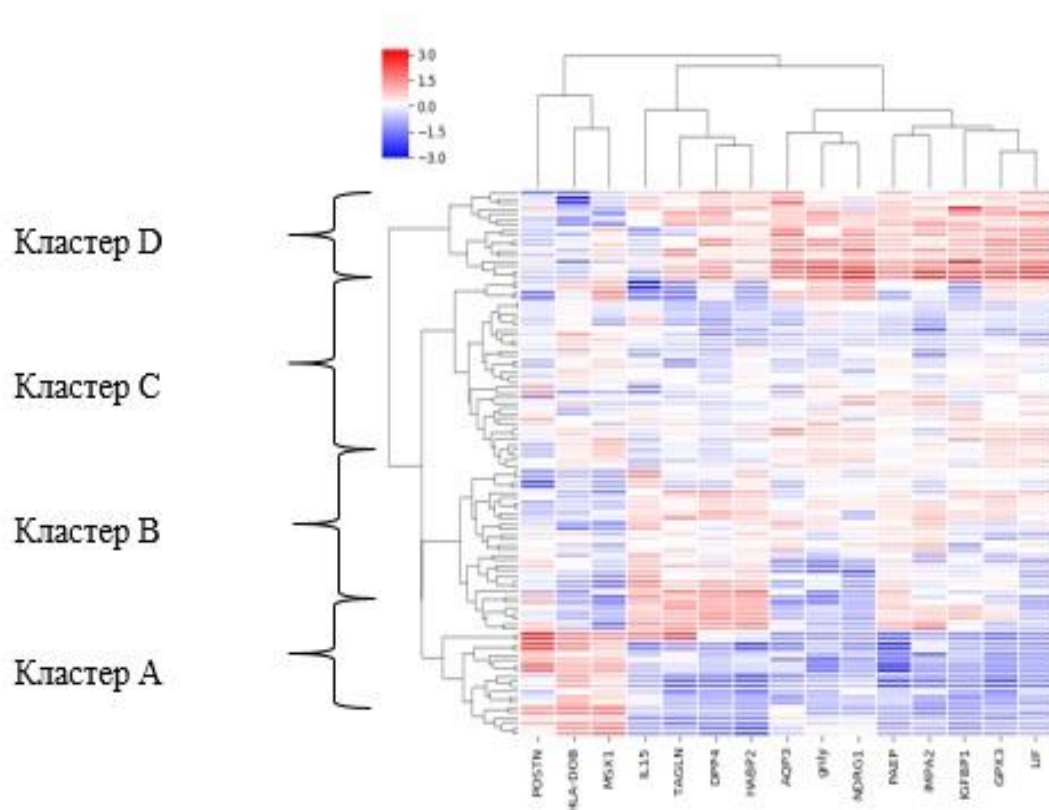


Рисунок 5 – Тепловая карта транскрипционных профилей генов в образцах тканей эндометрия в день забора пайпель-биопсии ЛГ+7-8

### 3.4.2 Сравнение транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия в кластерах образцов

Результаты сравнительного анализа транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия в выделенных кластерах образцов представлены в таблице 21.

Развитие эндометрия в менструальном цикле регулируется эстрогенами и прогестероном; очевидно, что повышение уровня прогестерона приводит к повышению прогестерон-ассоциированного протеина PAEP в тканях эндометрия. Данный маркер позволяет провести датирование эндометрия: на более ранних стадиях уровень экспрессии мРНК гена PAEP будет минимальным, далее будет повышаться по мере его дальнейшего созревания. Учитывая это, можно предположить, что по мере развития эндометрий претерпевает переходы от кластера к кластерам А → С → В → D.

Таблица 21 – Уровень экспрессии мРНК исследованных генов в кластерах образцов

\*Критерий Манна-Уитни при сравнении кластеров образцов

Ген	Кластер А Ме (Q1; Q3) n=20	Кластер С Ме (Q1; Q3) n=36	Кластер В Ме (Q1; Q3) n=31	Кластер D Ме (Q1; Q3) n=17	p-уровень
<b>PAEP</b>	1,0 (0,1; 4,5)	64,2 (39,1;140,7)	294,8 (194,5;405,0)	853,2 (617,4;1573,9)	$p_{a-c}=2,6 \times 10^{-8}$ $p_{a-b}=5,8 \times 10^{-4}$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=2,0 \times 10^{-6}$ $p_{c-d}=1,8 \times 10^{-8}$ $p_{b-d}=2,2 \times 10^{-9}$
<b>IMPA2</b>	1,0 (0,6;1,4)	3,1 (2,0;5,1)	6,3 (3,0;9,1)	10,6 (6,5;23,3)	$p_{a-c}=1,6 \times 10^{-6}$ $p_{a-b}=3,9 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=4,6 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=2,1 \times 10^{-6}$ $p_{b-d}=9,5 \times 10^{-8}$
<b>IGFBP1</b>	1,0 (0;3,0)	31,3 (13,6;148,8)	77,0 (33,2;169,1)	1382,8 (732,5;10935,0)	$p_{a-c}=3,3 \times 10^{-7}$ $p_{a-b}=2,2 \times 10^{-6}$ $p_{a-d}=1,5 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=ns$ $p_{c-d}=4,5 \times 10^{-7}$ $p_{b-d}=3,1 \times 10^{-8}$
<b>GPX3</b>	1,0 (0,6;2,4)	54,7 (17,2;101,8)	26,9 (7,4;82,6)	659,8 (172,7;1035,3)	$p_{a-c}=6,6 \times 10^{-12}$ $p_{a-b}=2,9 \times 10^{-7}$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=ns$ $p_{c-d}=1,7 \times 10^{-8}$ $p_{b-d}=9,4 \times 10^{-9}$
<b>AQP3</b>	1,0 (0,4;1,7)	2,4 (1,1;3,4)	1,7 (0,7;3,0)	13,1 (8,7;26,8)	$p_{a-c}=3,6 \times 10^{-7}$ $p_{a-b}=9,0 \times 10^{-8}$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=ns$ $p_{c-d}=2,8 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=ns$
<b>LIF</b>	1,0 (0;2,5)	7,2 (3,5;23,4)	7,2 (3,5;23,4)	483,2 (198,5;1398,7)	$p_{a-c}=3,3 \times 10^{-13}$ $p_{a-b}=1,9 \times 10^{-6}$ $p_{a-d}=3,6 \times 10^{-11}$ $p_{c-b}=1,3 \times 10^{-9}$ $p_{c-d}=4,5 \times 10^{-4}$ $p_{b-d}=3,6 \times 10^{-9}$
<b>gnly</b>	1,0 (0,5;2,2)	14,1 (3,4;22,6)	4,6 (1,2;9,7)	55,7 (15,8;212,9)	$p_{a-c}=2,3 \times 10^{-7}$ $p_{a-b}=3,2 \times 10^{-8}$ $p_{a-d}=1,8 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=8,6 \times 10^{-4}$ $p_{c-d}=6,1 \times 10^{-9}$ $p_{b-d}=1,9 \times 10^{-5}$

Ген	Кластер А Ме (Q1; Q3) n=20	Кластер С Ме (Q1; Q3) n=36	Кластер В Ме (Q1; Q3) n=31	Кластер D Ме (Q1; Q3) n=17	р-уровень
<b>NDRG1</b>	1,0 (0,1;2,3)	9,4 (3,3;35,7)	0,7 (0,3;6,4)	136,8 (41,1;673,6)	$p_{a-c}=6,5 \times 10^{-4}$ $p_{a-b}=7,3 \times 10^{-7}$ $p_{a-d}=1,9 \times 10^{-6}$ $p_{c-b}=9,6 \times 10^{-5}$ $p_{c-d}=5,3 \times 10^{-6}$ $p_{b-d}=ns$
<b>DPP4</b>	1,0 (0,8;2,0)	3,2 (2,4;4,7)	29,5 (11,1;78,0)	59,7 (23,7;102,8)	$p_{a-c}=1,4 \times 10^{-8}$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=4,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=1,2 \times 10^{-8}$ $p_{c-d}=1,6 \times 10^{-4}$ $p_{b-d}=3,4 \times 10^{-8}$
<b>HABP2</b>	1,0 (0,3;2,4)	5,3 (1,9;9,6)	24,1 (17,0;49,0)	20,7 (12,5;27,7)	$p_{a-c}=1,2 \times 10^{-6}$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=2,6 \times 10^{-10}$ $p_{c-d}=5,9 \times 10^{-5}$ $p_{b-d}=2,2 \times 10^{-9}$
<b>TAGLN</b>	1,0 (0,7;2,0)	1,7 (1,0;2,6)	4,8 (2,9;8,5)	6,0 (2,4;8,1)	$p_{a-c}=1,2 \times 10^{-5}$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=5,1 \times 10^{-4}$ $p_{c-b}=1,4 \times 10^{-7}$ $p_{c-d}=ns$ $p_{b-d}=6,2 \times 10^{-5}$
<b>IL15</b>	1,0 (0,8;2,1)	1,5 (1,0;1,9)	4,0 (3,2;5,0)	1,5 (1,2;2,2)	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=3,8 \times 10^{-6}$ $p_{a-d}=ns$ $p_{c-b}=6,6 \times 10^{-10}$ $p_{c-d}=ns$ $p_{b-d}=3,3 \times 10^{-6}$
<b>HLA-DOB</b>	1,0 (0,9;1,7)	$1,7 \times 10^{-1}$ ( $1,0 \times 10^{-1}$ ; $2,9 \times 10^{-1}$ )	$2,5 \times 10^{-2}$ ( $1,6 \times 10^{-2}$ ; $4,8 \times 10^{-2}$ )	$2,6 \times 10^{-2}$ ( $4,7 \times 10^{-3}$ ; $3,9 \times 10^{-2}$ )	$p_{a-c}=5,9 \times 10^{-7}$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=2,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=2,6 \times 10^{-7}$ $p_{c-d}=6,5 \times 10^{-7}$ $p_{b-d}=5,6 \times 10^{-9}$
<b>MSX1</b>	1,0 (0,8;1,7)	$5,9 \times 10^{-1}$ ( $3,4 \times 10^{-1}$ ; $8,3 \times 10^{-1}$ )	$1,5 \times 10^{-1}$ ( $1,1 \times 10^{-1}$ ; $2,3 \times 10^{-1}$ )	$4,1 \times 10^{-1}$ ( $2,3 \times 10^{-1}$ ; $7,3 \times 10^{-1}$ )	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=3,6 \times 10^{-4}$ $p_{a-d}=9,5 \times 10^{-5}$ $p_{c-b}=4,3 \times 10^{-9}$ $p_{c-d}=2,4 \times 10^{-4}$ $p_{b-d}=3,0 \times 10^{-9}$
<b>POSTN</b>	1,0 (0,3;4,6)	$2,6 \times 10^{-1}$ ( $1,6 \times 10^{-1}$ ; $3,3 \times 10^{-1}$ )	$2,8 \times 10^{-1}$ ( $1,6 \times 10^{-1}$ ; $4,9 \times 10^{-1}$ )	$1,9 \times 10^{-1}$ ( $1,5 \times 10^{-1}$ ; $2,4 \times 10^{-1}$ )	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=2,0 \times 10^{-5}$ $p_{c-b}=ns$ $p_{c-d}=2,8 \times 10^{-5}$ $p_{b-d}=3,7 \times 10^{-5}$

По мере развития эндометрия происходит постепенное нарастание уровня экспрессии мРНК генов PAEP, IMPA2, IGFBP1, GPX3, DPP4, TAGLN и снижение уровня экспрессии мРНК генов HLA-DOB и POSTN (рисунок 6).

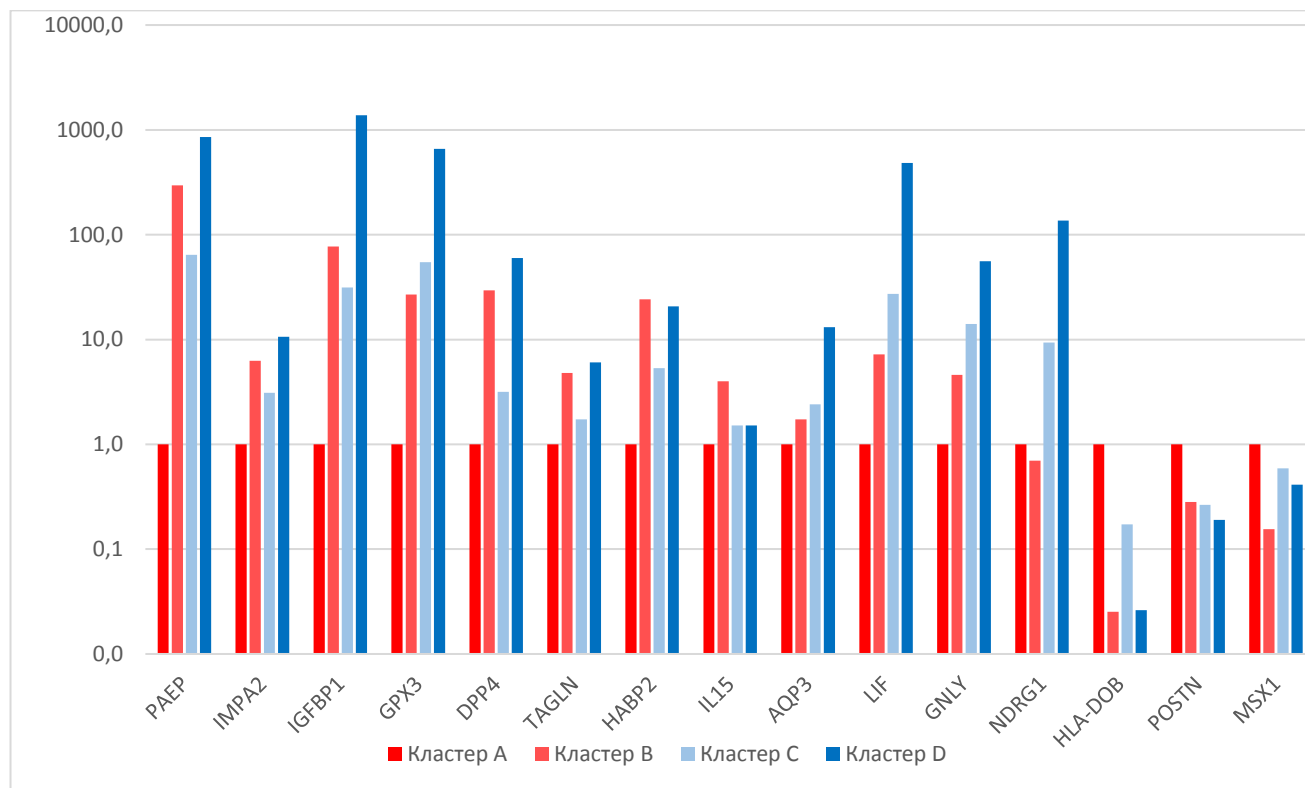


Рисунок 6 – Динамика изменения уровня экспрессии мРНК по мере развития эндометрия на стадиях ранней и средней фаз секрети в ЕЦ

Для экспрессии мРНК генов AQP3, LIF, GNLY, NDRG1 характерно их нарастание по мере развития эндометрия со снижением в кластере В, а для гена HABP2 – нарастание по мере развития эндометрия с повышением в кластере В.

Экспрессия мРНК генов IL15 варьирует в кластерах, а экспрессия мРНК гена MSX1 снижается по мере развития эндометрия и повышается в кластере D.

### 3.4.3 Сравнение результатов гистологического исследования и молекулярно-генетического датирования эндометрия в ЕЦ

Распределение образцов по кластерам соотносилось с гистологическим датированием эндометрия (таблица 22). Принадлежность образцов к кластеру А в равной степени соотносилось со стадиями ранней и средней фаз секрети (50%). К кластеру С 66,7% случаев (24 образца) соответствовали средней стадии фазы



секреции, а в 33,3% к ранней стадии фазы секреции. Образцы в кластерах D и B более, чем в 80% случаев относились со средней стадией фазы секреции (более 80%).

