

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации

На правах рукописи

Орехов Роман Евгеньевич

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕОДОЛЕНИЯ ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧ
ИМПЛАНТАЦИИ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ
МАТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

3.1.33. Восстановительная медицина,
спортивная медицина, лечебная физкультура,
курортология и физиотерапия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук
Оразов Мекан Рахимбердыевич
доктор медицинских наук,
Силантьева Елена Суликовна

Москва — 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧАХ ИМПЛАНТАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1 Дефиниции и потенциально значимые механизмы повторных неудач имплантации	13
1.2 Факторы риска повторных неудач имплантации.....	22
1.3 Преодоление повторных неудач имплантации	26
1.4 Заключение	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК.....	42
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
4.1 Иммуногистохимическое исследование эндометрия изучаемой когорты в средней стадии фазы пролиферации	57
4.2 Иммуногистохимическое исследование эндометрия в период «окна» имплантации (на 7-й день после пика концентрации ЛГ) в средней фазе секреции	63
ГЛАВА 5. МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДОВ ВРТ У ПАЦИЕНТОК С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ	71
5.1 Математическая модель прогнозирования успешности имплантации на основании клинико-анамнестических факторов.....	71
5.2 Математическая модель прогнозирования успешности имплантации на основании морфологических и иммуногистохимических предикторов	75
ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ.....	79
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82

7.1 Клинико-anamнестические факторы риска повторных неудач имплантации ..	84
7.2 Роль факторов местного иммунитета в фазе пролиферации в патогенезе повторных неудач имплантации.....	92
7.3 Роль факторов местного иммунитета в фазе секреции и окне имплантации в патогенезе повторных неудач имплантации	94
7.4 Эффективность комплексной терапии.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	104
ЛИТЕРАТУРА.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения 2020 года в мире бесплодны до 186 миллионов пар, в то время как мета-анализ 2022, включивший более чем 32 исследований с включением 124 556 женщин демонстрирует высокую распространенность женского бесплодия в популяции, достигающую 46,25% [124]. В РФ распространенность женского бесплодия по данным различных авторов составляет от 17,2% до 24% [3, 4, 6]. В условиях современности репродуктивный потенциал популяции в развитых странах дополнительно снижается по причине увеличения возраста первых родов и общего уменьшения числа детей в семье, что придаёт неуклонно растущей распространенности бесплодия важное медико-социальное значение [7, 8, 15].

Эволюция вспомогательных репродуктивных технологий от классического экстракорпорального оплодотворения и интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов к эпохе моделей прогнозирования, использующих искусственный интеллект, в последние годы способствовала всемирной репродуктивной революции в преодолении бесплодия. Но несмотря на значительное развитие ВРТ, по-прежнему присутствует высокая распространенность неудачных попыток ЭКО. По данным различных авторов только 22–31% циклов приводят к беременности, и лишь 15–22% из них заканчиваются живорождением [25, 67]. Несмотря на то, что достигнутые успехи в сфере ВРТ улучшают общие результаты для бесплодных пар, эффективность преодоления бесплодия остается низкой, и такие проблемы, как повторные неудачи имплантации, до сих пор остаются нерешенными [29, 71].

В 2022 году Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) опубликовало пресс-релиз, основанный на статистическом анализе крупного массива данных. По их данным, 20–30% бесплодия связаны с мужскими факторами, 20–35% — с женскими, а 25–40% — это сочетание женского и мужского факторов бесплодия. Оставшиеся 10–20% классифицируются как идиопатическое бесплодие, и большинство этих пар страдают от первичных или повторных неудач имплантации (ПНИ) [45, 60, 67, 83, 139].

Степень разработанности темы

Несмотря на то, что уже накоплено огромное количество исследований и обзоров, посвященных анализу различных факторов неудач имплантации, от анатомии матки и рецептивности эндометрия до нарушений соединительной ткани и иммунологических факторов, негативно влияющих на показатели успешности ВРТ, инструментов прогнозирования ПНИ с высокой прогностической ценностью или методов их преодоления пока разработано не было [29, 161].

ПНИ — это сложная проблема с несколькими переменными. Выделено множество факторов риска, включающих возраст матери, курение обоих родителей, повышенный индекс массы тела и уровень стресса [48,72], однако исследований, представляющих медико-социальную характеристику женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе, позволяющих выделить группы риска, на сегодняшний день нет.

Исследователи выделяют несколько гипотетических механизмов возникновения неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного генеза в отсутствие структурных аномалий матки: нарушение рецептивности эндометрия, в основе патогенеза которого лежит дефектный стероидный профиль, включающий в себя изменения архитектоники эндометрия, нарушенный иммунный статус, неоангиогенез, вазодилатацию, дефекты факторов свертывания, генетические факторы и даже нарушения биоценоза [32, 43, 46, 59, 96, 165]. Однако, несмотря на установленную чрезвычайно значимую роль состоятельности эндометрия и его рецептивности в патогенезе ПНИ, роль нарушений в отдельных звеньях имплантации изучена недостаточно, а имеющиеся данные достаточно противоречивы. Дискуссионны сведения об иммунологических механизмах формирования несостоятельности эндометрия, особенно в отсутствие макроспического субстрата или диагностических признаков хронического эндометрита. Многообещающими иммунологическими маркерами прогнозирования успешной имплантации в условиях субоптимальной рецептивности у пациенток с ПНИ являются uNK-клетки и Т-хелперы различных популяций в окне имплантации [23, 41, 44, 49, 82, 85, 88, 96, 99, 172, 179].

