

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Храмцова Александра Юрьевна

**МОДУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ ПЛАЗМОЙ,
ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ, У ПАЦИЕНТОК С
НЕУДАЧНЫМИ ПОПЫТКАМИ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ В
АНАМНЕЗЕ**

3.1.4 -Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Башмакова Надежда Васильевна
Заслуженный врач РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Екатеринбург – 2022

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Актуальность проблемы неудачных попыток переноса эмбрионов. Современные возможности влияния на рецептивность эндометрия (обзор литературы)	13
1.1. Проблематика неудачных попыток переноса эмбрионов в программах ВРТ.....	13
1.2. Патогенетические аспекты нарушения имплантации человеческого эмбриона в программах ВРТ	15
1.3. Толщина эндометрия - как маркер рецептивности эндометрия.....	19
1.4. Модуляция рецептивности эндометрия у пациенток с неудачными переносами эмбрионов в анамнезе.....	21
1.5. Особенности модуляции рецептивности эндометрия плазмой обогащенной тромбоцитами (PRP)	28
Глава 2. Материалы и методы исследования	38
2.1. Материалы исследования	38
2.2. Методы исследования.....	42
2.2.1. Клинико-статистический анализ	42
2.2.2. Ультразвуковое сканирование органов малого таза.....	43
2.2.3. Гистологическое исследование	44
2.2.4. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование эндометрия	46
2.2.5. Клинические анализы и гормональное исследование крови.....	48
2.2.6. Морфологическая оценка качества эмбрионов.....	49
2.2.7. Математические методы.....	50
Глава 3. Клинико-анамнестическая характеристика изучаемых групп	53
3.1. Характеристика соматического и акушерско-гинекологического анамнеза пациенток в группах наблюдения	53

3.2. Особенности исходов программ ЭКО с переносом эмбрионов в стимулированном цикле при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами	62
3.3. Особенности исходов программ переноса криоконсервированных эмбрионов (криоперенос) при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами при проведении пайпель-биопсии	68
3.4. Особенности исходов программ ВРТ при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами в циклах переноса криоконсервированных эмбрионов.....	74
Глава 4. Изменения морфофункциональных характеристик эндометрия при применении внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами	82
4.1. Микроскопические особенности эндометрия после плазмотерапии у пациенток с переносом криоконсервированных эмбрионов	82
4.2. Иммуногистохимические особенности эндометрия после плазмотерапии у пациенток с переносом криоконсервированных эмбрионов.....	92
4.3. Иммуногистохимические изменения эндометрия после применения плазмотерапии по сравнению с показателями фертильных пациенток	100
Глава 5. Способы прогнозирования успеха в программе ВРТ.....	108
5.1. Прогнозирование успеха программы переноса криоконсервированных эмбрионов с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования эндометрия на 18-22 день в предыдущем менструальном цикле ПЭ.....	108
5.2. Прогнозирование успеха программы ВРТ у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов	116
Заключение.....	121
Выводы.....	132
Практические рекомендации.....	135
Список сокращений.....	136

Список литературы138
--------------------------------	-------------

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на тридцатилетнюю историю существования вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) уже многие годы эффективность проведения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не меняется и остается на уровне 30-42%. Для достижения беременности важное значение имеют такие факторы, как качество эмбриона и состояние эндометрия [78]. Не только толщина, но и структура эндометрия играют ключевую роль в реализации диалога между эндометрием и эмбрионом [20]. Эти данные подтверждают существующее мнение о ключевой роли эндометрия в имплантации и плацентации. Нарушение полноценной имплантации человеческого эмбриона в связи с нерцептивным эндометрием является наиболее значимой причиной репродуктивных неудач ВРТ, занимая в их структуре до 70% [2, 20]. Потому в последние годы в фокусе научного интереса находятся исследования, посвященные изучению рецептивности эндометрия при патологии имплантации, связанной с бесплодием. Возможности иммуногистохимических, гистологических, микроскопических исследований позволяют приблизиться к формированию знаний о маркерах успешной имплантации.

При повторных неудачах имплантации в строме эндометрия определяется дисбаланс ER и PR (снижение стероидной рецепции или гиперэкспрессия ER). При соотношении PR/ER в диапазоне от 2 до 3 вероятность наступления беременности в программах ВРТ была максимальной. Одним из важнейших маркеров тканевого уровня рецептивности эндометрия являются пиноподии – выросты на апикальной части поверхности мембран желез эндометрия в середине лютеиновой фазы менструального цикла [96, 32]. С. Quinn et al. (2009) выделили пиноподии в качестве ключевых ультраструктурных образований, участвующих в формировании рецептивности, поскольку на их поверхности в наибольшем количестве экспрессируется LIF (leukemia inhibitory factor) – маркер рецептивности эндометрия [35]. Нарушение регуляции числа uNK и/ или

функции клеток (цитотоксичность, экспрессия рецепторов, секреция цитокинов или экспрессия генов) связаны с репродуктивными неудачами, такими как бесплодие и привычное невынашивание беременности. Увеличение количества CD34+ в эндометрии может являться маркером успешной имплантации у пациенток с бесплодием и неудачными попытками переноса эмбриона в анамнезе[12,111].

Методы лечения, направленные на увеличение толщины и улучшения рецептивности эндометрия в программах ВРТ, включают в себя назначение препаратов эстрадиола в больших дозах, аспирина, хирургические вмешательства, физиотерапевтические процедуры[48,101,61,86,31,15]. Однако, как показывает практика, не всегда эти методы приводят к желаемым результатам, и необходимы поиски новых подходов к решению проблемы нерцептивного эндометрия и дальнейшие научно-практические исследования.

Степень разработанности темы

Метод коррекции рецептивности эндометрия плазмой, обогащённой тромбоцитами (PRP, плазмотерапия) основан на терапевтически-регенеративной функции тромбоцитов и активных компонентов: факторов роста, цито- и хемокинов, содержащихся в тромбоцитах, которые запускают в тканях процессы биологического синтеза и регенерации при дегрануляции последних [52,67,87]. Существует предположение о том, что не только тромбоциты играют роль в клинических реакциях PRP [38]. Поэтому в настоящее время PRP может быть определена, как объем плазмы, который имеет количество тромбоцитов выше исходного уровня, приготовленный центрифугированием периферической крови пациента [80]. Стандартизация использования PRP остается сложной перспективой из-за количества переменных, участвующих в его приготовлении и введении [6,38,91].

В клинических наблюдениях показано, что PRP оказывает лечебное действие на эндометрий женщин при синдроме Ашермана и восстанавливает

его нормальную гистологическую структуру и функцию [95,72]. В исследованиях, посвященных применению внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами (плазмотерапия) в программах ВРТ [44,92,91,6], не рассматривается механизм влияния на рецептивность эндометрия по микроскопической и иммуногистохимической картине эндометрия. Необходимо большее количество исследований, которые позволят расширить представления о влиянии плазмотерапии на эндометрий пациенток, проходящих программы ВРТ, а так же сформировать группы пациенток, которым показано проведение данной процедуры.

Цель исследования

Повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий при подготовке эндометрия у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе с использованием внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами.

Задачи исследования

1. Оценить клинико-анамнестические предикторы повторных неудач ВРТ при переносе эмбриона в цикле стимуляции овуляции и криопереносе.
2. Усовершенствовать методику приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами.
3. Оценить эффективность программ ВРТ (ЭКО с переносом эмбрионов в стимулированном цикле и переноса криоконсервированных эмбрионов) с применением и без применения внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе.

4. Изучить особенности рецептивности эндометрия у пациенток с неудачными попытками переноса эмбриона в анамнезе до и после применения плазмотерапии и сравнить с показателями эндометрия фертильных женщин.
5. Разработать алгоритм коррекции рецептивности эндометрия при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами в программах ВРТ.

Научная новизна исследования

Разработана усовершенствованная методика приготовления и введения плазмы, обогащённой тромбоцитами, позволившая увеличить эффективность программ ВРТ.

Впервые проведено сравнение исходов ЭКО (стимулированный цикл) и переноса размороженных эмбрионов (криоцикл) при применении по усовершенствованной технологии плазмы, обогащённой тромбоцитами.

Впервые доказали, что при наличии у пациенток, двух и более неудачных переносов в анамнезе метод плазмотерапии имеет наибольшее влияние на эффективность программ ВРТ.

Впервые изучены гистологические изменения эндометрия после внутриматочной инфузии плазмы, обогащённой тромбоцитами в программах ВРТ. Проведено сопоставление исходов программ ВРТ и изменений микроскопической, иммуногистохимической картин у пациентов с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана и внедрена в практику методика приготовления и внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами. Данная методика отличается от других однократным центрифугированием крови, в

результате чего образуется в плазме концентрация тромбоцитов на 64,6 – 69,6% выше, чем в периферической крови, а также двойным внутриматочным введением плазмы во второй фазе менструального цикла (в циклах ЭКО в день пункции и на 3 сутки развития эмбрионов; в криоцикле на 120 и 48 часов до предполагаемого переноса эмбрионов).

Оптимизирована коррекция рецептивности эндометрия в зависимости от гистологической картины в предыдущем менструальном цикле до переноса эмбрионов.

Разработан прогноз наступления клинической беременности в зависимости от гистологической картины эндометрия в предыдущем менструальном цикле до переноса эмбрионов и количества тромбоцитов в плазме, которую в первый раз внутриматочно вводят пациентке.

Разработан прогноз наступления клинической беременности в программах ВРТ при применении плазмотерапии у пациенток с неудачными переносами эмбрионов в анамнезе.

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования проведено проспективное, когортное, сравнительное исследования. Все исследования выполнены в соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ от 26.02.2019 г.

Положения, выносимые на защиту

1. Эффективность программ ВРТ у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе увеличивается в среднем на 28,45% (ЭКО) и 24,9% (криоперенос) при внутриматочном использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами для подготовки эндометрия. Значимое влияние данной процедуры выявлено на исходы программ

ВРТ у пациенток с двумя и более неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе.

2. При проведении внутриматочной терапии плазмой, обогащенной тромбоцитами происходят изменения эндометрия на микроскопическом и иммуногистохимическом уровне. Гистологическая картина эндометрия после плазмотерапии сопоставима с эндометрием фертильных женщин.
3. Разработаны две математические модели прогноза наступления беременности в программах ВРТ при применении плазмотерапии (при наличии гистологического исследования эндометрия в предыдущем цикле до криопереноса эмбрионов и общее для программ ВРТ без гистологического исследования)

Степень достоверности и апробация работы

Использование современных методов исследования с привлечением статистического анализа, репрезентативной выборки с применением специализированного программного обеспечения для научных исследований, обобщение литературных данных по проблемам бесплодия позволяют считать результаты исследования, выводы, практические рекомендации достоверными и обоснованными.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих мероприятиях : на VI Конгрессе акушеров-гинекологов УФО с международным участием «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине» (Екатеринбург, 2019); на XXI научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2020); на VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» (Екатеринбург, 2020); на VII конгрессе акушеров-гинекологов УФО в дистанционном режиме «Женское здоровье: от рождения до менопаузы» (Екатеринбург, 2020); на

V Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: Уральские чтения» (Екатеринбург, 2021); на 15-м Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2021); на Всероссийской конференции «145 лет лидерства в перинатальной медицине», посвященной 145-летию ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ (Екатеринбург, 2022).

Автор принимал активное непосредственное участие во всех этапах диссертационного исследования, осваивал новые методы и навыки. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, цели, задач исследования, определение методологии, общей концепции и дизайна диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем д.м.н., профессором, Заслуженным врачом РФ Башмаковой Н.В.. Диссертантом лично проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, разработаны карты исследования, проведен подбор параметров для формирования групп, оценены клинические, гистологические, морфометрические, иммуногистохимические показатели; обработка и интерпретация полученных данных.

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанная методика приготовления и внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами внедрена в практику отделения ВРТ ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ в рамках платных услуг, оказываемых при подготовке к переносу эмбрионов. Результаты проведенной работы используются в учебном процессе в программах клинической ординатуры и постдипломного образования в ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ.

Публикации

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, из них по теме диссертации – 4 научных работ, в том числе 2 статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертаций. Соискатель имеет 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста, иллюстрирована 19 рисунками, 47 таблицами, 5 диаграммами и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиографический указатель включает 115 источников, из них 32 – отечественных и 83 – зарубежных источников.

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ НЕУДАЧНЫХ ПОПЫТОК ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЛИЯНИЯ НА РЕЦЕПТИВНОСТЬ ЭНДОМЕТРИЯ. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Проблематика неудачных попыток переноса эмбрионов в программах ВРТ

Распространенность бесплодия в Российской Федерации достигает 15-20 %, что считается критическим уровнем для воспроизводства населения и является одной из важных и сложных медицинских и социально-демографических проблем [1,9,65]. Сохранение репродуктивного здоровья и преодоление бесплодия являются одними из приоритетных направлений государственных программ в Российской Федерации.

Несмотря на тридцатилетнюю историю существования вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) уже многие годы эффективность проведения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не меняется и остается на уровне 30-42%. По данным отчета РАРЧ за 2019 год эффективность в свежем цикле программы ЭКО (количество клинических беременностей/перенос эмбрионов) составила 36,5%. Результативность программ переносов размороженных эмбрионов –42,6% [26]. Для достижения беременности важное значение имеют такие факторы как качество эмбриона и состояние эндометрия [78]. «Последним непреодоленным рубежом» вспомогательных репродуктивных технологий, по мнению их создателя - Роберта Эдвардса, является нерецептивный эндометрий, и ситуация не изменилась за прошедшие пятнадцать лет с момента провозглашения этого постулата [54].

Известно, что частота встречаемости патологических изменений эндометрия при бесплодии достигает 88%, при неэффективных попытках ЭКО – 77,5% [11]. Наличие внутриматочной патологии и патологии эндометрия

является независимым фактором риска бесплодия, увеличивающим его вероятность в четыре раза. Синдром «тонкого» эндометрия является сложным и не до конца изученным феноменом современной репродуктологии. Но не только толщина, но и структура эндометрия играют ключевую роль в реализации диалога между эндометрием и эмбрионом [20]. Эти данные подтверждают существующее мнение о ключевой роли эндометрия в имплантации и плацентации. Следовательно, очевидна необходимость его морфофункциональной оценки у женщин с бесплодием, неудачными попытками ЭКО в анамнезе и привычным самопроизвольным выкидышем.

Главными составляющими для достижения беременности считаются нормальный эмбрион и рецептивный эндометрий, способный его воспринять.

Эндометрий играет ведущую роль для наступления беременности и ее поддержания, как в естественном цикле, так и в циклах вспомогательных репродуктивных технологий. В естественном 28-30 дневном менструальном цикле женщины эндометрий становится восприимчив к имплантации через шесть дней после овуляции и продолжается 4-5 дней, то есть эндометрий рецептивен на 20-24 день менструального цикла. Сложные реакции и взаимодействия между эндометрием и эмбрионом приводят к прикреплению бластоцисты к люминальному эпителию и последующей инвазии в строму [71, 80]. Синхронизация между желтым телом, эндометрием и эмбрионом является основной частью успешной имплантации.

Нарушение полноценной имплантации человеческого эмбриона в связи с нерецептивным эндометрием является наиболее значимой причиной репродуктивных неудач ВРТ, занимая в их структуре до 70% [2, 20]. Поэтому в последние годы в фокусе научного интереса находятся исследования, посвященные изучению рецептивности эндометрия при патологии имплантации, связанной с бесплодием.

1.2. Патогенетические аспекты нарушения имплантации человеческого эмбриона в программах ВРТ

Патологические состояния слизистой матки подразделяются на дисгормональные (сопровождающиеся гиперпластическими, дистрофическими и атрофическими процессами), воспалительные и опухолевые [28]. У женщин, страдающих бесплодием, основное место в структуре патологии эндометрия занимают дисгормональные и воспалительные заболевания [29,27,30,18]. Современные исследования показали, что частота хронического эндометрита у пациенток с бесплодием колеблется в пределах 0,2-46 % [41, 63]. У женщин с привычным невынашиванием беременности после процедуры ЭКО он выявлялся в 14 % случаев. При этом у женщин с эндометритом регистрировалась более низкая частота имплантации (11,5 %) по сравнению с женщинами, у которых воспалительные изменения слизистой отсутствовали (32,7 %) [74,63]. У пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе наиболее чаще выявляется хронический эндометрит (24% против 6%), чем у пациенток, которые начали лечение бесплодия методами ВРТ [102].

Поиск этиологических факторов повторных неудач в исследованиях последних лет нацелен на наиболее детальное рассмотрение реализации патогенетических механизмов посредством иммунологических и инфекционных факторов, таких как уровень цитокинов, маточных НК-клеток и наличие специфических антител, а также любых инфекционных возбудителей, приводящих к хроническому эндометриту [89,85,70]. Эндометрий человека претерпевает циклические волны пролиферации, дифференцировки, апоптоза и регенерации в ответ на повышение и снижение уровней синтезируемых в яичниках эстрадиола и прогестерона. Во время фолликулярной фазы эстрадиол яичников индуцирует упорядоченный рост эндометрия, тогда как постовуляторное повышение уровня прогестерона контролирует дифференцировку этой ткани в рамках подготовки к имплантации эмбриона.

При отсутствии беременности, уровень половых стероидов падает, и эпителиальные клетки эндометрия регрессируют.

Однако, важен не столько уровень половых стероидов в организме, но сохранение всех путей реализации гормонального эффекта, в чем решающую роль играет количество функционально полноценных рецепторов ткани эндометрия к соответствующим стероидным гормонам.

Одной из возможных причин отсутствия имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является изменение взаимодействия эндометрия с эмбрионом вследствие десинхронизации nidации или нарушение рецептивности эндометрия в период «окна имплантации». Эта причина повышает количество неэффективных циклов ВРТ, увеличивая экономические потери. Г.Х. Толибова и соавт. (2016) рассматривают эндометриальную дисфункцию как «обратимые или условно обратимые морфофункциональные изменения эндометрия, в основе которых лежат нарушения молекулярных механизмов, приводящие к нарушению имплантации, плацентации и гибели эмбриона» [29].

Внедрение новых молекулярных и генетических методов исследования в дополнение к биопсийному исследованию позволило связать эндометриальную дисфункцию с нарушением экспрессии многих факторов, что позволило разработать алгоритм иммуногистохимической диагностики данного состояния [29].

В течение нормального менструального цикла содержание рецепторов претерпевает закономерные колебания: уровень рецепторов эстрагенов (ER) значительно повышается в позднюю фазу пролиферации, и, достигая пика, постепенно снижается на протяжении секреторной фазы. Максимальная экспрессия рецепторов прогестерона (PR) наблюдается в конце пролиферативной фазы, а затем происходит снижение экспрессии PR в середине лютеиновой фазы. Это плато экспрессии эпителиальных PR позволяет переключить системную регуляцию имплантации на более тонкую паракринную [46, 55]. Считается, что именно снижение уровня ER и PR в

эпителии эндометрия приводит к появлению на мембране этих клеток интегринов – белков клеточной адгезии [58]. Низкая экспрессия PR в пролиферативную фазу и отсутствие плато PR в лютеиновую фазу сочетается в дальнейшем с потерей других маркеров рецептивности. Наиболее неблагоприятным вариантом для наступления беременности является отсутствие снижения экспрессии ER в фазу секреции [75]. Селективное отсутствие PR в эпителии эндометрия критично для формирования маточной рецептивности [13].

При повторных неудачах имплантации в строме эндометрия определяется дисбаланс ER и PR (снижение стероидной рецепции или гиперэкспрессия ER). При соотношении PR/ER в диапазоне от 2 до 3 вероятность наступления беременности в программах ВРТ была максимальной [46].

Одним из важнейших маркеров тканевого уровня рецептивности эндометрия являются пиноподии – выросты на апикальной части поверхности мембран желез эндометрия в середине лютеиновой фазы менструального цикла. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии установлено, что максимальное развитие пиноподий на поверхности мембран желез эндометрия приходится на период окна имплантации [87,30]. Для успешной имплантации необходимо, чтобы, как минимум, 50% поверхности эпителия были покрыты пиноподиями [3,10].

C. Quinn et al. (2009) выделили пиноподии в качестве ключевых ультраструктурных образований, участвующих в формировании рецептивности [87], поскольку на их поверхности в наибольшем количестве экспрессируется LIF (leukemia inhibitory factor) – маркер рецептивности эндометрия. Предполагается, что пиноподии играют одну из ведущих ролей в имплантации бластоцисты [97]. Действие LIF в основном проявляется после связывания с гетеродимерным рецептором на цитоплазматической поверхности клеток (LIFR), который состоит из двух субъединиц. Уровни экспрессии LIF и LIFR постепенно увеличиваются после овуляции и продолжают увеличиваться до конца менструального цикла [107]. Согласно данным литературы,

экспрессия LIF достигает пика между 7-м и 12-м днем после овуляции, тогда как уровни его рецептора (LIFR) становятся максимальными между 19-м и 25-м днем цикла [30]. Также было отмечено, что более выраженная экспрессия LIF во время предполагаемого «окна имплантации» коррелирует с более высокой вероятностью наступления беременности. Напротив, снижение экспрессии LIF в течение этого периода связано с меньшей вероятностью зачатия в последующих циклах. Таким образом, увеличение уровней LIF и LIFR имеет важное значение для имплантации эмбрионов.

Считается, что натуральные клетки-киллеры матки (uNK) играют важную роль в развитии бесплодия. Нарушение регуляции числа uNK и/или функции клеток (цитотоксичность, экспрессия рецепторов, секреция цитокинов или экспрессия генов) связаны с репродуктивными неудачами, такими как бесплодие и привычное невынашивание беременности [4].

CD34 – uNK, маркер клеток эндотелия сосудов, который позволяет оценить уровень ангиогенеза. В ходе исследований было показано, что повышение экспрессии CD34⁺ сопровождалось увеличением частоты наступления беременности [12,111]. Увеличение количества CD34⁺ в эндометрии может являться маркером успешной имплантации у пациенток с бесплодием и неудачными попытками переноса эмбриона в анамнезе [52]. CD34⁺ клетки были обнаружены среди конденсированных клеточных популяций в строме, а также были обнаружены в регенеративном эпителии эндометрия. При воспалительных процессах эндометрия происходит миграция клеток CD34⁺, что позволило сделать вывод о роли в репарации uNK-клеток [115].

«Золотым стандартом» для оценки степени пролиферативной активности клеточной популяции служит определение белка Ki67, который экспрессируется во всех митотически активных клетках, находящихся всех фазах клеточного цикла [13]. Эстроген повышает экспрессию Ki67, а под воздействием прогестерона она снижается, что коррелирует с циклическими изменениями уровней этих гормонов и пролиферацией эпителия желез на

протяжении менструального цикла. При оценке экспрессии Ki67 отмечалось статистически значимое повышение его экспрессии в стромальных клетках эндометрия у женщин с миомами матки и бесплодием, что может быть связано с нарушением регуляции стероидных гормонов [5]. Следовательно, увеличение Ki67 может служить маркером отсутствия имплантации.

Авторы показали, что сниженная рецептивность при хроническом эндометрите обуславливалась уменьшением количества зрелых пиноподий и сниженной экспрессией фактора, ингибирующего лейкемию (LIF) покровным эпителием [77,93,88]. Хронический воспалительный процесс в железистых и стромальных клетках функционального слоя эндометрия способствует снижению экспрессии рецепторов прогестерона и в меньшей степени – рецепторов эстрогенов [81]. Снижается чувствительность слизистой оболочки матки к стероидам, поэтому даже при удовлетворительном синтезе эстрогенов и прогестерона отмечается неполноценность циклических превращений эндометрия [73,33].

1.3. Толщина эндометрия - как маркер рецептивности эндометрия

Толщина эндометрия — один из наиболее важных факторов, влияющих на частоту наступления беременности в ВРТ. Корреляция между рецептивностью и толщиной эндометрия, как фактор нарушения имплантации, упоминается во многих исследованиях [33,98,84,112,64]. Принято считать, что его толщина менее 7 мм дает минимальные шансы на продуктивное зачатие.

В настоящее время не существует общепризнанного определения «тонкий эндометрий». El-Toukhy T., 2008 определил тонкий эндометрий как эндометрий, толщина которого ниже порога, необходимого для имплантации эмбриона человека [109].

В различных исследованиях авторы сообщают о разной толщине эндометрия, которая считается недостаточной для успешной имплантации. Так, специалисты из Израиля [33] считают, что у пациенток, проходящих

программы ЭКО при толщине эндометрия 7 мм и менее (в день введения ХГЧ) частота наступления беременности составляет 10,8%, при толщине эндометрия от 7,1 до 14 мм — 18%, при толщине эндометрия от 14,1 мм и более — 36,4%.

В последнем ретроспективном исследовании в Великобритании были проанализированы более 25 тысяч свежих циклов ЭКО в период с 2006 по 2016 года. Была выявлена связь между толщиной эндометрия и наступлением клинической беременности, а также уровнем рождаемости, который составил 15,6% при толщине эндометрия до 5 мм и постепенно увеличивался до 33,1% при толщине эндометрия 10 мм. Статистическое моделирование позволило выявить оптимальный порог толщины эндометрия, который составил 10 мм и более [57].

Фундаментальным является вопрос, каким образом «тонкий» эндометрий препятствует нормальной имплантации. Как известно, на гистологическом уровне эндометрий состоит из двух слоев, базального и функционального. Функциональный слой питается от мелких сосудов капиллярной сети, растет на протяжении большей части менструального цикла, а затем почти полностью отторгается с менструацией. Базальный же слой эндометрия питается от крупных спиральных артерий. Важно, что в норме после овуляции, отмечается сужение спиральных артерий, с последующим снижением кровотока в капиллярной сети функционального слоя эндометрия [100]. В результате этого происходит снижение напряжения кислорода в функциональном слое эндометрия, что улучшает и облегчает процесс имплантации. В тонком эндометрии, имплантация эмбриона происходит близко к уровню спиральных артерий базального слоя, которые имеют обильный кровоток и высокое напряжение кислорода. С этим связано образование активных форм кислорода (ROS), которые прерывают имплантацию и инвазию трофобласта за счет торможения экспрессии факторов, индуцируемых гипоксией HIF1- α , VEGFA и др. [42,113].

К одной из ключевых причин формирования «тонкого» и нерецептивного эндометрия относят потерю рецепторов стероидных гормонов [94,104]. Потеря

рецептивности эндометрия может возникать в результате перенесенных воспалительных заболеваний органов малого таза, изменений гормонального гомеостаза, внутриматочных манипуляций и операций, связанных с травмой базального слоя эндометрия [10].

Индукция суперовуляции в программах экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов (ЭКО и ПЭ) связана со значительной экзогенной гормональной нагрузкой на организм женщины, которая влияет на рецептивность эндометрия. Также воздействие на эндометрий длительной терапии прогестероном может привести к истончению эндометрия [17].

Ряд специалистов считают, что наличие тонкого эндометрия может служить показанием для заморозки всех эмбрионов с целью переноса в следующих специально подготовленных циклах, где толщина эндометрия может быть большей. И это при том факте, что в литературе есть сообщения, об успешных беременностях в программах ЭКО при крайне низкой толщине эндометрия менее 4 мм [34], а также [45] сообщил о частоте родов 50% у пациенток с толщиной эндометрия 6 мм.

1.4. Модуляция рецептивности эндометрия у пациенток с неудачными переносами эмбрионов в анамнезе

Наиболее сложным в плане эффективности лечения и восстановления функциональной активности эндометрия остается группа пациенток с регенераторно-пластическим типом недостаточности эндометрия [16,19].

Методы лечения, направленные на увеличение толщины и улучшения рецептивности эндометрия в программах ВРТ, включают в себя назначение препаратов эстрадиола в больших дозах, аспирина, хирургические вмешательства, физиотерапевтические процедуры. Однако, как показывает практика, не всегда эти методы приводят к желаемым результатам, и необходимы поиски новых подходов к решению проблемы тонкого эндометрия и дальнейшие научно-практические исследования [31]. В мировой практике

продолжается поиск способов улучшения рецептивности эндометрия для увеличения эффективности программ ВРТ.

Особую роль в процессе созревания эндометрия и имплантации играют рецепторы гормона роста. Они относятся к семейству цитокиновых рецепторов, которые включают в себя более 30 рецепторов, таких как рецептор пролактина, рецептор эритропоэтина, рецептор тромбopoэтина, гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор, рецептор интерлейкина-3, рецептор интерлейкина-6, рецептор интерлейкина-7 [51]. Гормон роста (GH) – это одиночная полипептидная цепочка, состоящая из 191 аминокислоты, вырабатываемая соматотропными клетками передней доли гипофиза [39]. GH участвует в процессах гонадного стероидогенеза, гаметогенеза и овуляции. Экзогенный гормон роста стимулирует пролиферацию клеток эндометрия, индуцирует децидуализацию опосредованно через рецепторы эстрадиола, увеличивая количество маточных белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBPs) и простагландинов [66].

N. Cui, A.-M. Li и соавт., 2019, в своем исследовании сравнили частоту наступления беременности в зависимости от применения гормона роста (GH) или эстрогенов при подготовке эндометрия к переносу размороженных эмбрионов. Частота имплантации в группе пациенток с применением GH составила 24,4% против 10,5% в группе, где использовались эстрогены при подготовке «тонкого» эндометрия, частота наступления клинической беременности составила соответственно 42,5% против 18,9% ($p < 0.05$). Авторы сделали вывод, что GH может улучшить исход по беременности при переносе эмбрионов в криоцикле, воздействуя на клетки эндометрия, увеличив пролиферацию и васкуляризацию [48].

В начале 21 века ученые начали изучать воздействие на рецептивность эндометрия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (GCSF), который оказывает влияние на цитокины и факторы роста. В процессе имплантации участвуют иммунологические механизмы в эндометрии. GCSF повышает секрецию эндогенных цитокинов [99]. В исследовании 2020 года

авторы пришли к выводу, что GCSF влияет на пролиферацию и дифференцировку нормальных эндометриальных стромальных клеток и децидуальных стромальных клеток [70]. GCSF стимулирует пролиферацию нейтрофильных гранулоцитов, также повышает эффективность имплантации эмбриона через активацию макрофагов децидуальных клеток.

N. Gleicher, A. Vidali, and D. H. Barad, 2013, изучали влияние GCSF на толщину эндометрия женщин, у которых в предыдущих циклах ЭКО переносы эмбрионов были отменены из-за тонкого эндометрия [59]. Они обнаружили, что все пациенты с тонким эндометрием забеременели, используя внутриматочную инфузию GCSF. Однако, в ретроспективном исследовании 2021 года Zhu Y.C. и соавторы [115] установили, что толщина эндометрия увеличивается после внутриматочной инфузии GCSF, однако статистических различий по наступлению клинических беременностей не было выявлено.

Fatemeh Sarvi, Marjan Arabahmadi, Ashraf Alleyassin и соавт., 2017, проводили исследование среди пациенток с толщиной эндометрия менее 6 мм в день инъекции ХГЧ, которые не отвечали на силденафил и эстрадиол в предыдущих циклах [101]. Пациентки были случайным образом разделены на две группы: основная (15 женщин) и контрольная (13 женщин). В основной группе катетером для переноса эмбрионов в течение пяти минут вводили в матку дозу GCSF (300 микрограмм в 1 куб. см). В контрольной группе в матку с таким же типом катетера вводили 1 куб. см нормального физиологического раствора, а затем в тот же день всем участникам внутримышечно вводили 10000 единиц ХГЧ. В день пункции измеряли толщину эндометрия трансвагинальным УЗ-датчиком у всех участников групп. Если в группе толщина эндометрия была менее 6 мм, то через 2-3 дня после трансвагинальной пункции вводили вторую дозу GCSF. Затем в тот же день производился перенос 2-3 эмбрионов. Результаты, которые получили авторы исследования, показали, что инъекция GCSF увеличивает толщину эндометрия. В группе исследования толщина эндометрия в среднем была значительно выше в дни трансвагинальной пункции яичников 8.0 ± 1.0 мм против 6.3 ± 1.0 мм в

контрольной группе, и в дни переноса эмбрионов 9.1 ± 1.5 мм против 6.9 ± 1.1 (p < 0.001). Также в основной группе значительно выше средний показатель увеличения толщины эндометрия. Показатель биохимической беременности был выше в основной группе по сравнению с контрольной группой и составил 10,3 % против 5,4% (p < 0.001). Однако уровень клинической беременности в обеих группах не отличался: основная группа 15,3%, контрольная группа 20% (p = 0,7).