Таблица 22 – 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	<b>80,6%</b>
D (n=17)	2	11,8%	15	<b>88,2%</b>
Всего B+D (n=48)	8	16,7%	40	<b>83,3%</b>

Таким образом, в результате исследования установлена гетерогенность молекулярно-генетических профилей генов в период предполагаемого «окна имплантации» в ЕЦ, отражающая этапы развития секреторного эндометрия.

После проведения программы переноса размороженных эмбрионов был проведен анализ исходов проведенного лечения. Частота положительного результата β-ХГ составляла от 23,5 до 40% без статистически значимых различий между кластерами. Была выявлена статистически значимая разница по частоте родов живым плодом в кластерах B и C, то есть, когда молекулярно-генетический профиль эндометрия соответствовал промежуточному этапу развития между ране- и среднесекреторной трансформацией эндометрия (таблица 23).

### 3.4.4 Результаты исхода программ ВРТ в зависимости от кластерного разделения образцов эндометрия в ЕЦ

Таблица 23 – 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
Число и частота выкидышей	4 (20,0%)	2 (6,5%)	0	0	ns
Число и частота внематочных беременностей	0	1 (3,2%)	0	1 (5,9%)	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	<b>9 (29,0%)</b>	<b>10 (27,8%)</b>	3 (17,6%)	<b>p<sub>a-b</sub>=0,008</b> <b>p<sub>a-c</sub>=0,010</b>
Число и частота родов живым плодом	0	<b>9 (29,0%)</b>	<b>10 (27,8%)</b>	3 (17,6%)	<b>p<sub>a-b</sub>=0,008</b> <b>p<sub>a-c</sub>=0,010</b>

Таким образом, использование молекулярно-генетического критерия позволило выделить 4 кластера образцов в отличие от 2 стадий фаз секреции в соответствии с гистологическими изменениями. Частота биохимической беременности составила около 30% и не зависела от принадлежности образцов эндометрия к определенному молекулярно-генетическому кластеру. В то же время частота прогрессирующих беременностей и родов живым плодом была выше, когда транскрипционный профиль эндометрия соответствовал переходному периоду между стадиями ранней и средней секреции (кластеры экспрессии В и С).

### 3.4.5 Результаты кластерного анализа транскрипционного профиля генов в тканях эндометрия на фоне ЗГТ

Экспрессия генов на фоне ЗГТ показала похожую тенденцию в изменении уровня экспрессии генов, как в группе ЕЦ; в результате кластерного анализа так же были выделены 4 «кластерные» стадии развития эндометрия (рисунок 7).

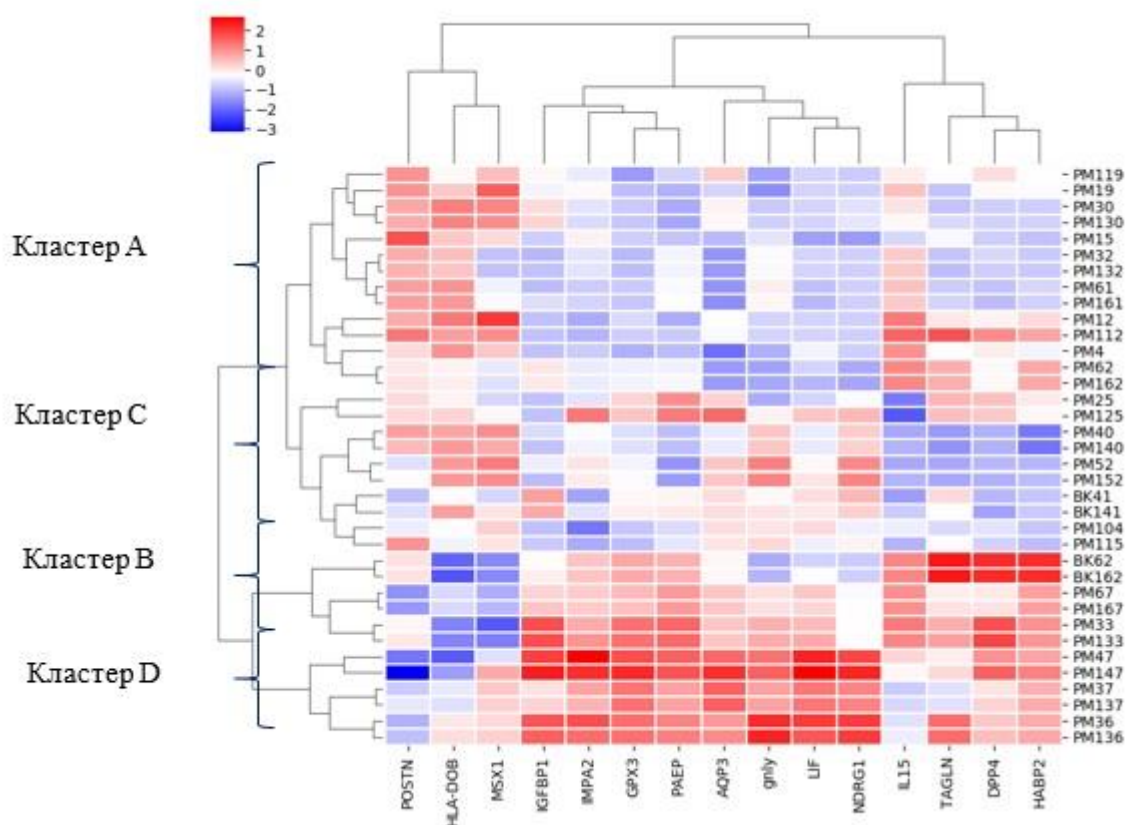


Рисунок 7 – Тепловая карта транскрипционных профилей генов в образцах тканей эндометрия в день забора пайпель-биопсии П+5 на фоне ЗГТ

В кластер А вошли 14 образцов, для которых было характерно повышенная экспрессия мРНК генов POSTN, HLA-DOB, MSX1 и низкая экспрессия мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLy, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN (рисунок 7). Кластеры В (n=6) и С (n=10) характеризовались промежуточными уровнями экспрессии исследованных генов. Кластер D (n=6) характеризовался высокой экспрессией мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLy, IMPA2,

РАЕР, IGFBP1, НАВР2, DPP4 и TAGLN и низкой экспрессией генов POSTN, HLA-DOB, MSX1 (таблица 24).

Таблица 24 – Уровень экспрессии мРНК исследованных генов в кластерах образцов на фоне ЦГТ

\*Критерий Манна-Уитни при сравнении кластеров образцов

Ген	Кластер А Me (Q1; Q3) n=14	Кластер С Me (Q1; Q3) n=10	Кластер В Me (Q1; Q3) n=6	Кластер D Me (Q1; Q3) n=6	p-уровень
<b>РАЕР</b>	1,0 (0,4; 3,5)	1,9 (0,6;9,2)	144,3 (81,3;588,5)	305,8 (153,9;782,5)	$p_{a-c} = ns$ $p_{a-b} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = 1,7 \times 10^{-2}$ $p_{c-d} = 9,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = ns$
<b>ИМРА2</b>	1,0 (0,8;1,1)	1,1 (0,6;1,7)	2,9 (2,7;3,7)	11,3 (5,5;18,1)	$p_{a-c} = ns$ $p_{a-b} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = 9,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d} = 2,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = 1,6 \times 10^{-2}$
<b>IGFBP1</b>	1,0 (0,1;5,3)	0,6 (0,1;1,7)	12,7 (6,2;372,5)	336,3 (78,2;637,3)	$p_{a-c} = ns$ $p_{a-b} = 8,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = 1,4 \times 10^{-2}$ $p_{c-d} = 4,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = ns$
<b>GPX3</b>	1,0 (0,7;1,2)	4,2 (2,0;8,3)	83,5 (54,1;355,8)	506,8 (453,6;1219,8)	$p_{a-c} = 4,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-b} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = 2,4 \times 10^{-2}$
<b>AQP3</b>	1,0 (0,7;3,8)	6,3 (5,8;8,6)	9,1 (5,5;9,1)	43,8 (27,2;47,5)	$p_{a-c} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-b} = 2,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = ns$ $p_{c-d} = 2,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = 3,0 \times 10^{-3}$
<b>LIF</b>	1,0 (0;5,4)	65,2 (25,9;10,8)	163,0 (63,0;272,5)	8880,0 (3074,3;21290,2)	$p_{a-c} = 0$ $p_{a-b} = 0$ $p_{a-d} = 0$ $p_{c-b} = ns$ $p_{c-d} = 4,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = 1,0 \times 10^{-3}$
<b>GPLY</b>	1,0 (0,4;4,3)	13,9 (9,1;26,5)	12,9 (3,7;40,8)	353,2 (122,5;1550,9)	$p_{a-c} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-b} = 2,6 \times 10^{-2}$ $p_{a-d} = 1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b} = ns$ $p_{c-d} = 5,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d} = 4,0 \times 10^{-3}$

Ген	Кластер А Ме (Q1; Q3) n=14	Кластер С Ме (Q1; Q3) n=10	Кластер В Ме (Q1; Q3) n=6	Кластер D Ме (Q1; Q3) n=6	p-уровень
<b>NDRG1</b>	1,0 (0;6,6)	303,2 (123,3;688,4)	38,4 (13,2;43,3)	74837,6 (19719,4;89641,2)	$p_{a-c}=0$ $p_{a-b}=2,1 \times 10^{-2}$ $p_{a-d}=0$ $p_{c-b}=1,3 \times 10^{-2}$ $p_{c-d}=2,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=4,0 \times 10^{-3}$
<b>DPP4</b>	1,0 (0,5;1,5)	0,3 (0,3;0,7)	34,4 (9,3;56,9)	3,7 (2,9;7,9)	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=2,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=4,2 \times 10^{-7}$ $p_{c-b}=3,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=7,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=ns$
<b>HABP2</b>	1,0 (0,5;3,6)	0,4 (0,3;0,5)	23,7 (19,6;234,1)	13,6 (12,6;16,1)	$p_{a-c}=8,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=1,2 \times 10^{-2}$ $p_{c-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=2,5 \times 10^{-2}$
<b>TAGLN</b>	1,0 (0,7;1,8)	1,1 (0,4;2,0)	4,6 (2,6;25,6)	2,0 (1,1;8,3)	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=ns$ $p_{c-b}=9,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=ns$ $p_{b-d}=ns$
<b>IL15</b>	1,0 (0,8;1,6)	0,3 (0,3;0,3)	1,7 (1,5;1,8)	0,5 (0,4;0,6)	$p_{a-c}=0$ $p_{a-b}=ns$ $p_{a-d}=5,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=4,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=4,0 \times 10^{-3}$
<b>HLA-DOB</b>	1,0 (0,6;1,6)	0,9 (0,2;1,4)	0 (0;0,1)	0,1 (0,1;0,3)	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=3,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=1,7 \times 10^{-2}$ $p_{b-d}=ns$
<b>MSX1</b>	1,0 (0,5;2,1)	0,9 (0,7;1,9)	0,2 (0,2;0,3)	1,0 (1,0;1,1)	$p_{a-c}=ns$ $p_{a-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=ns$ $p_{c-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-d}=ns$ $p_{b-d}=4,0 \times 10^{-3}$
<b>POSTN</b>	1,0 (0,8;1,3)	0,4 (0,2;0,7)	0,3 (0,1;0,4)	0,1 (0;0,1)	$p_{a-c}=1,9 \times 10^{-2}$ $p_{a-b}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{a-d}=1,0 \times 10^{-3}$ $p_{c-b}=ns$ $p_{c-d}=7,0 \times 10^{-3}$ $p_{b-d}=ns$

При исследовании экспрессии генов на фоне ЦГТ так же установлено увеличение уровня экспрессии мРНК генов PAEP, IMPA2, IGFBP1, GPX3, DPP4,

TAGLN, IL6 и снижение уровня экспрессии мРНК генов HLA-DOB и POSTN по мере развития эндометрия, поэтому разделение эндометрия на кластеры соответствовало таковому в ЕЦ (рисунок 8).

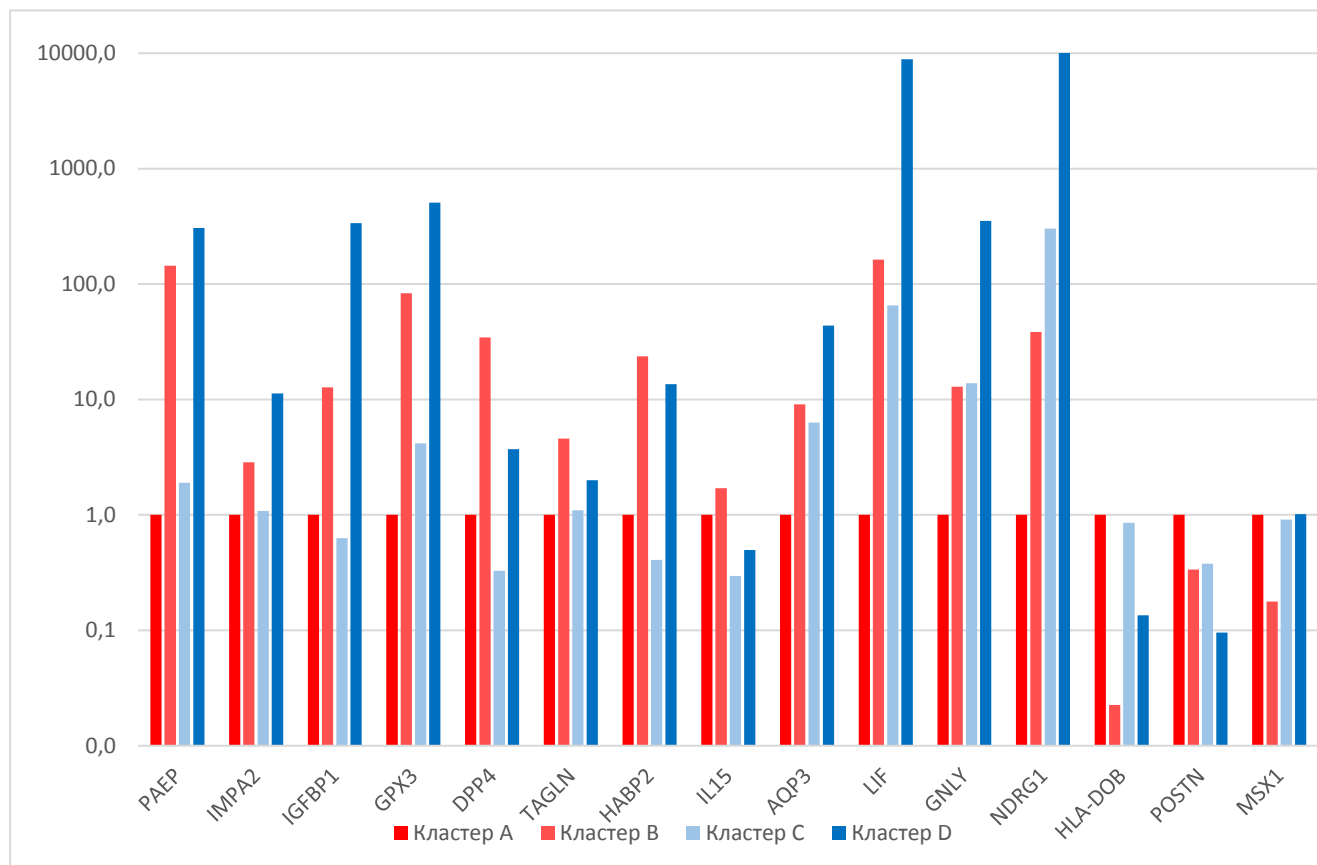


Рисунок 8 – Динамика изменения уровня экспрессии мРНК по мере развития эндометрия на стадиях ранней и средней фаз секреции на фоне ЦГТ

По мере созревания эндометрия увеличивается экспрессия мРНК генов AQP3, LIF, GNLV, NDRG1 в эндометрии от кластера А к кластеру D. Для гена HABP2 наблюдается нарастание по мере развития эндометрия с повышением в кластере B.