Из наиболее эффективных методов преодоления ПНИ исследователи выделяют правильный подбор протокола стимуляции овуляции, введение мононуклеарных клеток периферической крови [92-94], Г-КСФ [107], аутоплазменную терапию и физические методы воздействия [37, 92-94, 106, 107, 138, 184]. Физиотерапия остается контраверсионным методом [1, 2, 9-12, 14, 16, 17, 19, 56, 61, 62, 79, 103, 114, 150, 156, 160, 170, 171], требующим изучения и оценки влияния саногенетического воздействия на архитектуру и рецептивность эндометрия, ауто- и паракринные механизмы регуляции локального иммунного статуса, и, в конечном итоге, на успешность имплантации и репродуктивные исходы.

Необходимость детального исследования этиологии, патогенетических механизмов, факторов риска, а также эффективности преодоления повторных неудач имплантации для разработки полноценных протоколов лечения определило актуальность настоящего исследования.

Цель исследования: улучшить исходы преодоления повторных неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного происхождения.

Задачи исследования:

Выявить клиничко-anamнестические факторы риска повторных неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного генеза.

2. Определить особенности состояния локального иммунитета эндометрия в фазе пролиферации у пациенток изучаемой когорты.

3. Выявить особенности экспрессии регуляторных и цитотоксических лейкоцитов в эндометрии в период «окна имплантации» у пациенток изучаемой когорты.

4. Разработать и научно обосновать математические модели прогнозирования риска повторных неудач имплантации с использованием клиничко-anamнестических и иммуногистохимических предикторов.

5. Оценить эффективность комплексного лечения (сочетание циклической гормональной терапии и воздействия синусоидальных модулированных токов) в преодолении повторных неудач имплантации.

Научная новизна исследования

Расширены представления о вкладе иммунологических детерминант в патогенез ПНИ у пациенток с бесплодием маточного генеза в отсутствие структурных аномалий матки.

Установлены морфофункциональные закономерности иммуногенеза эндометрия в фазе пролиферации и в период «окна имплантации» у пациенток с бесплодием маточного генеза и ПНИ.

Выявлены клиничко-anamнестические и иммуногистохимические предикторы и доказана эффективность прогнозирования риска повторных неудач имплантации у пациенток изучаемой когорты. Определена ценность иммуногистохимических маркеров uNK-клеток, Т-хелперов различных популяций и маркера адгезии в период «окна имплантации» для выделения группы высокого риска ПНИ среди пациенток с бесплодием маточного генеза.

Разработаны эффективные модели прогнозирования риска ПНИ в когорте пациенток с бесплодием маточного генеза на основе использования клиничко-anamнестических (Модель 1, чувствительность – 80,0%, специфичность – 80,7%) и иммуногистохимических (Модель 2, чувствительность – 96,7%, специфичность – 91,2%) предикторов.

Доказано преимущество комбинированного метода лечения, включающего циклическую гормональную терапию и воздействие электроимпульсными токами, в преодолении бесплодия и улучшении репродуктивных исходов у пациенток изучаемой когорты.

Теоретическая и практическая значимость

Существенно расширены и углублены имеющиеся сведения о роли локальной иммунологической дисрегуляции в патогенезе имплантационных нарушений у пациенток с бесплодием маточного генеза. Показано, что триггером повторных неудач ВРТ является снижение иммунологической толерантности к полуаллогенной бластоцисте на фоне иммунологического дисбаланса, обусловленного сниженной экспрессией проангиогенных NK-клеток,

регуляторных супрессивных Т-хелперов и повышением плотности цитотоксического класса НК- и Т-клеток.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных высокоинформативных методов исследования, в том числе морфологических, иммуногистохимических и статистического анализа.

Разработаны математические прогностические модели, позволяющие стратифицировать пациенток с бесплодием маточного происхождения по степени риска повторных неудач имплантации и персонализировать тактику их ведения в программах ЭКО.

Практическому здравоохранению предложена эффективная модификация рутинного алгоритма ведения пациенток с ПНИ, страдающих бесплодием маточного происхождения, использование которого позволяет повысить ($p < 0,05$) частоту имплантации в 2,6 раза, частоту наступления клинической беременности – в 2,5 раза и живорождения – в 3,2 раза.