Hanni Ke, Jingjing Jiang, Mingdi Xia и соавт., 2017, изучили влияние тамоксифена у пациенток при подготовке «тонкого» эндометрия к переносу эмбриона в криоцикле[61]. Все пациентки в предыдущем цикле имели «тонкий» эндометрий менее 7,5 мм. Пациентки были разделены на группы по возможным причинам возникновения «тонкого» эндометрия. Первая группа – пациентки, имеющие в анамнезе синехии полости матки, вторая группа – пациентки, имеющие в анамнезе кюретаж матки, третья группа – пациентки, которым поставлен диагноз синдрома поликистозных яичников. Во всех группах наблюдалось увеличение толщины эндометрия при применении тамоксифена. У группы пациенток с синдромом поликистозных яичников наблюдалось наибольшее увеличение толщины эндометрия $9.31 \pm 1,55$ мм, самый высокий уровень наступления клинической беременности (60%) и живорождения (55,56%) в расчете на перенос эмбриона (p < 0.001).

Sunita Sharma, Geetha Rani, Gunja Bose и соавт., 2018, анализировали исследование, которое включало проспективное наблюдение применения кломифена цитрат, тамоксифена и гонадотропинов при внутриматочной инсеминации у пациенток с толщиной эндометрия менее 7 мм [106]. При сравнении наступления клинических беременностей показатели в группах, где применяли тамоксифен и гонадотропины были аналогичными 14,52 % против 14,89 %, однако в группе кломифена цитрат составлял 4,94 % (p < 0,002). Коэффициент рождаемости в группах составил соответственно 12,2 %, 12,7 %, 3,2 % (p < 0,004). Авторы сформулировали вывод, что применение тамоксифена может увеличить толщину эндометрия и частоту живорождения у

пациенток с «тонким» эндометрием, которые в анамнезе применяли кломифена цитрат и имели неудачные попытки в программах ВРТ.

Силденафил – селективный ингибитор циклогуанозинмонофосфат (цГМФ) специфической фосфодиэстеразы типа 5 (ФДЭ5), предотвращая распад цГМФ, усиливает эффект оксида азота на гладкую мускулатуру сосудистой стенки. Данный фактор приводит к улучшению маточного кровотока. Сочетание силденафила с эстрогенами проводит к эстраген-индуцированной пролиферации эндометрия [86].

В 2013 году R. Dehghani Firouzabadi и соавт, в рандомизированном контролируемом исследовании показали, что использование силденафила цитрат приводит к увеличению толщины эндометрия и частоты наступления беременности у пациенток с неудачными попытками при переносе эмбрионов и плохим ростом эндометрия [50]. Авторы оценивали влияние цитрат силденафила на ультразвуковую толщину и структуру эндометрия, частоту имплантации в замороженных циклах переноса эмбрионов. Пациентки были разделены на равные группы по 40 человек, в основной группе пациентки ежедневно принимали по 50 мг цитрат силденафила в дополнении к эстрадиолу от первого дня цикла до дня назначения препаратов прогестерона, в контрольной группе пациентки получали препараты эстрадиола при подготовке эндометрия к переносу криоконсервированных эмбрионов. По результатам исследования толщина эндометрия была значительно выше в группе цитрата силденафил 9,2 мм против 8,0 мм ($p < 0,0001$). Частота имплантации была статистически выше в основной группе и составила 14,16 %, а в контрольной группе частота составила 8,75% ($p = 0,22$). Данное исследование показало, что использование силденафилла улучшает рецептивность эндометрия. Авторы рекомендуют использование данного препарата при подготовке «тонкого» эндометрия у пациенток с неудачными попытками в программах ВРТ.

A. N. Fetih, D. M. Habib, I. I. Abdelaal и соавт., 2017, изучили влияние силденафила, добавленного в вагинальный гель кломифен цитрата на толщину эндометрия у пациенток с неудачными попытками стимуляции в анамнезе [61].

Пациентки были разделены на две группы: первая группа – пациентки, которые применяли кломифена цитрат, вторая группа – пациентки, которые использовали гель кломифена цитрата с добавлением синденафилас 7го дня менструального цикла до дня постановки ХГЧ. По результатам исследования толщина эндометрия в первой группе составила $6.6 \pm 1,4$ мм, во второй группе толщина эндометрия составила $9.3 \pm 3,1$ мм ($p < 0,001$), также наблюдалось усиление маточного кровотока по данным доплерометрии во второй группе. Частота наступления клинической беременности в первой группе составила 2,3%, против 8,4% во второй группе. Таким образом, применение силденафила увеличивает толщину эндометрия и усиливает маточный кровоток, что может явиться фактором для увеличения частоты наступления беременности у пациенток с «тонким» эндометрием [86].

В мировой практике включают в алгоритм предгравиданой подготовки эндометрия физиотерапевтические методы, которые оказывают позитивное влияние на маточную гемодинамику и приводит к увеличению частоты наступления беременности.

Одним из физиотерапевтических методов является нейромышечная электростимуляция (НМС) с помощью электродов, расположенных на коже. Исследователи из Китая проводили анализ эффективности переноса размороженных эмбрионов у пациенток с «тонким» эндометрием, неудачными попытками ЭКО в анамнезе, которым проводилась нейромышечная электростимуляция [82]. Пациентки были разделены на две группы: основная, в которой пациенткам проводили нейромышечную электростимуляцию совместно с применением гормональных препаратов и контрольная, в которой пациентки получали подготовку эндометрия только гормональными препаратами. У 60% пациенток, которым проводилась НМС толщина эндометрия после терапии составила 8 мм или более. Средняя толщина эндометрия до и после составила соответственно $5.6 \pm 0,82$ мм и $7.93 \pm 1,42$ мм в основной группе против $5.5 \pm 1,00$ мм и $6.78 \pm 0,47$ мм в контрольной группе; разница была статистически значимой ($p = 0,002$). Частота наступления

беременности в основной группе была выше (42% против 35%), но разница не была статистически значимой.

В 2014 году российскими исследователями М.Г.Шнейдерман, Е.А.Калинина, В.Ю.Смольникова и соавт. для подготовки женщин с «тонким» эндометрием к процедуре экстракорпорального оплодотворения использовали разработанный в ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» способ комбинированного негормонального лечения – обработка эндометрия смесью газов (CO₂ и N₂) [31]. Результат воздействия – улучшение кровообращения в слизистой и постепенное увеличение толщины базального и функционального слоя эндометрия. Для усиления эффекта параллельно применяли метод гинекологического массажа.

В исследование были включены 65 пациенток репродуктивного возраста (25–40 лет) с диагностированным первичным или вторичным бесплодием и наличием тонкого эндометрия, не поддающегося лечению другими методами. Группа А – 20 пациенток с диагнозом «бесплодие, тонкий эндометрий» получали орошение эндометрия смесью газов CO₂ и N₂ на 7, 9 и 11-й дни менструального цикла; группа В – 15 женщин параллельно с орошением эндометрия смесью газов CO₂ и N₂ прошли курс гинекологического массажа (5 процедур); группа С – 30 пациенток, составивших контрольную группу. В результате исследования, проведенного с участием 65 пациенток, удалось установить, что применение сочетанного метода лечения женщин с тонким эндометрием (орошение эндометрия смесью CO₂ и N₂ и гинекологического массажа) в процессе подготовки к процедуре ЭКО позволяет значительно увеличить толщину эндометрия (группа В – 11,1 мм по сравнению с группой С – 5,7 мм) и подготовить пациентку к последующему переносу эмбрионов, тем самым увеличивая шансы на положительный результат проводимой процедуры.

В диссертационной работе 2017 года Мелкозеровой О.А. описан комплекс лечебно-диагностических мероприятий в рамках разработанной концепции с применением внутриматочного орошения кавитационными

растворами. Применение данного комплекса мероприятий позволяет восстановить функциональные свойства и показатели рецептивности эндометрия у 85,9 % женщин, позволяет снизить ранние репродуктивные потери в 3,3 раза, способствует восстановлению фертильности у 69,34% женщин и завершению беременности родами живым ребенком у 50,53% пациенток репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия [15].

1.5. Особенности модуляции рецептивности эндометрия плазмой обогащенной тромбоцитами (PRP)

Терапевтическая основа использования богатой тромбоцитами плазмы в медицине основана способности факторов роста, цито- и хемокинов, содержащихся в тромбоцитах, запускать в тканях процессы биологического синтеза и регенерации при дегрануляции последних. Стандартизация использования PRP остается сложной перспективой из-за количества переменных, участвующих в его приготовлении и введении. Возможно, что индивидуально подобранные протоколы PRP на самом деле более полезны для наших пациентов [108].

Тромбоциты, как основные компоненты PRP, содержат более 1100 различных белков с многочисленными посттрансляционными модификациями, в результате чего образуется более 1500 биоактивных факторов на основе белка. Эти факторы включают мессенджеры иммунной системы, факторы роста, ферменты и их ингибиторы и другие факторы, которые могут участвовать в восстановлении тканей и заживлении ран. Еще одной важной характеристикой PRP является то, что он представляет собой аутологичный продукт, который готовится из собственной крови пациента. Таким образом, использование аутологичного PRP устраняет любые опасения по поводу риска перекрестного заражения, передачи заболевания или иммунных реакций [62,105].

Медиаторы тромбоцитов высвобождаются в альфа-гранулах, дельта-гранулах (плотных телах) и лямбда-гранулах. Описаны альфа-гранулы, высвобождающие более 300 белков, ответственных за коагуляцию, антикоагуляцию и фибринолиз, а также участвующих в воспалении, иммунитете, адгезии клеток и росте. Среди медиаторов, участвующих в свертывании, факторы V, XIII и IX, фибриноген и фактор фон Виллебранда. Антикоагулянтные белки включают антитромбин, белок S и ингибиторы пути тканевого фактора. Кроме того, многие факторы роста, включая тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста соединительной ткани (CTGF), стромальный фактор-1 альфа, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), факторы роста опухоли (TGFalpha, TGFbeta) и фактор роста фибробластов FGF-1, а также могут высвобождаться белки тимозин-бета4 и тромбоцидин 1, обладающие антибактериальными свойствами. В отличие от альфа-гранул, как содержание, так и функция дельта-гранул (плотных тел) гораздо менее разнообразны, а биоактивные амины (серотонин, гистамин), нуклеотиды, поли- и пирофосфаты участвуют в образовании и коагуляции сгустка. Лямбда-гранулы сравнимы с лизоцимами в других типах клеток, отвечают за деградацию белков, липидов и углеводов и, таким образом, участвуют в удалении клеточного мусора [67,87].

Влияние цитокинов и факторов роста на регуляцию процессов активации и стимуляции имплантации представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Функциональная активность основных факторов роста, входящих в состав PRP

Название фактора	Характеристика
PDGF — тромбоцитарный фактор роста	Активация миграции и пролиферации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, фибробластов, гладкомышечных клеток, остеобластов; активация миграции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов;

	активация макрофагов
TGF- β 1 — трансформирующий фактор роста	Индукция синтеза МКМ (компонентов межклеточного матрикса), регуляция пролиферации кератиноцитов и стимуляция продукции коллагена. Во время менструального цикла происходит экспрессия изоформы TGF- β в железистом эпителии во время секреторной фазы. Кроме того, TGF- β может играть определенную роль в имплантации путем стимулирование адгезии клеток трофобласта.
VEGF — фактор роста эндотелия сосудов	Стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза, стимуляция лимфоангиогенеза, повышение проницаемости сосудистой стенки. Полиморфизмы VEGF связаны с потенциалом имплантации в циклах ВРТ.
EGF — эпидермальный фактор роста	Стимуляция пролиферации эпителиальных, мезенхимальных клеток и фибробластов; стимуляция миграции и пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза; регуляция продукции коллагеназ
FGF — основной фактор роста фибробластов	Индукция пролиферации фибробластов; стимуляция роста эндотелиальных клеток; стимуляция ангиогенеза
GF — инсулиноподобный фактор роста	Стимуляция пролиферации фибробластов, синтез коллагена

Известно, что PRP играет критическую роль в пролиферации, регенерации и дифференцировке клеток благодаря наличию ряда GF, таких как VEGF, PDGF, EGF, TGF, IGF1 и других цитокинов, высвобождаемых при активации тромбоцитов в месте повреждения или воспаления [79]. Среди GFS VEGF также отвечает за васкуляризацию. Данные показывают, что PRP стимулирует пролиферацию различных клеток эндометрия, включая эпителиальные клетки, стромальные фибробласты эндометрия и мезенхимальные стволовые / прогениторные клетки эндометрия [36]. Добавление PRP значительно увеличивало пролиферацию клеток в линии стромальных клеток эндометрия человека (ICE7), и репликация эффектов наблюдалась при использовании первичных стромальных клеток. Мышиная модель также показала, что значительно увеличивается экспрессия Ki67 в эндометрии после лечения PRP [48]. Усиление экспрессии молекул адгезии и привлеченных стволовых клеток и увеличение миграции клеток эндометрия при инфузии PRP могут, в свою очередь, стимулировать рост и восприимчивость эндометрия [110, 36].

Действие PRP основано на терапевтически-регенеративной функции тромбоцитов и активных компонентов: цитокинов и факторов роста, которые высвобождаются при активации тромбоцитов. Однако на данный момент нет унифицированного алгоритма изготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами. Существуют одноступенчатые, двухступенчатые и модифицированные методы приготовления PRP [6,38,91].

Активация имеет решающее значение для функции тромбоцитов, которая включает сложное взаимодействие адгезии и сигнальных молекул. Факторами активации тромбоцитов являются: АДФ (Аденозиндифосфат), адреналин, серотонин, вазопрессин, тромбин, плазмин, фактор фон Виллебранда, коллаген. Активированные тромбоциты преимущественно участвуют в перекрестном разговоре с другими клетками крови и сосудов. Активированные тромбоциты позволяют рекрутировать лейкоциты в местах повреждения в условиях высокого сдвига. Полученные из тромбоцитов микрочастицы, а также

растворимые молекулы адгезии (sP-selectin, sCD40L) сбрасываемые с поверхности активированных тромбоцитов, способны активировать, в свою очередь, лейкоциты и эндотелиальные клетки [68].

Ранее PRP определялась как аутологичная концентрация тромбоцитов человека, которая в 3-5 раз превышает физиологическую концентрацию тромбоцитов в цельной крови. Но большинство клиницистов используют PRP без подсчета клеток в крови или препарате, чтобы подтвердить, что раствор действительно PRP. Растворимые белки, электролиты и гормоны плазмы необходимы для клеточной сигнализации и регуляции. Лейкоциты и эритроциты присутствуют в PRP и функционируют в воспалении, иммунитете и дополнительных клеточных сигнальных путях. Существует предположение о том, что не только тромбоциты играют роль в клинических реакциях PRP [37]. Поэтому в настоящее время PRP может быть определена, как объем плазмы, который имеет количество тромбоцитов выше исходного уровня, приготовленный центрифугированием периферической крови пациента [79].

В клинических наблюдениях показано, что PRP оказывает лечебное действие на эндометрий женщин при синдроме Ашермана и восстанавливает его нормальную гистологическую структуру и функцию [95,72]. Это связывают со способностью аутологичной PRP стимулировать рост эндометрия, повышать чувствительность к гормонам и способность к имплантации, улучшать васкуляризацию эндометрия, оказывать противовоспалительное и антибактериальное действие, стимулировать эндометриальные стволовые клетки [49].

Исследования показывают, что использование аутоплазмы, обогащенной растворимыми ростовыми факторами тромбоцитов (PRP), воздействует на процессы воспаления и репарации структур эндометрия. Ростовые факторы тромбоцитов, выброс которых происходит из везикулярно-тубулярной системы тромбоцитов, оказывают местный противовоспалительный и регенераторный эффект на поврежденный хроническим воспалением эндометрий.

Yajie Chang, Jingjie Li и соавт, 2015, оценили эффективность использования плазмы, обогащенной тромбоцитами совместно с препаратами стандартной заместительной гормональной терапии (ЗГТ) у пациенток с «тонким» эндометрием (менее 7 мм), которые имели в анамнезе отмену переноса эмбрионов в программе ЭКО в связи с плохой реакцией эндометрия на подготовку стандартной терапией. Пять пациенток получали внутриматочную аппликацию собственной плазмой, обогащенной тромбоцитами на 10й день ЗГТ, если толщина эндометрия не увеличивалась через 72 часа, проводилась повторная внутриматочная инфузия. Перенос эмбрионов осуществлялся при достижении эндометрия более 7 мм. По наблюдению авторов исследования у всех пациенток наступила клиническая беременность [44].

Leila Nazari, Saghar Salehpour M.D. и соавт, опубликовали пилотное исследование, в котором оценивалась эффективность применения плазмы, обогащенной тромбоцитами у пациенток в криоцикле. Двадцать пациенток были отобраны для проведения внутриматочной инфузии 0,5 мл собственной плазмы, обогащенной тромбоцитами. Внутриматочную аппликацию проводили за 48 часов до переноса размороженных бластоцист. По результатам исследования у 18 пациенток были зарегистрированы биохимические беременности. У одной пациентки беременность осложнилась прерыванием беременности на раннем сроке. У одной пациентки беременность осложнилась пузырным заносом, у 16 пациенток зарегистрированы клинические беременности. По результатам исследования установлено, что плазма, обогащенная тромбоцитами эффективна для улучшения исхода беременности в криоцикле [91].

Локальное применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, повышает частоту успешной имплантации эмбриона при проведении процедур ВРТ на 15–25% по сравнению с традиционными протоколами [6, 92].

Несмотря на большой потенциал применимости, реализация терапевтического применения PRP в качестве клинической альтернативы стала затруднительной из-за отсутствия исследований, связанных со стандартизацией методик и /или недостаточного описания принятых процедур. Поэтому необходимо установить стандартные критерии, которым будут следовать для получения PRP. В исследованиях, посвященных применению внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами (плазмотерапия) в программах ВРТ, не рассматривается механизм влияния на рецептивность эндометрия по микроскопической и иммуногистохимической картине эндометрия. Необходимо большее количество исследований, которые позволят расширить представления о влиянии плазмотерапии на эндометрий пациенток, проходящих программы ВРТ, а так же сформировать группы пациенток, которым показано проведение данной процедуры.

Резюме

Несмотря на тридцатилетнюю историю существования вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) уже многие годы эффективность проведения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не меняется и остается на уровне 30-42%.

На долю маточного фактора в изолированном или сочетанном варианте приходится до 62% всех случаев бесплодия и до 77,5 % неэффективных попыток ЭКО. Известно, что частота встречаемости патологических изменений эндометрия при бесплодии достигает 88%, при неэффективных попытках ЭКО – 77,5%

Патологические состояния слизистой матки подразделяются на дисгормональные (сопровождающиеся гиперпластическими, дистрофическими и атрофическими процессами), воспалительные и опухолевые. У женщин, страдающих бесплодием, основное место в структуре патологии эндометрия занимают дисгормональные и воспалительные заболевания. Современные

исследования показали, что частота хронического эндометрита у пациенток с бесплодием колеблется в пределах 0,2-46 %. У женщин с привычным невынашиванием беременности после процедуры ЭКО он выявлялся в 14 % случаев. При этом у женщин с эндометритом регистрировалась более низкая частота имплантации (11,5 %) по сравнению с женщинами, у которых воспалительные изменения слизистой отсутствовали (32,7 %). У пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе наиболее часто выявляется хронический эндометрит (24% против 6%), чем у пациенток, которые начали лечение бесплодия методами ВРТ.

Нарушение полноценной имплантации человеческого эмбриона в связи с нерецептивным эндометрием является наиболее значимой причиной репродуктивных неудач ВРТ, занимая в их структуре до 70%. Потому в последние годы в фокусе научного интереса находятся исследования, посвященные изучению рецептивности эндометрия при патологии имплантации, связанной с бесплодием.

Возможности иммуногистохимических, гистологических, микроскопических исследований позволяют приблизиться к формированию знаний о маркерах успешной имплантации.

При повторных неудачах имплантации в строме эндометрия определяется дисбаланс ER и PR (снижение стероидной рецепции или гиперэкспрессия ER). При соотношении PR/ER в диапазоне от 2 до 3 вероятность наступления беременности в программах ВРТ была максимальной.

Одним из важнейших маркеров тканевого уровня рецептивности эндометрия являются пиноподии – выросты на апикальной части поверхности мембран желез эндометрия в середине лютеиновой фазы менструального цикла. С. Quinn et al. (2009) выделили пиноподии в качестве ключевых ультраструктурных образований, участвующих в формировании рецептивности, поскольку на их поверхности в наибольшем количестве экспрессируется LIF (leukemia inhibitory factor) – маркер

рецептивности эндометрия. Увеличение уровней LIF и LIFR имеют важное значение для имплантации эмбрионов.

Нарушение регуляции числа uNK и/ или функции клеток (цитотоксичность, экспрессия рецепторов, секреция цитокинов или экспрессия генов) связаны с репродуктивными неудачами, такими как бесплодие и привычное невынашивание беременности. Увеличение количества CD34+ в эндометрии может являться маркером успешной имплантации у пациенток с бесплодием и неудачными попытками переноса эмбриона в анамнезе.

Корреляция между рецептивностью и толщиной эндометрия, как фактор нарушения имплантации, упоминается во многих исследованиях [32, 91, 112, 72, 61]. Принято считать, что его толщина менее 7 мм дает минимальные шансы на продуктивное зачатие в программах ВРТ.

Методы лечения, направленные на увеличение толщины и улучшения рецептивности эндометрия в программах ВРТ, включают в себя назначение препаратов эстрадиола в больших дозах, аспирина, хирургические вмешательства, физиотерапевтические процедуры. Однако, как показывает практика, не всегда эти методы приводят к желаемым результатам, и необходимы поиски новых подходов к решению проблемы нерецептивного эндометрия и дальнейшие научно-практические исследования.

Метод коррекции рецептивности эндометрия плазмой, обогащённой тромбоцитами основан на терапевтически-регенеративной функции тромбоцитов и активных компонентов: факторов роста, цито- и хемокинов, содержащихся в тромбоцитах, которые запускают в тканях процессы биологического синтеза и регенерации при дегрануляции последних. Стандартизация использования PRP остается сложной перспективой из-за количества переменных, участвующих в его приготовлении и введении. Возможно, что индивидуально подобранные протоколы PRP на самом деле более полезны для наших пациентов

Существует предположение о том, что не только тромбоциты играют роль в клинических реакциях PRP. Поэтому в настоящее время PRP может

быть определена, как объем плазмы, который имеет количество тромбоцитов выше исходного уровня, приготовленный центрифугированием периферической крови пациента.

Несмотря на большой потенциал применимости, реализация терапевтического применения PRP в качестве клинической альтернативы стала затруднительной из-за отсутствия исследований, связанных со стандартизацией методик и /или недостаточного описания принятых процедур. Поэтому необходимо установить стандартные критерии, которым будут следовать для получения PRP. В исследованиях, посвященных применению внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами (плазмотерапия) в программах ВРТ, не рассматривается механизм влияния на рецептивность эндометрия по микроскопической и иммуногистохимической картине эндометрия. Необходимо большее количество исследований, которые позволят расширить представления о влиянии плазмотерапии на эндометрий пациенток, проходящих программы ВРТ, а так же сформировать группы пациенток, которым показано проведение данной процедуры.

Материалы главы 1 опубликованы в следующих работах:

1. **Храмцова, А.Ю.** Современный взгляд на проблему «тонкого» эндометрия: пути решения в программах ВРТ (обзор литературы) / **А.Ю. Храмцова, Н.В. Башмакова** // Проблемы репродукции. -2019.- № 4.-С. 69-76.
2. Башмакова, Н.В. Инновационные методы повышения эффективности ВРТ / Н.В. Башмакова, **А.Ю. Храмцова**, И.А. Газиева, И.В. Рябухин // Status Praesens. – 2021.- № 3. - С. 39-43.
3. Подана в публикацию рукопись статьи, в журнал «Лечение и профилактика» : Башмакова, Н.В. Патогенетические аспекты нарушения имплантации человеческого эмбриона в программах ВРТ / Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, **А.Ю. Храмцова**, А.А. Гришкина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Настоящее исследование было проведено в период с 2018 по 2022 гг. на базе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор Г.Б. Мальгина).

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России. В соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра (принятой на 18-й Генеральной ассамблее Всемирной медицинской ассоциации WBA в июне 1964г., протокол №5 от 08.10.2019 г.), у всех пациенток и/или их законных представителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на участие в исследовании и использование биологического материала. Для решения поставленных в настоящей работе цели и задач были определены основные методологические подходы и сформирован дизайн исследования, представленный на рисунке 1.

В исследование были включены 200 пациенток (рисунок 1). Целью первого этапа исследования являлась оценка эффективности программ ВРТ (стимулированный цикл ЭКО и перенос криоконсервированных эмбрионов) с применением плазмотерапии и без внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе. В основную группу были включены 88 пациенток, с неудачными попытками переноса эмбриона в анамнезе, которым проведена в цикле переноса плазмотерапия. Основную группу 1 составили 23 женщины, проходящих программу ЭКО в отделении ВРТ ФГБУ НИИ ОММ МЗ РФ (руководитель – д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ Башмакова Н.В.), которым проведена плазмотерапия в день пункции фолликулов и на 3е сутки

развития эмбрионов. Вторую основную группу составили 65 женщин, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона.

В группу сравнения были включены 90 пациенток с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ с переносом эмбрионов без проведения плазмотерапии: 36 пациенток, проходящих программу ЭКО (3 группа) и 54 пациентки (4 группа), которым проводился перенос криоконсервированных эмбрионов.

Цель второго этапа исследования изучить влияние внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами на эндометрий пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе. Пациентки второй основной группы (65 женщин) были разделены на подгруппы (а и б). У 40 пациенток (группа 2а) проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона размороженного эмбриона без пайпель-биопсии эндометрия. Во второй группе у 25 пациенток (2б группа) проводилась гистологическая диагностика рецептивности эндометрия (взятие биоптата эндометрия - пайпель-биопсия) до программы ВРТ (на 18 – 22 день менструального цикла) и во время программы за 48 часов до переноса эмбрионов (в день второго введения плазмы).

5 группу (контрольную) составили 32 гинекологически здоровые женщины. Данные пациентки обратились по вопросам планирования беременности, которым проведена пайпель-биопсия и диагностика эндометрия на 18 -22 день менструального цикла.

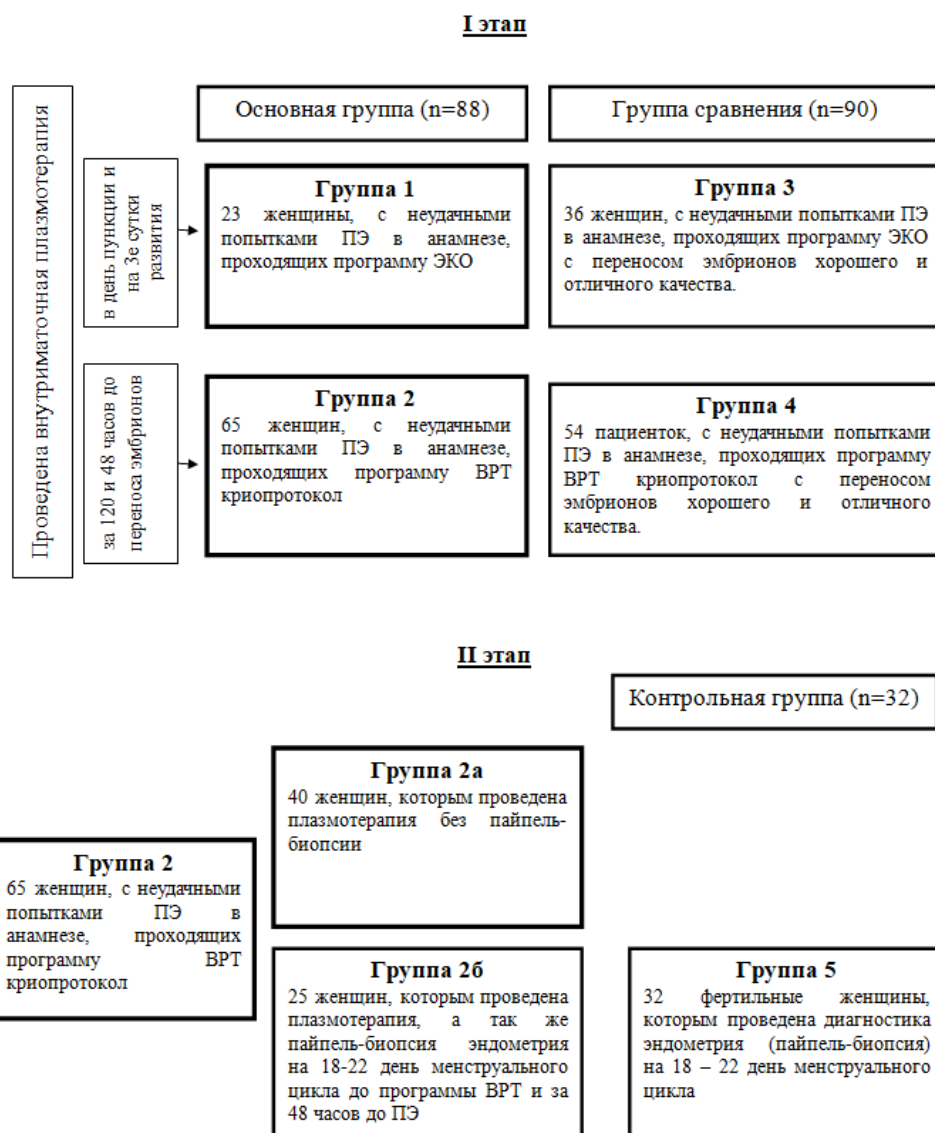


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Критериями включения (общие для 1-5 группы) пациенток являлись:

1. репродуктивный возраст (возраст женщин 18-45 лет);
2. ИМТ 19-30;
3. регулярный овуляторный менструальный цикл;
4. нормальный уровень гормонов гипоталамо-гипофизарной системы, стероидных гормонов яичников, гормонов надпочечников, щитовидной железы в сыворотке крови;
5. письменное информированное согласие пациентки на участие в исследовании;
6. уровень АМГ выше 1 нг/мл;

Критерии включения в 1-4 группы:

1. протокол контролируемой овариальной стимуляции (КОС) модифицированный короткий протокол с ант-ГнРГ, проведено ЭКО;
2. криопротокол с ЗГТ;
3. неудачная попытка/попытки переноса эмбриона/ов.

Критерии включения в 5 группу:

1. женщины, имеющие в анамнезе срочные роды через естественные родовые пути без отклонения от физиологического течения беременности и родового акта, закончившиеся рождением здоровых детей.

Критерии исключения (общие):

- наличие тяжелой экстрагенитальной патологии;
- ВИЧ-инфекция, гепатит В, С, контакты с данной группой пациентов;
- ИМТ менее 19, более 30;
- злокачественные опухоли любой локализации;
- прием противомикробных, иммуномодулирующих препаратов в течение последних 4-х месяцев;
- наличие тяжелой патоспермии у супруга.

Критерии исключения в 5 группу:

- применение методов вспомогательных репродуктивных технологий;
- невынашивание беременности в анамнезе.

Обследование пациенток проводили в соответствии с приказами Минздрава России № 572н от 1 ноября 2012 г. "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)»; № 107 н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»; № 803н от 31 июля 2020г ". О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению"; № 556н от 30 октября 2012 г. «Об

утверждении стандарта медицинской помощи при бесплодии с использованием вспомогательных репродуктивных технологий».