Экспрессия мРНК генов IL15, MSX1 на фоне ЦГТ варьировалась и не имеет четкой связи с развитием стадии эндометрий в кластерах.

### 3.4.6 Сравнительный анализ результатов гистологического исследования и молекулярно-генетического датирования эндометрия на фоне ЦГТ

Распределение образцов по кластерам соотносилось с гистологическим датированием эндометрия (таблица 25). Однако было установлено более выраженное распределение кластеров в соответствии с гистологической стадией развития эндометрия. Так принадлежность 100% образцов кластера А соответствовали стадии ранней фазы секреции (14 образцов), кластер С в 80% случаев (8 образца) соответствовали ранней стадии фазы секреции, а в 20% средней стадии фазы секреции, образцы кластера В в 66,7% (4 образца), а кластера D в 100% соответствовали средней стадии фазы секреции. Таким образом, кластерное стадирование эндометрия на фоне ЦГТ наглядно отражает гистологическое созревание эндометрия.

Таблица 25 – Сопоставление кластерного анализа с гистологическим исследованием

Кластер	Гистологическое исследование			
	Ранняя стадия фазы секреции (n=24)		Средняя стадия фазы секреции (N=12)	
	Количество	%	Количество	%
А (n=14)	14	<b>100,0%</b>	0	0
С (n=10)	8	<b>80,0%</b>	2	20,0%
В (n=6)	2	33,3%	4	<b>66,7%</b>
D (n=6)	0	0%	6	<b>100,0%</b>
Всего В+D (n=12)	2	16,7%	10	<b>83,3%</b>

После проведения оценки исходов программ ВРТ в группе ЦГТ не было установлено статистически значимой разницы в частоте положительных результатов В -ХГ между кластерами и колебалась от 66,7% до 28,6%. Однако установлена статистическая значимая разница в частоте пролонгирования беременностей и родов живым плодом в кластере В. В кластере С также были

выявлены более частое пролонгирование беременности и родов, однако результаты не были статистически значимы, вероятно, из-за малочисленности выборки (таблица 26).

### 3.4.7 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от кластерного разделения образцов эндометрия в группе ЦГТ

Таблица 26 – 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	p-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 выкидышей	0	0	0	0	ns
Число и частота внематочных беременностей	0	0	0	0	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	<b>4 (66,7%)</b>	<b>2 (20%)</b>	0	<b>p<sub>a-b</sub>=0,003</b> <b>p<sub>a-c</sub>=0,163</b> <b>p<sub>b-d</sub>=0,030</b>
Число и частота родов живым плодом	0	<b>4 (66,7%)</b>	<b>2 (20%)</b>	0	<b>p<sub>a-b</sub>=0,003</b> <b>p<sub>a-c</sub>=0,163</b> <b>p<sub>b-d</sub>=0,030</b>

Таким образом, полученные данные позволили нам выделить 4 кластерных стадии развития эндометрия у пациенток на фоне ЦГТ. Не было установлено различий в частоте положительных β-ХГч, однако по частоте пролонгирования беременности и родов наиболее благоприятным оказались кластеры В и С и составили 66,7% и 20%. Так как были установлены аналогичные результаты в ЕЦ, можно сделать предположение, что, вероятно, инвазия бластоцисты осуществляется в переходный период между ранней и средней стадиями фазы секреции.



### 3.4.8 Корреляции маркеров

Таблица 27 – Корреляция маркеров между изученными генами

		IMPA2	DPP4	HABP2	IGFBP1	GPX3	LIF	TAGLN	AQP3	IL6	GNLY	NDRG1	MMP7	IL15	MMP2
РАЕР	rS	0,812**	0,800**	0,779**	0,750**	0,750**	0,670**	0,611**	0,562**	0,534**	0,472**	0,389**	0,331**	0,312**	
	p	3,4x10 <sup>-36</sup>	1,7x10 <sup>-34</sup>	1,2x10 <sup>-31</sup>	3,4x10 <sup>-28</sup>	4,0x10 <sup>-28</sup>	8,6x10 <sup>-21</sup>	1,2x10 <sup>-16</sup>	9,0x10 <sup>-14</sup>	2,2x10 <sup>-12</sup>	1,2x10 <sup>-09</sup>	9,3x10 <sup>-07</sup>	3,7x10 <sup>-05</sup>	1,1x10 <sup>-04</sup>	
IMPA2	rS	0,705**	0,600**	0,655**	0,756**	0,689**	0,494**	0,635**	0,601**	0,579**	0,490**	0,395**			
	p	1,1x10 <sup>-23</sup>	5,9x10 <sup>-16</sup>	1,3x10 <sup>-19</sup>	8,3x10 <sup>-29</sup>	2,4x10 <sup>-22</sup>	1,5x10 <sup>-10</sup>	3,4x10 <sup>-18</sup>	5,4x10 <sup>-16</sup>	1,0x10 <sup>-14</sup>	2,3x10 <sup>-10</sup>	6,0x10 <sup>-07</sup>			
DPP4	rS	0,869**	0,632**	0,679**	0,473**	0,788**	0,441**	0,375**				0,470**	0,453**		
	p	1,1x10 <sup>-46</sup>	5,7x10 <sup>-18</sup>	1,9x10 <sup>-21</sup>	1,1x10 <sup>-09</sup>	1,0x10 <sup>-32</sup>	1,8x10 <sup>-08</sup>	2,4x10 <sup>-06</sup>				1,5x10 <sup>-09</sup>	6,5x10 <sup>-09</sup>		
HABP2	rS	0,672**	0,590**	0,381**	0,765**	0,324**	0,302**					0,396**	0,605**		
	p	6,2x10 <sup>-21</sup>	2,4x10 <sup>-15</sup>	1,6x10 <sup>-06</sup>	6,2x10 <sup>-30</sup>	5,6x10 <sup>-05</sup>	1,8x10 <sup>-04</sup>					5,8x10 <sup>-07</sup>	3,2x10 <sup>-16</sup>		
IGFBP1	rS	0,784**	0,659**	0,537**	0,472**	0,511**	0,526**	0,386**	0,334**						
	p	2,7x10 <sup>-32</sup>	6,2x10 <sup>-20</sup>	1,6x10 <sup>-12</sup>	1,2x10 <sup>-09</sup>	2,8x10 <sup>-11</sup>	5,4x10 <sup>-12</sup>	1,2x10 <sup>-06</sup>	3,1x10 <sup>-05</sup>						
GPX3	rS	0,871**	0,425**	0,699**	0,538**	0,754**	0,630**	0,424**							0,322**
	p	2,7x10 <sup>-47</sup>	6,6x10 <sup>-08</sup>	3,6x10 <sup>-23</sup>	1,5x10 <sup>-12</sup>	1,3x10 <sup>-28</sup>	7,5x10 <sup>-18</sup>	6,8x10 <sup>-08</sup>							6,2x10 <sup>-05</sup>
LIF	rS			0,820**	0,645**	0,839**	0,817**	0,328**							0,552**
	p			1,8x10 <sup>-37</sup>	6,9x10 <sup>-19</sup>	1,2x10 <sup>-40</sup>	5,1x10 <sup>-37</sup>	4,3x10 <sup>-05</sup>							2,8x10 <sup>-13</sup>
TAGLN	rS				0,314**									0,540**	
	p				9,7x10 <sup>-05</sup>									1,2x10 <sup>-12</sup>	
AQP3	rS	0,651**	0,706**	0,759**											0,561**
	p	2,7x10 <sup>-19</sup>	8,5x10 <sup>-24</sup>	3,7x10 <sup>-29</sup>											9,5x10 <sup>-14</sup>
IL6	rS	0,575**	0,620**	0,325**											0,554**
	p	1,6x10 <sup>-14</sup>	3,5x10 <sup>-17</sup>	5,3x10 <sup>-05</sup>											2,2x10 <sup>-13</sup>
GNLY	rS	0,834**													0,579**
	p	9,3x10 <sup>-40</sup>													1,0x10 <sup>-14</sup>
NDRG1	rS													-0,487**	0,665**
	p													3,0x10 <sup>-10</sup>	2,3x10 <sup>-20</sup>
MMP7	rS														
	p														
IL15	rS													-0,431**	
	p													4,0x10 <sup>-08</sup>	

\*\*p<0,001

Положительные корреляционные связи

0,7 > rS ≤ 0,9	высокие
0,5 > rS ≤ 0,7	средние
0,3 > rS ≤ 0,5	слабые

Отрицательные корреляционные связи

-0,9 > rS ≤ -0,7	высокие
-0,5 > rS ≤ -0,7	средние
-0,3 > rS ≤ -0,5	слабые

Таблица 27 – Корреляция маркеров между изученными генами

		HLA-DOB	MSX1	POSTN	HOXA11	HOXA10	IGF1
PAEP	rS	-0,772**	-0,602**	-0,382**	-0,300**		
	p	9,1x10 <sup>-31</sup>	4,8x10 <sup>-16</sup>	1,6x10 <sup>-06</sup>	2,0x10 <sup>-04</sup>		
IMPA2	rS	-0,617**	-0,385**	-0,355**			
	p	5,0x10 <sup>-17</sup>	1,2x10 <sup>-06</sup>	8,7x10 <sup>-06</sup>			
DPP4	rS	-0,744**	-0,509**				
	p	1,4x10 <sup>-27</sup>	3,3x10 <sup>-11</sup>				
HABP2	rS	-0,755**	-0,644**				
	p	9,8x10 <sup>-29</sup>	8,7x10 <sup>-19</sup>				
IGFBP1	rS	-0,660**	-0,444**	-0,408**			
	p	5,3x10 <sup>-20</sup>	1,5x10 <sup>-08</sup>	2,3x10 <sup>-07</sup>			
GPX3	rS	-0,584**		-0,541**		-0,416**	
	p	5,2x10 <sup>-15</sup>		1,1x10 <sup>-12</sup>		1,4E-07	
LIF	rS	-0,488**		-0,579**		-0,335**	
	p	2,7x10 <sup>-10</sup>		1,0x10 <sup>-14</sup>		3,0x10 <sup>-05</sup>	
TAGLN	rS	-0,525**	-0,495**				
	p	6,4x10 <sup>-12</sup>	1,3x10 <sup>-10</sup>				
AQP3	rS	-0,391**		-0,425**			
	p	8,3x10 <sup>-07</sup>		6,3x10 <sup>-08</sup>			
IL6	rS	-0,428**		-0,328**			
	p	5,1x10 <sup>-08</sup>		4,5x10 <sup>-05</sup>			
gngly	rS	-0,311**		-0,492**		-0,376**	
	p	1,1x10 <sup>-04</sup>		1,9x10 <sup>-10</sup>		2,3x10 <sup>-06</sup>	
NDRG1	rS			-0,516**		-0,354**	
	p			1,7x10 <sup>-11</sup>		9,6x10 <sup>-06</sup>	
MMP7	rS	-0,385**					
	p	1,3x10 <sup>-06</sup>					
MMP2	rS						0,386**
	p						1,2x10 <sup>-06</sup>
IL15	rS	-0,422**	-0,618**				-0,325**
	p	8,1x10 <sup>-08</sup>	4,8x10 <sup>-17</sup>				5,2x10 <sup>-05</sup>
HLA-DOB	rS		0,721**	0,375**	0,384**		0,403**
	p		3,1x10 <sup>-25</sup>	2,4x10 <sup>-06</sup>	1,4x10 <sup>-06</sup>		3,5x10 <sup>-07</sup>
MSX1	rS				0,416**		0,479**
	p				1,3x10 <sup>-07</sup>		6,5x10 <sup>-10</sup>
POSTN	rS					0,467**	
	p					2,0x10 <sup>-09</sup>	
HOXA11	rS						0,396**
	p						6,0x10 <sup>-07</sup>

\*\*p<0,001

Положительные корреляционные связи

0,7 > rS ≤ 0,9

высокие

0,5 > rS ≤ 0,7

средние

0,3 > rS ≤ 0,5

слабые

Отрицательные корреляционные связи

-0,9 > rS ≤ -0,7

высокие

-0,5 > rS ≤ -0,7

средние

-0,3 > rS ≤ -0,5

слабые

Для выявления положительных корреляционных связей учитывались средние (от 0,5 до 0,7), высокие (от 0,7 до 0,9) и очень высокие (более 0,9) связи.

Отрицательные связи были представлены слабыми (от -0,3 до -0,5), и средними (от -0,5 до -0,7) (таблица 27).

Были выявлены: высокие и средние корреляции между экспрессией гена PAEP, функция которого заключается в обеспечении последовательных событий, инициирующих наступление имплантации, с уровнем экспрессии генов, участвующих в передаче сигнала и апоптозе (IMPA2( $rS=0,81$ ,  $p=3,4 \times 10^{-36}$ ), DPP4( $rS=0,80$ ,  $p=1,7 \times 10^{-34}$ ), TAGLN ( $rS=0,61$ ,  $p=1,2 \times 10^{-16}$ ), AQP3 ( $rS=0,56$ ,  $p=9,0 \times 10^{-14}$ ), кодирующих белки регенерации и адгезии (HABP2( $rS=0,78$ ,  $p=1,2 \times 10^{-31}$ ); факторы роста (IGFBP1( $rS=0,75$ ,  $p=3,4 \times 10^{-28}$ ), кодирующих белок, который защищает клетки от повреждения перекисью водорода (GPX3 ( $rS=0,75$ ,  $p=4,0 \times 10^{-28}$ ) и цитокинами сем. IL-6: (LIF ( $rS=0,67$ ,  $p=8,6 \times 10^{-21}$ ), участвующих в процессе формирования воспалительного ответа (IL6 ( $rS=0,53$ ,  $p=2,2 \times 10^{-12}$ ); а также отрицательные корреляционные связи PAEP с HLA-DOB ( $rS=-0,77$ ,  $p=9,1 \times 10^{-16}$ ), участвующим в презентации антигенов и MSX1( $rS=-0,60$ ,  $p=4,8 \times 10^{-16}$ ), который обеспечивает супрессию генов дифференцировки во время эмбриогенеза.

Установлены высокие корреляционные связи между экспрессией IMPA2 и DPP4( $rS=-0,70$ ,  $p=1,1 \times 10^{-23}$ ), GPX3 ( $rS=0,76$ ,  $p=8,3 \times 10^{-29}$ ); средние корреляционные связи с экспрессией генов LIF ( $rS=0,69$ ,  $p=2,4 \times 10^{-29}$ ), IGFBP1( $rS=0,66$ ,  $p=1,3 \times 10^{-19}$ ), AQP3 ( $rS=0,64$ ,  $p=3,4 \times 10^{-18}$ ), IL6 ( $rS=0,60$ ,  $p=5,4 \times 10^{-16}$ ), GNLY ( $rS=0,57$ ,  $p=1,0 \times 10^{-14}$ ) и средняя отрицательная корреляция с HLA-DOB ( $rS=-0,62$ ,  $p=5,0 \times 10^{-17}$ ).

Высокие и средние корреляции были выявлены между DPP4 и экспрессией HABP2( $rS=0,87$ ,  $p=1,1 \times 10^{-46}$ ), TAGLN ( $rS=0,61$ ,  $p=1,2 \times 10^{-16}$ ), GPX3 ( $rS=0,68$ ,  $p=1,9 \times 10^{-21}$ ), IGFBP1( $rS=0,63$ ,  $p=5,7 \times 10^{-18}$ ). Отрицательные связи установлены с генами HLA-DOB ( $rS=-0,74$ ,  $p=1,4 \times 10^{-27}$ ), MSX1( $rS=-0,51$ ,  $p=3,3 \times 10^{-11}$ ).

Уровень экспрессии HABP2 имел высокую и среднюю корреляционную связи с генами TAGLN ( $rS=0,77$ ,  $p=1,0 \times 10^{-32}$ ), IL15 ( $rS=0,61$ ,  $p=3,2 \times 10^{-16}$ ), IGFBP1( $rS=0,67$ ,  $p=6,2 \times 10^{-21}$ ), GPX3 ( $rS=0,59$ ,  $p=2,4 \times 10^{-15}$ ) и отрицательные

корреляции с генами HLA-DOB ( $rS=-0,76$ ,  $p=9,8 \times 10^{-29}$ ), MSX1 ( $rS=-0,64$ ,  $p=8,7 \times 10^{-19}$ ).