Материалы и методы исследования

Исследование было проведено в два этапа. Первый этап был открытым наблюдением диагностическим проспективным. Второй этап был открытым проспективным рандомизированным неинтервенционным. Диссертационное исследование преследовало цели выявления клинико-anamнестических факторов риска неудач имплантации, исследования морфофункционального состояния эндометрия и оценку эффективности комплексного метода лечения. Для исследования основную группу выделили на основании наличия в анамнезе повторных неудач имплантации в отсутствие структурных аномалий матки. Группа сравнения на первом этапе исследования для выявления клинико-anamнестических факторов риска была представлена пациентками с маточным происхождением бесплодия, соответствующими критериям включения/исключения и успешно преодолевшими бесплодие с помощью ВРТ с 1 или 2 попытки. Группа сравнения на первом этапе для исследования морфофункционального состояния эндометрия была представлена соматически здоровыми женщинами, успешно реализовавшими свою репродуктивную функцию путем естественного зачатия, с учетом критериев

включения/исключения. Для оценки морфофункционального состояния эндометрия пациенткам основной группы и группы контроля выполняли патоморфологические и иммуногистохимические исследования пайпель-биоптатов, полученных в средней фазе пролиферации и в период «окна имплантации». На втором проспективном этапе исследования группы формировали на основании планируемого метода лечения методом рандомизации пациенток из женщин основной группы первого этапа. В процессе выполнения диссертационной работы были применены клинический, эпидемиологический, иммуногистохимический и патоморфологический методы, математико-статистический анализ, построение прогностических моделей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Группу риска повторных неудач имплантации при бесплодии маточного происхождения в отсутствие структурных аномалий матки формируют курящие (ОШ = 3,5; 95% ДИ: 1,0 – 11,4) пациентки с ожирением или избыточной массой тела (ОШ = 5,4; 95% ДИ: 1,1 – 25,6), страдающие болезнями системы пищеварения (ОШ = 3,1; 95% ДИ: 1,1 – 8,7), имеющие верифицированный хронический эндометрит (ОШ = 11,2; ДИ: 3,8 – 32,2), перенесшие полипэктомии (ОШ = 8,1; ДИ: 2,2 – 29,4), миомэктомии (ОШ = 6,7; ДИ: 2,0 – 21,7) и отдельные диагностические выскабливания (ОШ = 3,2; 95% ДИ: 1,2 – 8,5).

2. В основе патогенеза повторных неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного происхождения лежит дисфункция стероидных рецепторов и изменение локального иммунитета, субстратом которого является низкая экспрессия проангиогенных НК-клеток, регуляторных супрессивных Т-хелперов вкуче с повышением плотности цитотоксического класса НК- и Т-клеток, что формирует снижение иммунологической толерантности к полуаллогенной бластоцисте.

3. Персонафицированный алгоритм преодоления бесплодия с помощью ВРТ у пациенток с бесплодием маточного происхождения в отсутствие структурных аномалий матки должен включать выделение группы риска повторных неудач имплантации на основании клиничко-анамнестических

предикторов (Модель 1), а в сформированной группе высокого риска – оценку морфофункционального состояния эндометрия с последующим дополнительным прогнозированием персонального риска неудач имплантации (Модель 2).

4. Комплексный терапевтический подход к преодолению несостоятельности эндометрия у пациенток с высоким риском повторных неудач имплантации, включающий использование циклической гормональной терапии в сочетании с электроимпульсными токами, позволяет значимо ($p < 0,05$) повысить частоту имплантации (в 2,6 раза), частоту наступления клинической беременности (в 2,5 раза) и живорождения (в 3,2 раза).

Степень достоверности и апробация результатов работы

Для обработки полученных данных были использованы методы параметрического и непараметрического анализа. Систематизацию данных производили в Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ выполняли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics v.26 (разработчик – IBM Corporation). Визуализацию результатов исследований осуществляли с использованием программ Microsoft Office Word (2016), Microsoft Office Excel (2016), IBM SPSS Statistics v.26 и при помощи онлайн-инструментов StatTech v. 2.8.8 (<https://stattech.ru/>) и Lucidchart (<https://lucid.app/>).

Количественные данные оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критериев Колмогорова-Смирнова (>50) и Шапиро-Уилка (<50). Количественные данные, несоответствующие нормальному распределению, выражали в виде медианы (Me) и квартилей (Q1– Q3). Количественные данные, совокупности которых соответствовали критериям нормального распределения, презентовали в виде средних арифметических значений (M) и стандартных девиаций (SD) с указанием границ 95% доверительного интервала (ДИ). Сравнение количественных характеристик, соответствующих критериям нормального распределения, осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Сравнение количественных характеристик, не соответствующих критериям нормального распределения, проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение процентных долей при анализе

четырёхпольных таблиц сопряжённости выполняли с учётом критерия χ^2 Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10) или точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления менее 10). Для сравнения процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряжённости использовали критерий χ^2 Пирсона. Различия показателей считали значимыми при $p < 0,05$.

Для демонстрации меры эффекта при сравнении категориальных показателей использовали показатель отношения шансов (ОШ), позволяющий продемонстрировать отношение вероятности наступления исхода в основной группе и вероятности наступления исхода в контрольной группе. С целью оценки полученных значений ОШ рассчитывали 95% ДИ, в случае нахождения обеих границ значения >1 или <1 делали вывод о наличии значимых различий для сравниваемых признаков.

Для создания модели, предсказывающей вероятность определённого исхода, использовали метод логистической регрессии. С помощью коэффициента R^2 Найджелкерка измеряли величину дисперсии, которая могла быть объяснена моделью. Для определения наилучших значений параметров для оценки исхода с помощью показателей чувствительности и специфичности применяли анализ ROC-кривой. Точку отсечения для количественного признака определяли по наибольшему значению индекса Юдена.