Учитывая наличие в исследовании женщин, проходящих программы ВРТ: циклы ЭКО и криоциклы переносов эмбрионов, сравнение групп распределились следующим образом:

- 1 группа и 3 группа (циклы ЭКО с и без плазмотерапии);
- 2а и 2б группа (крио ПЭ с плазмотерапией, с и без пайпель-биопсии);
- 2 и 4 группы (циклы крио ПЭ с и без плазмотерапии);
- 2б и 5 группа (группы с исследование эндометрия с плазмотерапией у пациенток с бесплодием и без плазмотерапии у фертильных женщин);

2.2. Методы исследования

2.2.1. Клинико-статистический анализ

Клиническую оценку состояния здоровья обследованных женщин проводили с помощью разработанной статистической карты. Анамнестические данные получены в результате личного собеседования с пациентками, дополнительные сведения получены из индивидуальных карт пациента, выписок из истории болезней.

Анамнестическая оценка женщин групп наблюдения включала изучение подробный анализ реализации репродуктивной функции. Подробно изучались данные о гинекологических заболеваниях пациентки. Экстрагенитальные заболевания выявлялись в результате опроса пациенток, изучения выписок из амбулаторных карт.

Физическое развитие пациенток оценивали по результатам антропометрии. Определяли индекс массы тела, рассчитывая его по методу Брея как соотношение массы в килограммах к длине тела в метрах, возведенных в квадрат.

Предшествующее количество переносов эмбрионов хорошего и отличного качества оценивали при опросе пациентки, анализе

эмбриологических карт, выписок из индивидуальных карт пациенток и фиксировалось в статистической карте.

Клинико-лабораторное обследование пациенток было проведено согласно приказам № 107 и № 803 МЗ РФ "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

2.2.2. Ультразвуковое сканирование органов малотазы

В группах 1-4 пациенткам проводилось УЗИ органов малого таза на аппарате Voluson 8 (GeneralElectric®, США) с использованием трансвагинального конвексного датчика. УЗИ органов малого таза проводилось на 18-22 день менструального цикла, предшествующего программе ВРТ, на 2-4 день менструального цикла, 8-10 день менструального цикла, 12-16 день менструального цикла, день пункции или первый день применения препаратов прогестерона в криоцикле, на третьи сутки развития эмбрионов или на 3е сутки применения препаратов прогестерона, в день переноса эмбрионов, а также через 21 день после переноса эмбрионов для фиксации клинической беременности. При проведении ультразвукового исследования органов малого таза оценивали положение матки в полости малого таза; ее форму, структуру миометрия, констатировали наличие врожденных пороков развития матки (седловидная, двурогая и др.) миоматозных узлов и аденомиоза, рубца на матке, исключали патологию шейки матки, маточных труб. Кроме того, оценивали состояние фолликулярного аппарата яичников, динамику роста и размер фолликулов, исключали наличие объемных образований яичников. Перед переносом эмбрионов ультразвуковым методом исключался риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (наличие свободной жидкости в малом тазу, размер яичников). Особое внимание уделяли исследованию срединного маточного М-эхо. Определяли его толщину, структуру, симметричность,

контуры, наличие включений, а также оценивали состояние полости матки (наличие жидкостного и экзогенного содержимого, инородных тел).

За нормальное состояние М-эхо принимали ультразвуковую картину: полость матки сомкнута, не содержит инородных тел, гипо- или гиперэхогенного содержимого, ровное, симметричное, однородной структуры и одинаковой толщины на всем протяжении, отсутствие гиперэхогенных включений, соответствие его структуры дню менструального цикла.

Пациенткам 5 группы для исключения патологии полости матки и эндометрия проводилось УЗИ органов малого таза на 2-4 день менструального цикла и на 18-22 (в день взятия пайпель-биопсии).

2.2.3. Гистологическое исследование

Проводилась световая (обзорная) микроскопия биоптатов эндометрия, полученных при биопсии эндометрия на 18-22 день менструального цикла у пациенток 5 группы, у пациенток 2б группы на 18-22 день менструального цикла предшествующего программе ВРТ и на 3е сутки применения препаратов прогестерона. Материалы биоптатов эндометрия для гистологического исследования фиксировали в 10% нейтральном формалине, заключали в парафин, делали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином Карazzi и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону (BioVitrum, Россия).

На гистологических препаратах оценивалась структура эндометрия (состояние стромы, железистого аппарата, соответствие эндометрия фазе менструального цикла, развитие сосудов стромы эндометрия). Особое внимание уделялось оценке наличия пиноподий, плотности их распространения, степени их развития в соответствие с фазой менструального цикла, акселерации или гипоплазии пиноподий. Диагностировались воспалительные изменения, острые нарушения кровообращения и дистрофические изменения в исследуемых структурах.

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли при оптимальном увеличении на микроскопах AxioPlan 2 («CarlZeissJena», Германия) и LiecaDM 2500 (LeicaMicrosystems, Германия), с использованием цифровой фотокамеры («CarlZeissJena», Германия).

Для определения выраженности секреторной трансформации желез использовали морфометрическую оценку среднего количества поперечных срезов желез на поле зрения при увеличении $\times 400$, площадь, периметр, средние ширину и высоту желез с использованием программы «AxioVision» и «ZEN».

Состояния рецептивности эндометрия оценивалось на микроскопах AxioPlan 2 («CarlZeissJena», Германия) и LiecaDM 2500 (LeicaMicrosystems, Германия) по количеству и высоте пиноподий различной степени зрелости в поверхностном эпителии. При микроскопии выделяли низкие пиноподии, имеющие вид низких куполообразных выпячиваний и реснитчатых цитоплазматических образований на апикальной поверхности эпителиоцитов; высокие пиноподии, которые выглядели как цилиндрические или булавовидные выпячивания апикальной поверхности эпителиоцитов. При микроскопии контур цитоплазматической мембраны у таких клеток был четкий, в цитоплазме визуализировались мелкие вакуоли. В части эпителиоцитов пиноподии были разрушены и выглядели как бледные нитевидные выросты, напоминающие апокриновую секрецию [8]. Измерение высоты пиноподий проводили путем измерения от апикальной поверхности до верхушки не менее, чем в 10 полях зрения, и выводили среднее значение. В зависимости от площади, занимающей эпителиальный покров, пиноподии характеризовались как избыточные (более 50 %), умеренные (от 20 до 50 %) и невыраженные (менее 20 %) [40]

Исследование проводили в отделении иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ НИИ ОММ МЗ РФ (руководитель – д.м.н., профессор Чистякова Г.Н.).

2.2.4. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование эндометрия

Эндометрий для исследования был взят на 18-22 день менструального цикла у пациенток 5 группы, у пациенток 26 группы на 18-22 день менструального цикла предшествующего программе ВРТ и за 48 часов до переноса эмбрионов. Определялось состояние рецепторного аппарата, локального иммунитета, пролиферативной активности, апоптоза, ангиогенеза, лимфоангиогенеза, рецептивности эндометрия.

При оценке иммуногистохимических показателей использовали «двухэтапный стрептавидин-биотин-пероксидазный метод с демаскировкой антигена» с помощью стандартных наборов моноклональных и поликлональных антител фирмы «BondRTUPrimary» США, с использованием иммуногистостейнера закрытого типа Bond-MAX (Leica, Германия). Проявление реакции «антиген-антитело» осуществлялось системой визуализации «DakoCytomation» (Дания). Для визуализации первичных антител использовали безбиотиновую систему детекции SuperSensitivePolymer-HRP DetectionSystem (Biogenex США).

В эндометрии определяли выраженность экспрессии рецепторов к ER (клон 6F11, разведение 1:50, производство Bond RTU Primary), PR (клон 16, разведение 1:50, производство Bond RTU Primary), LIF (производство Invitrogen (США), разведение 1:100), CD34+ (клон 8G12). В биоптатах слизистой оболочки матки были исследованы показатели ангиогенеза – маркер эндотелия сосудов (CD34+) (клон QBEnd/10, в стандартном разведении 1:25, производство Bond RTU Primary), маркеры пролиферации Ki67 (клон MM1, BondRTUPrimary, Германия) (таблица 2).

Для иммуногистохимического исследования использовали серийные парафиновые срезы. Результаты реакции рецепторов к эстрогенам и прогестеронам идентифицировались по ядерному или мембранному окрашиванию клеток в коричневый цвет для соответствующих маркеров с оценкой процента окрашенных клеток и интенсивностью окраски клеток.

Экспрессию рецепторов к эстрогену, прогестерону оценивали по 3-х балльной шкале (слабая, средняя и выраженная степени).

Для оценки уровня экспрессии антигенов Ki67 в железах применяли индексы пролиферации и апоптоза, которые рассчитывались отношением количества окрашенных ядер клеток к общему числу ядер (при подсчете не менее 400 ядер) и выражались в процентах; экспрессию в ядрах стромальных клеток оценивали путем подсчета количества окрашенных ядер в поле зрения при увеличении $\times 400$, при этом изучали не менее 10 полей зрения.

Экспрессия CD34+ отмечалась в виде темно-коричневого окрашивания только в эндотелиальных клетках и оценивалась путем подсчета сосудистых щелей в поле зрения при увеличении $\times 400$ при оценке не менее 10 полей зрения.

Экспрессию LIФопределяли на мембранах клеток поверхностного эпителия, эпителия желез и клеток стромы эндометрия путем подсчета процента окрашенных ядер в поле зрения при увеличении $\times 400$, при этом изучали не менее 10 полей зрения. Реакция считалась положительной, когда клетки были окрашены в коричневый цвет. Процент положительно окрашенных клеток измеряли в каждом фрагменте. Интенсивность окрашивания оценивали с использованием балльной шкалы от 0 до 3: оценка 0 – нет окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2 – умеренное окрашивание; 3 – интенсивное окрашивание. H-score определялся как $\sum x_i (i + 1)$ положительного процента клеток и интенсивности окрашивания [83].

Для анализа результатов ИГХ реакций использовали метод гистологического счета H-score по формуле: $HS=1a+2b+3c$, где a – % слабо окрашенных клеток, b – % умеренно окрашенных клеток, c – % сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах.

Таблица 2 - Моноклональные и поликлональные антитела, использованные для ИГХ:

Показатель	
ER α , клон 6F-11	Рецепторы альфа к эстрадиолу
PR, клон 16	Рецепторы А к прогестерону
CD34, клон QVEnd/10	Маркер эндотелиальных клеток и клеточной адгезии
Ki67, клон SP6	Маркер клеточной пролиферации
LIF, поликлональные	Лейкемию ингибирующий фактор, маркер рецептивности

Исследование проводили в отделении иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ НИИ ОММ МЗ РФ (руководитель – д.м.н., профессор Чистякова Г.Н.).

2.2.5. Клинические анализы и гормональное исследование крови

На 2-5 день менструального цикла оценивали содержания лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), эстрадиол (Э), антимюллеров гормон (АМГ). Все гормональные исследования проводились на иммунохимическом анализаторе «Access 2» компании BeckmanCoulter (США).

Оценка содержания тромбоцитов в периферической крови оценивалась на автоматических гематологических анализаторах «BC-5300» и «BC-5150» фирмы «Mindray» (КНР), унифицированными методами.

Образцы плазмы женщин для внутриматочной аппликации исследовались на автоматических гематологических анализаторах «BC-5300» и «BC-5150» фирмы «Mindray» (КНР), унифицированными методами для определения количества элементов крови, вводимых в полость матки.

Внутривенный забор крови проводился натощак, в день процедуры внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами (плазмотерапия) с соблюдением норм асептики и антисептики. Кровь набирали в вакуумную пробирку 4 мл с цитратом натрия 3,8% (пробирка для коагулологических исследований).

Пробирку с кровью подвергали центрифугированию при 1500 об/мин в течение 5 минут происходит отделение эритроцитов. По окончании центрифугирования содержимое пробирки разделяется на две части: верхняя - желтого цвета (плазма), нижняя – красного цвета (конгломерат форменных элементов, в том числе эритроцитов). Плазму набирают шприцом в катетер для внутриматочных инсеминаций (переносов эмбрионов) в объеме 0,8-1 мл и в пробирку без наполнителя в объеме 0,3-0,5 мл для проверки количества вводимых тромбоцитов. Внутриматочное введение проводят в циклах ЭКО в день пункции и на 3 сутки развития эмбрионов, в криоцикла за 120 и 48 часов до предполагаемого переноса эмбрионов.

В образцах плазмы определяли количественное содержание компонентов крови: тромбоцитов, лейкоцитов.

2.2.6. Морфологическая оценка качества эмбрионов

Оценка качества переносимых эмбрионов на пятые сутки развития и размороженных эмбрионов проводилась согласно методическим рекомендациям РАРЧ[22]. Оценка бластоцист базируется на анализе клеток трофэктодермы, внутренней клеточной массы и размера полости. Пациенткам переносили эмбрионы выше 2 стадии развития и только хорошего, отличного качества с буквенными обозначениями А и В (таблица 3).

Таблица 3 - Рекомендуемая классификация для оценки эмбрионов человека на стадии бластоцисты

Оценка клеток внутренней клеточной массы	
A	Плотно упакованная масса клеток, много клеток
B	Неплотно сгруппированная масса клеток, немногочисленные клетки
C	Внутренняя клеточная масса выражена слабо или отсутствует
Оценка клеток трофэктодермы	
A	Много клеток формируют сплошной эпителий, клетки одинаковой округлой формы, плотно прилегают друг к другу
B	Немногочисленные клетки образуют неплотный эпителий, размер клеток разный, единичные вытянутые клетки
C	Трофэктодерма представлена несколькими сильно вытянутыми клетками, внутри клеток дегенеративные фрагменты

2.2.7. Математические методы

Статистическую обработку результатов исследований проводились с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel» (2010), «Stat Soft Statistica 6.0» (StatSoft, США), SPSSStatistics версия 22.0 (IBMMicrosoft, США). В случае подчинения распределения признака закону нормального распределения данные представляли в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m). При отклонении распределения признака от закона нормального распределения, данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го перцентилей, P25-P75).

Сравнение непрерывных количественных данных проведено с использованием t-критерий Стьюдента. Для сравнения бинарных данных применялся либо точный критерий Фишера (F-критерий), либо критерий Пирсона (χ^2) с поправкой Йетса (если абсолютные частоты были меньше 10).

Нулевая гипотеза отклонялась при $p < 0,05$. На этапе множественных сравнений (больше двух групп) полученные значения уровня значимости корректировались поправкой Бонферрони.

Качественные признаки представляли в виде абсолютного значения и относительной величины в процентах, оценку статистической значимости осуществляли с использованием критерия хи-квадрат (χ^2). Р – критический уровень значимости различий устанавливали равным 0,05 (критерий Краскела-Уоллиса) и $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона), при этом все расчеты выполняли с введением поправки Бонферони. Для оценки ранговых корреляционных связей между качественными и количественными признаками использовали коэффициент корреляции Тау-бКендалла. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$. Программы «StatSoftStatistica 6.0» и «SPSSStatistics версия 22.0» представляет результаты в форме 0,000, если выводимые величины малы (меньше 0,001).

Для разработки моделей прогноза эффективности в программах ВРТ при использовании плазмотерапии использовали дискриминантный анализ по имеющейся (обучающей) выборке объектов.

Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического метода по Спирмену в рамках программы «SPSSStatistics версия 22.0». Расчет решающего правила прогноза производился методом логистической регрессии.

Определение чувствительности (Se) и специфичности (Sp) всех переменных входящих в математическую модель, результирующего значения математической модели и выбор порога отсечения вычислены в ROC анализе программы «SPSSStatistics версия 22.0».

Проверка математической модели проведена на экзаменационной выборке в модели нейронной сети программы «SPSSStatistics версия 22.0».

Данные об общем количестве выполненных исследований приведены в таблице (таблица 4).

Таблица 4 – Общее количество произведенных исследований

Методы исследования	Количество
Клинико-статистический анализ	200
Ультразвуковое исследование органов малого таза	1040
Гистологическое исследование эндометрия	82
Иммуногистохимическое исследование эндометрия	82
Клинический анализ плазмы	176
Клинический анализ крови	176
Содержания ФСГ, ЛГ, Эстрадиол, АМГ в крови	200

Материалы главы 2 опубликованы в следующих работах:

1. Пат. 2762159 Рос. Фед. Способ внутриматочной инфузии аутологичной плазмы женщины для повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / **А.Ю. Храмцова**, Н.В. Башмакова, И.А. Газиева, Г.Н. Чистякова, А.А. Гришкина.- Москва, 2021.- 5 с.

ГЛАВА 3. КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗУЧАЕМЫХ ГРУПП

3.1. Характеристика соматического и акушерско-гинекологического анамнеза пациенток в группах наблюдения

В соответствии с критериями ВОЗ репродуктивный возраст женщин составляет от 15 лет усредненного времени начала менархе до 45 лет, когда снижается функция яичников и наступает менопауза. Поскольку на протяжении данного периода функция яичников и репродуктивный потенциал женщин меняется, акушеры гинекологи подразделяют репродуктивный возрастной период женщины на ранний (18-24 года), средний (25-34 года) и поздний (35-44 года).

Средний возраст пациенток всех групп находится в пределах 33-34 лет (таблица 5). Большая часть женщин являются представительницами среднего возрастного периода (25-34 года). Статистически значимых различий по возрасту женщин не было выявлено.

Таблица 5 – Возраст обследованных женщин сравниваемых групп, абс(%)

Возраст женщин (лет)	1 группа (n=23)	2 группа(n=65)		3 группа (n=36)	4 группа (n=54)	5 группа (n=32)	Значимость (p)
		2а группа (n=40)	2бгруппа (n=25)				
Менее 25	0 (0 %)	1 (2,5%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	$p_{1-3}=1$ ($\chi^2=\text{nan}$) $p_{2-4}=0,194$ ($\chi^2=1,69$) $p_{2a-2б}=0,734$ ($\chi^2=0,116$) $p_{1-2}=0,395$ ($\chi^2=0,724$) $p_{2б-5}=0,254$ ($\chi^2=1,303$)
25–34	8 (34,8 %)	24 (60 %)	14 (56 %)	22 (61,1%)	31 (57,4%)	18 (56,3 %)	$p_{1-3}=0,049$ ($\chi^2=3,892$) $p_{2-4}=0,908$ ($\chi^2=0,013$) $p_{2a-2б}=0,751$ ($\chi^2=0,101$) $p_{1-2}=0,051$ ($\chi^2=3,818$) $p_{2б-5}=0,985$ ($\chi^2=0,000$)

35–44	15 (65,2 %)	15 (37,5)	10 (40 %)	14 (38,9%)	23 (42,6%)	14 (43,7 %)	$p_{1-3}=0,049 (\chi^2=3,892)$ $p_{2-4}=0,648 (\chi^2=0,209)$ $p_{2a-2б}=0,841 (\chi^2=0,041)$ $p_{1-2}=0,027 (\chi^2=4,905)$ $p_{2б-5}= 0,776 (\chi^2=0,081)$
Средний возраст	34,78±3,87	33,25±4,56	33,56±4,69	33,34±3,10	33,15±4,16	34,6±5,7	$p_{1-3}=0,079 (t=0,894)$ $p_{2-4}=0,851 (t=0,999)$ $p_{2a-2б}=0,176 (t=0,611)$ $p_{1-2}=0,107 (t=0,242)$ $p_{2б-5}= 0,963 (t=0,016)$

Примечание:

1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;

2 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2а группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2б группа-пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ).

3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКОс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротоколс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

5 группа - фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия;

* Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется $0,05/5=0,01$

В ходе работы проанализирована структура бесплодия в каждой группе пациенток (таблица 6).

Таблица 6 – Структура факторов бесплодия в сравниваемых группах, абс (%)

Фактор бесплодия (МКБ-10)	Всего пациенток (n/%)	1 группа (n=23) (n/%)	2 группа(n=65)		3 группа (n=36) (n/%)	4 группа (n=54) (n/%)	Значение критерия χ^2	Значимость (p)
			2а группа (n=40) (n/%)	2б группа (n=25) (n/%)				
N97.0	42 (23,6%)	2 (8,7%)	13 (32,5%)	7 (28%)	7 (19,4%)	13 (24%)	$1-3=0,362$ $2-4=3,827$ $2a-2б=0,345$ $1-2=4,906$	$p_{1-3}=0,547$ $p_{2-4}=0,050*$ $p_{2a-2б}=0,557$ $p_{1-2}=0,027*$
N97.1	71 (39,9%)	6 (26,1%)	16 (40%)	12 (48%)	20 (55,4%)	17 (31,5%)	$1-3=3,568$ $2-4=2,446$ $2a-2б=0,698$ $1-2=0,883$	$p_{1-3}=0,059$ $p_{2-4}=0,118$ $p_{2a-2б}=0,403$ $p_{1-2}=0,347$

N97.4	25 (14%)	5 (21,75%)	5 (12,5%)	3 (12%)	2 (5,6%)	10 (18,5%)	1-3=3,422 2-4=3,53 2a-2б=0,004 1-2=2,41	p ₁₋₃ =0,064 p ₂₋₄ =0,057 p _{2a-2б} =0,952 p ₁₋₂ =0,12
N97.8	15 (8,5%)	3 (13%)	2 (5%)	2 (8%)	2 (5,6%)	6 (11,1%)	1-3=2,152 2-4=0,942 2a-2б=0,24 1-2=2,596	p ₁₋₃ =0,142 p ₂₋₄ =0,332 p _{2a-2б} =0,624 p ₁₋₂ =0,107
Сочетанные	18 (10,1%)	5 (21,75%)	2 (5%)	1 (4%)	4 (11,2%)	6 (11,1%)	1-3=1,226 2-4=1,78 2a-2б=0,035 1-2=6,028	p ₁₋₃ =0,268 p ₂₋₄ =0,182 p _{2a-2б} =0,852 p ₁₋₂ =0,014*
Комбинированные	7 (3,9%)	2 (8,7%)	2 (5%)	0 (0%)	1 (2,8)	2 (3,8%)	1-3=0,965 2-4=1,155 2a-2б=1,29 1-2=1,236	p ₁₋₃ =0,326 p ₂₋₄ =0,282 p _{2a-2б} =0,256 p ₁₋₂ =0,266

Примечание:

1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;

2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2б группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ).

3группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКОс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротоколс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

* p<0,05; ** Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется 0,05/4=0,0125

Наиболее частый фактор бесплодия во всех четырех группах являлся женское бесплодие, трубного происхождения(N97.1)(более 26 % в группах). Следующими по частоте являются женское бесплодие, связанное с мужскими факторами(N97.4) и с отсутствием овуляции (N97.0). Статистически значимых различий распределения по факторам бесплодия было выявлено между 2 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 4 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества) группами, а также 1(пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена

плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) и 2(пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) группами (по фактору женское бесплодие, связанного с отсутствием овуляции) ($p < 0,05$). Статистические значимые различия в структуре бесплодия выявлено при сочетанной форме, (когда встречались сочетания женского бесплодия трубного происхождения и другие факторы или трубного происхождения и связанное с отсутствием овуляции) между 1(пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) и 2 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) группами. Однако во всех случаях статистически значимых различий не было выявлено поправкой Бонферрони.

У женщин, проходящих программу ВРТ (1-4 группы), в анамнезе были неудачные попытки переноса эмбрионов хорошего и отличного качества. Среднее количество неудачных переносов представлено в таблице 7.

Таблица 7 –Среднее количество неудачных переносов в анамнезе

1 группа (n=23)	2 группа(n=65)		3 группа (n=36)	4 группа (n=54)	t-критерий Стьюдента	Значимость (p)
	2а группа (n=40)	2бгруппа (n=25)				
2,48±1,12	2,25±0,97	2,52±1,00	2,11±1,03	2,07±0,88	1-3=0,936 2-4=0,129 2а-2б=0,647 1-2=0,528	$p_{1-3}=0,016$ $p_{2-4}=0,131$ $p_{2а-2б}=0,245$ $p_{1-2}=0,575$
Примечание:						
1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;						
2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;						
2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;						
2б группа-пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ).						
3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКОс						

переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокोल переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

* Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется $0,05/4=0,0125$

Значимых различий по количеству переносов в анамнезе с поправкой Бонферрони не было выявлено. Количество переносов находится в пределах 2,07 и 2,52.

Все обследованные женщины имели нормостенический (пропорциональный) тип телосложения и хорошо выраженные вторичные половые признаки. Гирсутизм, гипертрихоз и другие признаки гиперандрогении отсутствовали. Половые органы были сформированы по женскому типу.

Анализ показал, что в группах наблюдения не встречались пациентки с дефицитом массой тела, у пациенток всех групп средний индекс массы тела (ИМТ) в пределах допустимых значений (таблица 8), статистически значимых различий в группах не выявлено.

Таблица 8 – Характеристика ИМТ у пациенток в сравниваемых группах

ИМТ	1 группа (n=23)		2 группа(n=65)				3 группа (n=36)		4 группа (n=54)		5 группа (n=32)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	2а группа (n=40)		2бгруппа (n=25)		абс	%	абс	%	абс	%		
			абс	%	абс	%								
Нормальная масса тела	15	65,2	29	72,5	17	68	23	63,9	41	76,1	16	50	1-3=0,011	$p_{1-3}=0,918$
Избыточный вес	8	34,8	11	27,5	8	32	13	36,1	13	23,9	16	50	2-4=0,282	$p_{2-4}=0,596$
													2а-2б=0,151	$p_{2а-2б}=0,698$
													1-2=0,337	$p_{1-2}=0,562$
													2б-5=1,865	$p_{2б-5}=0,172$

Примечание:

1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;

2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2б группа-пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ

криопротокोल, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ).

3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКОс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротоколс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

5 группа – фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия;

* Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется $0,05/5=0,01$

При оценке характера сопутствующей соматической патологии выявлены следующие особенности, представленные в таблице 9.

Таблица 9 – Структура соматической патологии у пациенток исследуемых групп

Название и код соматической патологии (МКБ 10)	1 группа (n=23)		2 группа(n=65)				3 группа (n=36)		4 группа (n=54)		5 группа (n=32)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	2а группа (n=40)		2бгруппа (n=25)		абс	%	абс	%	абс	%		
			абс	%	абс	%								
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90)	7	30,43	12	30	9	36	3	8,33	11	20,3	1	3,125	1-3=3,426 2-4=2,138 2а-2б=0,053 1-2=0,009 2б-5=8,336	p ₁₋₃ =0,065 p ₂₋₄ =0,144 p _{2а-2б} =0,818 p ₁₋₂ =0,925 p_{2б-5}=0,004**
Болезни системы кровообращения (I00-I99)	2	8,69	2	5	3	12	1	2,78	1	1,85	2	6,25	1-3=0,182 2-4=1,104 2а-2б=0,305 1-2=0,084 2б-5=0,084	p ₁₋₃ =0,67 p ₂₋₄ =0,294 p _{2а-2б} =0,581 p ₁₋₂ =0,768 p _{2б-5} =0,773
Нарушения рефракции и аккомодации (H52)	3	13,04	3	7,5	3	12	0	0	5	9,5	2	6,25	1-3=2,614 2-4=0,098 2а-2б=0,029 1-2=0,014 2б-5=0,084	p ₁₋₃ =0,106 p ₂₋₄ =0,755 p _{2а-2б} =0,866 p ₁₋₂ =0,906 p _{2б-5} =0,773
Болезни молочной железы (N60-N64)	4	17,39	15	37,5	10	40	3	8,33	10	18,5	5	15,63	1-3=0,405 2-4=5,651 2а-2б=0,041 1-2=2,527 2б-5=3,135	p ₁₋₃ =0,525 p₂₋₄=0,018* p _{2а-2б} =0,841 p ₁₋₂ =0,112 p _{2б-5} =0,077
Болезни желудочно-кишечного тракта (K 29)	2	8,67	2	5	1	4	2	5,56	2	3,7	2	6,25	1-3=0,004 2-4=0,045 2а-2б=0,177 1-2=0,041 2б-5=0,048	p ₁₋₃ =0,950 p ₂₋₄ =0,833 p _{2а-2б} =0,675 p ₁₋₂ =0,840 p _{2б-5} =0,826
Патология мочевыводящих путей (N 2-N 30)	0	0	2	5	2	8	1	2,78	2	3,7	0	0	1-3=0,052 2-4=0,035 2а-2б=0,002 1-2=0,404 2б-5=0,816	p ₁₋₃ =0,820 p ₂₋₄ =0,852 p _{2а-2б} =0,968 p ₁₋₂ =0,526 p _{2б-5} =0,367
Примечание:														

<p>1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;</p> <p>2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2б группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ);</p> <p>3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;</p> <p>4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;</p> <p>5 группа – фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия;</p> <p>* $p < 0,05$; ** Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется $0,05/5=0,01$</p>
--

У пациенток 2б группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона и пайпель-биопсия эндометрия) статистически значимо чаще регистрировались заболевания эндокринной системы (за счет гипотиреоза, аутоиммунного тиреоидита), чем у женщин из группы 5 (фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия эндометрия) ($p=0,004$).

У пациенток 2 группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона), чаще встречалась патология молочных желез (диффузно-кистозные мастопатии), чем у пациенток 4 группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества) ($p=0,018$). Однако статистических различий с поправкой Бонферрони не было выявлено.

Эти данные указывают на связь эндокринной соматической патологии (в том числе гипотиреоз) с репродуктивной функцией женщины и бесплодием [7]. В 5 группе включены фертильные женщины и у них не встречались гинекологические заболевания в анамнезе и на момент исследования.

Структура гинекологических заболеваний у женщин с женским бесплодием представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Структура гинекологических заболеваний у пациенток исследуемых групп

Наименование и код (МКБ-10)	1 группа (n=23)		2 группа (n=65)				3 группа (n=36)		4 группа (n=54)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	2а группа (n=40)		2б группа (n=25)		абс	%	абс	%		
			абс	%	абс	%						
Лейомиома матки (D25)	1	4,35	3	7,5	2	8	3	8,3	3	5,55	1-3=0,004 p ₁₋₃ =0,950 2-4=0,009 p ₂₋₄ =0,924 2а-2б=0,164 p _{2а-2б} =0,686 1-2=0,004 p ₁₋₂ =0,948	
Эндометриоз (N80), кроме аденомиоза	5	21,74	4	10	2	8	3	8,33	6	11,1	1-3=1,160 p ₁₋₃ =0,282 2-4=0,001 p ₂₋₄ =0,974 2а-2б=0,029 p _{2а-2б} =0,866 1-2=1,421 p ₁₋₂ =0,234	
Эндометриоз матки (Аденомиоз) (N80.0)	1	4,35	1	2,5	2	8	1	2,78	1	1,85	1-3=0,17 p ₁₋₃ =0,68 2-4=0,104 p ₂₋₄ =0,748 2а-2б=0,117 p _{2а-2б} =0,675 1-2=0,28 p ₁₋₂ =0,597	
Синдром поликистоза яичников (E28.2)	4	17,39	4	10	3	12	3	8,33	7	12,9	1-3=0,405 p ₁₋₃ =0,525 2-4=0,007 p ₂₋₄ =0,934 2а-2б=0,025 p _{2а-2б} =0,875 1-2=0,21 p ₁₋₂ =0,647	
Послеоперационный рубец матки, требующий предоставления медицинской помощи матери (O34.2)	5	21,74	3	7,5	0	0	5	13,89	4	7,4	1-3=0,183 p ₁₋₃ =0,669 2-4=0,064 p ₂₋₄ =0,801 2а-2б=0,613 p _{2а-2б} =0,427 1-2=4,134 p ₁₋₂ =0,043	
<p>Примечание:</p> <p>1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;</p> <p>2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2б группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ).</p> <p>3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.</p> <p>4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.</p> <p>* Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется 0,05/4=0,0125</p>												

В структуре гинекологических заболеваний у пациенток, проходящих программы вспомогательных репродуктивных технологий встречались гормонозависимые заболевания: эндометриоз, миома матки, синдром поликистозных заболеваний. Особая группа гинекологических заболеваний – это рубец на матке после кесарево сечения и миомэктомии. Статистически значимых различий в структуре гинекологических заболеваний не было выявлено в исследуемых группах.

Гормональный статус пациенток был исследован на следующие гормоны: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), эстрадиол (Э), антимюллеров гормон (АМГ) (таблица 11).