Положительные корреляции установлены между генами IGFBP1 и GPX3 ( $rS=0,78$ ,  $p=2,7 \times 10^{-34}$ ), LIF ( $rS=0,66$ ,  $p=6,2 \times 10^{-20}$ ), TAGLN ( $rS=0,54$ ,  $p=1,6 \times 10^{-12}$ ), IL6 ( $rS=0,51$ ,  $p=2,8 \times 10^{-11}$ ), GNLY ( $rS=0,53$ ,  $p=5,4 \times 10^{-12}$ ), а также средние отрицательные корреляции с геном HLA-DOB ( $rS=-0,66$ ,  $p=5,3 \times 10^{-20}$ ).

При определении корреляционных связей установлены высокий уровень связи между GPX3 и LIF ( $rS=0,87$ ,  $p=2,7 \times 10^{-47}$ ), GNLY ( $rS=0,75$ ,  $p=1,3 \times 10^{-28}$ ), средний уровень установлен со следующими генами: NDRG1 ( $rS=0,63$ ,  $p=7,5 \times 10^{-18}$ ), AQP3 ( $rS=0,69$ ,  $p=3,6 \times 10^{-23}$ ), IL6 ( $rS=0,54$ ,  $p=1,5 \times 10^{-12}$ ). Отрицательные корреляционные связи выявлены с HLA-DOB ( $rS=-0,58$ ,  $p=5,2 \times 10^{-15}$ ), POSTN ( $rS=-0,54$ ,  $p=1,1 \times 10^{-12}$ ).

Уровень экспрессии LIF статистически значимо имел высокие положительные корреляции с уровнем GNLY ( $rS=0,84$ ,  $p=1,2 \times 10^{-40}$ ), AQP3 ( $rS=0,82$ ,  $p=1,8 \times 10^{-37}$ ), NDRG1 ( $rS=0,82$ ,  $p=5,1 \times 10^{-37}$ ), а также среднюю отрицательную корреляцию с геном POSTN ( $rS=-0,58$ ,  $p=1,0 \times 10^{-14}$ ).

Выявлены положительные корреляционные связи AQP3 с генами NDRG1 ( $rS=0,76$ ,  $p=3,7 \times 10^{-29}$ ), GNLY ( $rS=0,71$ ,  $p=8,5 \times 10^{-24}$ ).

Кроме того, высокие положительные связи установлены между генами GNLY и NDRG1 ( $rS=0,83$ ,  $p=9,3 \times 10^{-40}$ ), а также между генами HLA-DOB и MSX1 ( $rS=-0,72$ ,  $p=3,1 \times 10^{-25}$ ).

Выявленные корреляционные связи позволили выделить две группы маркеров состояния развития эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации»: уровень экспрессии которых повышается (GPX3, PAEP, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, IGFBP1, LIF, IL15, GNLY, NDRG1) и понижается (HLA-DOB и MSX1, POSTN) по мере развития эндометрия.

### 3.5 Разработка интегрального молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия в ЕЦ

Использование кластерного анализа в рутинной клинической практике мало приемлемо. В связи с этим был разработан алгоритм молекулярно-генетического стадирования образцов эндометрия на основе интегральной оценки профиля экспрессии генов.

На основании полученных данных, была разработана модель интегральной оценки степени созревания эндометрия, включающая в себя оценку уровня экспрессии мРНК генов, PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB (таблица 28).

Благодаря предложенной модели, можно дифференцировать три степени созревания эндометрия (раннерецептивный, рецептивный и позднерецептивный).

Уравнение канонической линейной дискриминантной функции имеет вид:  $KЛДФ = k_1 \cdot x_1 + k_2 \cdot x_2 + \dots + k_n \cdot x_n + const$ , где  $k_1, k_2, k_n$  – коэффициенты функции,  $const$  – константа,  $x_1, x_2, x_3$  – относительные уровни экспрессии генов или другие параметры. Значения коэффициентов и константы ( $const$ ), представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих стадии созревания эндометрия в ЕЦ

Маркер	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

Чтобы определить к какому кластеру относится полученный образец эндометрия, с помощью разработанной модели необходимо произвести вычисление значений двух классифицирующих функций, определяющих транскрипционный профиль данного образца. Полученный транскрипционный профиль сравнивается со «средним транскрипционным профилем» трех стадий созревания эндометрия.

«Средний транскрипционный профиль» каждого патологического состояния вычисляют как средние значения КЛДФ в исследованной группе образцов. Значения центроидов приведены в таблице 29.

Таблица 29 – Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия

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

Сравнение транскрипционного профиля образца со «средним транскрипционным профилем» каждого кластера позволяет вычислить расстояние от образца к каждому из центроидов. Принадлежность к группе определяется путем выявления наименьшего расстояния от образца к центроиду определенного кластера (рисунок 9). Обозначенный на рисунке образец относится к кластеру рецептивного эндометрия, т.к. имеет наименьшее расстояние к центроиду данного кластера.

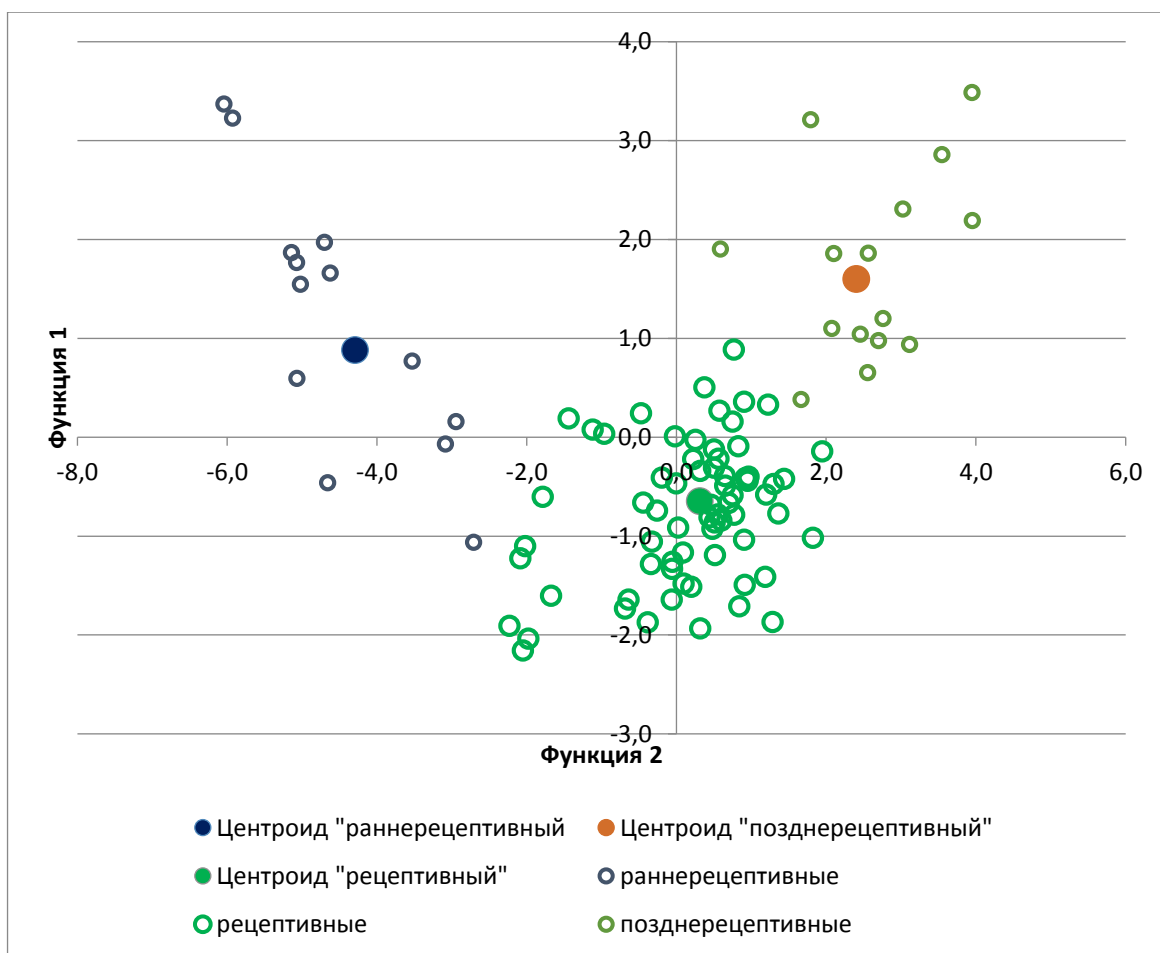


Рисунок 9 – Распределение образцов эндометрия в 1 группе (n=104)

На основании данной модели 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 9).

### **3.6 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования эндометрия**

Для выявления предикторов наступления беременности, была проведена оценка исходов программ криопереноса в соответствии с кластерным стадированием эндометрия (таблица 30). Не было выявлено статистически значимой разницы в частоте положительных результатов  $\beta$ -ХГч, клинической, внематочной беременностей и ранних репродуктивных потерь между группами.

Однако, установлены статистически значимые различия в частоте прогрессирующей беременности и частоте родов живым плодом между кластером 1 и 2. Так, в кластере 1 прогрессирующих беременностей и родов не было. В кластере 2 частота прогрессирующих беременностей составила 29,4%. Таким образом, наиболее благоприятным для наступления беременности является соответствие эндометрия кластеру 2.

Таблица 30 – 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)	р-уровень
Число и частота биохимических беременностей	6 (40%)	20 (29,4%)	4 (19%)	ns
Число и частота клинических беременностей	2 (13,3%)	20 (29,4%)	2 (9,5%)	ns
Число и частота выкидышей	2 (13,3%)	0	0	ns
Число и частота внематочных беременностей	0	0	2 (9,5%)	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	20 (29,4%)	2 (9,5%)	<b>p<sub>1-2</sub>=0,017</b>
Число и частота родов живым плодом	0	20 (29,4%)	2 (9,5%)	<b>p<sub>1-2</sub>=0,017</b>

### 3.7 Разработка интегрального молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия на фоне ЦГТ

Для группы ЦГТ был разработан другой алгоритм молекулярно-генетического стадирования образцов эндометрия на основе интегральной оценки профиля экспрессии генов.



На основании полученных данных, была разработана модель интегральной оценки степени созревания эндометрия, включающая в себя оценку уровня экспрессии мРНК генов IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLY, HLA-DOB, POSTN (таблица 31).

Благодаря предложенной модели, также можно дифференцировать три степени созревания эндометрия (ранний рецептивный, рецептивный и позднерецептивный).

Таблица 31 – 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
ln IMPA2	1,128	0,397
ln IGFBP1	1,316	0,471
ln GPX3	0,109	-0,847
ln AQP3	-0,366	-0,996
ln LIF	-0,474	0,961
ln gnly	0,844	0,321
ln HLA-DOB	-0,475	-0,382
ln POSTN	0,390	1,300
(Константа)	15,700	10,896

Значения центроидов приведены в таблице 32.

Таблица 32 – Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия

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

На основании данной модели было установлено: 6 из 36 образцов (16,7%) принадлежат к кластеру позднерецептивного эндометрия, 13 из 36 образцов (36,1%) – кластеру рецептивного эндометрия, 17 из 36 образцов (47,2%) – кластеру раннего рецептивного эндометрия (рисунок 10).

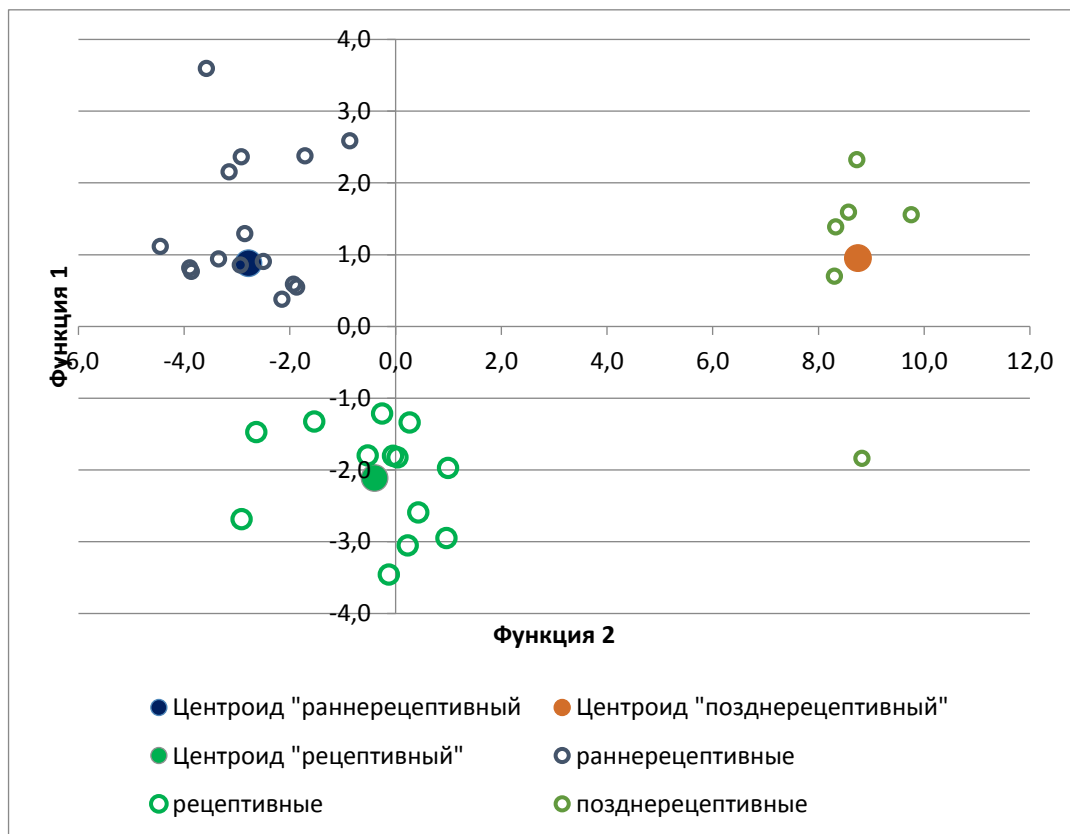


Рисунок 10 – Распределение образцов эндометрия во 2 группе (n=36)

### 3.7.1 Результаты исходов программ ВРТ в зависимости от интегрального молекулярно-генетического стадирования эндометрия

Для выявления предикторов наступления беременности была проведена оценка исходов программ криопереноса в соответствии с кластерным стадированием эндометрия (таблица 33). Не было выявлено статистически значимой разницы в частоте положительных результатов В-ХГч, клинической, внематочной беременностей и ранних репродуктивных потерь между группами.

Однако, в частоте прогрессирующей беременности и частоте родов живым плодом между кластером 1 и 2 установлены статистически значимые различия. Так

в кластере 1 прогрессирующих беременностей и родов не было. В кластере 2 частота прогрессирующих беременностей составила 46,2%. Таким образом, наиболее благоприятным для наступления беременности является соответствие эндометрия кластеру 2.

Таблица 33 – 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	p-уровень
Число и частота биохимических беременностей	6 (35,3%)	6 (46,2%)	0	ns
Число и частота клинических беременностей	0	6 (46,2%)	0	ns
Число и частота выкидышей	0	0	0	ns
Число и частота внематочных беременностей	0	0	0	ns
Число и частота прогрессирующих беременностей	0	6 (46,2%)	0	<b>p<sub>1-2</sub>=0,003</b>
Число и частота родов живым плодом	0	6 (46,2%)	0	<b>p<sub>1-2</sub>=0,003</b>

Учитывая небольшое количество данных, особенно для группы пациенток на фоне ЦГТ, разработанные модели требуют дальнейшего уточнения на большей выборке.