Апробация результатов диссертационного исследования состоялась 26 декабря 2022 года на совместном заседании работников кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии МИ РУДН и сотрудников КГ Лапино, протокол заседания номер 9.

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую работу клиники «Мать и дитя» Кунцево и КГ Лапино «Мать и дитя» ООО «Хавен», а также в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии и кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины факультета непрерывного медицинского образования МИ РУДН. Получены 3 патента на изобретения.

Автор лично выкопировал данные из 973 медицинских карт пациенток с бесплодием, уделив особое внимание 57 пациенткам с ПНИ в анамнезе и проведя их дополнительные обследования, включая пайпель-биопсию эндометрия. Автор отвечал за достоверность всех первичных данных и осуществлял их анализ, а также интерпретировал полученные результаты. Автор лично сформулировал выводы, практические рекомендации и научные положения, опубликовал 12 обзорных и оригинальных статей в российских и зарубежных журналах, в том числе 8 в журналах, рекомендованных ВАК РФ или РУДН, 5 – в журналах, индексируемых в базах Scopus и/или Web of Science.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПОВТОРНЫХ НЕУДАЧАХ ИМПЛАНТАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Дефиниции и потенциально значимые механизмы повторных неудач имплантации

С момента рождения Луизы Браун 40 лет назад более 10 миллионов детей родились в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и других процедур вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). На сегодняшний день ежегодно выполняется более 2,6 миллионов циклов, что приводит к более чем 500 000 родов в год [67, 71]. Эволюция ВРТ от классического ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ) к эпохе моделей прогнозирования, использующих искусственный интеллект, в последние годы способствовала всемирной репродуктивной революции. Этиология бесплодия считается многофакторной, некоторые из ключевых аспектов включают генетические аномалии одинаково как мужского, так и женского происхождения, нарушения овуляции, обструкции маточных труб, маточные или перитонеальные нарушения, а также мужские факторы инфертильности, например, субоптимальное качество спермы [29, 39, 47, 118, 177]. В 2022 году Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) опубликовало пресс-релиз, основанный на статистическом анализе крупного массива данных. В ходе анализа установлено, что 20–30% бесплодия связаны с мужскими факторами, 20–35% — с женскими, а 25–40% — это сочетание женского и мужского факторов бесплодия. Оставшиеся 10–20% классифицируются как идиопатическое бесплодие, и большинство этих пар страдают от первичных или повторных неудач имплантации (ПНИ) [45, 60, 67, 83, 139].

Таким образом, несмотря на значительное развитие ВРТ, по-прежнему присутствует высокая распространенность неудачных попыток ЭКО [40, 64, 84, 104, 143]. Существует огромное количество исследований и обзоров, сосредоточенных на различных факторах, от анатомии матки и рецептивности эндометрия до нарушений соединительной ткани и иммунологических факторов, отрицательно или положительно влияющих на показатели успешности ЭКО. Хотя

ВРТ и улучшает общие результаты для бесплодных пар, некоторые проблемы до сих пор остаются нерешенными, например, повторные неудачи имплантации.

Термин «повторные неудачи имплантации» применим только к пациенткам в программах ВРТ. Несмотря на рост количества исследований и рекомендаций относительно ПНИ в последние годы, термин остается контраверсионным, не имеющим согласованного определения. В современной литературе можно найти до 76 вариантов дефиниций, а общепринятого формального определения повторных неудач имплантации не существует [137]. В 2021 году был проведен опрос 8579 специалистов-членов ESHRE из 6916 центров ЭКО на тему ПНИ. Большинство респондентов устанавливает данную клиническую ситуацию на основании количества неудачных переносов эмбрионов (ПЭ), при этом наиболее распространенным порогом является три переноса как свежих, так и замороженных [43]. В клинических протоколах Минздрава РФ 2019 года «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации» и 2021 года «Женское бесплодие» подобная клиническая ситуация определяется как «Повторные неудачные попытки переноса эмбрионов (имплантации)» и относят к ней случаи 3-х неудачных попыток селективного (eSET или eDET) переноса «свежих» или размороженных эмбрионов у женщин моложе 35 лет, и 2-х — у женщин 35 лет и старше, при отсутствии каких-либо факторов, снижающих шансы наступления беременности [5, 13].

Нельзя говорить об имплантации, не рассмотрев такой важный аспект репродуктивной системы женщины, как рецептивность эндометрия. Имплантация — это сложный процесс, возникающий вследствие правильного взаимодействия между эндометрием и бластоцистой [66, 112, 178]. По различным оценкам на эмбриональные нарушения приходится лишь 10-30% всех неудач имплантации, в то время как субоптимальная восприимчивость эндометрия и дефектный диалог между эмбрионами и эндометрием ответственны за оставшиеся две трети [110]. Восприимчивость эндометрия была предметом обширных дискуссий на протяжении более 85 лет, с того момента, как Rock J., Bartlett M. K. et al. в 1937 году описали гистологические изменения эндометрия в «окне имплантации» [144].