Таблица 11 – Концентрация гормонов сыворотки крови, Ме (P25;P75)

Показатели	1 группа (n=23)	2 группа (n=65)		3 группа (n=36)	4 группа (n=54)	5 группа (n=32)	U-критерий Манна-Уитни	Значимость (p)
		2а группа (n=40)	2б группа (n=25)					
Лютеинизирующий гормон (МЕ/л)	5,43 (3,59; 7,49)	6,42 (4,86; 8,25)	5,75 (4,5; 5,75)	5,56 (4,06; 5,49)	6,87 (5,05; 8,66)	4,86 (3,89; 6,43)	1-3=498 2-4=1769,5 2а-2б=465,5 1-2=932,5 2б-5=723	p ₁₋₃ =0,191 p ₂₋₄ =0,533 p _{2а-2б} =0,642 p ₁₋₂ =0,079 p _{2б-5} =0,082
Фолликулостимулирующий гормон (МЕ/л)	7,34 (5,77; 8,5)	5,92 (5,37; 7,09)	5,7 (4,83; 6,63)	5,75 (4,79; 7,6)	6,25 (5,34; 7,42)	6,49 (5,81; 8,0)	1-3=351,5 2-4=1882,5 2а-2б=433,5 1-2=503,5 2б-5=864	p ₁₋₃ =0,331 p ₂₋₄ =0,211 p _{2а-2б} =0,369 p ₁₋₂ =0,020 p _{2б-5} =0,567
Эстрадиол (пмоль/л)	74,9 (45,45; 155)	97,34 (37,285; 142,5)	103,68 (47,09; 153)	64,6 (39,01; 134,25)	79,2 (38,57; 133)	67,0 (35,9; 84,51)	1-3=369,5 2-4=1489 2а-2б=525 1-2=704,5 2б-5=489	p ₁₋₃ =0,489 p ₂₋₄ =0,820 p _{2а-2б} =0,736 p ₁₋₂ =0,683 p _{2б-5} =0,832
Антимюллеров гормон (нг/мл)	3,15 (1,63; 4,13)	3,53 (1,68; 6,14)	3,26 (2,11; 6,12)	3,21 (1,78; 4,96)	3,11 (1,83; 5,69)	2,21 (1,2; 3,59)	1-3=504,5 2-4=1535,5	p ₁₋₃ =0,159 p ₂₋₄ =0,744 p _{2а-2б} =0,973

							2а-2б=502,5	p ₁₋₂ =0,179
							1-2=889	p _{2б-5} =0,562
							2б-5=603	
<p>Примечание:</p> <p>1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;</p> <p>2 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>2б группа-пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ);</p> <p>3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;</p> <p>4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;</p> <p>5 группа – фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия;</p> <p>* Критическое значение с учетом поправки Бонферрони равняется 0,05/5=0,01</p>								

Статистически значимых различий в уровне гормонов, характеризующих репродуктивную функцию пациенток, не выявлено.

3.2. Особенности исходов программ ЭКО с переносом эмбрионов в стимулированном цикле при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами

Пациенткам 1 группы с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов по разработанной методике приготовления и введения плазмы.

В образцах плазмы после центрифугирования определяли количественное содержание компонентов крови: тромбоцитов, лейкоцитов, а также количество тромбоцитов в периферической крови для оценки увеличения тромбоцитов в плазме, приготовленной по разработанной методике. Увеличение тромбоцитов в плазме после центрифугирования варьировалось в среднем на 64,6-69,6% (таблица 12).

Таблица 12 – Уровень форменных элементов крови в плазме и периферической крови у пациенток 1 группы, Me (P25;P75)

Форменные элементы	Тромбоциты (*10 ⁹ /л)	Тромбоциты (*10 ⁹ /л)	Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	Тромбоциты периферической крови (*10 ⁹ /л)
	1 введение	2 введения	1 введение	2 введение	
Среднее количество	401 (329,5;467,5)	390 (327; 464)	0,32 (0,11; 0,7)	0,29 (0,18; 0,66)	236,4 (215,5;290)
% увеличения концентрации тромбоцитов	69,6	64,6			

Для оценки влияния плазмотерапии на исходы циклов ЭКО проведена обработка статистических данных по структуре переносов и исходу пациенток 1 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) и 3 группах (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества).

Статистически значимых различий по количеству переносимых эмбрионов между пациенток 1 и 3 групп не было выявлено. Чаще осуществляли селективный (одного лучшего) перенос эмбриона (таблица 13, диаграмма 1).

Таблица 13 – Структура количества переносимых эмбрионов в 1 и 3 группах

Количество переносимых эмбрионов	1 группа (n=23)		3 группа (n=36)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
1	14	60,87	22	61,11	0,000	0,985
2	9	39,13	14	38,89		

Примечание - p – статистически значимые различия между группами:

1 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки

развития эмбрионов;

3 группа пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;

* $p < 0,05$

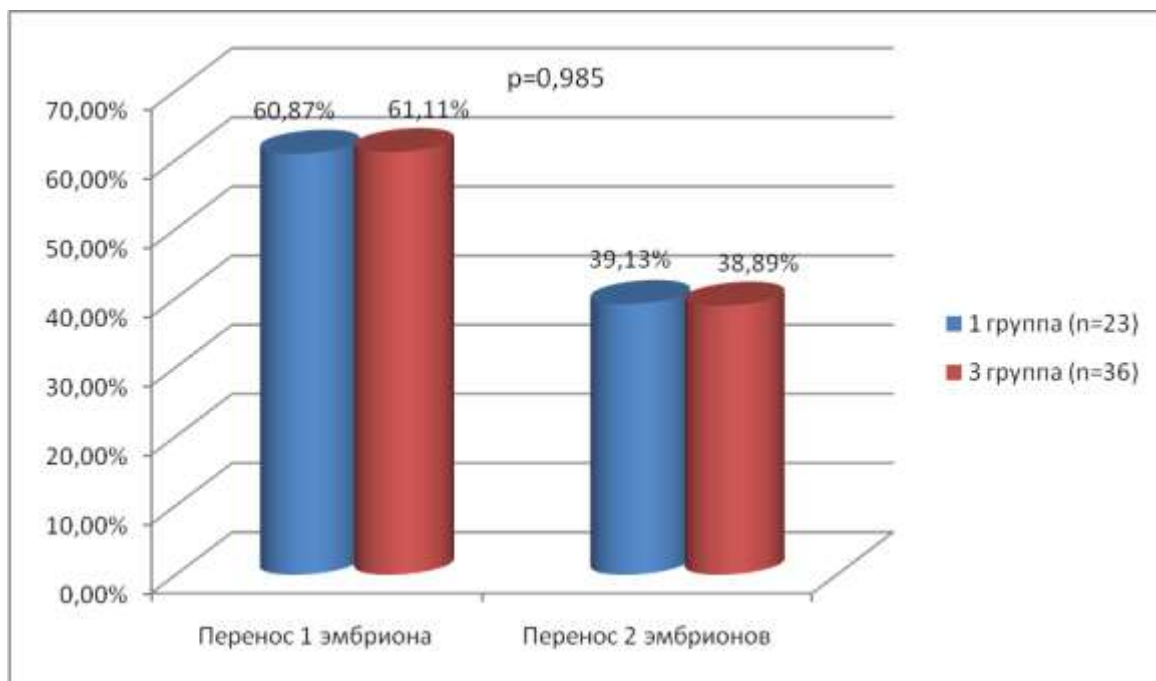


Диаграмма 1- Структура количества переносимых эмбрионов пациенткам 1 и 3 групп, (%)

Проанализирована структура переносов эмбрионов по качеству бластоцист (таблица 14).

Таблица 14 – Структура качества переносимых эмбрионов в 1 и 3 группах

Качество переносимых эмбрионов	1 группа (n=23)		3 группа (n=36)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Отличное (AA)	9	39,13	11	30,55	0,461	0,497
Хорошее (AB,BA,BB)	14	60,87	25	60,45		

Примечание - p – статистически значимые различия между группами:

1 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов;

3 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих

программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества;

* $p < 0,05$

В обеих группах (1 и 3 группы) пациенткам чаще переносили эмбрионы хорошего качества, более 60%. Статистически значимых различий по качеству переносимых эмбрионов не выявлено между 1 и 3 группами.

Учитывая отсутствие статистических различий по количеству и качеству переносимых эмбрионов проведена оценка эффективности программ ЭКО (таблица 15): количество биохимических и клинических беременностей у пациенток 1 группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) и 3 группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества).

Таблица 15 – Эффективность программ ЭКО с и без применения плазмотерапии, абс., %

	1 группа (n=23)		3 группа (n=36)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Количество биохимических беременностей	15	65,21	14	38,89	3,892	0,049*
Количество клинических беременностей	13	56,52	13	36,11	2,372	0,124

Примечание -р – статистически значимые различия между группами:

1 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов,

3 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества

* $p < 0,05$

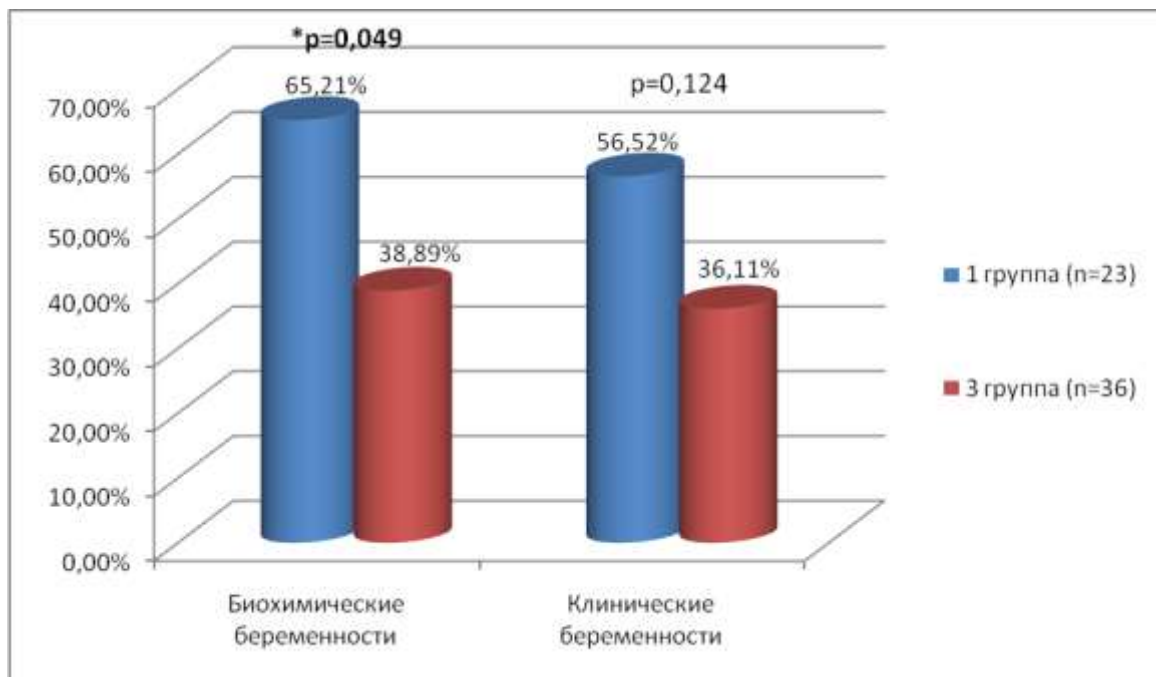


Диаграмма 2- Эффективность программ ЭКО у пациенток 1 и 3 групп, (%)

Количество биохимических беременностей в 1 группе статистически значимо выше, чем в 3 группе пациенток (диаграмма 2). В 1 группе (с применением плазмотерапии в цикле ЭКО) наблюдалось увеличение количества клинических беременностей по сравнению с 3 группой пациенток, однако статистически значимых различий не наблюдалась.

В 1 и 3 группах сформированы подгруппы пациенток, у которых в анамнезе было 2 и более неудачных переноса эмбрионов. Статистических различий по количеству повторных переносов эмбрионов не было выявлено между 1 и 3 группами. У данной выборки пациенток проведен анализ частоты наступления беременности (таблица 16).

Таблица 16 – Эффективность программ ЭКО с и без применения плазмотерапии у пациенток с 2 и более неудачными ПЭ в анамнезе, абс., %

	1 группа (n=19 из 23)		3 группа (n=15 из 36)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Количество биохимических беременностей	13	68,42	4	26,67	5,846	0,016*
Количество клинических беременностей	12	63,15	4	26,67	4,48	0,034*

Примечание -р – статистически значимые различия между группами:
 1 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов,
 3 группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества
 * p<0,05

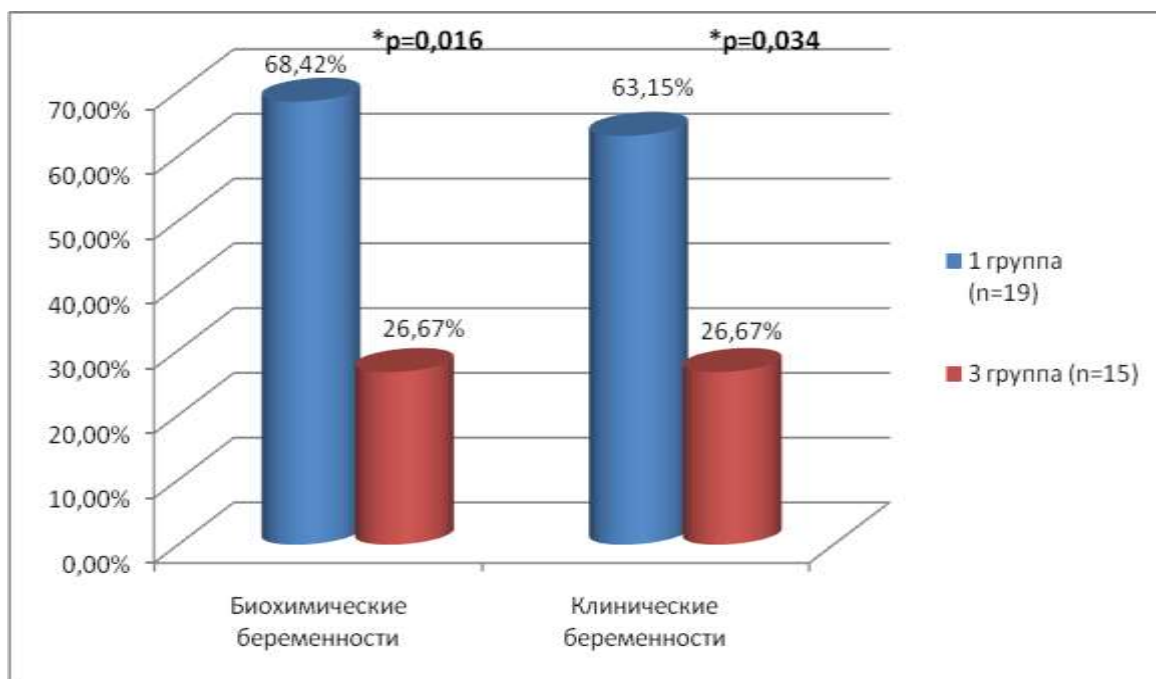


Диаграмма 3- Эффективность программ ЭКО у пациенток с 2 и более неудачными ПЭ в анамнезе 1 и 3 групп, (%)

У пациенток в 1 группе, которым проведена плазмотерапия, с 2 и более неудачными ПЭ в анамнезе наблюдалось статистически значимое увеличение частоты наступления беременностей, чем у пациенток 3 группы (диаграмма 3). Частота наступления клинических беременностей у пациенток в группе с плазмотерапией, проходящих программу ЭКО составила 63,15%. Следовательно, более высока эффективность при применении плазмотерапии у пациенток, проходящих программу ЭКО, которые имеют два и более неудачных переноса в анамнезе.

3.3. Особенности исходов программ переноса криоконсервированных эмбрионов (криоперенос) при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами при проведении пайпель-биопсии

Для оценки влияния плазмотерапии, а также исключение влияния скрейчинг-эффекта при проведении пайпель-биопсии за 48 часов до ПЭ на исходы циклов крио ПЭ проведена обработка статистических данных по биохимическим и клиническим беременностям в группах 2а (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 2б (пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ)).

По количеству переносимых эмбрионов у пациентов 2а и 2б группах статистически значимых различий не выявлено при нормальном распределении параметра (таблица 17).

Таблица 17 – Структура количества переносимых эмбрионов во 2а и 2б группах

Количество переносимых эмбрионов	2а группа (n=40)		2б группа (n=25)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
1	13	32,5	7	28	0,146	0,702
2	27	67,5	18	72		

Примечание-р – статистически значимые различия между группами:

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона,

2б группа – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ)

* $p < 0,05$

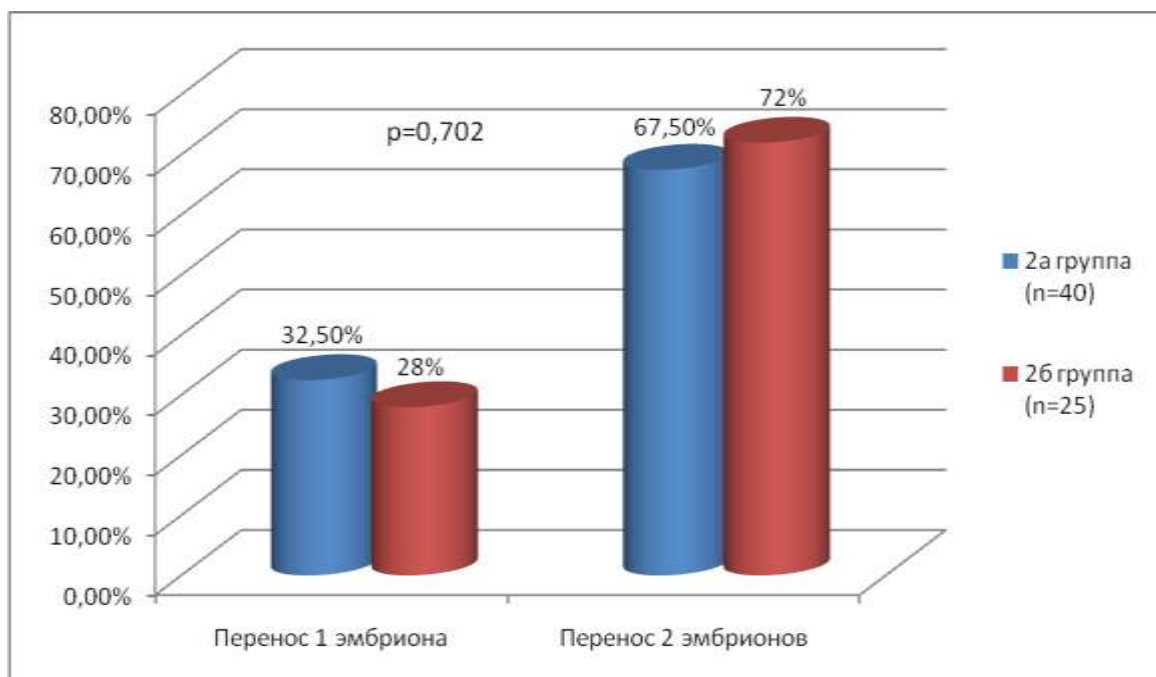


Диаграмма 4- Структура количества переносимых эмбрионов пациенткам 1 и 3 групп, (%)

В обеих группах чаще переносили по 2 эмбриона, согласно приказам [23, 24] при неудачных попытках ПЭ в анамнезе. Доля переносов двух эмбрионов составляла в обеих группах выше 67,5% (диаграмма 4).

Проанализирована структура переносов эмбрионов по качеству бластоцист (таблица 18).

Таблица 18 – Структура качества переносимых эмбрионов в 2а и 2б группах

Качество переносимых эмбрионов	2а группа без биопсии (n=40)		2б группа с пайпель-биопсия (n=25)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Отличное (AA)	11	27,5	5	20	0,098	0,755
Хорошее (AB,BA,BB)	29	72,5	20	80		

Примечание-р – статистически значимые различия между группами:

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокोल, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2б группа – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ);

* p<0,05

В обеих группах (2а и 2б группы) пациенткам чаще переносили эмбрионы хорошего качества, более 72,5%. Статистически значимых различий по качеству переносимых эмбрионов не выявлено между 2а и 2б группами.

Пациенткам обеих групп проводили внутриматочные инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами. Часть образца приготовленной плазмы отправляли на анализ содержания количества форменных элементов. Анализ достоверности различий непараметрических данных проводился с помощью расчета критерия Манна-Уитни. Статистически значимых различий по количеству содержания тромбоцитов в периферической крови, количества тромбоцитов и лейкоцитов в

плазме для внутриматочной инфузии пациенткам 2а и 2б групп не было выявлено (таблица 19).

Таблица 19 – Уровень форменных элементов крови в плазме и периферической крови у пациенток 2а и 2б групп, Ме (P25;P75)

Форменные элементы	Тромбоциты (*10 ⁹ /л) 1 введение	Тромбоциты (*10 ⁹ /л) 2 введения	Лейкоциты (*10 ⁹ /л) 1 введение	Лейкоциты (*10 ⁹ /л) 2 введение	Тромбоциты периферической крови (*10 ⁹ /л)
2а группа(n=40)	356 (270,5;415)	393 (309,25;433)	0,35 (0,12;0,58)	0,415 (0,16; 0,7)	252 (214;278)
2б группа (n=25)	377 (312;448)	367 (288;442)	0,52(0,3;0,7)	0,3 (0,11; 0,43)	264 (224; 297)
Критерий U Манна-Уитни	564,5	488,5	596	394	556,5
Значимость (p)	0,384	0,876	0,195	0,152	0,342

Пациенткам, которым проводилась плазмотерапия измерялась толщина (М-ЭХО) и трижды фиксировались показатели: в день первого внутриматочного введения плазмы, в день второго внутриматочного введения плазмы (для 2б группы это день проведения пайпель-биопсии эндометрия и плазмотерапия) и в день ПЭ (таблица 20).

Таблица 20 – Динамика роста эндометрия у пациенток 2а и 2б групп, Ме (P25;P75)

М-ЭХО, мм	2а группа (n=40)	2б группа(n=25)	Критерий U Манна-Уитни	Значимость (p)
1 введение плазмы	8 (7,3;9,05)	8 (7,2; 8,6)	479,5	0,782
2 введение плазмы	8,9 (7,87;10)	8,5 (7,8; 10)	495	0,946
День ПЭ	10 (9,5;12)	10,1 (9,77;12)	521,5	0,563

Примечание - p – статистически значимые различия между группами:

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих

программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

2б группа – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ);

* $p < 0,05$

Статистически значимых различий между показателями М-ЭХО у пациенток 2а и 2б группы не были выявлены. В день переноса эмбрионов толщина эндометрия была выше 8 мм у всех пациенток. На рисунке 2 визуальное отражено увеличение М-ЭХО у пациенток 2а и 2б группы.

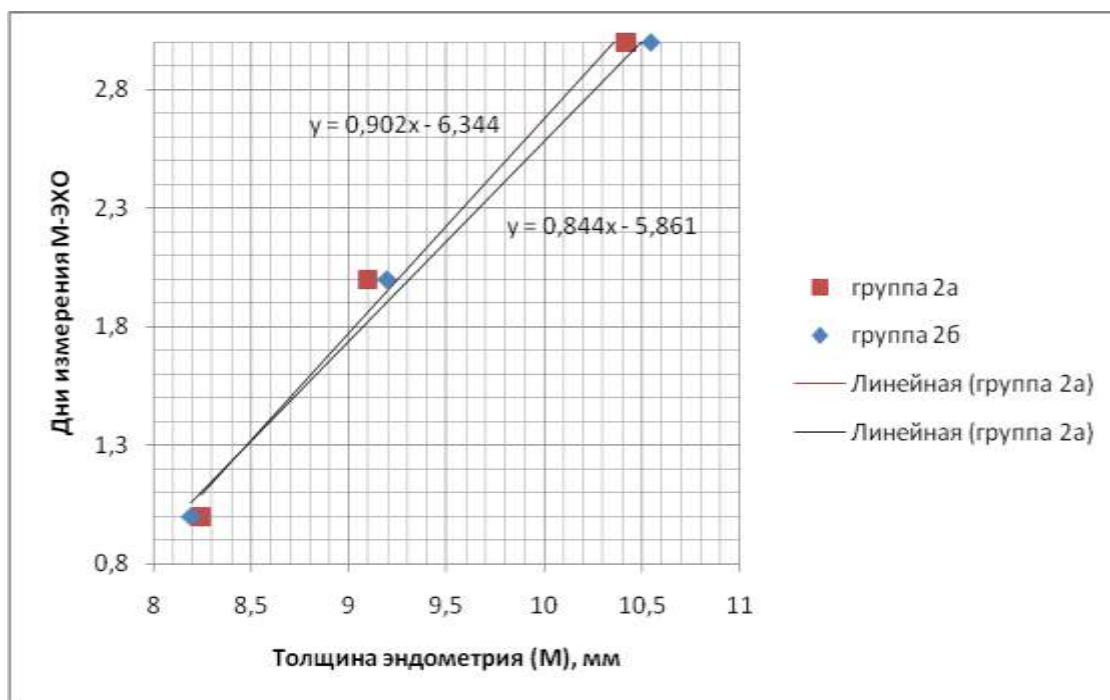


Рисунок 2 – Динамика роста эндометрия (М-ЭХО, мм) у пациенток 2а и 2б групп

Проанализировав динамику роста эндометрия у пациенток 2а и 2б групп, отсутствие статистически значимых различий можно сделать заключение, что процедура пайпель-биопсии эндометрия (скрейчинг-эффект) не повлияла на структуру и толщину эндометрия пациенток в цикле подготовки к переносу эмбрионов.

Учитывая отсутствие статистических различий по количеству и качеству переносимых эмбрионов, проведена оценка эффективности программ ЭКО: количество биохимических и клинических беременностей у пациенток, которым проведена плазмотерапия 2а (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 2б групп (пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ)).

Учитывая отсутствие статистических значимых различий данных при переносе эмбрионов и подготовки к переносу эмбрионов, проведена оценка эффективности программ ПЭ в крициклах с применением процедуры плазмотерапии (таблица 21).

Таблица 21 – Эффективность программ криоПЭ с применением плазмотерапии и без пайпель-биопсии, абс., %

	2 группа (n=40)		2б группа (n=25)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Количество биохимических беременностей	22	55	15	60	0,157	0,692
Количество клинических беременностей	18	45	12	48	0,056	0,813

Примечание -р – статистически значимые различия между группами:

2а группа – пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона,

2б группа – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до

переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ)

Частота наступления клинической беременности у пациенток 2б группы незначительно выше, чем у пациенток 2а группы, однако статистически значимых различий не было выявлено. Следовательно, проведенная пайпель-биопсия эндометрия не повлияла на исходы программ ВРТ.

3.4. Особенности исходов программ ВРТ при модуляции рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами в циклах переноса криоконсервированных эмбрионов

Проведен сравнительный анализ исходов программ криопереносов у пациенток 2 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 4 групп (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества).

По количеству переносимых эмбрионов у пациентов 2 и 4 групп статистически значимых различий не выявлено (таблица 22).

Таблица 22 – Структура количества переносимых эмбрионов у пациенток 2 и 4 групп

Количество переносимых эмбрионов	2 группа (n=65)		4 группа (n=54)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
1	20	30,7	24	44,5	2,367	0,124
2	45	69,3	30	55,5		

Примечание-р – статистически значимые различия между группами:

2 группа- пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

* p<0,05;

В обеих группах чаще переносили по 2 эмбриона, согласно приказам [23, 24] и клиническим рекомендациям при неудачных попытках ПЭ в анамнезе. Доля переносов двух эмбрионов составляла в обеих группах выше 55%.

Пациентам 2 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 4 групп (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол) переносили размороженные эмбрионы на стадии бластоцисты отличного и хорошего качества (таблица 23).

Таблица 23 – Структура качества переносимых эмбрионов во 2 и 4 группах

Качество переносимых эмбрионов	2 группа (n=65)		4 группа (n=54)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Отличное (AA)	16	24,61	19	35,2	1,141	0,286
Хорошее (AB,BA,BB)	49	75,39	35	64,8		

Примечание-р – статистически значимые различия между группами:

2 группа- пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;

4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.

* p<0,05;

В обеих группах (2 и 4 группы) пациенткам чаще переносили эмбрионы хорошего качества, более 64%. Статистически значимых различий по качеству переносимых эмбрионов не выявлено между 2 и 4 группами.

Оценена толщина эндометрия (М-ЭХО) в день переноса эмбрионов у пациенток 2 и 4 группы. Статистических различий не было выявлено (таблица 24).

Таблица 24 – Толщина эндометрия у пациенток 2 и 4 групп, Ме (P25;P75)

	2 группа (n=65)	4 группа(n=54)	Критерий U Манна-Уитни	Значимость (p)
М-ЭХО в день ПЭ, мм	10 (9,5;12)	10 (10;11)	1849,0	0,503
<p>Примечание-р – статистически значимые различия между группами:</p> <p>2 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведенаплазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротоколс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.</p> <p>* p<0,05;</p>				

Учитывая отсутствие статистических различий по количеству и качеству переносимых эмбрионов, толщины эндометрия в день переноса эмбрионов проведена оценка эффективности программ ЭКО: количество биохимических и клинических беременностей у пациенток 2 и 4 групп (таблица 25).

Таблица 25 – Эффективность программ криопереноса эмбрионов с и без применения плазмотерапии, абс., %

	2 группа (n=65)		4 группа (n=54)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Количество биохимических беременностей	37	56,92	16	29,63	8,895	0,003*
Количество клинических беременностей	30	46,15	12	22,22	7,397	0,007*
<p>Примечание-р – статистически значимые различия между группами:</p> <p>2 группа- пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведенаплазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>4 группа -пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротоколс переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.</p> <p>* p<0,05;</p>						

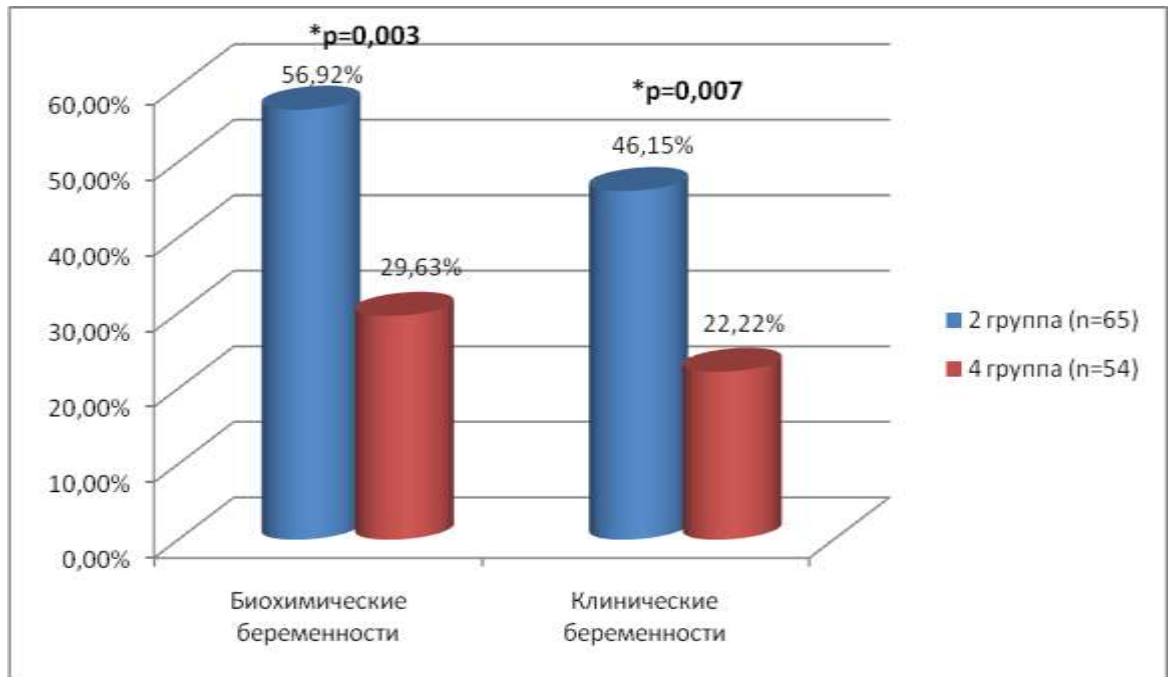


Диаграмма 5- Эффективность программ криоцикл ПЭ у пациенток 2 и 4 групп, (%)

Частота наступления биохимических и клинических беременностей выше у пациенток в группе с применением плазмотерапии и составляет 56,92% и 46,15% против 29,63% и 22,22% - у пациенток без применения плазмотерапии (диаграмма 5).