Вероятно, адгезия бластоцисты хорошо происходит и в ранний рецептивный период развития эндометрия, однако ввиду недостаточного молекулярного созревания полноценной инвазии трофобласта не происходит, в результате чего беременность не пролонгируется до клинических стадий. Таким образом, для

успешной пролонгации беременности и индукции плацентации необходимы более «продвинутые» стадии созревания эндометрия.

### **Резюме по молекулярно-генетическому исследованию**

После анализа литературных данных и проведенного биоинформатического анализа имеющихся в свободном доступе результатов исследования транскрипционных профилей генов в эндометрии в течение менструального цикла, выполненных на микроматрицах высок ой плотности, были выбраны 15 генов для проведения дальнейшего молекулярно-генетического исследования: GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, IGFBP1, IL15, GNLV, NDRG1 методом ОТ-ПЦР.

В результате проведенного кластерного анализа, были выделены 4 кластера образцов: А, В, С и D.

Так как эндометрий подвергается секреторной трансформации под действием прогестерона, предложена гипотеза созревания эндометрия на основании увеличения уровня экспрессии гена PAEP, который контролируется прогестероном: сначала уровень экспрессии генов соответствует кластеру А (n=20), по мере созревания переходит в кластер С (n=36), далее в кластер В (n=31) и завершающим этапом - кластер D (n=17) в ЕЦ и от кластера А (n=14), далее к кластеру С ( n=10), после чего переходит в кластер В(n=6) и кластер D (n=6) в группе ЦГТ.

Кластер А в обеих группах характеризовался повышенной экспрессией мРНК генов POSTN, HLA-DOB, MSX1 и низкой экспрессией мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLV, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN. Кластеры В и С характеризовались промежуточными уровнями экспрессии исследованных генов. Кластер D характеризовался высокой экспрессией мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLV, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN и низкой экспрессией генов POSTN, HLA-DOB, MSX1.

После сопоставления кластеров в ЕЦ с гистологическим исследованием оказалось, что образцы кластера А в равной степени соответствовали ранней и

средней стадиям фазы секреции (50%), в то же время более 80 % образцов кластеров В и D соответствовали средней стадии секреции. Образцы кластера С в 66,7% случаев соотносились со средней стадией фазы секреции. В цикле ЦГТ все образцы кластера А и 80% образцов кластера С соответствовали ранней стадии фазы секреции (14 и 10 образцов). В 66,7% биоптатов кластера В и 100% образцов кластера D была определена средняя стадия фазы секреции (4 и 6 образцов). То есть предложенное кластерное распределение созревания эндометрия достаточно неплохо отражало секреторную трансформацию эндометрия в соответствии с гистологическим исследованием.

Для определения наиболее благоприятного времени для переноса эмбриона были проанализированы исходы программ ВРТ в соответствии с выделенными кластерами образцов эндометрия. Не было установлено статистически значимых различий в частоте положительных результатов В-ХГч. Однако, по частоте прогрессирующих беременностей и родов живым плодом исходы были лучше при соответствии транскрипционного профиля кластерам В и С как в ЕЦ, так и в группе ЦГТ, то есть, вероятно, переходному периоду между ранней и средней стадиями секреторной фазы гистологически верифицированного эндометрия, что позволило сделать предположение о соответствии «окна имплантации» этому периоду. Частота прогрессирующих беременностей и родов живым плодом в кластерах В и С была выше и составила соответственно 29,0% ( $p_{a-b}=0,008$ ), и 27,8% ( $p_{a-c}=0,01$ ) по сравнению с кластером А в ЕЦ (9 и 10 беременностей) и 66,7% ( $p_{a-b}=0,003$ ) и 27,8% ( $p_{a-c}=0,2$ ) (4 и 2 беременности) у пациенток из группы ЦГТ.

Для практического применения на основе дискриминантного анализа был предложен упрощенный алгоритм определения принадлежности образцов к одной из трех фаз развития имплантационного эндометрия (ранний рецептивный, рецептивный и позднерецептивный), включающий интегральную оценку уровня экспрессии мРНК генов PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB в ЕЦ и экспрессию мРНК генов IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLY, HLA-DOB, POSTN на фоне ЦГТ. При определении принадлежности образца эндометрия к раннерецептивной стадии (кластер 1) может быть рекомендован сдвиг дня

переноса на более поздние сроки. Наиболее благоприятными для переноса являются промежуточные стадии развития имплантационного эндометрия - рецептивного (кластер 2). Умеренный прогноз имеет заключительный этап развития эндометрия- позднерецептивный (кластер 3), когда может быть рекомендован сдвиг дня переноса на более ранние сроки.

## Глава 4. Обсуждение полученных результатов

Несмотря на прогресс в области вспомогательных репродуктивных технологий, отсутствие понимания процесса имплантации остается основным препятствием на пути к успешной беременности. Неудачи имплантации являются серьезной проблемой как для спонтанной, так и для беременности в программах [122]. Известно, что бластоциста может имплантироваться в слизистую оболочку матки в строго ограниченный период времени, когда эндометрий находится в рецептивном состоянии. В течение менструального цикла ткань эндометрия подвергается трансформации под действием стероидных гормонов яичника и ряда генетических факторов. Этот период получил название «окно имплантации» [92].

Повторные неудачные имплантации являются непреодолимым барьером на пути наступления беременности у пациенток с бесплодием. Наиболее изученным фактором в данной проблеме является эмбрион. Если генетический потенциал бластоцисты можно определить с помощью технологии ПГС, то вопрос определения готовности эндометрия к «принятию» эмбриона остается открытым.

Исследования, посвященные поискам возможных предикторов рецептивности эндометрия, ведутся уже более 60 лет [26], когда был разработан «золотой стандарт» для оценки рецептивности эндометрия. В то же время более поздние исследования поставили под сомнение точность гистологических критериев [11,90]. В поисках маркеров рецептивности эндометрия предложены различные методы изучения эндометриальной ткани такие как электронная микроскопия [89], ИГХ [6,8], изучение микрочипов ДНК [31,65,80,85,87,88,96,110], исследование мРНК [32,45,56,59]. Тем не менее, общепринятых маркеров и тест-систем, которые могли бы быть использованы в рутинной клинической практике, пока нет.

Проведенные ранее исследования предлагают гипотезу о том, что у женщин с безуспешными попытками ЭКО и ПЭ существует так называемый «сдвиг окна имплантации» [123]. Учитывая тенденцию к развитию персонифицированного подхода к пациентам, наиболее перспективным методом решения данной

проблемы является определение персонального окна имплантации с последующим переносом размороженных эмбрионов, с учетом оценки данного параметра [31,65,96,110].

Вышеизложенное легло в основу проведенного исследования, целью которого было повышение результативности программ криопереноса на основании оценки персональных особенностей транскрипционного профиля генов в период «окна фертильности».

Для решения поставленной цели было обследовано 140 женщин, которые проходили подготовку к переносу размороженных эмбрионов на базе 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.).

Проведенный анализ клинико-anamнестических данных на **первом этапе** работы показал, что женщины обеих групп были сопоставимы по возрасту ( $34 \pm 4,4$  лет и  $36 \pm 4,5$  лет), ИМТ ( $22,3 \pm 3,0$  и  $21,8 \pm 3,4$ ) и длительности бесплодия ( $3,9 \pm 2,7$  и  $5,0 \pm 2,7$  лет). Частота встречаемости соматических заболеваний не отличалась от общепопуляционной: наиболее распространенными были заболевания ЖКТ (21,2% и 16,7%), болезни молочных желез (15,4%) и мочеполовой системы (5,6%).

Каждая третья женщина из числа обследованных ранее перенесла хронические воспалительные заболевания органов малого таза, отражением которых явились хронический эндометрит (30,8% и 16,7% в 1-й и 2-й группах) и полипы эндометрия (11,5% и 27,8% соответственно), что могло негативно влиять на рецептивность эндометрия [50].

Результаты анализа частоты встречаемости оперативных вмешательств показали, что практически у каждой второй пациентки ранее были произведены гинекологические операции. Гистероскопия с РДВ по поводу патологии эндометрия была выполнена у 57,7% и 44,4% пациенток 1-й и 2-й групп соответственно.

Основным показанием для проведения оперативного лечения лапароскопическим доступом являлось наличие НГЭ. При этом в 37,5% и 41,6% случаев у пациенток 1 и 2 групп была произведена резекция яичников по поводу



эндометриоидных кист. В этой связи представляют интерес исследования, демонстрирующие негативное влияние НГЭ на рецептивность эндометрия за счет нарушения сигнального воздействия E2 и П на эндометрий [97].

Все обследованные женщины имели своевременное менархе и регулярный менструальный цикл на момент проведения обследования. Гормональный статус всех обследованных женщин указывал на сохраненный овариальный резерв и не отличался от аналогичных показателей женщин фертильной популяции.

На отсутствие беременностей в анамнезе указали 48,1% женщин 1-й группы и 38,9% пациенток 2-й группы. Для лечения вторичного бесплодия обратилось более половины обследованных женщин (51,9% и 61,1%). Анализ исходов беременностей показал, что в каждом втором – третьем случаях она характеризовалась осложненным течением, завершившимся ранними репродуктивными потерями.

100 женщин (71,4%) из 140 обследованных (47,4% в 1-й группе и 66,7% во 2-й группе) имели 2 и более безуспешные попытки ЭКО в анамнезе при переносе в полость в полость матки эмбрионов хорошего и отличного качества. Таким образом, анализ клинико-анамнестических данных, демонстрирующий наличие внутриматочной патологии в каждом втором случае с преобладанием хронического эндометрита и полипов эндометрия, а также наличие НГЭ у половины обследованных женщин и отсутствие беременности при переносе в полость матки эмбрионов хорошего и отличного качества, указывал на то, что причины неудач лечения могли быть связаны с нарушением рецептивных свойств эндометрия [17].

Согласно критериям включения, на момент вступления в исследование все пациентки имели криоконсервированные эмбрионы высокого качества. В первой группе  $3,7 \pm 2,5$  эмбрионов, во второй  $2,7 \pm 1,4$  эмбрионов.

**Второй этап** исследования включал проведение пайпель-биопсии эндометрия с целью получения биоптатов для их последующей оценки. С помощью простой рандомизации с неравномерным распределением все пациентки были разделены на 2 группы: в 1-ю группу, были включены 104 женщины, которым пайпель-биопсия была произведена на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ, во 2-ю группу

вошли 36 пациенток, которым пайпель-биопсия была проведена на 6 день назначения прогестерона на фоне ЦГТ.

На третьем этапе был проведен анализ образцов эндометрия, полученных в период «окна фертильности» с помощью гистологического и молекулярно-генетического исследования с последующим проведением программы переноса размороженных эмбрионов. В зависимости от результатов гистологического исследования были выделены подгруппы: 1А (n=32) и 2А (n=24) пациентки, в образцах эндометрия которых была выявлена ранняя стадия фазы секреции; в подгруппы 1Б (n=72) и 2Б (n=12) были включены женщины, образцы эндометрия которых соответствовали средней стадии фазы секреции.

Перед проведением молекулярно-генетического исследования был произведен биоинформатический анализ данных литературы для выбора наиболее перспективных генов, участвующих в процессах имплантации.

Четвертый этап исследования заключался в анализе диагностической ценности выявленных молекулярно-генетических особенностей созревания эндометрия в зависимости от исходов программы криопереноса, а также разработка интегрального молекулярно-генетического критерия степени зрелости эндометрия.

Приведённые ранее исследования показали, что перенос размороженных эмбрионов повышает количество положительных результатов программ ВРТ [54,55]. Так как данные литературы свидетельствуют о негативном влиянии стимуляции суперовуляции на созревание эндометрия, в настоящее время существует тенденция к витрификации blastocyst и переносу эмбрионов в криоциклах для синхронизации развития эмбриона и эндометрия) [4,58]. В литературе продолжается обсуждение, поиск и прогностическая ценность различных молекулярно-генетических предикторов рецептивного эндометрия для улучшения результативности программ криопереноса [31,65,85,87,88,96].

Концепция данного исследования также была направлена на поиск возможных методов определения персональных предикторов успешной

имплантации, с помощью оценки изменения экспрессии генов в циклах ЕЦ и ЦГТ, с последующим переносом размороженных эмбрионов.

В день забора пайпель-биопсии эндометрия были выявлены статистически достоверные отличия в уровне Е2. Так у женщин 2-й группы (получающих ЦГТ) он составил  $1174,1 \pm 451,3$  пмоль/л, что было практически в 2 раза выше по сравнению с аналогичным показателем женщин 1-й группы  $586,8 \pm 300,0$  пмоль/л ( $p < 0,05$ ). Концентрация П составила  $38,9 \pm 16,7$  и  $39,4 \pm 16,0$  нмоль/л и не различалась между группами.

Полученные результаты вполне объяснимы и сопоставимы с данными литературы, если учитывать тот факт, что пациентки 2-й группы проводили гормональную подготовку эндометрия [40]. Интересно, что уровень прогестерона в сыворотке крови оставался примерно одинаковым в обеих группах. Считается, что морфологические изменения в эндометрии напрямую связаны с уровнем Е2 и П, и что высокие или низкие концентрации этих стероидов во время лютеиновой фазы могут негативно сказаться на процессе секреторной трансформации эндометрия. В ряде работ, проведенных ранее, показано, что суперфизиологические значения уровня Е2 в циклах стимуляции суперовуляции способствуют ускоренному созреванию эндометрия [4]. В данном исследовании в группе, в которой были установлен повышенный уровень Е2 на фоне ЦГТ в большинстве случаев диагностирована ранняя стадия фазы секреции (66,7%). Вероятно, что Е2, вводимый экзогенно, имеет меньшую тропность к рецепторам Е2 в эндометрии, в результате чего не происходит ускоренного созревания эндометрия.

В исследовании Groll J.M. (2009г.) были получены противоположные данные о том, что уровень Е2 и П не влияет на гистологическое развитие эндометрия у фертильных женщин. Кроме того, авторы установили, что помимо гистологического развития, не происходит изменения уровня  $\beta 3$  интегрин и остеопонтина, а также отношения рецепторов Е2 и П (ER-  $\alpha$ , PR-A и PR-B) в условиях повышенного Е2. Однако, нужно учитывать, что женщины с бесплодием и повторными неудачными имплантациями могут иметь нарушения в сигнальном

взаимодействии в эндометрии, что может влиять на отсутствие эффекта от проводимого протокола ЭКО и ПЭ [40].

Интересные результаты были получены в экспериментальном исследовании, посвященном изучению влияния различных уровней П у фертильных женщин на гистологические и молекулярно-генетические изменения в эндометрии. Сравнивали 4 группы женщин: 1 группа (n=6), получали 2,5 мг П внутримышечно, 2 группа (n= 6) – 5,0мг, 3 группа (n=12) – 10,0 мг и 4 группа (n=12) – 40 мг. Все участницы получали препарат Е2 в трансдермальной форме. 10 женщин, не получавших гормональную поддержку, вошли в группу контроля. Эндометрий был получен на 10-й день после назначения П или после пика ЛГ в моче в ЕЦ. Авторы делают заключение о том, что более высокие дозы П ( $\geq 5$  мг / день) не приводили к изменению в гистологическом исследовании, однако были выявлены изменения в экспрессии генов. Отставание в развитии эндометрия на 3 дня по данным гистологического исследования было установлено в группе, где применялся П в дозировке 2,5мг/день, т.е. в условиях дефицита прогестерона. В данном исследовании, несмотря на нормальное содержание П в день забора пайпель-биопсии эндометрия, установлено отставание в развитии эндометрия в 66,7% случаев на фоне применения ЦГТ. Таким образом, еще раз подтверждается теория о низком прогностическом критерии датирования эндометрия только с помощью гистологического исследования, в отличие от молекулярно-генетического, которое показало значительные изменения в уровне экспрессии в зависимости от уровня П [38].