Был проделан огромный путь в изучении морфологических характеристик эндометрия, а проточная цитофлоуметрия и достижения молекулярной биологии позволили провести дальнейшие исследования перекрестных связей между эмбрионом и эндометрием [50]. В изучении рецептивности и имплантации значительно помогают «омики» — сфера исследований высокочувствительными методами, позволяющими одновременно изучать изменения на различных молекулярных уровнях: геномик, транскриптомик, протеомик, метаболомик и др. Использование «омик» революционизирует понимание физиологии и патофизиологии эндометрия человека [78].

Хотя достижения последних лет привели к глубокому пониманию процессов, связанных с перекрестным диалогом эмбриона и эндометрия во время имплантации, причина их нарушений остается загадкой, и значительный прогресс в преобразовании открытий в клинически значимые прогностические тесты и методы лечения субоптимальной восприимчивости эндометрия достигнут не был.

Восприимчивость и селективность эндометрия являются двумя взаимодополняющими концепциями, введенными для описания эндометрия как биосенсора, оценивающего качество эмбриона [128]. Селективность — это встроенная запрограммированная функция эндометрия для распознавания и отклонения эмбрионов с пониженным потенциалом развития. Напротив, восприимчивость позволяет эндометрию обеспечивать оптимальную среду для развития эмбрионов и формирования плаценты.

Обширный мета-анализ 2019 года, включивший 163 исследования (88834 женщины) [38], позволил выделить основные маркеры рецептивности эндометрия, а именно:

- Сонографические маркеры. Оцениваются в день введения триггера овуляции и в день переноса эмбриона
 - Толщина эндометрия
 - Трехлинейная структура
 - Объем эндометрия

- Пульсационный индекс маточных артерий
- Индекс резистентности в маточных, аркуатных, радиальных, базальных и спиральных артериях
- Маточные сокращения в день переноса эмбриона
- Маркеры в биоптате эндометрия
 - BCL6
 - MUC1
 - α -Ингибин
 - β -Гликан
 - люминальный интегрин $\alpha\nu\beta 3$
 - лиганд L-селектина
 - ароматаза P450
 - фактор роста эндотелия сосудов A
 - экспрессия матриксных металлопротеиназ и E-кадгерина
 - рецептор hCG-LH
 - LIF (лейкемия-ингибирующий фактор)
 - колониестимулирующий фактор макрофагов
 - HOXA-10
 - подсчет количества пиноподий электронной микроскопией (минимум на 60 полях при $\times 2000$ увеличении)
 - ERA
 - концентрация hDP 200 (Human decidua-associated protein 200)
 - ФНО- α
 - ИЛ-18
- Гистероскопическая оценка
 - кольцевой тип расположения желез и наличие хорошо развитых варикозоподобных сосудов
 - оценка кровотока эндометрия более 29 мл/мин/100 г

В то время как некоторые исследования в этом мета-анализе 2019 года демонстрировали высокую чувствительность в оценке рецептивности эндометрия определенными маркерами, другие демонстрировали противоположные данные. Следовательно, выводы относительно клинического применения определенных маркеров в практике репродуктолога сделать невозможно, хотя авторы выделяют сонографические критерии, а также тест ERA, как наиболее эффективные [59, 168, 180]. Однако существуют ограничения в использовании ERA, включая расходы, неточные результаты и инвазивный характер теста [49]. Основным фактором, ограничивающим качество доказательств, подтверждающих чувствительность маркеров оценки рецептивности эндометрия с использованием биоптатов эндометрия, аспирированной из полости матки жидкости, УЗИ или гистероскопии, была некачественность/неточность при выполнении исследований. Кроме того, большинство маркеров изучались лишь на маленьких выборках, что также усугубляло контраверсионность результатов и привело к неопределенности в отношении роли изученных критериев, воспроизводимости исследований, а главное — их клинической ценности.

Последние годы в изучении этиопатогенеза повторных неудач имплантации большое значение уделяется различным иммунологическим механизмам формирования несостоятельности эндометрия, особенно в отсутствие макроспического субстрата или признаков хронического эндометрита [23, 41, 49, 82, 85, 99].

За реализацию иммунного ответа в полости матки в первую очередь отвечают маточные NK-клетки, Uterine Natural Killer (uNK). Они происходят из линии NK-клеток и отличаются маркером CD56⁺, однако не обладают такой же способностью разрушать раковые клетки и другие чужеродные молекулы HLA класса 1, следовательно, не оказывают вредного воздействия на имплантированный эмбрион. Из-за сходного фенотипа CD117⁺ CD94⁻ CD3⁻, вполне вероятно, что периферические NK-клетки на 3 стадии своего развития мигрируют в эндометрий и завершают свое созревание и развитие уже там, впоследствии становясь uNK-клетками [176]. Фактически, они являются доминирующим типом иммунных

клеток в слизистой оболочке матки, и было предположено, что именно они играют роль в инвазии трофобласта и увеличенной кровотоке по спиральным артериям. Измерение уровня uNK-клеток представляется затруднительным, так как он колеблется в течение менструального цикла из-за изменения уровня прогестерона и других гормонов. В результате любое изменение гормонального фона у здоровых фертильных женщин может повлиять на уровень клеток uNK.