Также оценена частота наступления беременности у пациенток с 2 и более неудачными переносами эмбрионов в анамнезе (таблица 26).

Таблица 26 – Эффективность программ криопереноса эмбрионов с и без применения плазмотерапии у пациенток с 2 и более неудачными попытками ПЭ в анамнезе, абс., %

	2 группа (n=53 из 65)		4 группа (n=40 из 54)		Значение χ^2	Значимость (p)
	абс	%	абс	%		
Количество биохимических беременностей	33	62,26	10	25	12,73	0,000*
Количество клинических беременностей	27	50,94	10	25	6,404	0,011*

беременностей						
<p>Примечание-р - статистически значимые различия между группами:</p> <p>2 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона;</p> <p>4 группа - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества.</p> <p>* $p < 0,05$;</p>						

Частота наступления биохимических и клинических беременностей у пациенток с 2 и более неудачными попытками ПЭ статистически значимо выше в группе с применением плазмотерапии 62,26% и 50,94% против 25% у пациенток без применения плазмотерапии перед переносом эмбрионов.

Резюме

В группах наблюдения женщины были сопоставимы по возрасту, антропометрическим данным, гормональному статусу.

У пациенток 2б группы (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона и пайпель-биопсия эндометрия) статистически значимо чаще регистрировались заболевания эндокринной системы (за счет гипотиреоза, аутоиммунного тиреоидита), чем у женщин из группы 5 (фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия эндометрия) ($p=0,004$).

Наиболее частый фактор бесплодия во всех четырех группах являлся женское бесплодие, трубного происхождения (N97.1) (более 26 % в группах). Следующими по частоте являются женское бесплодие, связанное с мужскими факторами (N97.4) и с отсутствием овуляции (N97.0). Статистически значимых различий с поправкой Бонферрони по факторам бесплодия не было выявлено.

Пациенткам 1 и 2 групп проводили внутриматочную инфузию плазмой, обогащенной тромбоцитами. В образцах плазмы после центрифугирования

определяли количественное содержание компонентов крови: тромбоцитов, лейкоцитов, а также количество тромбоцитов в периферической крови для оценки увеличения тромбоцитов в плазме, приготовленной по разработанной методике. Увеличение тромбоцитов в плазме после центрифугирования варьировалось в среднем 64,6-69,6%

При анализе исходов программ ВРТ с применением плазмотерапии были выявлены следующие особенности. Количество биохимических беременностей в 1 группе (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) -65,21%, статистически значимо выше, чем в 3 группе пациенток (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества) – 38,89% ($p=0,049$). В 1 группе (с применением плазмотерапии в цикле ЭКО) наблюдается увеличение количества клинических беременностей (56,52%) по сравнению с 3 группой пациенток (36,11%), однако статистически значимых различий не наблюдалась ($p=0,124$). У пациенток в 1 группес 2 и более неудачными ПЭ в анамнезе, которым проведена плазмотерапия наблюдалось статистически значимое увеличение частоты наступления беременностей, чем у пациенток 3 группы. Частота наступления клинических беременностей у пациенток в группе с плазмотерапией, проходящих программу ЭКО составила 63,15% против 26,67% у пациенток 3 группы ($p=0,034$). Следовательно, более высока эффективность при применении плазмотерапии у пациенток, проходящих программу ЭКО, которые имеют два и более неудачных переноса в анамнезе.

Для оценки влияния плазмотерапии, а также исключение влияния скрейчинг-эффекта при проведении пайпель-биопсии за 48 часов до ПЭ на исходы циклов крио ПЭ проведена обработка статистических данных по биохимическим и клиническим беременностям в группах 2а (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса

эмбриона) и 2б (пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ)). Частота наступления клинических беременностей у пациенток 2б группы незначительно выше (48%), чем у пациенток 2а группы (45%), однако статистически значимых различий не было выявлено ($p=0,813$). Следовательно, проведенная пайпель-биопсия эндометрия не повлияла на исходы программ ВРТ.

Проведен сравнительный анализ исходов программ криопереносов у пациенток 2 (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) и 4 групп (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества).

Частота наступления биохимических и клинических беременностей выше у пациенток в группе с применением плазмотерапии и составляет 56,92% и 46,15% против 29,63% и 22,22% - у пациенток без применения плазмотерапии ($p=0,003$; $p=0,007$). Частота наступления биохимических и клинических беременностей у пациенток с 2 и более неудачными попытками ПЭ статистически значимо выше в группе с применением плазмотерапии 62,26% и 50,94% против 25% у пациенток без применения плазмотерапии перед переносом эмбрионов ($p=0,000$; $p=0,011$).

Полученные данные свидетельствуют об повышении эффективности программ ВРТ при применении плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе. Особенно, данная процедура может быть показана в программах крио ПЭ и у пациенток с 2 и более неудачными попытками ПЭ в анамнезе.

Материалы главы 3 опубликованы в следующих работах:

1. Пат 2762159 Рос. Фед. Способ внутриматочной инфузии аутологичной плазмы женщины для повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / **А.Ю. Храмцова**, Н.В. Башмакова, И.А. Газиева, Г.Н. Чистякова, А.А. Гришкина.- Москва, 2021.- 5с.
2. Башмакова, Н.В. Модуляция рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами / Н.В. Башмакова, **А.Ю. Храмцова**, А.А. Гришкина, И.А. Газиева // Проблемы репродукции. – 2021.- № 2.- С. 76-83.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФУЗИИ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ

4.1. Микроскопические особенности эндометрия после плазмотерапии у пациенток с переносом криоконсервированных эмбрионов

Для определения тенденции изменения микроскопической картины эндометрия при проведении плазмотерапии для подготовки к переносу эмбрионов, проведено исследование биопсийного материала пациенток в предыдущем цикле и в цикле переноса эмбриона с применением плазмотерапии (после первой процедуры внутриматочной аппликации).

Для определения маркеров имплантации и изменения микроскопической картины эндометрия после первой плазмотерапии проведен анализ частоты встречаемости гистологического признака и имплантации (биохимическая беременность) (таблица 27).

Таблица 27 – Частота встречаемости микроскопического признака в зависимости от исходов (наступление биохимической беременности; наличие имплантации) в программах переноса криоконсервированного эмбриона.

Признак	Отсутствие биохимической беременности (n=10)	Зафиксирована биохимическая беременность (n=15)	Значение χ^2	Значимость (p)
	Абс/%	Абс/%		
Неравномерность распределение желез до плазмотерапии	7 (70%)	12 (80%)	0,329	0,566
Неравномерность распределение желез после первой процедуры плазмотерапии	3 (30%)	10 (66,7%)	3,232	0,072
Округлая форма желез до плазмотерапии	0 (0%)	4 (26,7%)	3,175	0,075
Округлая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	1 (10%)	0 (0%)	1,56	0,211
Слегка извитая форма	2 (20%)	5 (33,3%)	0,529	0,467

желез до плазмотерапии				
Слегка извитая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	1 (10%)	3 (20%)	0,446	0,504
Извитая форма желез до плазмотерапии	8 (80%)	6 (40%)	3,896	0,048*
Извитая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	7 (70%)	13 (86,66%)	1,042	0,307
Фибробластическая трансформация клеток стромы до плазмотерапии	0 (0%)	4 (26,7%)	2,88	0,099
Фибробластическая трансформация клеток стромы после первой процедуры плазмотерапии	2 (10%)	1 (6,67%)	1,01	0,315
Фиброз стромы до плазмотерапии	1 (10%)	5 (33,3%)	1,791	0,181
Фиброз стромы после первой процедуры плазмотерапии	2 (20%)	1 (6,67%)	1,01	0,315
Предцедуальная реакция стромы до плазмотерапии	3 (30%)	2 (13,3%)	1,402	0,307
Предцедуальная реакция стромы после первой процедуры плазмотерапии	8 (80%)	7 (46,67%)	2,778	0,096
Метаплазия эпителия до плазмотерапии	0 (0%)	1 (6,67%)	0,694	0,405
Метаплазия эпителия после первой процедуры плазмотерапии	0 (0%)	0 (0%)	-	-
Субнуклеарная вакуолизация в железистом эпителии до плазмотерапии	9 (90%)	11 (73,33%)	1,042	0,307
Субнуклеарная вакуолизация в железистом после первой процедуры плазмотерапии эпителии	9 (90%)	12 (80%)	0,446	0,504
Секреторная трансформация желез до плазмотерапии	6 (60%)	1 (6,67%)	8,466	0,004*
Секреторная трансформация желез после первой процедуры плазмотерапии	5 (50%)	12 (80%)	2,482	0,115
Отек стромы до плазмотерапии	7 (70%)	9 (60%)	0,260	0,610
Отек стромы после первой процедуры плазмотерапии	7 (70%)	12 (80%)	0,329	0,566
Кровоизлияния до плазмотерапии	7 (70%)	13 (86,67%)	0,320	0,572
Кровоизлияния после первой процедуры плазмотерапии	6 (60%)	9 (60%)	0	1
Мононуклеарная инфильтрация стромы до плазмотерапии	3 (30%)	8 (53,3%)	1,326	0,250
Мононуклеарная инфильтрация стромы после первой процедуры	3 (30%)	4 (26,67%)	0,033	0,856

плазмотерапии				
Периваскулярный склероз до плазмотерапии	0 (0%)	2 (13,3%)	1,558	0,212
Периваскулярный склероз после первой процедуры плазмотерапии	0 (0%)	1 (6,67%)	0,694	0,405
Лимфоциты в строме до плазмотерапии	7 (70%)	9 (60%)	0,260	0,610
Лимфоциты в строме после первой процедуры плазмотерапии	3 (30%)	2 (13,3%)	1,042	0,307
Клубки толстостенных сосудов до плазмотерапии	1 (10%)	0(0%)	1,563	0,211
Клубки толстостенных сосудов после первой процедуры плазмотерапии	1 (10%)	2 (13,33%)	0,063	0,802
Тонкостенные сосуды до плазмотерапии	3 (30%)	8 (53,3%)	1,326	0,250
Тонкостенные сосуды после первой процедуры плазмотерапии	7 (70%)	5 (33,3%)	3,232	0,072
Полнокровные сосуды до плазмотерапии	4 (40%)	8 (53,3%)	0,427	0,513
Полнокровные сосуды после первой процедуры плазмотерапии	3 (30%)	2 (13,33%)	1,042	0,307

В период до применения плазмотерапии влияющими факторами на имплантацию оказались: наличие извитых желез в 6 раз уменьшает шанс на наступление биохимической беременности $OR=0,167$ (ДИ 0,026-1,073); отсутствие секреторной трансформации желез в 21 раз увеличивает шанс на наступление беременности $OR=21$ (ДИ 1,922-229,392). Следовательно, если у пациенток выявлено по микроскопическому исследованию эндометрия до подготовки к переносу криоконсервированных эмбрионов, отсутствие секреторной деформации желез в строме и форма желез не имеет извитое строение, возможно применение плазмотерапии в цикле переноса для увеличения шансов имплантации.

Микроскопические изменения эндометрия и связь с клинической беременностью представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Частота встречаемости микроскопического признака в зависимости от исходов (наступление клинической беременности) в программах переноса криоконсервированного эмбриона.

Признак	Отсутствие клинической беременности (n=13)	Зафиксирована клиническая беременность (n=12)	Значение χ^2	Значимость (p)
	Абс/%	Абс/%		
Неравномерность распределение желез до плазмотерапии	10 (76,9%)	9 (69,23%)	0,013	0,910
Неравномерность распределение желез после первой процедуры плазмотерапии	4 (30,77%)	9 (66,7%)	4,891	0,027*
Округлая форма желез до плазмотерапии	1 (7,69%)	3 (25%)	1,391	0,238
Округлая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	1 (7,69%)	0 (0%)	0,962	0,327
Слегка извитая форма желез до плазмотерапии	3 (23,1%)	4 (33,3%)	0,326	0,568
Слегка извитая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	2 (15,38%)	2 (16,67%)	0,008	0,903
Извитая форма желез до плазмотерапии	9 (69,23%)	5 (41,66%)	1,924	0,165
Извитая форма желез после первой процедуры плазмотерапии	9 (69,23%)	11 (91,67%)	1,963	0,161
Фибробластическая трансформация клеток стромы до плазмотерапии	1 (7,69%)	3 (25%)	1,391	0,238
Фибробластическая трансформация клеток стромы после первой процедуры плазмотерапии	2 (15,38%)	1 (8,33%)	0,294	0,588
Фиброз стромы до плазмотерапии	3 (23,1%)	3 (25%)	0,013	0,910
Фиброз стромы после первой процедуры плазмотерапии	2 (15,38%)	1 (8,33%)	0,294	0,588
Предецидуальная реакция стромы до плазмотерапии	3 (23,1%)	2 (16,67%)	0,16	0,689
Предецидуальная реакция стромы после первой процедуры плазмотерапии	8 (61,5%)	7 (66,67%)	0,027	0,870
Метаплазия эпителия до плазмотерапии	0 (0%)	1 (8,33%)	1,128	0,288
Метаплазия эпителия после первой процедуры плазмотерапии	0 (0%)	0 (0%)	-	-
Субнуклеарная вакуолизация в железистом эпителии до плазмотерапии	10 (76,92%)	10 (83,33%)	0,16	0,689
Субнуклеарная	12 (92,3%)	9 (75%)	1,391	0,238

вакуолизация в железистом после первой процедуры плазмотерапии эпителии				
Секреторная трансформация желез до плазмотерапии	6 (46,15%)	1 (8,33%)	4,427	0,035*
Секреторная трансформация желез после первой процедуры плазмотерапии	8 (61,5%)	9 (66,7%)	0,520	0,471
Отек стромы до плазмотерапии	9 (53,84%)	7 (58,33%)	0,322	0,571
Отек стромы после первой процедуры плазмотерапии	9 (53,84%)	10 (83,33%)	0,580	0,409
Кровоизлияния до плазмотерапии	10 (76,92%)	10 (83,33%)	0,16	0,689
Кровоизлияния после первой процедуры плазмотерапии	7 (53,85%)	8(66,67%)	0,427	0,513
Мононуклеарная инфильтрация стромы до плазмотерапии	4 (30,77%)	7 (58,3%)	1,924	0,165
Мононуклеарная инфильтрация стромы после первой процедуры плазмотерапии	3 (23,07%)	4 (33,33%)	0,326	0,568
Периваскулярный склероз до плазмотерапии	0 (0%)	2 (16,67%)	2,579	0,108
Периваскулярный склероз после первой процедуры плазмотерапии	0 (0%)	1 (8,33%)	1,128	0,288
Лимфоциты в строме до плазмотерапии	8 (61,5%)	8 (66,67%)	0,071	0,790
Лимфоциты в строме после первой процедуры плазмотерапии	3 (23,07%)	2 (16,67%)	0,160	0,689
Клубки толстостенных сосудов до плазмотерапии	1 (7,7%)	0(0%)	0,962	0,327
Клубки толстостенных сосудов после первой процедуры плазмотерапии	1 (7,7%)	2 (16,67%)	0,476	0,409
Тонкостенные сосуды до плазмотерапии	4 (30,77%)	7 (58,3%)	1,924	0,165
Тонкостенные сосуды после первой процедуры плазмотерапии	8 (61,5%)	4 (33,3%)	1,989	0,158
Полнокровные сосуды до плазмотерапии	4 (30,76%)	8 (33,3%)	3,222	0,073
Полнокровные сосуды после первой процедуры плазмотерапии	4 (30,76%)	1 (8,33%)	1,963	0,161

В период до применения плазмотерапии влияющими факторами на наступление клинической беременности выявлено отсутствие секреторной трансформации желез (рисунок 3 А, Б). При применении плазмотерапии количество пациенток, имеющих секреторную трансформацию, увеличилось. Следовательно, если у пациенток отсутствует секреторная трансформация

желез и планируется проведение плазмотерпии, то шанс наступления беременности в 9,4 раз выше $OR=9,433$ (ДИ 0,585-100). После первой процедуры внутриматочной инфузии плазмы при равномерном распределении желез в строме шанс на наступление беременности снижается в 6,7 раз $OR=0,148$ (ДИ 0,017-0,963).

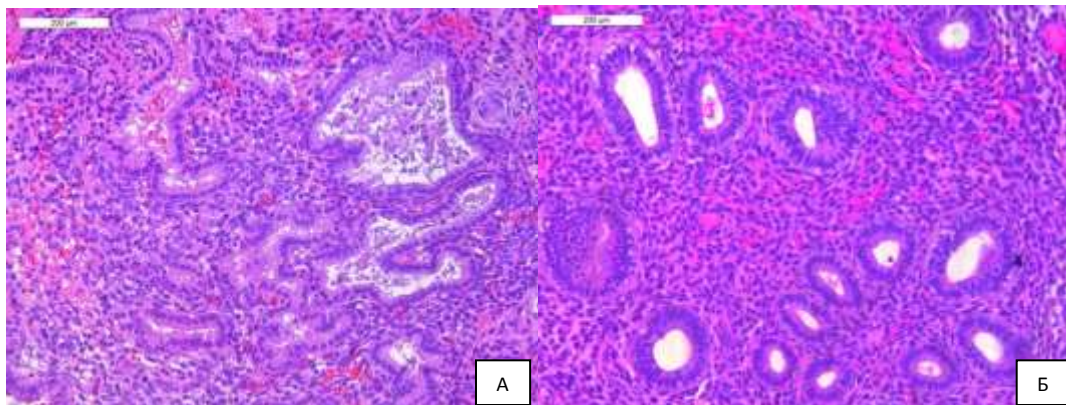


Рисунок 3 – А. Полноценная секреторная трансформация эндометриальных желез. Б. Отсутствие признаков секреторной трансформации эндометриальных желез. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Проведено сравнение микроскопической картины биоптата эндометрия у пациенток 2б (пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ) группы и 5 группы (фертильные женщины) для выявления предикторов бесплодия и возможности приближения микроскопии после плазмотерапии к фертильным пациенткам с рецептивным эндометрием (таблица 29).

Таблица 29 – Частота встречаемости микроскопического признака у пациенток до плазмотерапии и рецептивного эндометрия

Признак	Группа 2 б (n=25)	Группа 5 (n=32)	Значение χ^2	Значимость (p)
	Абс/%	Абс/%		
Неравномерность распределение желез	19	27	0,632	0,427
Округлая форма желез	4	0	5,506	0,019*
Слегка извитая форма желез	7	10	0,071	0,790
Извитая форма желез	14	22	0,981	0,322

Фибробластическая трансформация клеток стромы	4	12	3,213	0,073
Фиброз стромы	6	11	0,722	0,396
Прецидуальная реакция стромы	5	20	10,296	0,001*
Метаплазия эпителия	1	2	0,143	0,706
Субнуклеарная вакуолизация в железистом эпителии	20	8	17,113	0,000*
Секреторная трансформация желез	7	32	33,674	0,000*
Отек стромы	16	28	4,403	0,036*
Кровоизлияния	20	29	1,313	0,252
Мононуклеарная инфильтрация стромы	11	13	0,060	0,798
Периваскулярный склероз	2	0	2,653	0,103
Лимфоциты в строме	16	2	21,664	0,000*
Клубки толстостенных сосудов	1	8	4,655	0,031*
Тонкостенные сосуды	11	32	23,754	0,000*
Полнокровные сосуды	12	31	18,094	0,000*

Признаками нерецептивного эндометрия по данным сравнительного анализа микроскопического исследования являются: наличие округлой формы желез в 1,2 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,840$ (ДИ 0,708-0,997); отсутствие прецидуальной реакции стромы в 6,7 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,149$ (ДИ 0,044-0,505); присутствие субнуклеарной вакуолизации в железистом эпителии (рисунок 4) в 10 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,098$ (ДИ 0,028-0,340); отсутствие секреторной трансформации в 3,6 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,280$ (ДИ 0,149-0,525); отсутствие отека стромы в 3,9 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,256$ (ДИ 0,067-0,958); присутствие лимфоцитов стромы в 26 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,038$ (ДИ 0,007-0,195); отсутствие толстостенных и тонкостенных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 8 раз $OR=0,214$ (ДИ 0,014-1,08) и в 2,3 раза $OR=0,44$ (ДИ 0,283-0,685); отсутствие полнокровных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 33 раза $OR=0,029$ (ДИ 0,003-0,253) (таблица 29).

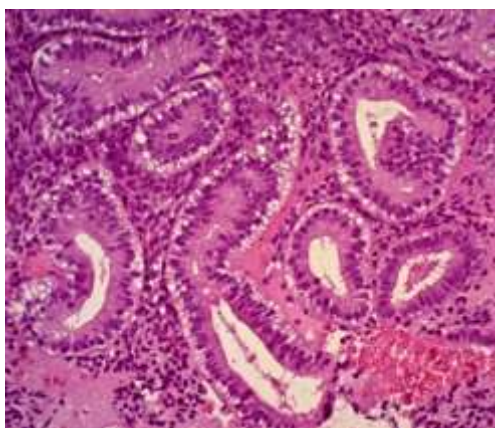


Рисунок 4- Морфологическая картина слизистой матки. Субнуклеарные вакуоли в эпителиоцитах желез. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$ (окуляр 10 \times объектив 20).

Сопоставимость показателей микроскопической картины эндометрия после первой плазмотерапии с гистологическими признаками фертильных пациенток представлена в таблице 30.

Таблица 30 – Частота встречаемости микроскопического признака у пациенток после плазмотерапии и рецептивного эндометрия

Признак	Группа 2 б (n=25)	Группа 5 (n=32)	Значение χ^2	Значимость (p)
	Абс/%	Абс/%		
Неравномерность распределение желез	13	27	7,029	0,008*
Округлая форма желез	1	0	1,303	0,254
Слегка извитая форма желез	4	10	1,764	0,184
Извитая форма желез	20	22	0,916	0,339
Фибробластическая трансформация клеток стромы	3	12	4,707	0,030
Фиброз стромы	3	11	3,792	0,051
Прецидуальная реакция стромы	15	20	0,037	0,847
Метаплазия эпителия	0	2	1,619	0,203
Субнуклеарная вакуолизация в железистом эпителии	20	8	17,113	p<0,001*
Секреторная трансформация желез	17	32	11,912	0,001*
Отек стромы	19	28	1,283	0,257
Кровоизлияния	15	29	7,477	0,006
Мононуклеарная инфильтрация стромы	7	13	0,982	0,322
Периваскулярный склероз	1	0	1,303	0,254
Лимфоциты в строме	5	2	2,463	0,117
Клубки толстостенных сосудов	3	8	1,523	0,217
Тонкостенные сосуды	12	32	21,556	0,000*
Полнокровные сосуды	5	31	35,646	0,000*

Отличительными особенностями микроскопических признаков эндометрия после плазмотерапии по сравнению с эндометрием фертильных пациенток являются: неравномерность распределения желез в строме $OR=0,200$ (ДИ 0,058-0,690), однако ранее было выявлено, что при наличии данного признака после первой внутриматочной инфузии позволяет увеличить шанс наступления клинической беременности. После применения первой инфузии плазмы сохраняется субнуклеарная вакуолизация в железистом эпителии в 10 раз $OR=0,098$ (ДИ 0,028-0,340); отсутствие тонкостенных сосудов отличается в 2 раза $OR=0,480$ (ДИ 0,319-0,722); отсутствие полнокровных сосудов эндометрия (рисунок 5) в 124 раза меньше после первой внутриматочной инфузии плазмы $OR=0,008$ (ДИ 0,0009-0,074).

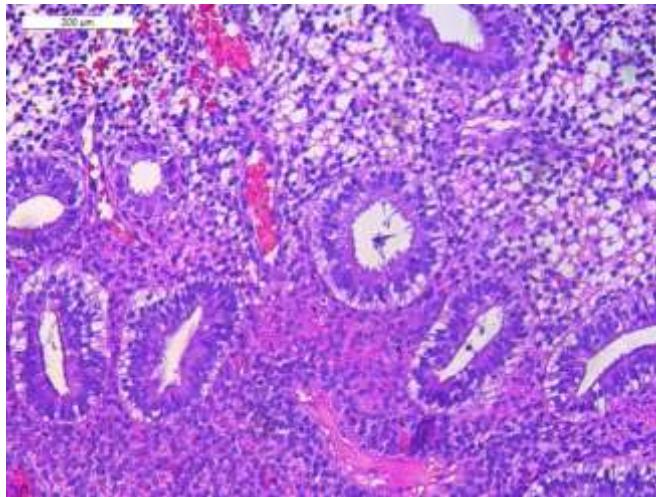


Рисунок 5- Полнокровные сосудов в биоптате эндометрии. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$ (окуляр 10 \times объектив 20).

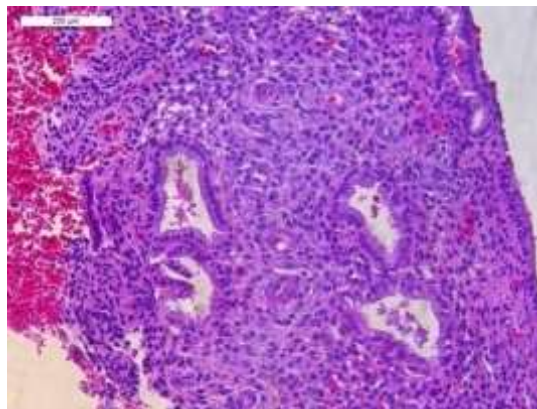


Рисунок 6- Морфологическая картина слизистой матки. Предецидуальная реакция стромы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Статистически значимыми изменениями в микроскопической картине эндометрия после первого введения плазмы, обогащенной тромбоцитами являются: уменьшение округлой формы желез (до проведения плазмы $p=0,019$; после первой плазмотерапии $p=0,254$); увеличение частоты прецидуальной реакции стромы (до проведения плазмы $p=0,001$; после первой плазмотерапии $p=0,847$) (рисунок 6); увеличение частоты отека стромы (до проведения плазмы $p=0,036$; после первой плазмотерапии $p=0,257$); снижение частоты встречаемости лимфоцитов в строме (до проведения плазмы $p=0,000$; после первой плазмотерапии $p=0,117$); увеличение числа толстостенных сосудов (до проведения плазмы $p=0,031$; после первой плазмотерапии $p=0,217$) (таблица 31).

Таблица 31 – Площадь распределения и высота пиноподий в эндометрии 2б и 5 групп, Me (P25;P75)

	2б ₁ группа (n=25)	5 группа(n=32)	2б ₂ группа (n=25)	Значение критерия	Значимость (p)
Площадь распределения (%)	10 (5;18)	9 (8;10)	15 (10;35)	2б ₁ -5 (критерий Манна-Уитни)=289,5 2б ₂ -5(критерий Манна-Уитни)=52 2б ₁ -2б ₂ (Вилкоксона)=89	2б ₁ -5=0,236 2б ₂ -5=0,927 2б ₁ -2б ₂ =0,022
Высота (мкм X400)	6,2 (4,5;8,75)	27 (23,8;33,26)	7,6 (5,91;10)	2б ₁ -5(критерий Манна-Уитни)=695 2б ₂ -5(критерий Манна-Уитни)=572 2б ₁ -2б ₂ (Вилкоксона)=126	2б₁-5=0,000* 2б₂-5=0,000* 2б ₁ -2б ₂ = 0,078

Примечание-p – статистически значимые различия между группами:

2б₁ – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ), материал до плазмотерапии

5 – фертильные женщины, которым проведена пайпель-биопсия;

2б₂ – пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель-биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ), материал после первой внутриматочной инфузии

* $p < 0,0167$;

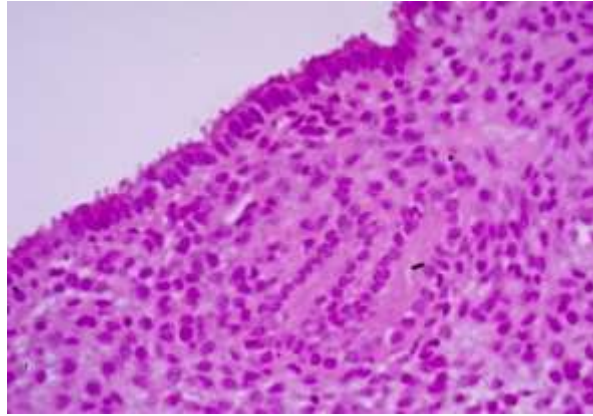


Рисунок 7-Зрелые пиноподии, занимающие большую часть апикальной поверхности эпителиоцитов в эндометрии женщины 5 группы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

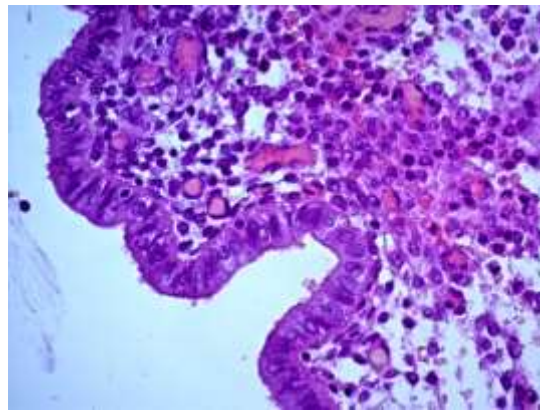


Рисунок 8- Поверхностный эпителий с редкими невысокими пиноподиями до плазмотерапии. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$ (окуляр 10 \times объектив 40).

При анализе динамики площади распределения и высоты пиноподий в эндометрии пациенток до и после плазмотерапии, а также в образцах у фертильных пациенток (рисунок 7), была выявлена статистически значимая низкая высота пиноподий в образцах у пациенток 2б группы. При применении плазмотерапии выявлена динамика увеличения высоты и площади распределения пиноподий, однако статистических различий не было выявлено.

4.2. Иммуногистохимические особенности эндометрия после плазмотерапии у пациенток с переносом криоконсервированных эмбрионов

Результаты иммуногистохимического исследования, включающего определение рецепторов к эстрогену, прогестерону и лейкемия-ингибирующего фактора в ядрах эпителиоцитов и клеток стромы у пациенток 2б группы (до и после плазмотерапии) представлены в таблицах 32, 33, 34.

Таблица 32 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона и LIF у женщин до плазмотерапии (2б группа) в зависимости от исхода программы переноса криопереноса (в баллах; Me (P25;P75))

Показатель		Исход		Значение критерия	Значимость (p)
		Отсутствие клинической беременности	Фиксирована клиническая беременность		
H-scorePR	железы	300 (269;300)	165,5 (100;267)	34,0	0,016*
	строма	217 (169;281)	148 (128,7;176,5)	40,5	0,040*
H-scoreER	железы	126 (16;220)	32,5 (9;99,25)	53,0	0,186
	строма	79 (28;169)	13 (3;48,25)	41,5	0,046*
PR/ER	железы	2,13(1,15; 18)	2,89 (1,2; 8,9)	68,5	0,828
	строма	3,23 (1,4; 7,75)	4,25 (2,16; 23,4)	69	0,483
H-scoreLIF	железы	51 (0;118)	76 (5,25;93,25)	74,5	0,852
	строма	0 (0;0)	0 (0;6,75)	104,0	0,168
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий					

Зафиксирована клиническая беременность у пациенток с особенностями иммуногистологической картиной в цикле до проведения плазмотерапии: снижение интенсивности экспрессии PR в строме (p=0,016) и железах (p=0,40) и ER в строме (p=0,46).