Ультразвуковое исследование органов малого таза, проведенное в первую фазу менструального цикла, не выявило достоверных различий в размерах тела матки и яичников. При оценке толщины эндометрия в день забора пайпель-биопсии эндометрия установлено, что все пациентки имели оптимальную величину М-ЭХО, что в среднем составило  $9,0 \pm 1,6$  мм у пациенток 1 группы и  $8,9 \pm 1,5$  мм у пациенток 2 группы. Полученные данные не показали статистически достоверных отличий.

По результатам гистологического исследования биоптатов эндометрия установлено значимое увеличение частоты выявления эндометрия ранней стадии фазы секреции в цикле ЦГТ (2 группа женщин) по сравнению с результатами женщин 1-й группы в ЕЦ (66,7% против 30,8%,  $p < 0,05$ ), в то время как эндометрий средней стадии фазы секреции в 2 раза чаще был выявлен у женщин 1-й группы по сравнению с аналогичными данными во 2-й группе (69,2% против 33,3%,  $p < 0,05$ ).

Представляют интерес похожие данные, полученные в работе Масловой М.Г. (2015г.), в которой оценивались биоптаты эндометрия у 133 женщин с бесплодием в ЕЦ на 7-8 день пика ЛГ перед проведением «свежего» цикла ЭКО. Автор установила, что у 43,6% женщин была диагностирована ранняя стадия фазы секреции. Из числа этих женщин беременность в последующем цикле ЭКО наступила в 44,8% случаев, в то время как при выявлении средней стадии фазы секреции беременностью завершили 33,8% циклов ЭКО, однако разница между группами не была достоверной. Автор делает вывод о том, что частота наступления беременности была выше в группе с диагностированной ранней стадией фазы секреции, так как стимуляция суперовуляции способствует более быстрому созреванию эндометрия под действием высокого уровня эстрадиола в программах ЭКО, по сравнению с ЕЦ. В результате чего, вероятно, и произошла синхронизация развития эндометрия и эмбриона в «свежем» цикле. В то же время, при исследовании биоптатов эндометрия, полученных от 23 пациенток после проведения ЦГТ в течение двух циклов перед программой ЭКО ранняя стадия фазы секреции была выявлена в 52,2%, средняя – в 47,8% образцов. При анализе исходов лечения оказалось, что частота наступления беременности была выше среди пациенток с диагностированной ранней стадией фазы секреции и составила 41,7% по сравнению с 36,4% [2].

Несмотря на то, что изучение гистологического стадирования эндометрия ведется уже с 1950 года [26], вопрос о диагностической ценности гистологического исследования эндометрия у женщин с бесплодием остается открытым по сей день.

Так, изучение образцов эндометрия у здоровых женщин ( $n=18$ ) первоначально в ЕЦ, а затем на фоне ЦГТ в период «окна имплантации»,

проведенное в США, не выявило различий в результатах гистологического исследования эндометрия между ЕЦ и циклом с ЦГТ, согласно которым была выявлена средняя стадия фазы секреции. Авторы делают вывод о том, что гистологическое заключение не меняется у фертильных женщин, несмотря на использование гормональных препаратов [40].

Далее мы проанализировали исходы криопротоколов в зависимости от данных гистологического исследования и подготовки эндометрия. Частота биохимической, клинической и прогрессирующей беременности в 2 раза чаще выявлена у пациенток с ранней стадией фазы секреции, как в ЕЦ (43,8%, 31,3%, 31,3%), так и в цикле ЦГТ (33,3%, 16,6%, 16,6%) по сравнению с аналогичными показателями при наличии средней стадии фазы секреции. Однако, не было выявлено значимых различий, вероятно, ввиду малого количества наблюдений. Также прослеживалась тенденция к увеличению числа родов живым плодом при ПЭ у пациенток с диагностированной ранней стадией фазы секреции в ЕЦ (31,3%), в то время как для средней стадии фазы секреции этот показатель составил 16,6%. Частоты наступления клинической беременности у женщин на фоне ЦГТ были сопоставимы и составили 16,6% и 16,7% в подгруппах 2А и 2Б.

Полученные нами данные, позволяют предположить, что, вероятно, период наивысшей восприимчивости эндометрия не всегда совпадает с гистологическими критериями средней стадии фазы секреции, что также было показано в сравнительном исследовании 2013 года, целью которого явилась оценка сопоставления результатов гистологического исследования эндометрия и теста ERA. Были изучены образцы эндометрия (n=49), полученные от фертильных доноров ооцитов в различные дни ЕЦ. 7 образцов исследовались с помощью теста ERA дважды с интервалом 29 и 40 месяцев между исследованиями. Оказалось, что результаты молекулярно-генетического исследования при повторном изучении эндометрия в 100% случаев были сопоставимы с первичным анализом. При гистологическом исследовании образцов 13 из 49 образцов были верифицированы неправильно, в отличие от транскриптомного анализа [105].

Аналогичные результаты были получены Evans G.E. в 2018 году. Авторы провели сравнение между циклами у одних и тех же женщин с разницей от нескольких месяцев до 3 лет маркеров пролиферации, адгезии и цитокинов в день ЛГ+2 и ЛГ+7. В результате уровень изученных паттернов генов в эндометрии, полученный в один и тот же день после пика ЛГ, не изменился. Таким образом, можно предположить, что особенности экспрессии мРНК эндометрия являются генетически-запрограммированным процессом, не связанным с морфологическими критериями. Поэтому использование только гистологического метода для определения готовности эндометрия к имплантации нецелесообразно [11,90]. Однако авторы делают акцент на том, что для более точной молекулярной диагностики «окна имплантации» необходимо изучать образцы эндометрия, полученные как в раннюю стадию фазы секреции (ЛГ+2), так и в среднюю стадию (ЛГ+7) [35].

Учитывая неоднозначные данные, полученные нами при сопоставлении исходов программ криопереноса с гистологической стадией развития эндометрия, был проведен дальнейший поиск предикторов успешной имплантации на основании молекулярно-генетического исследования.

По результатам молекулярно-генетического исследования выполнен кластерный анализ независимо от гистологической стадии развития эндометрия на основании 15 генов, которые имели отличия в уровне экспрессии в 2 и более раз в период «окна имплантации» (GPX3, PAEP, LIF, DPP4, TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, HLA-DOB, MSX1, POSTN, IGFBP1, IL15, GNLY, NDRG1).

На основании особенностей изменения уровня экспрессии генов были выделены 4 кластера: кластер А, кластер В, кластер С и кластер D.

Так как ведущую роль в развитии эндометрия играют эстрадиол и прогестерон, под действием которых, вероятно, происходит повышение гена PAEP, мы разработали метод стадирования эндометрия в соответствии с ранее описанными кластерами на основании изменения экспрессии этого гена. Таким образом были получены 4 стадии развития эндометрия от кластера к кластеру: А → С → В → D.

Для кластера А характерны в ЕЦ (n=10) в 50% образцов и на фоне ЦГТ (n=14) в 100% образцов соответствие ранней стадии фазы секреции, а также высокий уровень экспрессии мРНК генов POSTN, HLA-DOB, MSX1 и низкая экспрессия мРНК генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLV, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN. Кластеры В и С характеризовались промежуточным уровнем экспрессии мРНК изученных генов. В то же время в кластере С в ЕЦ (n=12) 33,3% и на фоне ЦГТ (n=8) 80% образцов соответствовал и ранней стадии фазы секреции, а средняя стадия фазы секреции в ЕЦ (n=24) в 67,7% и в 20% образцов на фоне ЦГТ (n=2). Кластер В ЕЦ (n=25) в 80,6% и на фоне ЦГТ (n=4) в 66,7% образцов имели морфологические признаки средней фазы стадии секреции. В преобладающем количестве образцов в кластере D была установлена средняя стадия фазы секреции: в ЕЦ (n=15) -88,2%, на фоне ЦГТ (n=6)- 100%. Молекулярно-генетические особенности экспрессии мРНК генов были прямо противоположны кластеру А; отмечались высокая экспрессия генов LIF, GPX3, AQP3, NDRG1, GNLV, IMPA2, PAEP, IGFBP1, HABP2, DPP4 и TAGLN и низкая экспрессия генов POSTN, HLA-DOB, MSX1.

Таким образом, можно условно разделить полученные кластеры на три рецептивных состояния эндометрия: пререцептивный (кластер А), рецептивный (кластеры В и С) и поздне-рецептивный (кластер D). Наша классификация была подтверждена оценкой исходов криопротокотов. При анализе исходов криопротокотов оказалось, что в частоте положительных результатов β-ХГч статистически достоверные различия получены не были. Так, в кластере А был получен положительный уровень β-ХГч в ЕЦ в 40% (n=8) на фоне ЦГТ в 28,6% (n=8), однако, число клинических беременностей в ЕЦ составило 4 случая, которые в последующем прервались на раннем сроке. На фоне же ЦГТ этот показатель был равен нулю. Оценка исходов в кластере D имела похожую тенденцию: число положительных β-ХГч в ЕЦ составило 23,5% (n=4) на фоне ЦГТ 33,3% (n=2). Показатель клинической беременности на фоне ЦГТ равнялся нулю, в ЕЦ – трем. Число прогрессирующих беременностей и родов в группе ЕЦ так же составило три случая.



Можно сделать предположение о недостаточной инвазии цитотрофобласта в слизистую оболочку матки, возможно, ввиду его «недозревшего» или «перезревшего» состояния. Вероятно, что в данном случае коррекция дня переноса эмбрионов с учетом статуса эндометрия может снизить частоту ранних репродуктивных потерь.

Частота прогрессирующих беременностей и родов была выше у пациенток, эндометрий которых соответствовал кластерам В и С, то есть переходному периоду между ранней и средней стадиями фазы секреции, и соответствовала 29% и 27,8% по сравнению с кластером А ( $p_{a-b}=0,008$ ,  $p_{a-c}=0,01$ ) в группе ЕЦ и 66,8% и 20% в группе ЦГТ. Однако, статистически значимые различия были установлены только между кластерами В, А и D ( $p_{a-b}=0,003$ ,  $p_{b-d}=0,030$ ). Таким образом, можно сделать предположение, что наиболее благоприятным для имплантации и пролонгирования беременности является развитие эндометрия, соответствующее кластерам В и С, то есть на стыке ранней и средней стадий фазы секреции.

В 2017 году группа испанских ученых провела сравнительное исследование, направленное на установление взаимосвязи между транскрипционным профилем рецептивности эндометрия и частотой живорождений и биохимических беременностей. В результате проведенного исследования 321 образца эндометрия, полученных в предполагаемое «окно имплантации», рецептивный статус был установлен в 228 случаях. Также в исследовании полученные данные рецептивного состояния эндометрия были классифицированы на подгруппы: на позднюю пререцептивную ( $n=79$ ), оптимальную рецептивную ( $n=132$ ), позднюю рецептивную ( $n=9$ ) и пострецептивную ( $n=18$ ). Оценка исходов лечения показала, что частота положительного теста на беременность составила: 65,8% и 56,8% в позднюю рецептивную и оптимально рецептивную стадии и 66,6% и 37,5% в позднюю рецептивную и пострецептивную. Частота продолжающихся беременностей составила 76,9% и 80% в первых двух группах, а в стадиях поздней рецептивности и пострецептивности 33,3% и 100%. В тоже время частота биохимических беременностей в первых двух группах была значительно ниже по сравнению со стадией поздней рецептивности и составила 7,7%, 6,6% и 50% ( $p$

<0,05). Эти данные подтверждают теорию о важности определения статуса готовности эндометрия у пациенток с бесплодием для повышения результативности программ ВРТ [124].

В ранее проведенных работах, как правило, сравнивались образцы, полученные в разные фазы цикла [65,87,88,96]. Так, в работе Díaz-Gimeno P. (2013г.) при исследовании образцов эндометрия, полученных на ЛГ+7 (n = 40), ЛГ+1-5 (n = 13), а также с 8-12 день менструального цикла (n = 15) у фертильных пациенток, проведенный кластерный анализ позволил четко выделить 3 группы образцов: пререцептивные, пострецептивные (n = 28) и рецептивные (n = 40) на основании изменения уровня экспрессии 238 генов [105].

G.E. Evans (2012г.) получили четкое разделение на 2 стадии (нерецептивную и рецептивную) при сравнении образцов полученных на день ЛГ+2 и ЛГ+7 при гистологическом и молекулярно-генетическом исследованиях. Однако, авторы делают акцент на том, что «окно имплантации» не для всех женщин должно соответствовать 7 дню после овуляции, так как этот показатель рассчитан для женщин с 28-дневным циклом. Соответственно, если женщина имеет цикл более 28 дней, то и «окно фертильности» у нее может сдвигаться на более поздний период [57].

Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что, несмотря на то что в нашем исследовании все образцы были получены в период предполагаемого «окна имплантации», особенности экспрессии генов позволили нам разделить образцы на 4 кластерные стадии развития эндометрия. К раннерецептивному и позднерецептивному периоду были отнесены образцы кластеров А и D, к рецептивному могут быть отнесены образцы кластеров С и В. Очевидно, что для подтверждения предложенной нами модели стадирования эндометрия необходимо включить большее количество женщин. В то же время, оценка исходов криопротокола свидетельствует о позитивной тенденции в определении наилучшего дня для переноса эмбрионов.

В результате корреляционного анализа установлена прямая корреляционная связь между повышением уровня экспрессией мРНК генов GPX3, PAEP, DPP4,

TAGLN, HABP2, IMPA2, AQP3, IGFBP1, LIF, IL15, GNLV, NDRG1 и обратная корреляционная связь вышеуказанных генов с экспрессией мРНК генов HLA-DOB и MSX1, POSTN.

Полученные нами данные согласуются с работой Díaz-Gimeno P.(2013г), на основании которой было получено увеличение экспрессии генов в период «окна имплантации» GPX3 в 35,5раз, PAEP в 31,4 раза, LIF в 15 раз, DPP4 в 7,7раз, TAGLN в 5,7 раз, IGFBP1 в 5,4 раза, AQP3 в 4,6 раз, GNLV в 4,5 раз, HABP2 в 4,1раз, IMPA2 в 3,9 раз, IL15 в 3 раза при одновременном снижении уровня мРНК HLA-DOB в 11,1 раз, POSTN в 6 раз, MSX1 в 3,3 раза [105].

Похожие результаты были получены в работе Talbi S. (2006г). При сравнении изменения уровня экспрессии генов между стадиями ранней и средней стадиями фазы секреции установлены статистически значимые повышения уровня генов: PAEP в 43,6 раз, GPX3 в 40,2 раза, DPP4 в 11,2 раза, LIF в 3,8 раз, IL15 в 3,9 раз, IL6 в 3,6 раз, IGFBP1 в 2,5 раз, AQP3 в 2,3 раза; - и понижение экспрессии следующих гена MSX1 в 0,3 раз. В то же время, при сравнении среднесекреторной фазы эндометрия с позднесекреторной, достоверно повышалась экспрессия генов: MMP7 в 5 раз, IGFBP1 в 22,9 раз; снижение уровня мРНК отмечено в генах IGF1 в 0,29 раз, HOXA10 в 0,56 раз, HOXA11 в 0,33 раза [88].

Altmäe S. и соавт. (2012г.) было проведено интересное исследование, направленное на выявление белок-белковых взаимодействий с целью выявления молекулярных сетей между имплантационным эндометрием и эмбрионом. В результате получены значимые изменения в уровне экспрессии мРНК генов APOD, CLDN4, C1R, CYP2C9, DKK1, DPP4, EDNRB, GADD45A, GPX3, HABP2, ID4, IL15, LIF, LMOD1, MAOA, MAP3K5, MTNR1A, PAEP, SERPING1 и SPP1 и гены с пониженной регуляцией, такие как CCNB1, MSX1, MSX2 и OLFM1. Авторы делают вывод о важной роли выявленных генов в начале процесса имплантации между бластоцистой и рецептивным эндометрием [101].

Так как кластерный анализ не используется в рутинной практике, следующим этапом нашей работы стала разработка интегрального молекулярно-генетического критерия 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, GNLY, HLA-DOB, POSTN на фоне ЦГТ. С помощью предложенной модели можно определить степень развития эндометрия.