Во время имплантации паракринные сигналы uNK стимулируют эпителиальные клетки эндометрия с образованием IL-15, VEGF и других факторов, которые могут регулировать пролиферацию uNK-клеток. Иммунная паракринная связь между uNK и эпителиальными клетками эндометрия способствует имплантации и развитию трофобласта (Рисунок 1) [88, 172].

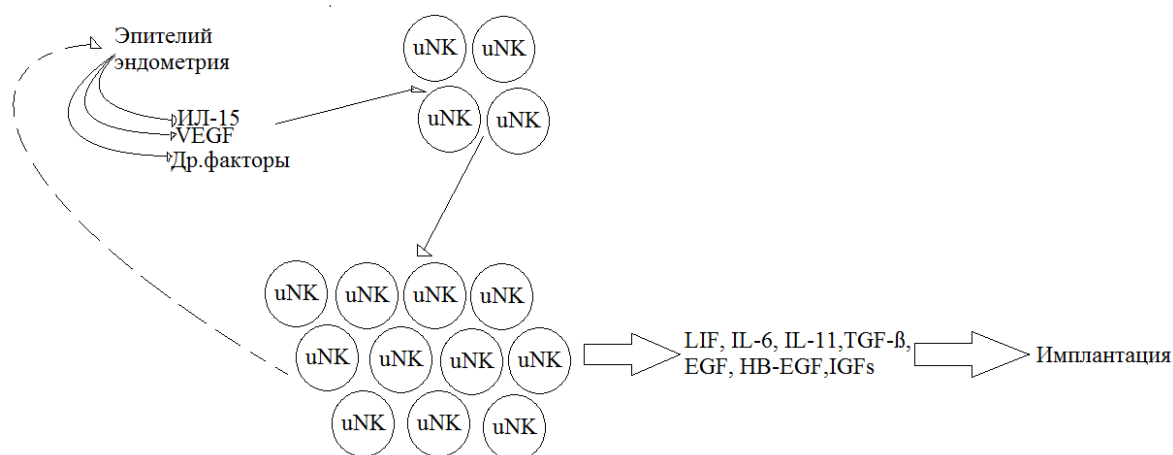


Рисунок 1 — Схематическое изображение роли uNK в имплантации

Исследование, опубликованное Santillan I. et al. (2015), показало, что и уровень периферических NK-клеток, и uNK повышен у пациенток с неудачами имплантации. Уровни NK-клеток в крови составляли $13,4 \pm 1,2\%$ (диапазон 2,63–29,01) у пациенток с повторными неудачами имплантации и $8,4 \pm 0,7\%$ (диапазон 5,72–13,28) в контрольной группе. Уровень uNK измеряли с помощью биопсии эндометрия, и уровни, превышающие 250 клеток CD56⁺ на поле высокой мощности, 400 \times , были обнаружены у 53% пациенток с идиопатическими неудачами имплантации и только у 5% в группе контроля. Эти измерения стали

возможными благодаря оценке НК-клеток матки при помощи иммуногистохимического исследования (ИГХ). Хотя пороговые значения все еще требуют стандартизации, анализ НК-клеток может в итоге оказаться полезным для женщин, страдающих идиопатическими повторными неудачами имплантации [179]. С другой стороны, мета-анализ Seshadri S et al (2014), нацеленный на определение роли НК-клеток как в периферической крови, так и в матке, обнаружил некоторые противоречивые данные об их роли при бесплодии. Не было значительных различий в периферических (СО – 0,33; 95% ДИ –1,06; 0,40; P = 0,37) и маточных (СО – 1,82; 95% ДИ – 4,80; 1,17; P = 0,23) уровнях НК-клеток, выраженных в процентных соотношениях между фертильными и бесплодными женщинами. Но в исследованиях, в которых они были выражены в виде числовых значений, были значительно более высокие уровни периферических НК-клеток у бесплодных женщин (СО 3,16; 95% CI 1,07; 5,24; P = 0,003). Кроме того, согласно другому исследованию, уровни НК-клеток, по-видимому, не связаны с уровнем рождаемости у лиц, проходящих ЭКО (ОР 0,57; 95% ДИ 0,06; 5,22; P = 0,62). В этом исследовании были также зафиксированы значительно более высокие процентные доли периферических НК-клеток (СО 1,36; 95% ДИ 0,04; 2,69; P = 0,04) и чисел (СО 0,81; 95% ДИ 0,47; 1,16; P <0,00001), однако не было значимых различий в уровнях uNK-клеток между женщинами с повторными неудачами имплантации и контрольной группой (СО 0,40; 95% ДИ – 1,24; 2,04; P = 0,063). Остается неясным, почему измерения НК-клеток в абсолютных и относительных показателях дают разные результаты [148].

Sacks G. et al. (2012) обнаружили, что у женщин при неудачах имплантации значительно увеличена концентрация периферических НК-клеток ($0,23 \times 10^9 / л \pm 0,11$ против $0,20 \times 10^9 / л \pm 0,13$) и их процентное содержание ($> 18\%$, пороговое значение) в лимфоцитах по сравнению с группой контроля [44]. Тем не менее, важно отметить, что чувствительность этого теста составляла всего 11%, что говорит о возможной роли множества других факторов, способствующих затруднениям в достижении беременности у пациенток с неудачами имплантации. Определение уровня НК-клеток нельзя использовать как предиктор неудач

имплантации в общей популяции, но можно использовать у женщин с уже установленным диагнозом, чтобы определить, связана ли этиология с их иммунологическим профилем.