Таблица 33 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона и LIF у женщин после плазмотерапии (2б группа) в зависимости от исхода программы переноса криопереноса (в баллах; Me (P25;P75))

Показатель		Исход		Значение критерия	Значимость (p)
		Отсутствие клинической беременности	Фиксирована клиническая беременность		
H-scorePR	железы	300 (206;300)	202 (186,5;209,5)	23,5	0,002
	строма	250 (160;289)	141 (107;208,75)	48,0	0,110
H-scoreER	железы	141 (107;208,75)	144 (95,75;211,25)	31,5	0,010
	строма	33(22;63)	105(24,5;110,75)	94,5	0,198
PR/ER	железы	1 (1;1,01)	1,35 (1,02; 1,41)	97	0,136
	строма	5,24(3,2;12,7)	1,58 (1,12; 2,3)	35	0,063
H-scoreLIF	железы	0 (0;400)	110 (0;400)	84,5	0,728
	строма	81 (13;300)	36 (12,5;302)	68	0,611
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий					

Зафиксирована клиническая беременность у пациенток с особенностями иммуногистологической картиной после первой плазмотерапии: снижение интенсивности экспрессии PR в строме ($p=0,002$) (рисунок 8) и ER в железах ($p=0,01$). Приближается к статистически значимым различиям отношение рецепторов прогестерона к рецепторам эстрагенов в строме. У пациенток с показателем отношения выше 3 частота наступления беременности ниже ($p=0,063$).

Оценка изменения экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона и LIF в цикле до плазмотерапии и после первого внутриматочного введения представлена в таблице 34.

Таблица 34 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона и LIF до и после плазмотерапии (Me (P25;P75))

Показатель		Me (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
H-scorePR железы	до PRP	269 (150;300)	104	0,717
	после PRP	206 (202; 300)		
H-scorePR строма	до PRP	169 (140;267)	148,5	0,706
	после PRP	182 (126;280)		
H-scoreER железы	до PRP	85 (16;211)	50	0,002*
	после PRP	215 (143;300)		
H-scoreER строма	до PRP	44 (5;123)	168	0,882
	после PRP	47 (22;106)		
H-scoreLIF железы	до PRP	75(0;100)	220	0,000*
	после PRP	100 (0;400)		
H-scoreLIF строма	до PRP	0 (0;0)	80	0,077
	после PRP	54 (13;302)		
Примечание – * $p < 0,05$ – уровень статистической значимости различий				

Следовательно, при плазмотерапии увеличивается экспрессия рецепторов эстрогена в железах ($p=0,002$) (рисунок 9). При сравнении показателей H-scoreLIF наблюдается повышение экспрессии после плазмотерапии в железах ($p < 0,001$), однако статистически значимых различий по исходу программы ВРТ не было выявлено.

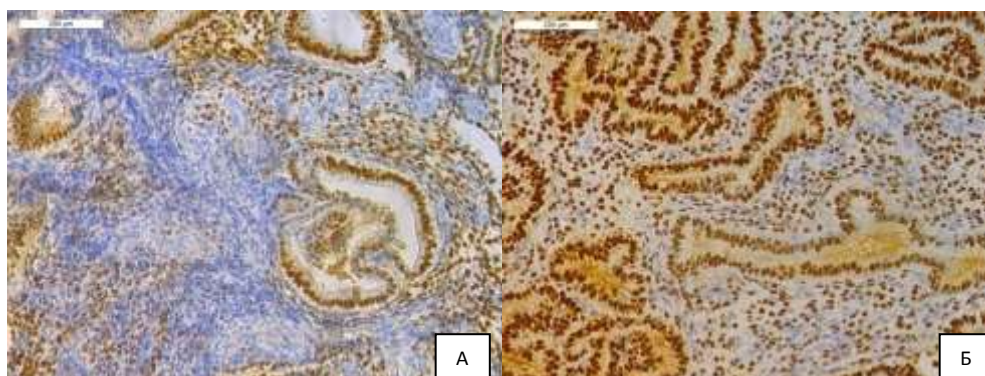


Рисунок 9 –Экспрессия PR у пациентки: А - сниженная экспрессия до плазмотерапии; Б – нормальная экспрессия после плазмотерапии. ИГХ $\times 200$

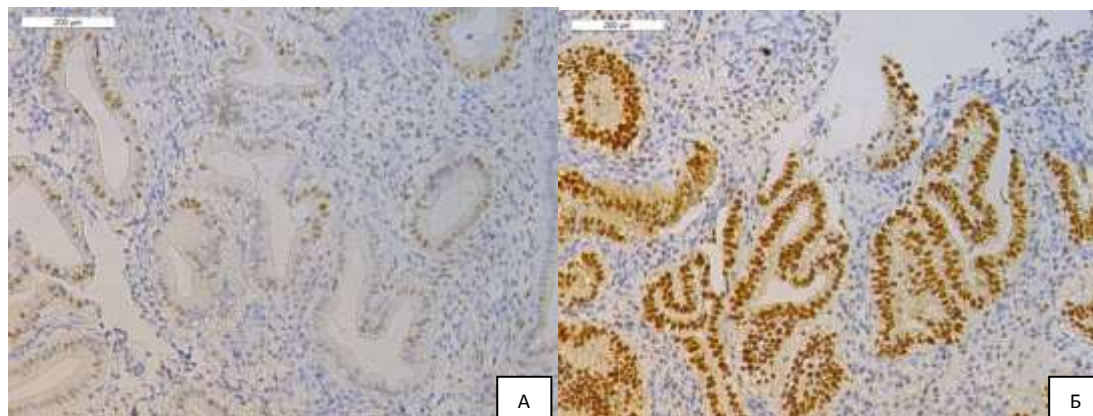


Рисунок 10 –Экспрессия ER у пациентки: А - сниженная экспрессия до плазмотерапии; Б – нормальная экспрессия после плазмотерапии. ИГХ $\times 200$

Оценка изменения экспрессии CD 34+ в цикле до плазмотерапии и после первого внутриматочного введения представлена в таблице 35.

Таблица 35 – Характеристика экспрессии CD 34+ в эндометрии до и после плазмотерапии (Me (P25;P75))

Показатель	Me (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
До плазмотерапии CD 34+	16 (12;26)	37,5	0,346
После плазмотерапии CD 34+	14,5 (11,25; 19,25)		
Примечание – * $p < 0,05$ – уровень статистической значимости различий			

Статистически значимых изменений экспрессии CD 34+ в эндометрии до и после плазмотерапии не было выявлено (рисунок 10).

Наличие связи экспрессии CD 34+ в эндометрии и наступлении клинической беременности отражено в таблице 36.

Таблица 36 – Характеристика экспрессии CD 34+ в эндометрии до и после плазмотерапии в зависимости от исхода программы переноса криопереноса (Ме (P25;P75))

Показатель		Исход		Значение критерия	Значимость (p)
		Отсутствие клинической беременности	Фиксирована клиническая беременность		
CD 34+	До плазмотерапии	13 (13;26)	17(11,75; 24,74)	131	0,943
	После плазмотерапии	16,5 (13,75; 20,25)	11,5 (11;12,75)	41,5	0,146

Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий

Статистически значимых изменений CD 34+ в эндометрии и наступлении беременности не было выявлено. Следовательно экспрессия CD 34+ не является значимым критерием для наступления беременности при применении плазмотерапии (рисунок 11).

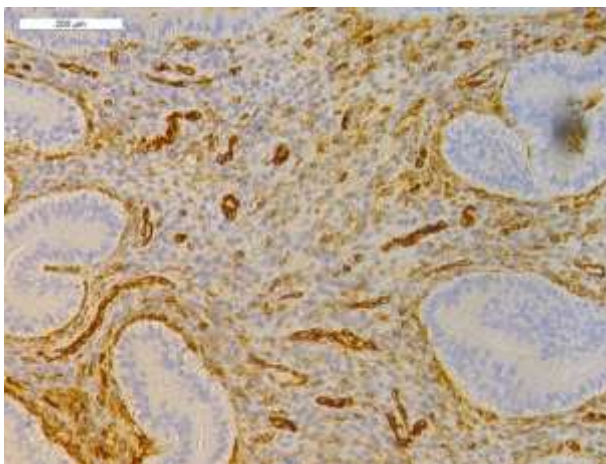


Рисунок 11 – Экспрессия рецептора CD34+ в эндометрии женщин.

ИГХ×200

Оценка изменения Ki67 в строме и железах при применении плазмотерапии отражено в таблице 37.

Таблица 37 – Характеристика экспрессии Ki67 в эндометрии до и после плазмотерапии (Me (P25;P75))

Показатель		Me (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
Ki67 строма	до PRP	17 (9;23)	54,5	0,9
	после PRP	10 (4;40)		
Ki67 железы	до PRP	4 (1;25)	69,5	0,285
	после PRP	7,5 (2,25; 28,75)		
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий				

После плазмотерапии наблюдается снижение экспрессии Ki67 в строме и повышении экспрессии Ki67 в железах, однако, статистически значимых различий не было выявлено.

Наличие связи экспрессии Ki67 в эндометрии и наступлении клинической беременности отражено в таблице 38.

Таблица 38 – Характеристика экспрессии Ki67 в эндометрии до и после плазмотерапии (2б группа) в зависимости от исхода программы переноса криопереноса (Me (P25;P75))

Показатель		Исход		Значение критерия	Значимость (p)
		Отсутствие клинической беременности	Фиксирована клиническая беременность		
Ki67 строма	До плазмотерапии	19 (6;37)	16,5 (10,5;18,25)	4,5	0,382
	После плазмотерапии	14 (5,5;40,25)	6 (1,75; 32)	27	0,437
Ki67 железы	До плазмотерапии	9 (1;34)	3,5 (1; 13,75)	49,5	0,754
	После плазмотерапии	22,5 (4,25;55,5)	3 (2,25;4,5)	18,5	0,102
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий					

Статистически значимых различий по наступлению клинической беременности и изменению экспрессии Ki67 в эндометрии до и после плазмотерапии не было выявлено.

Проведена оценка ранговых корреляционных связей Тау-bКендалла между количеством тромбоцитов при первом внутриматочном введении плазмы и прирост иммуногистохимических показателей (таблица 39).

Таблица 39 – Корреляционные связи между количеством вводимых тромбоцитов в плазму и иммуногистохимическими изменениями

Показатель	Тай-б Кендалла	Значение (двухстороннее)
Прирост H-score PR железы	0,024	0,869
Прирост H-score PR строма	0,037	0,797
Прирост H-score ER железы	-0,067	0,604
Прирост H-score ER строма	0,085	0,543
Прирост H-score LIF железы	-0,089	0,541
Прирост H-score LIF строма	-0,075	0,606
Прирост CD 34+	-0,177	0,380
Прирост Ki67 строма	0,009	0,622
Прирост Ki67 железы	0,000	1

Корреляционных связей между количеством вводимых тромбоцитов и изменениям иммуногистохимических показателей не было выявлено (таблица 40). Эти данные подтверждают предположение, что количество тромбоцитов, содержащихся во вводимой плазме, не влияет на исход программы ВРТ [98]. В случае данного исследования, количество тромбоцитов не повлияло на изменения иммуногистохимических показателей эндометрия.

4.3. Иммуногистохимические изменения эндометрия после применения плазмотерапии по сравнению с показателями фертильных пациенток

Для определения маркеров нерецептивного эндометрия у пациенток с бесплодием проанализированы показатели экспрессии рецепторов эндометрия у пациенток 2б группы и у фертильных женщин. Результаты иммуногистохимического исследования, включающего определение рецепторов к эстрогену, прогестерону, LIF, Ki67 в ядрах эпителиоцитов и клеток стромы у пациенток с бесплодием 2б группы до плазмотерапии и фертильных женщин 5 группы представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона, LIF, Ki67 до плазмотерапии у пациенток с бесплодием и у фертильных женщин (Me (P25;P75))

Показатель		Me (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
H-scorePR железы	5 группа	215 (186,5;221,25)	292	0,080
	2б группа (до PRP)	269 (150; 300)		
H-scorePR строма	5 группа	220 (210;225)	503	0,096
	2б группа (до PRP)	169 (140;267)		
H-scoreER железы	5 группа	210 (180;250)	599,5	0,001*
	2б группа (до PRP)	85 (16;211)		
H-scoreER строма	5 группа	110 (90;162,5)	610	0,001*
	2б группа (до PRP)	44 (5;123)		
H-scoreLIF железы	5 группа	300(127,5;300)	743	0,000*
	2б группа (до PRP)	75 (0;100)		

H-scoreLIF строма	5 группа	300(0;300)	637	0,000*
	2б группа (до PRP)	0 (0;0)		
Ki67 строма	5 группа	7,5 (0;16,25)	189,5	0,007*
	2б группа (до PRP)	17 (9;23)		
Ki67 железы	5 группа	1 (0;11,25)	242,5	0,083
	2б группа (до PRP)	4 (1;25)		
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий				

В рецептивном эндометрии можно выделить увеличение экспрессии рецепторов эстрогенов (ER) и LIF в железах и строме, а так же снижение показателей экспрессии Ki67 в строме (рисунок 12,13). Эти данные указывают на особенности эндометрия (маркеры нерецептивного эндометрия) у пациенток с бесплодием .

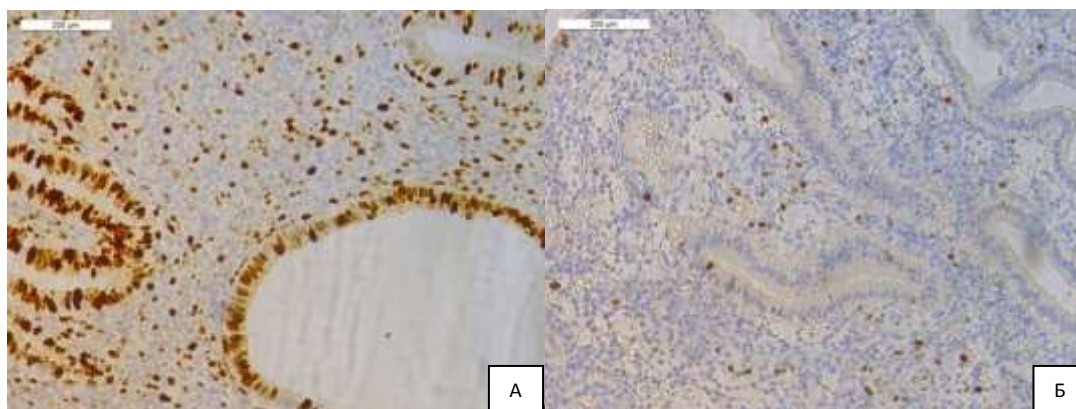


Рисунок 12 – Экспрессия Ki67 в эндометрии женщин: А – повышенная экспрессия, Б – нормальная экспрессия. ИГХ×200

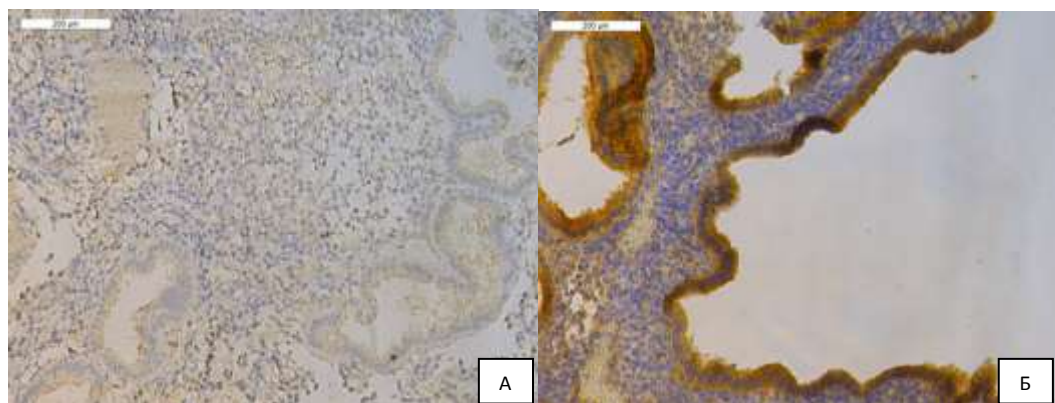


Рисунок 13 – Экспрессия LIF в эндометрии женщин: А – сниженная экспрессия, Б – нормальная экспрессия. ИГХ×200.

Результаты иммуногистохимического исследования, включающего определение рецепторов к эстрогену, прогестерону, LIF, Ki67 в ядрах эпителиоцитов и клеток стромы у пациенток с бесплодием 2б группы после плазмотерапии и фертильных женщин 5 группы представлены в таблицах 42. Таблица 41 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона, LIF, Ki67 после плазмотерапии и у фертильных женщин (Ме (P25;P75))

Показатель		Ме (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
H-scorePR железы	5 группа	215 (186,5;221,25)	255	0,019*
	2б группа (после PRP)	206 (202; 300)		
H-scorePR стромы	5 группа	220 (210;225)	486,5	0,157
	2б группа (после PRP)	182 (126;280)		
H-scoreER железы	5 группа	210 (180;250)	350,5	0,416
	2б группа (после PRP)	215 (143;300)		
H-scoreER стромы	5 группа	110 (90;162,5)	613,5	0,000*

	2б группа (после PRP)	47 (22;106)		
H-scoreLIF железы	5 группа	300(127,5;300)	458	0,286
	2б группа (после PRP)	100 (0;400)		
H-scoreLIF строма	5 группа	300(0;300)	452,5	0,329
	2б группа (после PRP)	54 (13;302)		
Ki67 строма	5 группа	7,5 (0;16,25)	163	0,011*
	2б группа (после PRP)	10 (4;40)		
Ki67 железы	5 группа	1 (0;11,25)	196,5	0,63
	2б группа (после PRP)	7,5 (2,25; 28,75)		
Примечание – * $p < 0,05$ – уровень статистической значимости различий				

После плазмотерапии сохраняются следующие статистически значимые тенденции иммуногистохимических показателей эндометрия по сравнению с показателями у фертильных пациенток: сниженная экспрессия ER в строме и повышенные значения Ki67 в строме. Более высокие показатели H-scorePRV железах эндометрия наблюдается у пациенток после плазмотерапии, чем в эндометрии фертильных женщин ($p=0,019$).

Проведен анализ иммуногистохимических показателей эндометрия после плазмотерапии у пациенток с последующим наступлением клинической беременности и у фертильных женщин (таблица 42).

Таблица 42 – Характеристика экспрессии в эндометрии рецепторов эстрогена, прогестерона, LIF, Ki67 после плазмотерапии у пациенток с наступившей клинической беременностью и у фертильных женщин (Me (P25;P75))

Показатель		Me (P25;P75)	Значение критерия	Значимость (p)
H-scorePR железы	5 группа	215 (186,5;221,25)	195,5	0,928
	2б группа	202 (186,5;209,5)		
H-scorePR строма	5 группа	220 (210;225)	302	0,003*
	2б группа	141 (107;208,75)		
H-scoreER железы	5 группа	210 (180;250)	241	0,204
	2б группа	144 (95,75;211,25)		
H-scoreER строма	5 группа	110 (90;162,5)	194,5	0,006*
	2б группа	105 (24,5;110,75)		
H-scoreLIF железы	5 группа	300(127,5;300)	213	0,527
	2б группа	100 (0;400)		
H-scoreLIF строма	5 группа	300 (0;300)	230	0,328
	2б группа	36 (12,5;302)		
Ki67 строма	5 группа	7,5 (0;16,25)	65	0,229
	2б группа	6 (1,75; 32)		
Ki67 железы	5 группа	1 (0;11,25)	79	0,49
	2б группа	3 (2,25;4,5)		
Примечание – *p<0,05– уровень статистической значимости различий				

По результатам иммуногистохимического анализа в эндометрии пациенток, у которых наступила беременность после плазмотерапии показатели H-scoreER (p=0,006) и H-scorePR (p=0,003) в строма ниже по сравнению с эндометрия фертильных женщин.

Резюме

При анализе микроскопической и иммуногистохимической картины эндометрия были выявлены маркеры нерцептивного эндометрия, те

показатели, которые статистически значимо отличались от показателей фертильных женщин:

- наличие округлой формы желез в 1,2 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,840$ (ДИ 0,708-0,997);
- отсутствие прецедуальной реакции стромы в 6,7 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,149$ (ДИ 0,044-0,505);
- присутствие субнуклеарной вакуолизации в железистом эпителии в 10 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,098$ (ДИ 0,028-0,340);
- отсутствие секреторной трансформации в 3,6 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,280$ (ДИ 0,149-0,525); отсутствие отека стромы в 3,9 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,256$ (ДИ 0,067-0,958);
- присутствие лимфоцитов стромы в 26 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,038$ (ДИ 0,007-0,195);
- отсутствие толстостенных и тонкостенных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 8 раз $OR=0,214$ (ДИ 0,014-1,08) и в 2,3 раза $OR=0,44$ (ДИ 0,283-0,685);
- отсутствие полнокровных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 33 раза $OR=0,029$ (ДИ 0,003-0,253);
- сниженная высота пиноподий;
- сниженные показатели H-scoreER и LIF в строме и железах;
- повышенные показатели Ki67 в строме.

Если у пациенток отсутствует секреторная трансформация желез по результатам микроскопического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла и планируется проведение плазмотерпии, то шанс наступления беременности в 9,4 раз выше $OR=9,433$ (ДИ 0,585-100). Статистически значимыми изменениями в микроскопической картине эндометрия после первого введения плазмы, обогащенной тромбоцитами

являются: уменьшение округлой формы желез (до проведения плазмы $p=0,019$; после первой плазмотерапии $p=0,254$); увеличение частоты прецидуальной реакции стромы (до проведения плазмы $p=0,001$; после первой плазмотерапии $p=0,847$); увеличение частоты отека стромы (до проведения плазмы $p=0,036$; после первой плазмотерапии $p=0,257$); снижение частоты встречаемости лимфоцитов в строме (до проведения плазмы $p=0,000$; после первой плазмотерапии $p=0,117$); увеличение числа толстостенных сосудов (до проведения плазмы $p=0,031$; после первой плазмотерапии $p=0,217$). При применении плазмотерапии выявлена динамика увеличения высоты и площади распределения пиноподий, однако статистических различий не было выявлено.

При плазмотерапии увеличивается экспрессия рецепторов эстрогена в железах ($p=0,002$). При сравнении показателей H-scoreLIF наблюдается повышение экспрессии после плазмотерапии в железах ($p<0,001$), однако статистически значимых различий по исходу программы ВРТ не было выявлено. После плазмотерапии наблюдается снижение экспрессии Ki67 в строме и повышении экспрессии Ki67 в железах, однако статистически значимых различий не было выявлено.

По результатам иммуногистохимического анализа в эндометрии пациенток, у которых наступила беременность после плазмотерапии показатели H-scoreER ($p=0,006$) и H-scorePR ($p=0,003$) в строме ниже по сравнению с эндометрия фертильных женщин.

Статистически значимых изменений экспрессии CD 34+ в эндометрии до и после плазмотерапии не было выявлено, следовательно данный маркер не служит маркером успеха программы ВРТ с применением плазмотерапии.

Корреляционных связей между количеством вводимых тромбоцитов и изменениям иммуногистохимических показателей не было выявлено. Эти данные могут служить косвенным подтверждением предположения, что не только количество тромбоцитов, содержащихся во вводимой плазме, влияет на исход программы ВРТ [79]. В случае данного исследования, количество

тромбоцитов не повлияло на изменения иммуногистохимических показателей эндометрия.

Материалы главы 4 опубликованы в следующих работах:

1. Пат 2762159 С1 Рос. Фед. Способ внутриматочной инфузии аутологичной плазмы женщины для повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / **А.Ю. Храмцова**, Н.В. Башмакова, И.А. Газиева, Г.Н. Чистякова, А.А. Гришкина.- Москва, 2021.- 5с.
2. Башмакова, Н.В. Модуляция рецептивности эндометрия плазмой, обогащенной тромбоцитами / Н.В. Башмакова, **А.Ю. Храмцова**, А.А. Гришкина, И.А. Газиева // Проблемы репродукции. – 2021.- № 2.- С. 76-83.

ГЛАВА 5. СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УСПЕХА В ПРОГРАММЕ ВРТ

5.1. Прогнозирование успеха программы переноса криоконсервированных эмбрионов с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования эндометрия на 18-22 день в предыдущем менструальном цикле ПЭ

С целью повышения эффективности программы переноса криоконсервированного эмбриона с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками ПЭ в анамнезе проанализированы клиничко-анамнестические данные, результаты клинических анализов крови, УЗИ-исследования, микроскопического и иммуногистохимического анализов методом пошагового дискриминантного анализа с помощью пакета прикладных программ «SPSSStatistics версия 22.0».

Дискриминантный анализ является разделом многомерного статистического анализа, который позволяет изучать различия между двумя и более группами объектов по нескольким переменным одновременно. Корректное применение дискриминантного анализа предполагает формирование двух выборок пациентов: обучающей и проверяющей. На обучающей выборке формируется уравнение решающего правила прогноза, позволяющее правильно предсказать вероятность возникновения изучаемого события на данной выборке. Далее уравнение решающего правила проверяется на тестовой выборке и результаты предсказания сравниваются с истинными классами объектов из тестовой выборки. На тестовой выборке рассчитываются чувствительность и специфичность решающего прогностического правила.

Методом пошагового дискриминантного анализа построено следующее распознающее правило:

$$D = -13,228 \times x_1 - 0,048 \times x_2 + 0,0217 \times x_3 + 5,211 \times x_4 + 13,447 \times x_5 - 6,782 \times x_6 - 4,303 \times x_7 + 17,496$$

где

x_1 – индикатор $\{0,1\}$ (0 – число переносов меньше 2;

1 – число переносов больше или равно двух);

x_2 –

количество вводимых тромбоцитов в плазму при первом внутриматочном введении
($10^9/\text{л}$);

x_3 – H – score PR в железах эндометрия;

x_4 – индикатор $\{0,1\}$

(0 – отсутствие секреторной трансформации эндометрия;

1 – наличие секреторной трансформации эндометрия);

x_5 – индикатор $\{0,1\}$

(0 – отсутствие кровоизлияния в образцах эндометрия;

1 – наличие кровоизлияния в образцах эндометрия);

x_6 – индикатор $\{0,1\}$

(0 – отсутствие мононуклеарной инфильтрации;

1 – наличие мононуклеарной инфильтрации стромы);

x_7 – индикатор $\{0,1\}$

(0 – отсутствие полнокровных сосудов в эндометрии;

1 – наличие полнокровных сосудов в эндометрии);

17,496 – константа.

Принятие диагностического решения осуществляется следующим образом: при $D \leq 0$ вероятный исход — наступление клинической

беременности, при $D > 0$ вероятный исход — отсутствие клинической беременности.

Чувствительность и специфичность полученных результатов была оценена при помощи ROC-анализа. По итогам скользящего экзамена в регламенте SPSS чувствительность параметров прогнозирования наступления клинической беременности в криопротоколе и у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла представлена в таблице 43, рисунок 14.

Таблица 43 - ROC –анализ

Область	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
			Нижняя граница	Верхняя граница
0,994	0,011	0,000	0,973	1,000

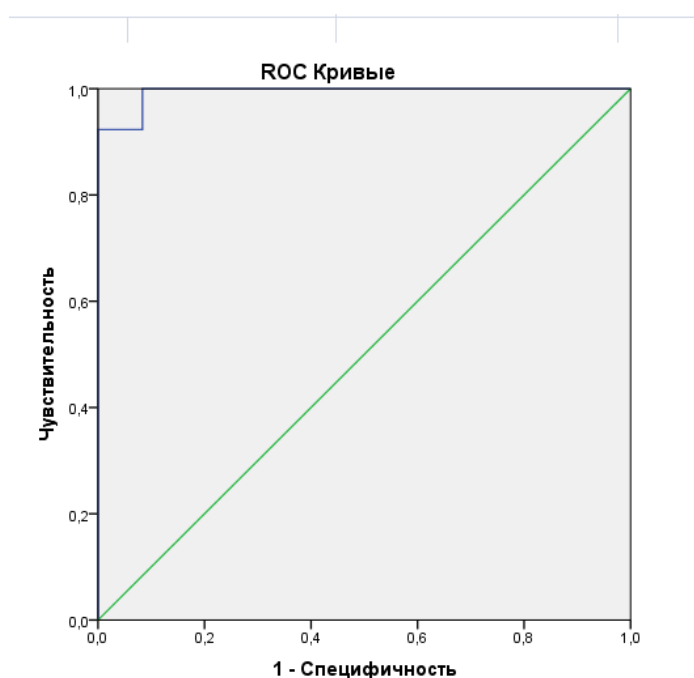


Рисунок 14 – ROC-кривая модели прогнозирования успеха программы криопереноса эмбрионов с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла

По итогам скользящего экзамена в регламенте SPSS чувствительность параметров прогнозирования успеха наступления беременности в программе криопереноса эмбрионов с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования - 92,3%, специфичность - 83,3%.

По результатам построения ROC-кривой показатель области под кривой составил $0,994 \pm 0,011$, ДИ $0,973 - 1$ при $p < 0,001$, что соответствует высокому качеству построения модели прогнозирования успеха программы криопереноса эмбрионов у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла.

Проверка предложенной формулы проведена через многослойный перцептрон нейросети с двумя нейронами (рисунок 15).

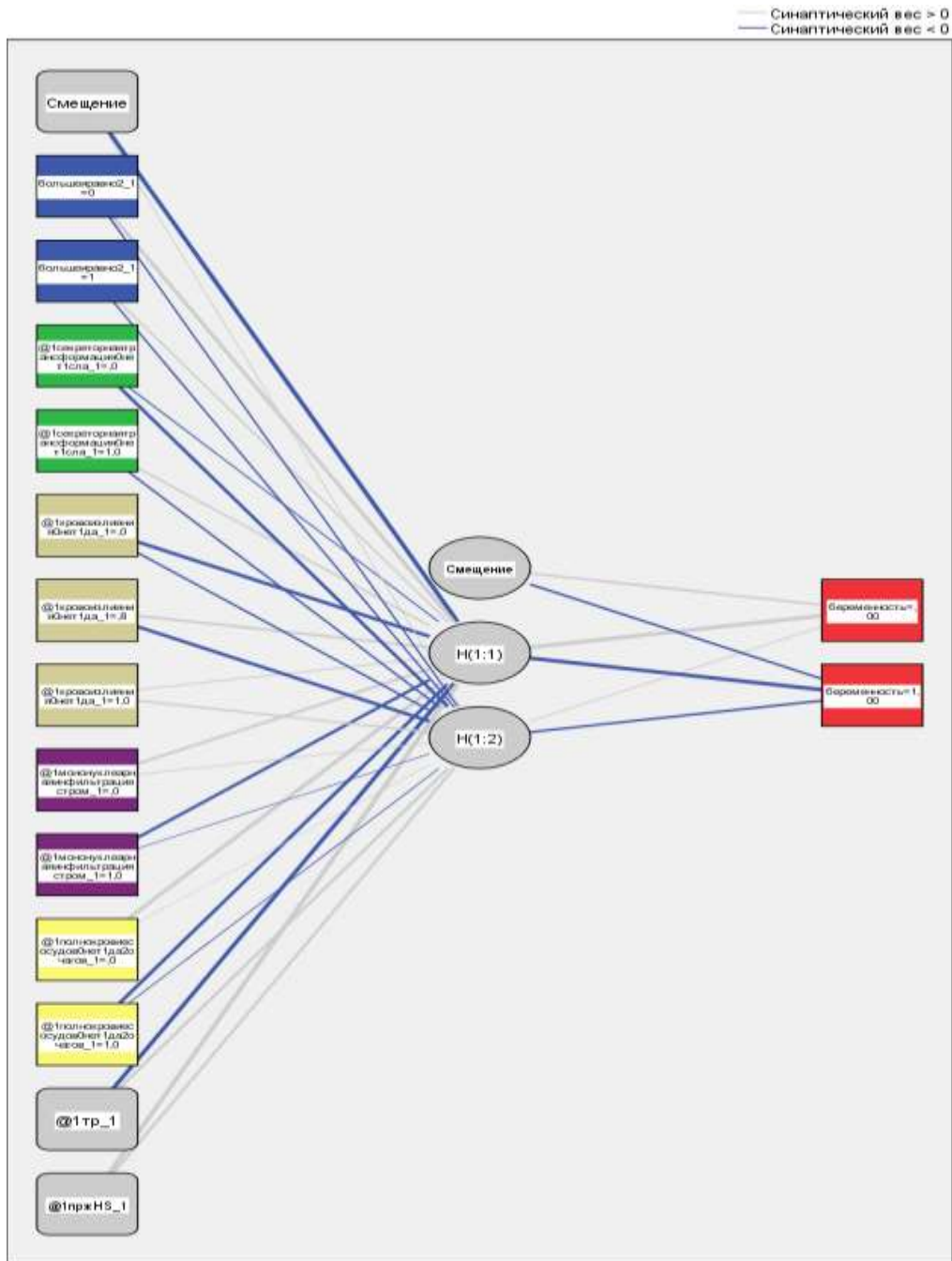


Рисунок 15 – Вводные и выходящие данные о пациентках с неудачными попытками ПЭ в анамнезе и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла нейронной сети

В обучающую выборку вошло 20 женщин, в экзаменационную выборку - 5 женщин. Результаты проверки представлены в таблице 44, рисунок 16.