На основании данной модели были выделены три стадии развития эндометрия: раннерецептивная, рецептивная и позднерецептивная. Таким образом выявлена молекулярно-генетическая гетерогенность изменений эндометрия в период «окна имплантации». Полученные данные согласуются с данными работы Р. Díaz-Gimeno (2017г.), в которой в результате кластерного анализа авторы выделили 4 стадии транскриптомных групп «окна фертильности»: ранняя пререцептивная (EPR), поздняя пререцептивная (LPR), поздняя рецептивная (LR) и рецептивная (RR) [124].

Для выявления наиболее благоприятного периода для наступления и пролонгирования беременности был проведен анализ исходов криопротоколов в соответствии с разработанными стадиями развития эндометрия.

Установлено, что у женщин, эндометрий которых соответствовал раннерецептивному состоянию, частота положительного теста на беременность составила 40% в ЕЦ и 35,3% в группе ЦГТ. В то же время, не выявлено ни одного случая прогрессирующих беременностей и родов, что вероятно может свидетельствовать о том, что молекулярно-генетическая неполноценность эндометрия способствовала нарушению процессов инвазии цитотрофобласта, несмотря на успешную попытку адгезии. Безусловно, генетический потенциал эмбриона играет немаловажную роль в процессе наступления беременности, однако по данным литературы, частота наступления беременности (36,6% против 21,4%,  $p = 0,416$ ), клинических беременностей (53,5% против 33,3%,  $p = 0,846$ ) и родов живым плодом (47% против 27,9%,  $p = 0,188$ ) у пациенток с RIF не имели значимых отличий между пациентками, которые проводили ПГС ( $n=43$ ) и теми, которые отказались проводить ПГС ( $n=45$ ). В связи с этим можно предположить, что далеко не все эмбрионы, перенесенные пациенткам, имели хромосомные аномалии [95].

Для пациенток с установленной рецептивной стадией развития эндометрия была выявлена частота наступления беременности равная 29,4% в группе ЕЦ и составила 46,2% в группе ЦГТ. При этом все беременности закончились родами живым плодом. Это и послужило выбором данного периода как наилучшего для переноса размороженных эмбрионов.

В группе с позднерецептивным эндометрием частота положительного  $\beta$ -ХГч составила 19% в группе ЕЦ, во второй группе не выявлено ни одного положительного результата. В то же время в 9,5% случаях беременность закончилась родами живым плодом и внематочной беременностью, что косвенно может свидетельствовать о том, что эндометрий в этой стадии развития опережает развитие эмбриона. Наши данные не согласуются Р. Díaz-Gimeno (2017г.), который установил, что в пострецептивном периоде эндометрия повышается частота встречаемости биохимической беременности по сравнению с рецептивным периодом [124].

Анализируя вышеизложенное, мы пришли к выводу, что наиболее благоприятным предиктором для наступления и пролонгирования беременности является соответствие эндометрия переходному кластерному периоду развития эндометрия (рецептивный). Возможно, «окно имплантации» находится на стыке двух фаз созревания эндометрия ранней стадии фазы секреции и средней стадии фазы секреции. С помощью гистологического метода исследования определить этот период не представляется возможным. Поэтому изучение транскрипционного профиля созревания эндометрия могло бы сыграть ведущую роль в установлении этого периода, что согласуется с данными литературы [105].

Таким образом, вопросы синхронизации развития эмбриона и эндометрия на сегодняшний день занимают одну из лидирующих позиций в репродуктивной медицине. Результаты проведенного исследования позволили выделить четыре молекулярно-генетические стадии созревания эндометрия и предложить гипотезу о возможном изменении концепции традиционного определения «окна имплантации» в среднюю фазу секреторной трансформации эндометрия, на более ранний период, соответствующий стыку двух фаз эндометрия (ранней стадии фазы

секреции и средней стадии фазы секреции). Однако, учитывая небольшой объем выборки для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

На основании полученных данных нами разработан алгоритм подготовки пациенток с безуспешными попытками ЭКО к проведению программы переноса размороженных эмбрионов (рисунок 11).

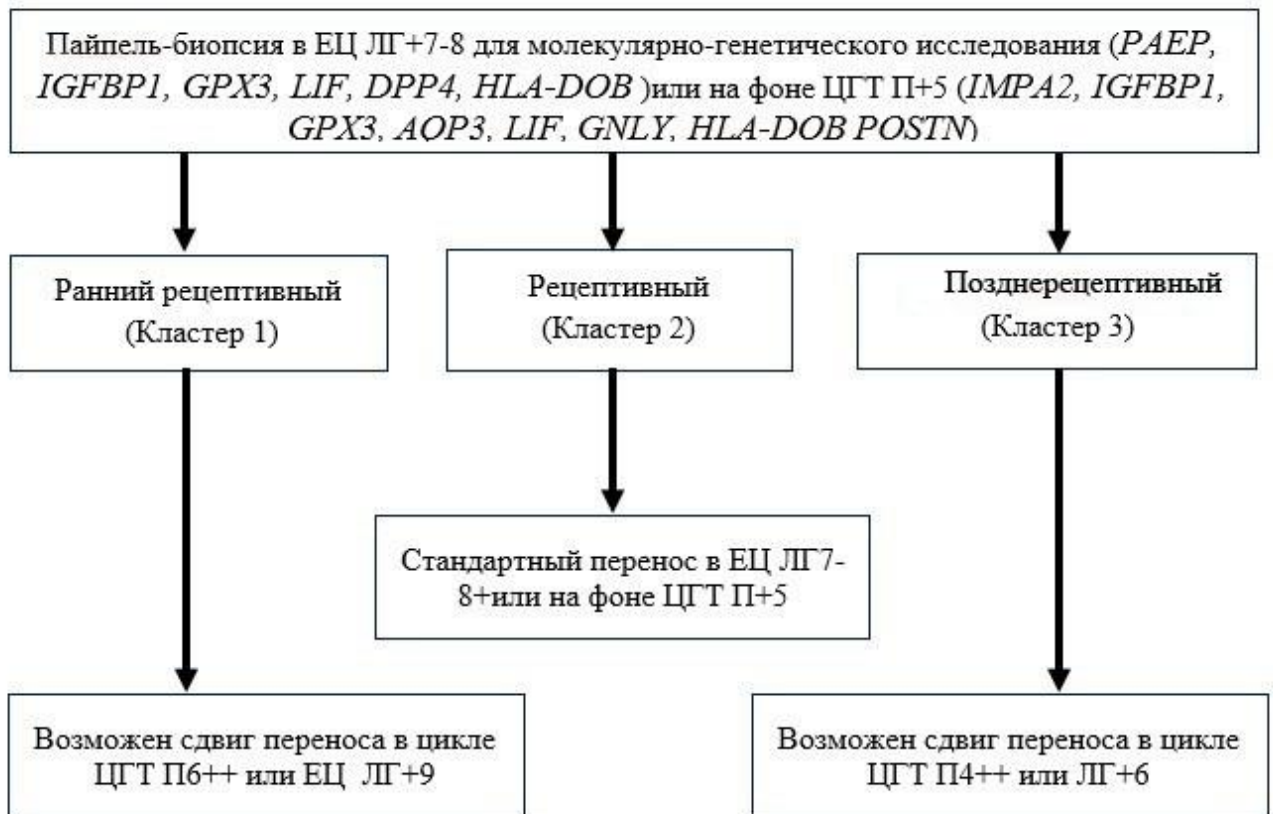


Рисунок 11 – Алгоритм ведения пациенток, готовящихся к переносу размороженных эмбрионов

Согласно представленному алгоритму, в цикле перед переносом размороженных эмбрионов рекомендуется производить пайпель-биопсию эндометрия с последующим молекулярно-генетическим исследованием мРНК генов: PAEP, IGFBP1, GPX3, LIF, DPP4, HLA-DOB на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ, либо экспрессию мРНК генов IMPA2, IGFBP1, GPX3, AQP3, LIF, GNLY, HLA-DOB, POSTN на П+5 на фоне ЦГТ.

Если после проведения интегральной оценки эндометрия установлена его принадлежность к рецептивному периоду, рекомендуется перенос в стандартном протоколе на 7-8 день после пика ЛГ в ЕЦ или на П+5 на фоне ЦГТ, что соответствует наиболее благоприятному периоду развития эндометрия.

При получении результата исследования, соответствующего позднерецептивному, можно рекомендовать сдвиг дня переноса на 1 день раньше - П+4 или ЛГ +6, так как, вероятно наличие «перезревшего» эндометрия.

Если же установлена принадлежность биоптата к раннерецептивному периоду, то в этом случае рекомендуется сдвиг дня переноса на 1 день позже П+6 или ЛГ+9, так как возможно эндометрий «не созрел» для имплантации.

## Выводы

1. Анамнестическими особенностями женщин с повторными неудачами имплантации являются: НГЭ (28,6%), хронические воспалительные заболевания органов малого таза в числе которых превалируют хронический эндометрит (27,1%) и полип эндометрия (15,7%), а также неудачные беременности, завершившиеся ранними репродуктивными потерями (85,8% случаев) у пациенток с вторичным бесплодием. Клинико-лабораторное обследование данной когорты женщин не выявило отличительных особенностей от общей популяции.

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 (кластер1), рецептивный (кластер2), 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 клинической беременности (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 А–Г).

3. При установлении соответствия образца эндометрия раннерецептивному статусу целесообразно сдвинуть ПЭ размороженного эмбриона на один день позже: на фоне ЦГТ день П+6; на фоне 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 размороженного эмбриона на 1 день раньше: в цикле ЦГТ – день П+4; в ЕЦ – день ЛГ+6.

## Список сокращений

АМГ – антимюллеров гормон

антГнРГ – антагонисты гонадотропин – рилизинг гормона

ВЗОТМ – воспалительные заболевания органов малого таза

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

Е2 – эстрадиол

ЕЦ – естественный цикл

ИГХ – иммуногистохимия

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ЛГ – лютеинизирующий гормон

Me – медиана

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

ПГТ – предимплантационное генетическое тестирование

П – прогестерон

ПЭ – перенос эмбриона

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

РДВ – раздельное диагностическое выскабливание

ТВП – трансвагинальная пункция

ТПБ – трубно-перитонеальное бесплодие

УЗИ – ультразвуковое исследование

УПМ – условно-патогенная микрофлора

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЦГТ – циклическая гормональная терапия

ЦС – цервикальная слизь

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

AQP3 – аквапорин 3  
DPP4 – дипептилпептидаза 4  
ER – эстрогеновый рецептор  
ERA – тест эндометриальной рецептивности  
G-CSF – гранулоцит стимулирующий фактор роста  
GNLY – гранулолизин  
GPX3 – глутатионпироксидаза 3  
HABP2 – гиалуронан-связывающий протеин 2  
HLA-DOB – главный комплекс гистосовместимости класс II DO бета  
IGFBP1 – инсулиноподобный фактор роста, связывающий протеин 1  
IL – интерлейкин  
IMPA2 – инозитолмонофосфатаза 2  
IVM – (In Vitro Maturation) созревание яйцеклеток вне организма  
LIF – лейкемия–ингибирующий фактор  
LIF-R – рецептор LIF  
MSX1 – гомеобокса 7  
NDRG1 -N-мус – регулируемый ген  
PAEP – прогестаген-ассоциированный эндометриальный протеин  
POSTN – периостин  
PR – прогестероновый рецептор  
RIF – (Recurrent implantation failure) повторные неудачные имплантации  
TAGLN – трасгелин

## Список литературы

1. Клинические исходы программ ЭКО с ооцитами донора при использовании технологии эндометриального скретчинга у пациенток с умеренным и экстремальным отставанием развития эндометрия / К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, А.А. Федоров, [и др.] // Медицинский алфавит. – 2017. – Т. 1., № 3. – С.46–50.
2. Маслова, М.А. Подготовка пациенток с бесплодием к программе экстракорпорального оплодотворения с учетом молекулярно–генетических маркеров в эндометрии: Автореф. дис.канд. мед. наук. – М., 2015. – 23 С.
3. Материалы РАРЧ 2016г // Проблемы репродукции. – 2017. –Т. 23, №5. - С. 8 – 22.
4. Морфофункциональное состояние эндометрия в стимулированных циклах программы экстракорпорального оплодотворения / Е. В. Митюрин, С. Г. Перминова, Т. А. Демура [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 11. - С. 80-87.
5. Морфологические и молекулярно-биологические признаки нарушения рецептивности эндометрия при бесплодии женщин, страдающих наружным генитальным эндометриозом / Н.Б. Парамонова, Е.А. Коган, А.В. Колотовкина [и др.] // Архив патологии. – 2018. - № 80-3. – С. 11-18.
6. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе/ М.М. Левиашвили, Т.А. Демура, Н.Г. Мишиева [и др.] //Акушерство и гинекология. – 2012. - №4-1. -С. 65-69.
7. Перспективы применения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы крови у пациенток с повторными неэффективными попытками имплантации/ Д.М. Обидняк, А.М. Гзгзян, Д.А. Ниаури [и др.] // Проблемы репродукции. - 2017. - Т. 23, № 5. - С. 84-88.

8. Принципы индивидуальной гормональной подготовки эндометрия у пациенток с неэффективными попытками ЭКО / Е.В. Дюжева, Коган Е.А., Калинина Е.А. [и др.] //Акушерство и Гинекология. – 2011. - №7-2. - С. 39-45.
9. Сеидова, Л.А. Исследование маркеров рецептивности эндометрия в цервикальной слизи как неинвазивный метод оценки имплантационного потенциала / Л.А. Сеидова, С.Г. Перминова, Т.А. Демур // Акушерство и гинекология. -2015. -№5. - С .74-79.
10. Эффективность внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Т. С. Амян, С. Г. Перминова, Л. В. Кречетова [и др.] // Гинекология. – 2018. - № 2. - С. 28-33.
11. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women/ M.J. Murray[et al.] // Fertility Sterility. – 2004. - Vol.81. - P.333–343.
12. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature/ P. Díaz-Gimeno [et al.] // Fertility Sterility. – 2011. - Vol. 95, N1. - P. 50-60.
13. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions/ C. Abiges - Rizo [et al.] // Journal of Cell Science. -2009. -Vol.122. - P.3037–3049.
14. Array Express – functional genomics data [electronic resource] / R. Apweiler [et al.] - режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>
15. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)/ C. De Geyter [et al.] // Human Reproduction. - 2018. - Vol.33, N 9. - P.1586-1601.

16. Assessing infertility stress: re-examining the factor structure of the Fertility Problem Inventory/ M. Moura-Ramos [et al.] // Human Reproduction. - 2012. - Vol. 27. - P. 496–505.
17. Asynchronous and pathological windows of implantation: two causes of recurrent implantation failure / P. Sebastian-Leon [et al.] // Human Reproduction. - 2018. - Vol.33, N4. - P. 626-635.
18. Autologous Intrauterine Platelet-Rich Plasma Instillation for Suboptimal Endometrium in Frozen Embryo Transfer Cycles: A Pilot Study/ S.R. Tandulwadkar [et al.] // Journal of Human Reproductive Sciences. – 2017. -Vol.10, N3. – P .208-212.
19. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization / Y. Chang [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Medicine. -2015. - Vol.8, N1. - P.1286-1290.
20. Chromosomal assignment and genomic structure of II15 / D.M. Anderson [et al.] // Genomics. – 1995.Feb 10. - Vol. 25, N3. – P.701-706.
21. Clinical validation of pinopode as a marker of endometrial receptivity: a randomized controlled trial / Z. Qiong [et al.] // Fertility Sterility. -2017. - Vol.108, N3. - P. 513-517.
22. Conditional deletion of MSX homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity / T. Daikoku [et al.] // Developmental Cell. – 2011. - Vol.21. - P.1014–1024.
23. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony / B.S. Shapiro [et al.] // Fertility Sterility. – 2008. - Vol.89, N1. - P.20–26.
24. Current Trends of Reproductive Immunology Practices in InVitro fertilization (IVF) - A First World Survey Using IVF-Worldwide.com / J. Kwak-Kim[et al.] // American journal of reproductive immunology. -2012. - Vol.69, N1.- P.12-20.

25. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure / B. Gellersen [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2014. - Vol.35, N6. - P.851-905.
26. Dating the endometrial biopsy/ R.W. Noyes [et al.] // *Fertility Sterility*. -1950. - Vol.1. - P.23–25.
27. Decidual Control of Trophoblast Invasion / Sharma S. [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. -Vol.75, N3. - P.341-350.
28. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives / B. Gellersen [et al.] // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2007. - Vol.25. - P.445–453.
29. Decrease in Expression of HOXA10 in the Decidua After Embryo Implantation Promotes Trophoblast Invasion / G. Godbole [et al.]// *Endocrinology*. - 2017. - Vol.158, N8. - P.2618-2633.
30. Determination of the transcript profile of human endometrium / J.M. Borthwick [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. -2003. - Vol.9. - P. 19–33.
31. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis / M. Enciso [et al.] // *Human Reproduction*. – 2018. -Vol.1;33(2). - P.220-228.
32. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction / C. Chan [et al.] // *Fertility Sterility*. -2013. - Vol.100, N3. - P.810-817.
33. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? / H. Fujiwara [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. - 2009. -Vol.15. - P.335–343.
34. Does endometrial injury enhances implantation in recurrent in-vitro fertilization failures? A prospective randomized control study from tertiary care center / N. Singh [et al.] // *Journal of Human Reproductive Sciences*. – 2015. - Vol.8, N4. - P.218 -223.



35. Does the endometrial gene expression of fertile women vary within and between cycles? / G.E. Evans [et al.] // *Human Reproduction*. - 2018. -Vol.33, N3. - P. 452-463.
36. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice / H. Song [et al.] // *Molecular Endocrinology*. - 2000. -Vol.14. - P.1147-1161.
37. Effect of local endometrial injury in proliferative vs. luteal phase on IVF outcomes in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization / W. Liu [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. - 2017. - Vol.22,15, N1. - P.75.
38. Effect of randomized serum progesterone concentration on secretory endometrial histologic development and gene expression / S.L. Young [et al.] // *Human Reproduction*. - 2017. - Vol.32, N9. - P.1903-1914.
39. Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: A pilot study / L. Nazari [et al.] // *International Journal of Reproductive BioMedicine (Yazd)*. - 2016. -Vol.14, N10. - P.625-628.
40. Effects of variations in serum estradiol concentrations on secretory endometrial development and function in experimentally induced cycles in normal women / J.M. Groll [et al.] // *Fertility Sterility*. -2009. - Vol.92, N6. - P.2058-2061.
41. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: A retrospective, two- centers study / Hashimoto T. [et al.] // *Reproductive Medicine and Biology*. - 2017. - Vol.16. - P.290-296.
42. Embryo Implantation: War in Times of Love / N. Ashary [et al.] // *Endocrinology*. - 2018. - Vol.159, N2. - P.1188-1198.
43. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques / C.O Nastri [et al.] // *Cochrane Database Systematic Reviews*. - 2015. - Vol. 22, N3. - P.CD009517.

44. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis / N. Potdar [et al.] // *Reproductive Bio Medicine Online*. - 2012. -Vol.25, N6. - P.561-571.
45. Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure / H. Shen [et al.] // *Chinese Medical Journal*. - 2017. - Vol. 130, N5. - P.566–573.
46. Endometrial receptivity and human embryo implantation / N.A. Rashid [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2011. - Vol.66, N 1. - P.23-30.
47. Endometrial scratching for subfertility: everyone's doing it / S. Lensen [et al.] // *Human Reproduction*. - 2016. -Vol.31, N6. - P.1241-1244.
48. Endometrial scratching for women with previous IVF failure undergoing IVF treatment / A. Gibreel [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. - 2015. -Vol.31, N4. - P.313-316.
49. Endometrial scratching prior to IVF; does it help and for whom? A systematic review and meta-analysis / N.E. Hoogenhuijze [et al.] // *Human Reproduction Open*. - 2019. - Vol. 29, N1. - hoy025.
50. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure / Y. Li [et al.] // *Fertility Sterility*. -2019. - Vol.113, N1. - P. 187-196.
51. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders / B. S. Shapiro[et al.] // *Fertility and Sterility*. -2011. -Vol. 96, N2. - P. 516 – 518.
52. Expression of the actin-associated protein transgelin (SM22) is de-creased in prostate cancer / P.D. Prasad [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2010. -Vol.339. - P.337–347.

53. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 are the same protein, the expression of which is down regulated in many cell lines / D. Lawson[et al.] // Cell Motility and the Cytoskeleton. -1997. - Vol.38. - P. 250–257.
54. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure / B.S. Shapiro [et al.] // Reproductive Bio Medicine Online. - 2014. - Vol.29, N3. - P.286–290.
55. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes / M. Roque [et al.] // Human Reproduction Update. - 2019. -Vol.25, N1. - P.2-14.
56. Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation / G.E. Evans [et al.] // Fertility Sterility. -2012. - Vol.97, N6. - P.1365-1373.
57. Gene expression confirms a potentially receptive endometrium identified by histology in fertile women / G.E. Evans [et al.] // Human Reproduction. - 2012. - Vol.27, N9. - P.2747-2755.
58. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles / S. Mirkin [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. - 2004. -Vol.89, N11. - P.5742- 5752.
59. Genome-based expression profiling as a single standardized microarray platform for the diagnosis of endometrial disorder: an array of 126-gene model / L.H. Tseng [et al.] // Fertility Sterility. -2010. - Vol. 94, N1. - P. 114-119.
60. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation / L.C Kao[et al.] // Endocrinology. - 2002. -Vol.143. - P. 2119–2138.
61. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation / M. Seppälä [et al.] // Endocrine Reviews. – 2002. - Vol.23, N4. - P.401-430.

62. Granulocyte colony stimulating factor treatment of resistant thin endometrium in women with frozen-thawed blastocyst transfer / M. Kunicki [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. - 2017. -Vol.63, N1. - P.49-57.
63. HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism / A.I. Guce [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. - 2013. -Vol. 20. - P. 90 - 98.
64. Homocysteine- respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis: GRP78/ BiP and novel genes / K. Kokame [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. -1996. - Vol. 271. – P.29659–29665.
65. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle / D. Haouzi [et al.] // *Human Reproduction*. – 2009. - Vol. 24, N1.- P. 198-205.
66. IL-15 expression at human endometrium and decidua / K. Kitaya Anderson [et al.] // *Biology of Reproduction*. - 2000. -Vol.63. - P.683–687.
67. Interleukin- 6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line / M. Jovanović [et al.] // *Placenta*. – 2009. -Vol. 30. - P.320–328.
68. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care/ J. Boivin [et al.] // *Human Reproduction*. – 2007. -Vol.6. - P.1 506–1512.
69. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by HCG improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study / N. Yu [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2016. -Vol.76, N3. - P. 212- 216.
70. Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure / S. Li [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. -2017. -Vol.119. - P.15-22.

71. Intrauterine insemination of cultured peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer improves clinical outcome for patients with repeated implantation failures / A. Madkour [et al.] // *Zygote*. – 2016. -Vol.24, N1. - P.58-69.
72. Knöfler, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion / M. Knöfler // *The International Journal of Developmental Biology*. - 2010. -Vol.54. - P.269-280.
73. Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells / A.K. Brar [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. - 1995. - Vol.163. - P. 30–37.
74. Large scale validation of human N-myc downstream-regulated gene (NDRG)-1 expression in endometrium during the menstrual cycle / B. Malette [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. - 2003. - Vol.9, N11. - P.671-679.
75. Lessey, B. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity / B. Lessey // *Human Reproduction*. - 1998. -Vol.13, N3. - P. 247-258.
76. LIF and LIF-R expression in the endometrium of fertile and infertile women: A prospective observational case-control study/ C. Margioula-Siarkou [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. -2016. - Vol.13, N6. - P. 4721-4728.
77. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies / M.E. Ritchie[et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. - Vol.43, N7. – P. e47.
78. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation / Y. Gnainsky [et al.] // *Fertility and Sterility*. -2010. -Vol.94. - P.2030–2036.
79. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization / A. Barash [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2003. - Vol.79, N6. - P.1317-1322.

80. Mahajan, N. Endometrial receptivity array: Clinical application / N. Mahajan // *Journal of Human Reproductive Sciences*. - 2015. - Vol.8, N3. - P.121- 129.
81. Marbaix, E. Role of matrix metalloproteinases in the endometrium in normal and pathologic menstruation / E. Marbaix // *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*. – 2005. - Vol.160, N5–6. - P.232–240.
82. Matrix metalloproteinases-2, -7 and tissue metalloproteinase inhibitor-1 expression in human endometrium / B. Grzechocinska [et al.] // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. - 2018. - Vol.56, N3. - P.133-140.
83. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy / J. Cha [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. - Vol.18, N12. - P.1754-1767.
84. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression / G.V. Benson [et al.] // *Development*. – 1996. - Vol.122, N9. - P. 2687-2696.
85. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers / S. Altmäe [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. - Vol.7. - P.10077.
86. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages / S. Linder[et al.] // *Journal of Cell Science*. – 2000. -Vol.113. - P.4165–4176.
87. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling / A.P. Ponnampalam [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2004. -Vol. 10, N12. -P. 879-893.
88. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women / S. Talbi [et al.] // *Endocrinology*. – 2006. -Vol.147, N3. - P. 1097-1121.
89. Morphometric analysis of the human endometrium during the implantation window. Light and transmission electron microscopy study / A. Zhioua [et al.] // *Journal*

of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction (Paris). – 2012. -Vol.41, N3. - P.235-242.

90. NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status / C. Coutifaris [et al.] // Fertility Sterility. - 2004. -Vol.82, N5.- P.1264–1272.

91. No correlation between pinopode formation and LIF and MMP2 expression in endometrium during implantation window / M. Mikołajczyk [et al.] // Folia Histochemica et Cytobiologica. - 2011. - Vol.49, N4. - P.615-621.

92. Psychoyos, A. Uterine receptivity for nidation / A. Psychoyos // Annals of the New York Academy of Sciences. - 1986. - Vol. 476. - P. 36-42.

93. Platelet-rich plasma as an adjuvant in the endometrial preparation of patients with refractory endometrium /A. Molina [et al.] // JBRA Assisted Reproduction. – 2018. - Vol.1,22, N1. - P.42-48.

94. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors / R. A. Paola [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. - 2013. - Vol.4, N3. - P. 67.

95. Pre-implantation genetic screening among women experiencing recurrent failure of in vitro fertilization / S. Hatirnaz [et al.] // International Journal of Gynecology & Obstetrics. - 2017. -Vol.137, N3. - P.314-318.

96. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results / T. Garrido-Gómez [et al.] // Fertility Sterility. -2013. - Vol. 99, N4. - P. 1078–1085.

97. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? / M. Ryan [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. -2019. - Vol. 20, N15. - P. 3822.

98. Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus  $\alpha\beta3$  testing in women with unexplained infertility / J. M. Franasiak [et al.] // Fertility Sterility. - 2014. -Vol.101, N6. - P.1724-1731.

99. Prospective, randomized study of the endometrial receptivity analysis (ERA) test in the infertility work-up to guide personalized embryo transfer versus fresh transfer or deferred embryo transfer / C. Simon [et al.] // Elsevier. - 2016. -Vol.106, N3. - P.46–47.
100. Recurrent implantation failure: Definition and Management / C. Coughlan[et al.] // Reproductive Bio Medicine Online. - 2014. -Vol.28. - P.14-38.
101. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks / S. Altmäe [et al.] // Molecular Endocrinology. - 2012. -Vol.26, N1. - P.203-217.
102. Simon, A. Repeated implantation failure: clinical approach / A. Simon, N. Laufer // Fertility Sterility. – 2012. -Vol. 97. - P. 1039-1043.
103. Successful treatment of unresponsive thin endometrium / N. Gleicher [et al.] // Fertility Sterility. - 2011. -Vol.95:2123. - P.13-17.
104. Smith, M. B. Endometrial preparation for third-party parenting and cryopreserved embryo transfer / M.B. Smith, R.J. Paulson // Fertility Sterility. - 2019. - Vol.111, N4. - P.641-649.
105. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity / P. Díaz-Gimeno [et al.] // Fertility Sterility. - 2013. - Vol.99, N2. - P.508-517.
106. The Comprehensive R Archive Network [electronic resource] / S. Urbanek [et al.] // The R Project for Statistical Computing. - режим доступа: [https:// cran.r-project.org/](https://cran.r-project.org/)
107. The effect of endometrial injury on first cycle IVF/ICSI outcome: A randomized controlled trial / A. Mahran[et al.] // International Journal of Reproductive Bio Medicine (Yazd). - 2016. -Vol.14, N3. - P.193-198.
108. The effect of endometrial injury on implantation and clinical pregnancy rates/ D. Levin [et al.] // Gynecological Endocrinology. - 2017. -Vol.33, N10. - P.779-782.



109. The effect of endometrial injury on ongoing pregnancy rate in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial / T. W. Yeung [et al.] // *Human Reproduction*. - 2014. -Vol.29, N11. - P.2474-2481.
110. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure / M. Ruiz-Alonso [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2013. -Vol.100, N3. - P. 818-824.
111. The Pleiotropic Effect of Glycodelin-A in Early Pregnancy / C.L. Lee [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2016. -Vol.75, N3. - P.290-297.
112. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window / C. Quinn [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2007. -Vol.87. -P.1015-1021.
113. The role of G-CSF in recurrent implantation failure: A randomized double blind placebo control trial / F. Davari-Tanha [et al.] // *International Journal of Reproductive Bio Medicine (Yazd)*. - 2016. - Vol.14, N12. - P.737-742.
114. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility / H. Du [et al.] // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. - 2015. - Vol.6, N1. - P.2-23.
115. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2018. - Vol. 11.
116. The Window of Implantation Is Closed by Estrogen via Insulin-Like Growth Factor 1 Pathway / R. Kobayashi J [et al.] // *Journal of Reproduction & Infertility*. – 2017. - Vol.18, N2. - P.231-241.
117. Therapeutic role of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for infertile women under in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) treatment: a meta-analysis / L. Zhang [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. - 2018. - Vol.298, N5. - P.861-871.

118. Transcription profile analysis of the endometrium revealed molecular markers of the personalized 'window of implantation' during in vitro fertilization / O. V. Burmenskaya [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. - 2017. -Vol. 33, NS1. - P.22 - 27.
119. Transcription profiling of human endometrium from patients with a history of endometriosis vs. normal controls sampled at a range of menstrual cycle timepoints [electronic resource] / L. Giudice [et al.] // *ArrayExpress-2008*- режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-GEOD-6364/>
120. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study / S. Zadehmodarres [et al.] // *JBRA Assisted Reproduction*. - 2017. -Vol.1,21, N1. - P.54-56.
121. Venables, W. N. *Modern Applied Statistics with S* / W. N Venables, B. D. Ripley // Springer-Verlag. - 2002.
122. Wang, Xi. An update on the progress of transcriptomic profiles of human endometrial receptivity / Xi Wang, Qi Yu // *Biology of Reproduction*. - 2018. -Vol. 98, N4. - P. 440–448.
123. What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study / M. Ruiz-Alonso [et al.] // *Human Reproduction*. - 2014. - Vol. 29, N6. - P.1244-1247.
124. Window of implantation transcriptomic stratification reveals different endometrial subsignatures associated with live birth and biochemical pregnancy / P. Díaz-Gimeno [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2017. -Vol.108, N4. - P.703-710.

## Приложение

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

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

Приложение Б – Коэффициенты и константы канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих стадии созревания эндометрия в ЦГТ

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

Приложение В – Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия для 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 Г – Значения центроидов кластеров, классифицирующих стадии созревания эндометрия на фоне ЦГТ

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