В мета-анализе 2019 года [96] был сделан вывод, что при изучении когорты бесплодных женщин нет различий в концентрациях НК периферической крови, если при измерении игнорировать фазу менструального цикла. Однако в секреторной фазе авторы наблюдали более высокую долю циркулирующих НК-клеток у женщин, страдающих от бесплодия.

Исследователи также изучали зависимость между концентрацией в периферической крови крупных Т-клеточных гранулярных лимфоцитов (пост-тимусные антиген-праймированные, конститутивно активированные CD3 + CD8 + Т-лимфоциты, характеризующиеся наличием цитотоксических гранул в цитоплазме и совместной экспрессией CD57 (CD3 + CD8 + CD57 +) и повторными неудачами имплантации. На основании этих данных можно сделать вывод, что уровни CD3-CD56 + и CD8 + CD57 + клеток в периферической крови не связаны с повторными неудачами имплантации и не могут быть рекомендованы в качестве маркеров [96].

В настоящее время роль НК-клеток в недостаточности имплантации остается в процессе изучения и вызывает множество контраверсий. Уровень и активность НК-клеток — это всего лишь один аспект иммунной системы женщин, страдающих бесплодием, и для того, чтобы их анализ стал клинически значимым, необходимо накопление большего количества данных.

Еще одним многообещающим объектом изучения рецептивности эндометрия и её нарушений являются эндометриальные пиноподии, микроскопические образования апикальной клеточной мембраны функционального слоя, которые проходят различные морфофункциональные стадии развития по мере течения лютеиновой фазы менструального цикла [135]. Описаны развивающиеся, полностью развитые и пиноподии в стадии регресса, каждая из которых длится примерно 24 ч [142]. Диаметр пиноподий варьируется в пределах 4-6 мкм в зависимости от стадии созревания, и их развитие тесно связано с густой сетью

нитевидного актина (F-актина), который экспрессируется под апикальной поверхностью плазматической мембраны [135, 142]. В недавнем рандомизированном контролируемом исследовании авторы отслеживали экспрессию пиноподий, анализировали корреляцию с результатами беременности при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) и, наконец, провели индивидуальный анализ реакции на перенос эмбрионов в зависимости от изученных показателей пиноподий. В ходе двухлетнего клинического исследования разработанная авторами математическая модель оценки продемонстрировала, что у женщин с высокой балльной оценкой пиноподий была выше частота успешных беременностей и требовалось меньше циклов переноса эмбрионов [36]. Однако механизмы регуляции экспрессии пиноподий, нарушения их морфологических трансформаций и клиническую ценность в условиях субоптимальной рецептивности эндометрия только предстоит изучить.

Гликопротеин MUC1 — это молекула, регулирующая адгезию в эндометрии. Хотя MUC1 играет роль антиадгезивного белка из-за его физикохимических свойств, опосредованных его длинным эктодоменом [28, 109, 122], исследования показали, что у фертильных женщин экспрессия MUC1 во время окна имплантации может как снижаться, так и повышаться [121]. Однако точная роль MUC1 в имплантации до сих пор не изучена, и многие исследования также демонстрируют, что экстремально низкий уровень MUC1 в «окне имплантации» может быть связан с нарушением рецептивности эндометрия [1, 120, 136, 145]. Недавнее исследование продемонстрировало, что у женщин с привычным невынашиванием экспрессия MUC1 в эндометрии снижена по сравнению с фертильными женщинами в дни ЛГ+7 и +8 [13662]. Авторы этого исследования предположили, что снижение экспрессии MUC1 может вызывать имплантационную несостоятельность эндометрия и прерывать отбор эмбрионов, что позволяет дефектным бластоцистам имплантироваться, но приводит к увеличению частоты репродуктивных потерь. Однако в другом исследовании, данные не нашли своего подтверждения значительного снижения экспрессии MUC1 в группе пациенток, страдающих привычным невынашиванием, напротив, данный маркер был значительно снижен

у пациенток, страдающих ПНИ, а многомерный линейный регрессионный анализ показал, что экспрессия MUC1 не зависит от демографических и клинических характеристик обследуемых пациенток [181]. Это позволяет предположить, что снижение экспрессии MUC1 в эндометрии во время окна имплантации может служить независимым маркером рецептивности у пациенток с ПНИ, однако необходимо проведение дополнительных исследований для изучения точной роли и механизмов регуляции.

1.2 Факторы риска ПНИ

Большинство популяционных исследований, посвященных неудачам имплантации, выделяют такие факторы риска как возраст матери, повышенный индекс массы тела, курение и уровень стресса [29].