Таблица 44 – Результаты проверки формулы через нейронную сеть

		Предсказанные			
		0,00	1,00	Процент правильных	
Пример	Обучение	0,00	10	0	100,0%
		1,00	0	10	100,0%
	Общий процент		50,0%	50,0%	100,0%
Проверка		0,00	2	1	66,7%
		1,00	0	2	100,0%
	Общий процент		40,0%	60,0%	80,0%

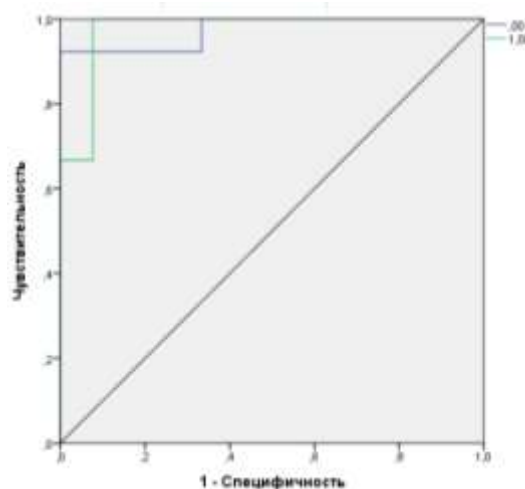


Рисунок 16 – ROC-кривая модели прогнозирования успеха через нейросети программы криопереноса эмбрионов с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла

По результатам построения ROC-кривой через нейронную сеть показатель области площади под кривой составил 0,974, что соответствует высокому качеству построения модели прогнозирования.

Таким образом, разработанный способ позволяет прогнозировать наступление клинической беременности в цикле криопереноса эмбрионов у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов и наличием гистологического исследования на 18-22 день предыдущего менструального цикла.

Клинический пример

Пациентка Т., 31 года обратилась в отделение ВРТ ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ с основным диагнозом женское бесплодие, трубного происхождения для подготовки эндометрия к переносу размороженных эмбрионов. ИМТ пациентки составил 20,7 кг/м², в анамнезе 2 неудачные попытки переноса эмбрионов. Проведено взятие биоптата эндометрия пайпель-биопсией на 18-22 день менструального цикла до переноса эмбрионов для проведения гистологического исследования.

Полученные данные микроскопического исследования эндометрия пациентки представлены в таблице 45.

Таблица 45- Показатели микроскопического исследования эндометрия

Признак	Особенности. Наличие (+) или отсутствие (-) признака
Площадь распределения пиноподий	5%
Высота пиноподий	6,9 мкм
Распределение желез в строме	Равномерное распределение желез
Форма желез	Слегка извитая
Фибробластическая трансформация	-
Фиброз стромы	-
Предцедуальная реакция стромы	-
Субнуклеарная вакуолизация	+
Секреторная трансформация	-
Отек стромы	-
Кровоизлияние	-
Мононуклеарная инфильтрация стромы	-
Периваскулярный склероз	-
Лимфоциты в просвете желез	-
Клубки толстостенных сосудов	-
Клубки тонкостенных сосудов	+
Полнокровие сосудов	+

При иммуногистохимическом исследовании эндометрия данной пациентки выявлены следующие особенности рецептивности эндометрия, представленные в таблице 46.

Таблица 46-Иммуногистохимические показатели эндометрия пациентки

Признак	Значение
H-scorePR железы	18
H-scorePR строма	155
H-score ER железы	11
H-score ERстрома	5
H-scoreLIF железы	7
H-scoreLIFстрома	300
Ki67 строма	17
Ki67 железы	1

Учитывая две неудачные попытки переноса эмбрионов в анамнезе пациентке рекомендована процедура внутриматочной плазмотерапии. На 2й день менструального цикла начата подготовка эндометрия (приМ-ЭХО 2,3 мм) с применением препаратов эстрадиола 4 мг/сут peros. На 14й день менструального цикла проведено УЗ-исследование полости матки М-ЭХО=7,6 мм. Учитывая день менструального цикла, толщину эндометрия решено назначить препараты микронизированного прогестерона в дозировке 600 мг/сут вагинально. В этот же день проведена плазмотерапия по разработанной методике. По данным анализа плазмы содержание тромбоцитов $500 \cdot 10^9/\text{л}$ (содержание в периферической крови $275 \cdot 10^9/\text{л}$). Увеличение количества тромбоцитов при одноступенчатом центрифугировании составило 81,8 %.

Вторая процедура внутриматочного введения плазмы проведена на 17 день менструального цикла (приМ-ЭХО 8,3 мм). Количество тромбоцитов в плазме составило $541 \cdot 10^9/\text{л}$. На 19 день менструального цикла был запланирован перенос размороженных эмбрионов.

Пациентке проведен перенос двух размороженных эмбрионов качеством 4BA, 4BB.

Учитывая полученные данные, проведен прогноз наступления клинической беременности по разработанной формуле.

$$D = -13,228 \times x_1 - 0,048 \times x_2 + 0,0217 \times x_3 + 5,211 \times x_4 + 13,447 \times x_5 - 6,782 \times x_6 - 4,303 \times x_7 + 17,496$$

Формула для пациентки:

$$D = -13,228 \times 1 - 0,048 \times 500 + 0,0217 \times 18 + 5,211 \times 0 + 13,447 \times 0 - 6,782 \times 0 - 4,303 \times 1 + 17,496$$

$$D = -30,426$$

По данным прогноза вероятный исход – наступление клинической беременности.

При анализе содержания бета-ХГЧ на 12 день после переноса, зафиксирована биохимическая беременность. Через 21 день после переноса проведено УЗ-исследования и зафиксирована маточная беременность малого срока.

5.2. Прогнозирование успеха программы ВРТ у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов

С целью повышения эффективности программ ВРТ с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками ПЭ в анамнезе проанализированы клиничко-анамнестические данные, результаты клинических анализов крови, УЗ-исследования, микроскопического и иммуногистохимического анализов методом пошагового дискриминантного анализа с помощью пакета прикладных программ «SPSSStatistics версия 22.0». Данная формула позволит прогнозировать наступление клинической беременности у пациенток без проведения гистологического исследования в предыдущем цикле, вне зависимости от вида программы ВРТ (ЭКО или кроцикл ПЭ).

Методом пошагового дискриминантного анализа (линейной дискриминантной функции Фишера) построено следующее распознающее правило:

$$D = -1,002 \times x_1 - 1,442 \times x_2 - 0,012 \times x_3 - 1,206 \times x_4 + 7,566,$$

где

x_1 – количество переносимых эмбрионов{1,2}

x_2 – качество переносимых эмбрионов

(0 – хорошее качество (AB, BA, BB), 1 – отличное качество (AA));

x_3 –

количество вводимых тромбоцитов в плазму при первом внутриматочном введении
($10^9/\text{л}$);

x_4 – индикатор {0,1} (0 – число переносов меньше 2;

1 – число переносов больше или равно двум);

7,566 – константа.

Принятие диагностического решения осуществляется следующим образом: при $D \leq 0$ вероятный исход — наступление клинической беременности, при $D > 0$ вероятный исход — отсутствие клинической беременности.

Чувствительность и специфичность полученных результатов была оценена при помощи ROC-анализа и проверена через многослойный перцептрон с тремя нейронами (таблица 47, рисунки 17,18).

Таблица 47 – Результаты проверки формулы через нейронную сеть

Пример		Предсказанные		
		0	1	Процент правильных
Обучение	0	33	3	91,7%
	1	7	25	78,1%
	Общий процент	58,8%	41,2%	85,3%
Проверка	0	9	0	100,0%
	1	4	7	63,6%
	Общий процент	65,0%	35,0%	80,0%

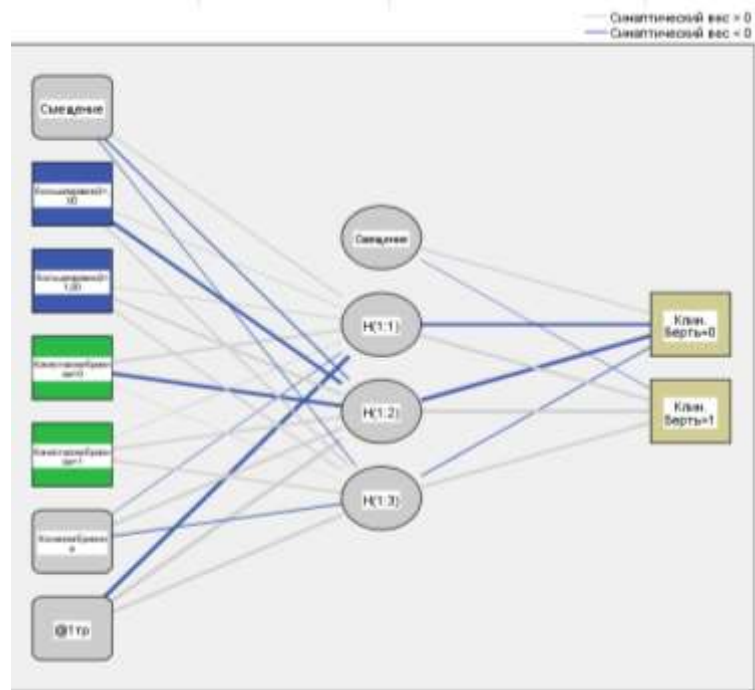


Рисунок 17 – Вводные и выходящие данные о пациентках с неудачными попытками ПЭ в анамнезе нейронной сети

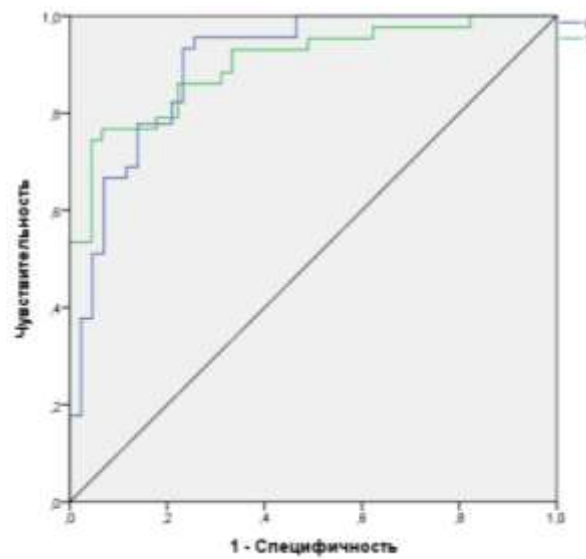


Рисунок 18 – ROC-кривая модели прогнозирования успеха через нейросети программ ВРТ у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов с применением плазмотерапии

В выборку обучения вошли данные 68 пациенток, группу экзамена составили 20 женщин. По итогам скользящего экзамена в регламенте SPSS чувствительность параметров прогнозирования наступления клинической при применении плазмотерапии у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов составила 74,4%, специфичность – 73,3%, площадь под линией составила 90,2%, что соответствует высокому качеству построения модели прогнозирования.

Таким образом, разработанный способ позволяет прогнозировать наступление клинической беременности в программах ВРТ с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытка переноса эмбрионов в анамнезе.

На основе предложенных математических моделей составлен алгоритм прогнозирования наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий при применении плазмотерапии (рисунок 19).



Рисунок 19 – Алгоритм прогнозирования наступления беременности в программах ВРТ при проведении плазмотерапии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большие успехи, достигнутые в области развития методов ВРТ эффективность проведения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не меняется и остается на уровне 30-42% [26].

Программы вспомогательных репродуктивных технологий улучшают общие результаты для бесплодных пар, но некоторые проблемы до сих пор остаются нерешенными, как, например повторные неудачи имплантации (ПНИ). Термин повторные неудачи имплантации применим только к пациентам в программах ВРТ. В клиническом протоколе Минздрава РФ 2019 г. клиническую ситуацию называют «Повторные неудачные попытки переноса эмбрионов (имплантации)» если встречаются случаи трех неудачных попыток селективного переноса «свежих» или размороженных эмбрионов у женщин моложе 35 лет, и двух – у женщин 35 лет и старше, при отсутствии каких-либо факторов, снижающих шансы наступления беременности [25]. Основные причины высокой распространенности неудач в программах ВРТ включают генетические аномалии как мужского, так и женского происхождения, нарушения овуляции, маточные или перитонеальные нарушения [61].

Имплантация – это сложный процесс правильного взаимодействия между эндометрием и бластоцистой. На долю эмбриональных нарушений приходится лишь 30% всех неудач имплантации, в то время как субоптимальная восприимчивость эндометрия и измененный диалог между эмбрионами и эндометрием ответственны за оставшиеся две трети [21].

Поиск методов влияния на рецептивность эндометрия привел к применению препаратов эстрадиола в больших дозах, аспирина, хирургические вмешательства, внутриматочная терапия факторами роста, физиотерапевтические процедуры [49,102,62,87,31,15]. Однако, несмотря на эти вмешательства, многие женщины с тонкими или нерцептивным эндометрием не реагируют на эти методы лечения. Одним из перспективных и

эффективных методов считается внутриматочное применение плазмы, обогащенной тромбоцитами в циклах с переносом эмбрионов.

Было показано, что плазма, обогащенная тромбоцитами играет роль в регенерации тканей, ангиогенезе, миграции клеток, дифференцировке и пролиферации, которые опосредуются многочисленными факторами роста и цитокинами, высвобождаемыми PRP после активации. Специфические факторы роста и цитокины включают трансформирующий фактор роста-бета, фактор роста фибробластов, инсулиноподобные факторы роста 1 и 2, фактор роста эндотелия сосудов и эпидермальный фактор роста [36].

Аутологичная PRP получается путем забора венозной крови, которая центрифугируется для удаления эритроцитов из образца [105]. Существует несколько методов подготовки к PRP от сбора цельной крови до серийно выпускаемых наборов PRP.

Kamath и соавт. обсуждают использование 0,5-1,0 мл PRP для внутриматочной инфузии; однако они не описывают метод приготовления [70]. В методике Chang Y у пациенток было забрано 15 мл цельной крови, а затем использовался двухступенчатый процесс центрифугирования, начальный при $300 \times g$ в течение 10 мин при $18^\circ C$, в результате чего образуются 3 слоя, состоящие из эритроцитов внизу, охристой оболочки посередине и клеточной плазмы в надосадочной жидкости [43]. Два верхних слоя помещали в отдельную пробирку и центрифугировали при $700 \times g$ в течение 15 мин при $18^\circ C$, и от 0,5 до 1,0 мл PRP отбирали пипеткой для инфузий [43]. В работе Nazari и соавт. образец центрифугировали сразу после сбора сначала при 1200 об / мин в течение 10 мин, а затем снова центрифугировали при 3300 об / мин в течение 5 мин, чтобы собрать 0,5 мл PRP для инфузии [90].

Все описанные методики внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами направлены на применение в первой фазе менструального цикла для увеличения толщины эндометрия в циклах подготовки к переносу размороженных эмбрионов.

Разные методы приготовления, время внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, небольшое количество пациентов в исследованиях не дает возможность объединить результаты, полученные авторами и дать полную оценку эффективности применения плазмы, обогащенной тромбоцитами в программах ВРТ.

Применение запатентованной нами методики позволило стандартизировать метод приготовления, введения плазмы, обогащенной тромбоцитами в стимулированных циклах ЭКО и в циклах переноса размороженных эмбрионов. В отличие от двухэтапных методов приготовления использование режима центрифугирования 1500 об/мин в течение 5 минут позволило увеличить концентрацию тромбоцитов в плазме на 64,6 – 69,6% выше, чем в периферической крови и сократить время процедуры. Отсутствие специализированных наборов для одноэтапного центрифугирования позволяет использовать разработанный метод приготовления плазмы с исключением внешнего влияния реагентов для отделения эритроцитарной массы на эндометрий пациентки.

В нашей работе мы вводили плазму, обогащенную тромбоцитами в циклах ЭКО в день пункции и на 3 сутки развития эмбрионов, в криоциклах за 120 и 48 часов до предполагаемого переноса эмбрионов. То есть происходит воздействие на эндометрий во вторую фазу менструального цикла, что отличает от имеющихся методик. При внутриматочном введении в начале пролиферативной фазы введенная плазма влияет на рецепторы эндометрия для формирования «окна имплантации». Рецептивность позволяет эндометрию оптимально реагировать на эмбрион, имплантацию и в дальнейшем формирования плаценты.

Для проведения проспективного, когортного сравнительного исследования были обследованы 200 пациенток. У 88 пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе при проведении программы ВРТ (1 и 2 группа) внутриматочно введена плазма, обогащенная тромбоцитами, согласно разработанной методике.

Основную группу 1 составили 23 женщины, проходящих программу ЭКО в отделении ВРТ ФГБУ НИИ ОММ МЗ РФ, которым проведена плазмотерапия в день пункции фолликулов и на 3е сутки развития эмбрионов. Вторую основную группу составили 65 женщин, проходящих программу переноса размороженных эмбрионов, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона. У 40 пациенток (группа 2а) проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона размороженного эмбриона без пайпель-биопсии эндометрия. Во второй группе у 25 пациенток (2б группа) проводилась гистологическая диагностика рецептивности эндометрия (взятие биоптата эндометрия - пайпель-биопсия) до программы ВРТ (на 18 – 22 день менструального цикла) и во время программы за 48 часов до переноса эмбрионов (в день второго введения плазмы).

Группа сравнения разделена на два подгруппы (3 и 4 группы), в которые были включены 90 пациенток с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ с переносом эмбрионов без проведения плазмотерапии: 36 пациенток, проходящих программу ЭКО («свежий» цикл перенос эмбрионов) (3 группа) и 54 пациентки (4 группа), которым проводился перенос криоконсервированных эмбрионов (криопротокол).

Для сравнения гистологической картины эндометрия до и после плазмотерапии и сопоставления с эндометрием фертильных пациенток, проведена диагностика биоптата эндометрия на 18-22 день менструального цикла у 32 фертильных женщин (5 группа). Данные пациентки гинекологически здоровы, имели в анамнезе минимум одни срочные роды и обратились к специалистам ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ по вопросам планирования беременности.

Учитывая небольшое количество исследований посвященных внутриматочному применению плазмы, обогащенной тромбоцитами в программах ВРТ и отсутствие данных об эффективности в программах стимулированных циклах ЭКО с переносом эмбрионов, мы провели оценку

исходов программ ВРТ (ЭКО и криопереносов) при применении плазмы, обогащенной тромбоцитами.

При анализе исходов программ ВРТ с применением плазмотерапии были выявлены следующие особенности. Количество биохимических беременностей в 1 группе (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО, которым проведена плазмотерапия в день пункции и на 3е сутки развития эмбрионов) -65,21%, статистически значимо выше, чем в 3 группе пациенток (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ЭКО без плазмотерапии с переносом эмбрионов хорошего и отличного качества) – 38,89% ($p=0,049$), но статистически значимых различий по наступлению клинической беременности не было выявлено. Однако проанализировав исходы программ ЭКО у пациенток 1 и 3 группы с 2 и более неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе, наблюдалось статистически значимое увеличение частоты наступления беременностей в группе с применением плазмотерапии- 63,15% против 26,67% у пациенток 3 группы ($p=0,034$).

Следовательно, более высока эффективность при применении плазмотерапии у пациенток, проходящих программу ЭКО, которые имеют два и более неудачных переноса в анамнезе.

В ходе исследования исключено влияние скрейчинг-эффекта при проведении пайпель-биопсии на исходы циклов переноса криоконсервированных эмбрионов. Для этого группа 2 была поделена на подгруппы 2а - пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона и 2б - пациентки с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель - биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ). Частота наступления клинических беременностей у пациенток 2б группы (пациентки с неудачными

попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокोल, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона, а так же пайпель- биопсия эндометрия до и во время программы ВРТ (на 18-22 день менструального цикла и за 48 часов до ПЭ) незначительно выше (48%), чем у пациенток 2а (пациентки, с неудачными попытками ПЭ в анамнезе, проходящих программу ВРТ криопротокол, которым проведена плазмотерапия за 120 и 48 часов до переноса эмбриона) группы (45%). Однако статистически значимых различий не было выявлено ($p=0,813$). Следовательно, проведенная пайпель-биопсия эндометрия не повлияла на исходы программ ВРТ.

Сравнительный анализ исходов программ криопереноса эмбрионов с и без применения плазмотерапии выявил, что частота наступления биохимических и клинических беременностей выше у пациенток в группе с применением плазмотерапии и составляет 56,92% и 46,15% против 29,63% и 22,22% - у пациенток без применения плазмотерапии ($p=0,003$; $p=0,007$). Частота наступления биохимических и клинических беременностей у пациенток с 2 и более неудачными попытками ПЭ статистически значимо выше в группе с применением плазмотерапии 62,26% и 50,94% против 25% у пациенток без применения плазмотерапии перед переносом эмбрионов ($p=0,000$; $p=0,011$).

Полученные данные свидетельствуют о повышении эффективности программ ВРТ при применении плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе, что сопоставимо с данными имеющихся исследований посвященных применению плазмотерапии в циклах подготовки к переносу размороженных эмбрионов у пациенток с «тонким» эндометрием [43,69,91]. Особенно, данная процедура может быть показана в программах переноса криоконсервированных эмбрионов вне зависимости от количества неудачных переносов эмбрионов в анамнезе и у пациенток в циклах ЭКО с 2 и более неудачными попытками ПЭ в анамнезе.

Возможности иммуногистохимических, гистологических, микроскопических исследований приблизили к формированию знаний о

маркерах успешной имплантации. При проведении данной работы оценены изменения эндометрия при внутриматочном введении плазмы, обогащенной тромбоцитами и сопоставление с исходами программ ВРТ.

При анализе микроскопической и иммуногистохимической картины эндометрия были выявлены маркеры нерцептивного эндометрия (показатели у пациенток с бесплодием, которые статистически значимо отличались от фертильных женщин):

- наличие округлой формы желез в 1,2 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,840$ (ДИ 0,708-0,997);
- отсутствие прецидуальной реакции стромы в 6,7 раза уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,149$ (ДИ 0,044-0,505);
- присутствие субнуклеарной вакуолизации в железистом эпителии в 10 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,098$ (ДИ 0,028-0,340);
- отсутствие секреторной трансформации в 3,6 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,280$ (ДИ 0,149-0,525); отсутствие отека стромы в 3,9 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,256$ (ДИ 0,067-0,958);
- присутствие лимфоцитов стромы в 26 раз уменьшает шанс рецептивности эндометрия $OR=0,038$ (ДИ 0,007-0,195);
- отсутствие толстостенных и тонкостенных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 8 раз $OR=0,214$ (ДИ 0,014-1,08) и в 2,3 раза $OR=0,44$ (ДИ 0,283-0,685);
- отсутствие полнокровных сосудов уменьшает шанс рецептивности эндометрия в 33 раза $OR=0,029$ (ДИ 0,003-0,253);
- сниженная высота пиноподий;
- сниженные показатели H-scoreER и LIF в строме и железах;
- повышенные показатели Ki67 в строме

Изменения некоторых маркеров рассмотрены в систематическом метаанализе 2019 года, однако авторы указывают, что основным ограничивающим фактором для качества доказательств, подтверждающих маркеры восприимчивости эндометрия, измеренные с помощью биопсии эндометрия, аспирации эндометриальной жидкости или гистероскопии, была неточность (в том числе несоответствие времени забора эндометрия в исследованиях). Большинство маркеров были исследованы в небольших единичных исследованиях, что привело к неопределенности в отношении значимости и клинической ценности [47]. Нами проведена пайпель-биопсия у пациенток на 18-22 день менструального цикла, что позволяет сопоставить полученные данные гистологического исследования у пациенток с бесплодием, проходящих подготовку у переносу размороженных эмбрионов и у фертильных женщин.

Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами при подготовки эндометрия к переносу эмбрионов меняет гистологическую картину эндометрия. Статистически значимыми изменениями в микроскопической картине эндометрия после первого введения плазмы, обогащенной тромбоцитами являются: уменьшение округлой формы желез (до проведения плазмы $p=0,019$; после первой плазмотерапии $p=0,254$); увеличение частоты прецидуальной реакции стромы (до проведения плазмы $p=0,001$; после первой плазмотерапии $p=0,847$); увеличение частоты отека стромы (до проведения плазмы $p=0,036$; после первой плазмотерапии $p=0,257$); снижение частоты встречаемости лимфоцитов в строме (до проведения плазмы $p=0,000$; после первой плазмотерапии $p=0,117$); увеличение числа толстостенных сосудов (до проведения плазмы $p=0,031$; после первой плазмотерапии $p=0,217$).

Одним из важнейших маркеров тканевого уровня рецептивности эндометрия являются пиноподии – выросты на апикальной части поверхности мембран желез эндометрия в середине лютеиновой фазы менструального цикла [47]. При применении плазмотерапии выявлена динамика увеличения высоты и

площади распределения пиноподий, однако статистических различий не было выявлено.

Роль экспрессии рецепторов в формировании «окна имплантации» описана во многих работах. При повторных неудачах имплантации в строме эндометрия определяется дисбаланс ER и PR (снижение стероидной рецепции или гиперэкспрессия ER). При соотношении PR/ER в диапазоне от 2 до 3 вероятность наступления беременности в программах ВРТ была максимальной [57,46]. Увеличение уровней LIF и LIFR имеют важное значение для имплантации эмбрионов [30,97,107]. При оценке экспрессии Ki67 отмечалось статистически значимое повышение его экспрессии в стромальных клетках эндометрия у женщин с миомами матки и бесплодием, что может быть связано с нарушением регуляции стероидных гормонов [5]. Нами была оценена зависимость иммуногистологических изменений эндометрия и наступление клинической беременности в циклах криопереноса эмбрионов. При плазмотерапии увеличивается экспрессия рецепторов эстрогена в железах ($p=0,002$). При сравнении показателей H-score LIF наблюдается повышение экспрессии после плазмотерапии в железах ($p<0,001$), однако статистически значимых различий по исходу программы ВРТ не было выявлено. После плазмотерапии наблюдается снижение экспрессии Ki67 в строме и повышении экспрессии Ki67 в железах, однако статистически значимых различий не было выявлено.

По результатам иммуногистохимического анализа в эндометрии пациенток, у которых наступила беременность после плазмотерапии показатели H-score ER ($p=0,006$) и H-score PR ($p=0,003$) в строме ниже по сравнению с эндометрия фертильных женщин.

В литературных обзорах нарушение регуляции числа uNK и/ или функции клеток (цитотоксичность, экспрессия рецепторов, секреция цитокинов или экспрессия генов) связаны с репродуктивными неудачами, такими как бесплодие и привычное невынашивание беременности. Увеличение количества CD34+ в эндометрии указан как маркер успешной имплантации [12,11,114].

Однако в нашем исследовании статистически значимых изменений экспрессии CD 34+ в эндометрии до и после плазмотерапии не было выявлено, следовательно данный маркер не служит маркером успеха программы ВРТ с применением плазмотерапии.

Нами не было выявлено корреляционных связей между количеством вводимых тромбоцитов и изменениям иммуногистохимических показателей. Эти данные могут служить косвенным подтверждением предположения, что не только количество тромбоцитов, содержащихся во вводимой плазме, влияет на исход программы ВРТ [72]. Возможно, изменения гистологической картины эндометрия зависят от влияния мононуклеарных клеток периферической крови, таких как моноциты и лимфоциты. Эти клетки стимулируют регенерацию тканей путем высвобождения цитокинов.

Проведенное исследование и анализ полученных результатов позволил разработать две математические модели прогноза наступления клинической беременности методом пошагового дискриминантного анализа, результат работы которых проверены с помощью нейронной сети.

Первая формула прогнозирования успешного исхода программы криопереноса эмбрионов для пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов и наличием гистологической картины эндометрия в предыдущем менструальном цикле при применении плазмотерапии. Данная формула составлена с учетом попыток переносов эмбрионов в анамнезе, наличия гистологических особенностей (наличие или отсутствие секреторной трансформации эндометрия, полнокровных сосудов, мононуклеарной инфильтрации стромы, показателей экспрессии рецепторов прогестерона в железах эндометрия), количества вводимых тромбоцитов при первой плазмотерапии.

Вторая математическая модель прогноза наступления беременности программ ВРТ при применении плазмотерапии у пациенток с неудачными переносами эмбрионов в анамнезе. Разработанная прогностическая модель для пациентов без гистологического анализа эндометрия в программах ВРТ (ЭКО

или крио перенос эмбрионов) основана на количестве попыток переноса эмбрионов в анамнезе, количества вводимых тромбоцитов при первой плазмотерапии, количество и качество переносимых эмбрионов.

На основании разработанных моделей прогнозирования был сформулирован алгоритм прогнозирования наступления беременности в программах ВРТ при проведении плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе.

Полученные данные в результате научной работы доказывают высокую эффективность применения процедуры плазмотерапии в программах ВРТ у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнез по методике, разработанной автором. Однако необходимы дальнейшие исследования и усовершенствования методов внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами для формирования дополнительных групп пациенток с показаниям к плазмотерапии в программах ВРТ.

ВЫВОДЫ

1. Средний возраст у пациенток при повторных попытках переноса эмбрионов составил 33,5 лет при среднем количестве переносов в анамнезе 2,34. Предикторами повторных неудач у пациенток в циклах ВРТ являются:
 - наличие эндокринной патологии за счет гипотиреоза (23,59% против 3,125% у фертильных женщин);
 - гинекологические заболевания, такие как синдром поликистозных яичников (частота встречаемости 11,79%), наружный генитальный эндометриоз (11,2%);
 - наличие рубца на матке (частота встречаемости 9,55%).
2. Усовершенствована методика приготвления и внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами в программах ВРТ, заключающаяся в однократном центрифугировании крови при 1500 об/мин в течение 5 минут с последующим внутриматочным введением в день пункции и на 3 сутки развития эмбрионов в стимулированных циклах ЭКО, за 120 и 48 часов до предполагаемого переноса эмбрионов в криоциклах.
3. Эффективность программ ВРТ (ЭКО и перенос криоконсервированных эмбрионов) статистически значимо выше при применении плазмотерапии у пациенток с двумя и более неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе, по сравнению с исходами программ ВРТ без использования данной процедуры (50,95% против 25% - в циклах ЭКО, 63,15% против 26,67% - в циклах переноса размороженных эмбрионов). Показаниями для проведения внутриматочного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами по разработанной методике, могут являться в циклах ЭКО – 2 и более неудачных переноса эмбрионов в анамнезе, а также циклы переноса размороженных эмбрионов вне зависимости от количества неудачных попыток переносов эмбрионов.

4. Выявлены гистологические маркеры нерецептивного эндометрия, на которые направлено действие активных биологических вещества, содержащиеся в плазме, обогащенной тромбоцитами. Данными маркерами являются: форма желез (округлая), отсутствие предецидуальной реакция стромы, присутствие мононуклеарная инфильтрация в строме, отсутствие секреторной трансформации, отсутствие отека стромы, присутствие лимфоцитов стромы, отсутствие толстостенных и тонкостенных сосудов, отсутствие полнокровных сосудов, сниженная высота пинородий, сниженные показатели H-scoreER и LIF в строме и железах, повышенные показатели Ki67 в строме. После первого внутриматочного введения происходит изменение формы желез (из округлой в извитые), появляются предецидуальная реакция и отек стромы, увеличиваются признаки секреторной трансформации, снижается частота присутствия лимфоцитов стромы, что соответствует характеристикам эндометрия у фертильных женщин.
5. Разработаны два способа прогнозирования успешного исхода (наступления клинической картины) в программах ВРТ.
 - При наличии гистологического исследования эндометрия на 18-22 день предыдущего менструального цикла у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе, которые планирует перенос размороженного эмбриона с применением плазмотерапии, возможно спрогнозировать исход программы ВРТ. При прогнозировании успеха наступления клинической беременности после переноса размороженных эмбрионов учитывается: количество тромбоцитов, вводимых в первый раз, количество неудачных попыток переноса эмбрионов, гистологические показатели: отсутствие или наличие секреторной трансформации, отсутствие или наличие кровоизлияния в образцах эндометрия, отсутствие или наличие мононуклеарной инфильтрации стромы, отсутствие или наличие полнокровных сосудов, H-scorePR в железах эндометрия.

- Прогнозирование наступления клинической беременности с применением плазмотерапии у пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе в программах ВРТ (ЭКО или кроперенос эмбрионов) основано на количестве и качестве переносимых эмбрионов, количестве тромбоцитов, вводимых в первый раз, количество неудачных попыток переноса эмбрионов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациенток с неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе при проведении гистологического исследования биоптата эндометрия на 18-22 день предыдущего менструального цикла до цикла переноса эмбрионов необходимо оценить микроскопическую картину, а также иммуногистохимические показатели: H-scoreER, PR и LIF в строме и железах, Ki67. Исследование экспрессии CD34+ в эндометрии не играет ключевой роли в прогнозировании успеха программы криопереноса эмбрионов.
2. У женщин при двух и более неудачных попыток переноса эмбрионов в анамнезе при подготовке к переносу эмбрионов необходимо рекомендовать проведение процедуры внутриматочной инфузии плазмы, обогащенной тромбоцитами для повышения эффективности программ ВРТ.
3. Для женщин, которые планируют криоперенос эмбрионов и имеют в анамнезе хотя бы один неудачных перенос эмбрионов необходимо рекомендовать проведение плазмотерапии.
4. При приготовлении и введении плазмы, обогащенной тромбоцитами возможно использовании разработанной методикой, которая заключается в одноэтапном центрифугировании крови при 1500 об/мин в течение 5 минут. По окончании центрифугирования содержимое пробирки разделяется на две части: верхняя - желтого цвета (плазма с концентрацией тромбоцитов на 64,6 – 69,6% выше, чем в периферической крови), нижняя – красного цвета (конгломерат форменных элементов, в том числе эритроцитов). Плазму набирают шприцом в катетер для внутриматочных инсеминаций (переносов эмбрионов) в объеме 0,8-1 мл. Внутриматочное введение проводится в циклах ЭКО в день пункции и на 3 сутки развития эмбрионов, в криоцикла за 120 и 48 часов до предполагаемого переноса эмбрионов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CD (clusterofdifferentiation) – кластер дифференцировки лимфоцитов
- CD 34+ (clusterofdifferentiation) - мембранный белок, молекула межклеточной адгезии (сцепления между клетками)
- CO₂- углекислый газ
- CTGF- фактор роста соединительной ткани
- EGF – эпидермальный фактор роста
- ER – рецептор эстрогена
- FGF-1- фактор роста фибробластов
- GCSF -гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- GH – гормон роста
- ICE7 – стромальные клетки эндометрия
- IGFBPs- инсулиноподобный фактор роста
- HIF1- α - фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа
- Ki67 – маркер пролиферации клеток
- LIF – лейкемию ингибирующий фактор
- LIF-R – рецептор к лейкемию ингибирующему фактору
- N₂- свободный азот
- PDGF — тромбоцитарный фактор роста
- PR – рецептор к прогестерону
- PRP – плазма, обогащенная тромбоцитами
- sP-selectin - белок клеточной поверхности
- sCD40L - растворимая форма лиганда клеточной адгезии
- TGF- α,β — трансформирующий фактор роста
- uNK – натуральные клетки–киллеры матки
- VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
- АДФ - аденозиндифосфат
- АМГ - антимюллеров гормон
- анТГнРГ – антагонист гонадотропин релизинг гормона

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
ЗГТ – заместительная гормональная терапия
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИМТ – индекс массы тела
Крио ПЭ – перенос размороженных эмбрионов
КОС – контролируемая овариальная стимуляция
ЛГ - лютеинизирующий гормон
НМС – нейромышечная электростимуляция
ПЭ – перенос эмбриона/ов
РАРЧ – Российская ассоциация репродукции человека
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФДЭ5 - фосфодиэстераза типа 5
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ – хорионический гонадотропин
цГМФ - циклогуанозинмонофосфат
Э - эстрадиол
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айламазян, Э.К. Теория и практика общей экологической репродуктологии / Э.К. Айламазян, Т.В. Беляева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. - № 3. – С. 8-10.
2. Боярский, К.Ю. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ. Обзор литературы / К.Ю.Боярский, С.Н.Гайдуков, Н.А.Пальченко// Проблемы репродукции.- 2013.- № 4.- С. 3-7
3. Брагина, Е.Е. Морфологические маркёры рецептивности эндометрия / Е.Е. Брагина // Проблемы репродукции.- 2013.- № 4.- С. 17-24.
4. Бурлев, В.А. Функциональная активность эндометрия влияет на результаты ЭКО и перенос эмбрионов: молекулярные механизмы регуляции фертильности / В.А. Бурлев, Л.Н. Кузьмичев // Проблемы репродукции. - 2010.- № 2.- С. 41-52.
5. Гришкина, А.А. Морфофункциональные критерии эндометриальной дисфункции у женщин с первичным бесплодием при пролиферативных заболеваниях : автореф. дис. ... канд.мед.наук / А.А. Гришкина.- Санкт-Петербург, 2021.- 24 с.
6. Доронина, О.К. Использование обогащенной тромбоцитами аутоплазмы в программах экстракорпорального оплодотворения у пациенток с бесплодием на фоне хронического эндометрита / О.К. Доронина, Э.Н. Дейлидко // Opinion Leader.- 2020.- № 3.- С. 46-52.
7. Есина, М.М. Система репродукции при гипотиреозе / М.М. Есина //Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева.- 2017.- № 2.- С. 77-83.
8. Казачков, Е.Л. Морфофункциональная характеристика нарушений рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите / Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова, Е.Е. Воропаева и др. // Архив патологии. – 2014. – № 3. – С. 53-48.

9. Киселевич, М.Ф. Клинико-эпидемиологические аспекты женского бесплодия / М.Ф. Киселевич, Г.А. Байбуртян, И.И. Абашкина // Научные исследования и разработки в эпоху глобализации : сборник статей международной научно-практической конференции.- Уфа : Аэтерна, 2017. – С.193-200.
10. Краснопольская, К.В. Современные подходы к оценке рецептивности эндометрия (обзор литературы) / К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, И.Ю. Ершова // Проблемы репродукции.- 2016.- № 5.- С. 61-69.
11. Кузнецова, И.В. Проблема тонкого эндометрия и возможные пути ее решения / И.В. Кузнецова, Н.С. Землона, Т.Н. Рашидов и др. // Эффективная фармакотерапия.- 2015. - № 1. – С.15-25.
12. Кузьмичев, Л.Н. Принципы комплексной оценки подготовки эндометрия у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий / Л.Н. Кузьмичев, В.Ю. Смольникова, Е.А.Калинина // Акушерство и гинекология.- 2010.- № 5.- С.32-36.
13. Келлэт, Е.П. Роль эндометрия в неудачах реализации репродуктивной функции / Е.П. Келлэт, А.В. Шуршалина // Проблемы репродукции. - 2010.-№ 2.- С. 16-20.
14. Макаров, И.О. Молекулярно-биологический профиль при гиперпластических процессах эндометрия / И.О. Макаров, Н.А. Шешукова, А.С. Федотова // Гинекология. – 2012. – № 1. – С. 17-19.
15. Мелкозерова, О.А. Патогенетические аспекты нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами и методы их коррекции : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / О.А. Мелкозерова.- Москва, 2017.- 46 с.
16. Мелкозёрова, О.А. Проблемы коммуникации эмбриона и эндометрия: маркеры нарушений и механизмы влияния / О.А. Мелкозёрова, Н.В. Башмакова, А.В. Есарева // Российский вестник акушера-гинеколога.- 2016.- № 5.- С. 29-36.

17. Мелкозёрова, О.А. Современные технологии подготовки пациенток с патологией эндометрия вирусной этиологии к применению программ вспомогательных репродуктивных технологий / О.А. Мелкозёрова, Н.В. Башмакова, А.В. Есарева и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. -2018.- № 1.- С. 19-24.
18. Мелкозёрова, О.А. Репродуктивные и перинатальные исходы применения криотехнологий в программах экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) / О.А. Мелкозёрова, Н.В. Башмакова, И.В. Данькова и др. // Проблемы репродукции. -2019.- № 3.- С. 82-90.
19. Оразов, М.Р. Повторные неудачи имплантации: этиология и возможности физиотерапии / М.Р. Оразов, Е.С. Силантьева, Р.Е. Орехов и др. // Трудный пациент.- 2020.- № 8-9.- С. 20-24.
20. Оразов, М.Р. Проблемный эндометрий как фактор бесплодия: поиск путей преодоления продолжается / М.Р. Оразов, К.В. Краснопольская, Е.С. Силантьева и др. // Трудный пациент.- 2020.- № 8-9. – С.13-19.
21. Оразов, М.Р. Тайны патогенеза повторных неудач имплантации / М.Р. Оразов, Р.Е. Орехов, Д.П. Камиллова и др. // Трудный пациент.- 2020.- № 4.- С. 43-48.
22. Оценка ооцитов и эмбрионов в лаборатории ВРТ : методические рекомендации. – Москва, 2021.- 17 с.
23. О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению : Приказ № 107 н от 30 августа 2012 г.- Москва, 2012.- 52 с.
24. О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению : Приказ № 803н от 31 июля 2020г.- Москва, 2020.- 80 с.
25. Протокол лечения.Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация : клинические рекомендации № 15-4/466-07.- Москва, 2019.- 185 с.
26. Регистр ВРТ РАРЧ. Отчет за 2019 год. - Санкт-Петербург, 2021.- 30 с.

27. Рудакова, Е.Б. Новые возможности в диагностике внутриматочной патологии в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Е.Б. Рудакова // Лечащий врач.-2013.- № 11.- С.10-14.
28. Струков, А.И. Патологическая анатомия : учебник для медицинских вузов / А.И. Струков, В.В. Серов. – Москва : Литтерра, 2012. – 846 с.
29. Толибова, Г.Х. Сравнительная оценка морфологических критериев эндометриальной дисфункции у пациенток с первичным бесплодием, ассоциированным с воспалительными заболеваниями малого таза, наружным генитальным эндометриозом и миомой матки / Г.Х. Толибова // Журнал акушерства и женских болезней.– 2016.– № 6.– С. 52-60.
30. Ульшина, О.А. Хронический эндометрит: место в структуре внутриматочной патологии у женщин с первичным и вторичным бесплодием / О.А. Ульшина // Наука, образование, общество : тенденции и перспективы развития : материалы VI междунар. науч.-практ. конф. – Чебоксары : ЦНС «Интерактив плюс», 2017. – С. 87-90.
31. Шнейдерман, М.Г. Проблема тонкого эндометрия: возможности комбинированного негормонального лечения при подготовке к процедуре экстракорпорального оплодотворения / М.Г. Шнейдерман, Е.А. Калинина, В.Ю. Смольникова и др. // Гинекология.- 2014.- № 3. - С.
32. Шуршалина, А.В. Морфофункциональные перестройки эндометрия в «окно имплантации» / А.В. Шуршалина, Т.А. Демура // Акушерство и гинекология.- 2011.- № 7.- С. 9-13.
33. Amir, W. Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology / W. Amir, B. Micha, H. Ariel et al. // Fertility and Sterility/- 2007.- Vol.87, № 4.- P. 799–804.
34. Amui, J. Successful twin pregnancy in a donor oocyte recipient despite a maximum endometrial thickness in the late proliferative phase of 4 mm / J. Amui, J.H. Check, R. Cohen // Clin. Exp. Obstet. Gynecol. - 2011. - № 38. - P. 328-329.

35. Aghajanova, L. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium / L. Aghajanova, A. Stavreus–Evers, Y. Nikas et al. // *Fertil. Steril.* –2003. – Vol.79. – P. 808-814.
36. Aghajanova L. In Vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration / L. Aghajanova, S. Houshdaran, S. Balayan et al. // *J Assist Reprod Genet.* - 2018.- Vol.35, № 5.- P. 757–770.
37. Boswell, S.G. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors / S.G. Boswell, B.J. Cole, E.A. Sundman et al. // *Arthroscopy.* -2012.- Vol.28, № 3.–P. 429-439.
38. Bos-Mikich, A. Platelet-rich plasma or blood-derived products to improve endometrialreceptivity? / A. Bos-Mikich, O.F. Marcelo, O. de Ricardo et al. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.*- 2019.- Vol.36.- P. 613–620.
39. Boynukalin, K. The use of growth hormone in in vitro fertilization / K. Boynukalin, T. Güler // *Basic Clin Sci.*- 2013.- Vol. 2.- P. 123-127.
40. Brosens, J.J. Uterine selection of human embryos at implantation / J.J. Brosens, M.S. Salker, G. Tekler et al // *Sci. Rep.*–2014. – Vol. 4. –P. 38-94.
41. Carvalho, F.M. Functional endometrial polyps in infertile asymptomatic patients: a possible evolution of vascular changes secondary to endometritis / F.M. Carvalho, F.N. Aguiar, R. Tomioka et al // *Eur J Obstet Gynecol. Reprod. Biol.* – 2013. – Vol. 170. – № 1. – P. 152-156.
42. Cervello, I. 133+ bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome / I. Cervello, C. Gil-Sanchis, X. Santamaría // *Fertility and Sterility.*- 2015.- Vol.104, № 6.- P. 1552-1560.
43. Chang, Y. Autologous platelet-rich plasma infusion improves clinical pregnancy rate in frozen embryo transfer cycles for women with thin endometrium / Y.Chang, J. Li, L. Wei et al. // *Medicine.*- 2019.- Vol.98.- P. 1-5.

44. Chang, Y. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization / Y. Chang, J. Li // International Journal of Clinical and Experimental Medicine.- 2015.- Vol.8, № 1.- P. 1286-1290.
45. Check, J.H. Live fetus following embryo transfer in a woman with diminished egg reserve whose maximal endometrial thickness was less than 4 mm / J.H. Check, R. Cohen // Clin. Exp. Obstet. Gynecol. - 2011. - № 38. - P. 330-332.
46. Connelly, O.M. Reproductive functions of progesterone receptors Recent / O.M. Connelly // Prog. Horm. Res.- 2012. – Vol.57.- P.339 - 355.
47. Craciunas, L. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / L. Craciunas, I. Gallos, J. Chu et al. //Hum Reprod Update.- 2019.- Vol.25, № 2.- P. 202-223.
48. Cui, N. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium /N. Cui, A.-M. Li, Z.-Y. Luo et al. // Journal of Endocrinological Investigation January.- 2019.- Vol. 42, № 1.- P. 27–35.
49. De Miguel-Gómez, L. Comparison of different sources of platelet-rich plasma as treatment option for infertility-causing endometrial pathologies / L. De Miguel-Gómez, S. López-Martínez, H. Campo H, Francés-Herrero et al. // Fertil Steril.-2020.- Vol.115,№ 2.- P. 490–500.
50. Dehghani-Firouzabadi, R. Effect of sildenafil citrate on endometrial preparation and outcome of frozen-thawed embryo transfer cycles: a randomized clinical trial / R. Dehghani-Firouzabadi, F. Davar, M. Hojjat et al. // Iran J. Reprod. Med. -2013.- Vol.11, № 2.- P. 151–158.
51. Dehkhoda, F. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects / F. Dehkhoda, M. Christine, L. Johan // Medina and Andrew J. Brooks. Frnt. Endocrinol.- 2018.- Vol.13.- P. 345-367.
52. Ding, J.L. Aberrant expressions of endometrial Id3 and CTLA-4 are associated with unexplained repeated implantation failure and recurrent miscarriage /

- J.L. Ding, L.H. Diao, T.L. Yin et al. // *Am J Reprod Immunol.*- 2017.- Vol.78, № 2.- P. 822-980.
53. Donoghue, J.F. Endometrial uNK cell counts do not predict successful implantation in an IVF population / J.F. Donoghue, P. Paiva, W.T. The et al. // *Hum Reprod.*- 2019.- Vol.34, №12.- P. 2456-2466.
54. Edwards, R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? / R.G. Edwards // *Reprod. Biomed. Online.*- 2006.- Vol.13.- P. 887-904.
55. Enciso, M. The precise determination of the window of implantation significantly improves ART outcomes / M. Enciso, J. Aizpurua, B. Rodríguez-Estrada et al. // *Sci Rep.*- 2021.- Vol.11, № 1.- P. 134-200.
56. Fetih, A.N. Adding sildenafil vaginal gel to clomiphene citrate in infertile women with prior clomiphene citrate failure due to thin endometrium: a prospective self-controlled clinical trial / A.N. Fetih, D.M. Habib, I.I. Abdelaal et al. // *Facts Views Vis Obygn.*- 2017.- Vol.9, № 1.- P. 21-27.
57. Gallos, I.D. Optimal endometrial thickness to maximize live births and minimize pregnancy losses: Analysis of 25,767 fresh embryo transfers / I.D. Gallos, M. Khairy, J. Chu et al. // *Reprod Biomed Online.*- 2018.- Vol.37, № 5.- P. 542-548.
58. Germeyer, A. Endometrial beta3 integrin profile reflects endometrial receptivity defects in women with unexplained recurrent pregnancy loss / A. Germeyer, R.F. Savaris, J. Jauckus // *Reproductive Biology and Endocrinology.*- 2014.- Vol.12.- P. 53 – 67.
59. Gleicher, N. A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies / N. Gleicher, A. Kim, T. Michaeli et al. // *Human Reproduction.*- 2013.- Vol.28, № 1.- P. 172–177.
60. Günther, V. Recurrent implantation failure - an overview of current research / V.Günther, S.V. Otte, D. Freytag et al. // *Gynecol Endocrinol.*- 2021.- Vol.37, № 7.- P. 584-590.

61. Hanni, K. The effect of tamoxifen on thin endometrium in patients undergoing frozen–thawed embryo transfer / K. Hanni, J. Jingjing, X. Mingd et al.// *Reproductive Sciences.*- 2018.-Vol.25, № 6. P. 861-866.
62. Hesseler, M.J. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review / M.J. Hesseler, N. Shyam // *J Am Acad Dermatol.*- 2019.- Vol.81, № 3.- P. 834-846.
63. Hirata, K. Histological diagnostic criterion for chronic endometritis based on the clinical outcome / K. Hirata, F. Kimura, A. Nakamura et al. // *BMC Womens Health.*- 2021.- Vol.21, № 1.- P. 94.
64. Huang, J. Value of endometrial thickness change after human chorionic gonadotrophin administration in predicting pregnancy outcome following fresh transfer in vitro fertilization cycles / J. Huang, J. Lin, H. Gao et al. // *Arch Gynecol Obstet.*- 2021.- Vol.303, № 2.- P. 565-572.
65. Irani, S. Evaluation of the uterine causes of female infertility by ultrasound: a literature review / S. Irani, F. Ahmadi, M. Javam // *Journal of Midwifery and Reproductive Health.* – 2017. – Vol.5, № 2. – P. 919-926.
66. Ipsa, E. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues / E. Ipsa, V.F. Cruzat, J.N. Kagize et al. // *Front Endocrinol (Lausanne).* -2019.- Vol.12, № 10.- P. 7-77.
67. Jansen, E.E. Platelet-therapeutics to improve tissue regeneration and wound healing-physiological background and methods of preparation / E.E. Jansen, A. Braun, P. Jansen et al. // *Biomedicines.*- 2021.- Vol.9, № 8.- P. 86-89.
68. Jurk, K. Platelets: physiology and biochemistry / K. Jurk, B.E. Kehrel // *Semin Thromb Hemost.*-2005.- Vol.31, № 4.- P. 381-392.
69. Kamath, M.S. Clinical adjuncts in in vitro fertilization: a growing list / M.S. Kamath, M. Mascarenhas, S. Franik et al. // *Fertil Steril.* -2019.- Vol.34.- P.1–9.
70. Kamath, M.S. Granulocyte-colony stimulating factor administration for subfertile women undergoing assisted reproduction / M.S. Kamath, R.

- Kirubakaran, S.K. Sunkara //Cochrane Database Syst Rev.- 2020.- Vol.17, № 1.- P. 13-26.
71. Karavani, G. Endometrial thickness following early miscarriage in IVF patients - is there a preferred management approach? / G. Karavani, H. Alexandroni, D. Sheinin et al. // *Reprod Biol Endocrinol.*- 2021.- Vol.19, № 1.- P. 9-13.
72. Kim, M.K. Human platelet-rich plasma facilitates angiogenesis to restore impaired uterine environments with asherman's syndrome for embryo implantation and following pregnancy in mice / M.K. Kim, J.A. Yoon, S.Y. Yoon et al. // *Cells.*- 2022.- Vol.11, № 9.- P.15-49.
73. Kitaya, K. Endometritis: new time, new concepts / K. Kitaya, T. Takeuchi, S. Mizuta et al. // *FertilSteril.* -2018.- Vol.110, № 3.- P. 344-350.
74. Kitaya, K. Multi-drug-resistant chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure: trend over the decade and pilot study for third-line oral antibiotic treatment / K. Kitaya, S.E. Tanaka, Y. Sakuraba et al. // *J Assist Reprod Genet.*- 2022 .- № 2. – P. 354-401.
75. Klonos, E. Endometrial changes in estrogen and progesterone receptor expression during implantation in an oocyte donation program / E. Klonos, P. Katopodis, E. Karteris et al. // *ExpTher Med.*- 2020.- Vol.20, № 6.- P.1-78.
76. Kolanska, K. Proportion of cytotoxic peripheral blood natural killer cells and t-cell large granular lymphocytes in recurrent miscarriage and repeated implantation failure: case-control study and meta-analysis / K. Kolanska, L/ Suner, J. Cohen et al. // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*-2019.- Vol.67, № 4.- P. 225–236.
77. Lash, G.E. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage / G.E. Lash, J. Ernerudh // *Journal of Reproductive Immunology.*- 2015.- Vol.108.- P.83–89.
78. Lessey, B.A. What exactly is endometrial receptivity? / B.A. Lessey, S.L. Young // *FertilSteril.*- 2019.- № 111.- P. 611-617

79. Lin, Y. Platelet-rich plasma as a potential new strategy in the endometrium treatment in assisted reproductive technology / Y. Lin, J. Qi, Y. Sun et al. // *Front Endocrinol (Lausanne)*.- 2021.- Vol.18, № 12.- P. 7075-7084.
80. Luddi, A. Clues to non-invasive implantation window monitoring: isolation and characterisation of endometrial exosomes / A. Luddi, N. Zarovni, E. Maltinti et al. // *Cells*. – 2019.- Vol. 8, № 8.- P. 8-11.
81. Mac Lean, J.A. Progesterone actions and resistance in gynecological disorders / J.A. Mac Lean, K. Hayashi // *Cells*.- 2022 .- Vol.11, № 4.- P. 64-67.
82. Madafeitom, M.A. Neuromuscular electrical stimulation and biofeedback therapy may improve endometrial growth for patients with thin endometrium during frozen-thawed embryo transfer: A preliminary report / M.A. Madafeitom, D. Bodombossou, Z. Chengyu et al.//*Reproductive Biology and Endocrinology*.- 2011.- № 9.- P.12-22.
83. Makker, A. Cellular homeostasis, implantation window and unexplained infertility: Role of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 / A. Makker, M.M. Goel, K. Manuet et al. // *Int J Reprod Contracept. Obstet. Gynecol.* – 2019. – Vol. 8. – P. 2754-2760.
84. Makrigiannakis, A. Approaches to improve endometrial receptivity in case of repeated implantation failures / A. Makrigiannakis, F. Makrygiannakis, T. Vrekoussis // *Front Cell Dev Biol*.- 2021.- Vol. 9, № 61.- P. 32-77.
85. Mariee, N.G. The correlation of autoantibodies and uNK cells in women with reproductive failure / N.G. Mariee, E. Tuckerman, S. Laird et al. // *J Reprod Immunol*.- 2012.- Vol.95, № 1–2.- P. 59–66.
86. Marin, L. Sildenafil supplementation for women undergoing infertility treatments: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / L. Marin, A. Andrisani, L. Bordin et al. // *Clin Med*.- 2021 Vol.10, № 19.- P. 43-46.
87. Marini, M.G. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro / M.G. Marini, C. Perrini, P. Esposti et al. // *Reprod Biol Endocrinol*.- 2016.- № 14.- P. 58–75.

88. Moberg, C. Endometrial expression of LIF and its receptor and peritoneal fluid levels of IL-1 α and IL-6 in women with endometriosis are associated with the probability of pregnancy / C. Moberg, V. Bourlev, N. Ilyasova // Archives of Gynecology and Obstetrics.- 2015.- Vol.292, № 2.- P.429–437.
89. Mrozikiewicz, A.E. Biomolecular markers of recurrent implantation failure-a review / A.E. Mrozikiewicz, M. Ożarowski, P. Jędrzejczak et al. // Int J Mol Sci.- 2021.- Vol. 22, № 18.- P.10-82.
90. Nazari, L. Effects of autologous platelet-rich plasma on endometrial expansion in patients undergoing frozen-thawed embryo transfer: a double-blind RCT / L. Nazari, S. Salehpour, S. Hoseini et al. // Int J Reprod BioMed.- 2019.- №17.- P. 443-448.
91. Nazari, L. Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: A pilot study / L. Nazari, S. Salehpour / Int J Reprod Bio Med.- 2016.- Vol.14, № 10. – P. 625-628.
92. Nazari, L. The effects of autologous platelet-rich plasma on pregnancy outcomes in repeated implantation failure patients undergoing frozen embryo transfer: a randomized controlled trial / L. Nazari, S. Salehpour, S. Hosseini et al. // Reprod Sci. -2022.- Vol.29, № 3.- P. 993-1000.
93. Pantos, K. The role of interleukins in recurrent implantation failure: a comprehensive review of the literature / K. Pantos, S. Grigoriadis, E. Maziotis et al.//Int J Mol Sci.- 2022.- Vol.23, № 4.- P. 21-98.
94. Park, J.Y. A microphysiological model of human trophoblast invasion during implantation / J.Y. Park, S. Mani, G. Clair et al. // Nat Commun. -2022.- Vol.13, № 1.- P. 12-52.
95. Puente Gonzalo, E. Intrauterine infusion of platelet-rich plasma for severe Asherman syndrome: a cutting-edge approach / E. Puente Gonzalo, L. Alonso Pacheco, A. Vega Jiménez et al. // Updates Surg.- 2021.- Vol.73, № 6.- P. 2355-2362.
96. Quinn, C. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity / C. Quinn, R. Casper // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol.15. – P. 229-236.

97. Rarani, F.Z. Endometrial pinopodebiomarkers: molecules and micro RNAs / F.Z. Rarani, F. Borhani, B. Rashidi // *J. Cell Physiol.* –2018. – Vol.233. – P. 9145-9158.
98. Richter, K.S. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos / K.S. Richter, K.R. Bugge, J.G. Bromer et al. // *Fertility and Sterility.*– 2007.- Vol.8, № 1.- P. 53–59.
99. Rocha, M.N.C. The role played by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on women submitted to in vitro fertilization associated with thin endometrium: systematic review / M.N.C. Rocha, R.S. Florêncio, R.R.F. Alves et al. // *JBRA Assist Reprod.* -2020.- Vol.24, № 3.- P. 278-282.
100. Rossman, I. The injection of the blood vascular system of the uterus / I. Rossman, G.W. Bartelmez // *Anat. Rec.*- 1957.- Vol.128.- P. 223–231.
101. Sarvi, F. Effect of increased endometrial thickness and implantation rate by granulocyte colony-stimulating factor on unresponsive thin endometrium in fresh in vitro fertilization cycles:a randomized clinical trial, fatemehsarvi, marjanarabahmadi, ashraf alleyassin, marziehagha hosseiniand marzieghasemi / F. Sarvi // *Obstetrics and Gynecology International.*- 2017.- Vol.20.- P. 6.
102. Saxtorph, H.M. Are different markers of endometrial receptivity telling us different things about endometrial function? / H.M. Saxtorph, G. Persson, T. Hallager et al. // *Am J Reprod Immunol.*- 2020.- Vol. 84, № 6.- P.133-123.
103. Saxtorph, M.H. Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study / M.H. Saxtorph, T. Hallager, G. Persson et al. // *Reprod Biomed Online.*- 2020.- Vol. 41, № 6.- P. 998-1006.
104. Sfakianoudis, K. The role of uterine natural killer cells on recurrent miscarriage and recurrent implantation failure / K. Sfakianoudis, A. Rapani, S. Grigoriadis et al. // *From Pathophysiology to Treatment. Biomedicines.*- 2021.- Vol.9, № 10.- P. 14-25.

105. Sharara, F.I. A narrative review of platelet-rich plasma (PRP) in reproductive medicine / F.I. Sharara, L.L. Lelea, S. Rahman et al. // *J Assist Reprod Genet.*- 2021.- Vol.38, № 5.- P. 1003-1012.
106. Sharma, S. Tamoxifen is better than low- dose clomiphene or gonadotropins in women with thin endometrium (<7 mm) after clomiphene inintrauterine insemination cycles: a prospective study / S. Sharma, G. Rani, G. Bose et al. // *Journal of Human Reproductive Sciences.*- 2018.-Vol.11, № 1.- P. 34-39.
107. Siarkou, M. LIF and LIF-R expression in the endometrium of fertile and infertile women: A prospective observational case - control study / M. Siarkou // *Molecular medicine reports.*- 2016.- № 13.- P. 4721-4728.
108. Textor, J. Platelet-rich plasma (prp) as a therapeutic agent: platelet biology, growth factors and a review of the literature / J. Textor, J. Lana, S. Andrade Santana et al.// *Platelet-Rich Plasma. Lecture Notes in Bioengineering.* Springer.- Berlin, Heidelberg, 2014. – 234 p.
109. Toukhy, T.El. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles / T.El. Toukhy, A. Coomarasamy, N. Khairy // *Fertil. Steril.*- 2008.- Vol.89.- P. 832–839.
110. Urman, B. Platelet-rich plasma another add-on treatment getting out of hand? how can clinicians preserve the best interest of their patients? / B. Urman, A. Boza, B. Balaban // *Hum Reprod.*- 2019.- Vol.34, № 11.- P. 2099–20103.
111. Vacca, P. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells / P. Vacca, C. Vitale, E. Montaldo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*- 2011.- Vol.108, № 6.- P.2402–2407.
112. Xu, J. The effects of endometrial thickness on pregnancy outcomes of fresh ivf/icsi embryo transfer cycles: an analysis of over 40,000 cycles among Five Reproductive Centers in China / J. Xu, S. Zhang, L. Jin et al. // *Front Endocrinol (Lausanne).*- 2022.- Vol.24, № 12.- P. 788-806.

113. Yang, H.W. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos / H.W. Yang, K.J. Hwang, H.C. Kwon // Hum. Reprod.- 1998.- Vol.13.- P. 998–1002.
114. Yin, M. CD34⁺KLF4⁺ stromal stem cells contribute to endometrial regeneration and repair / M. Yin, H.J. Zhou, C. Lin et al. // Cell Rep.- 2019.- Vol.27, № 9.- P. 2709-2724.
115. Zhu, Y.C. Effect of intrauterine perfusion of granular leukocyte-colony stimulating factor on the outcome of frozen embryo transfer / Y.C. Zhu, Y.X. Sun, X.Y. Shen et al. // World J Clin Cases.- 2021.- Vol.9, № 30.- P. 9038-9049.