Отрицательная корреляция между возрастом и репродуктивными исходами широко известна. Например, Shapiro B. S. et al. (2016) установили, что с увеличением возраста матери происходит усиление эмбрио-эндометриальной асинхронности, то есть акселерация, остановка или отставание развития пиноподий, приводящие к асинхронности развития эмбриона на фоне дефектной рецептивности эндометрия. Авторы обнаружили, что 50% переносов эмбрионов не были синхронизированы у женщин моложе 35 лет, по сравнению с 68,1% у женщин старше 35 лет. Показатель успешной имплантации, который рассчитывался для каждого переноса эмбрионов, был значительно ниже в циклах ЭКО у женщин старше 35 лет (в среднем 24,5 - 36,8) по сравнению с женщинами моложе 35 лет (в среднем 41,1 - 42,1). Кроме того, частота живорождения была значительно выше у женщин <35 лет (50,7%) по сравнению с женщинами старше 35 лет (28,5%). Женщины старше 35 лет имели более низкий овариальный резерв, более тонкий функциональный слой эндометрия и отклонения в развитии бластоцисты [166].

Данные Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) за 2018 год демонстрируют, что частота имплантации эмбрионов при свежих и замороженных переносах была значительно выше у пациенток моложе 35 лет (41,8% и 49,6% соответственно), чем у пациенток старше 42 лет (5,9% и 23,9% соответственно). Стоит отметить, что частота

имплантации при переносе с использованием донорских яйцеклеток составила 53,9% при свежем переносе и 41,9% при замороженном переносе, независимо от возраста пациенток, что говорит о том, что качество эмбрионов, включая генетические факторы, снижается по мере увеличения возраста пациентки [25]. Таким образом, возраст пациентки с ПНИ, особенно с не исключенным эмбриональным фактором, может служить веским основанием для применения специфических маркеров прогнозирования успешности имплантации и создания персонализированных подходов к преодолению бесплодия.

Goldman R. H. et al. (2019) показали, что успешность имплантации, частота наступления клинической беременности и живорождения снижаются с увеличением ИМТ и возраста, а частота репродуктивных потерь увеличивается с увеличением ИМТ и возраста ($p < 0,001$). Так же ИМТ оказал большее влияние на живорождение в молодом возрасте по сравнению с более старшим возрастом [161]. В мета-анализе, включившем результаты 21 исследования, Sermondade N. et al показали, что вероятность рождения живого ребенка после ЭКО у женщин с ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м²) снижается по сравнению с женщинами с нормальным весом (ИМТ 18,5-24,9 кг/м²): отношение риска (ОР) (95% ДИ) 0,85 (0,82) – 0,87). Анализ подгрупп показал, что прогноз был хуже, когда ожирение было связано с синдромом поликистозных яичников, в то время как происхождение ооцитов (донорское или не донорское) не изменяло общую интерпретацию результатов исследования [72].

Повышенный ИМТ (> 25 кг/м²) также влияет на частоту успешной имплантации. Среди пациенток, перенесших ЭКО, пациентки с ожирением I, II и III степени (ИМТ > 30 кг/м²) имели бóльшую вероятность неудачной имплантации, продемонстрированную соотношениями шансов, 0,69 (0,53–0,90), 0,52 (0,36–0,74) и 0,58 (0,35–0,96) по сравнению с пациентками с нормальным весом (ИМТ 18,5–24,99 кг/м²). Кроме того, женщины с избыточным весом и ожирением (ИМТ > 25 кг/м²), перенесшие ЭКО, у которых было низкое количество собранных ооцитов, имели более высокий риск неудачи имплантации и репродуктивных потерь в сравнении с нормовесными пациентками с таким же количеством собранных

ооцитов. Вероятность повышения качества эмбриона для переноса зависела от количества собранных ооцитов, и, соответственно, при меньшем количестве собранных ооцитов вероятность отрицательного исхода ВРТ увеличивалась из-за недостаточного количества эмбрионов хорошего качества. Несмотря на то, что женщинам, страдающим ожирением, требовалось больше циклов стимуляции гонадотропинами, у них созревало достоверно меньше ооцитов для сбора (в среднем 8 против 10 у женщин без ожирения, $P = 0,03$). Полученные данные свидетельствуют о том, что ожирение может негативно влиять на качество ооцитов и развитие фолликулов [29].

Пациентки с привычным выкидышем и высоким индексом массы тела (ИМТ) имеют высокий риск ранних репродуктивных потерь, уступающий только старшему материнскому возрасту. Это позволяет предположить, что ИМТ играет важную роль в определении успеха имплантации.

Таким образом, возраст матери и ИМТ остаются ключевыми факторами риска неудач имплантации, однако существуют исследования, демонстрирующие тот факт, что связанное с возрастом снижение фертильности оказывает большее влияние на совокупный коэффициент рождаемости и имплантацию, в частности. Это позволяет предположить, что трата времени для достижения нормального ИМТ до ЭКО может быть пагубной для женщин в возрасте с избыточным весом или ожирением [161]. Решение об отсрочке ВРТ для снижения ИМТ должно быть принято после оценки влияния комбинации факторов возраста и веса на конкретную пациентку.

В ретроспективном исследовании 200 циклов ЭКО/ИКСИ Heger A et al. (2018) продемонстрировали, что толщина эндометрия была значительно ниже у курящих пациенток по сравнению с некурящими ($10,4 \pm 1,5$ мм против $11,6 \pm 1,8$ мм), что, несомненно, приводило к снижению частоты успешной имплантации [152].

В нескольких исследованиях было показано, что курение значительно повышает риск выкидыша по сравнению с некурящими пациентами, проходящими

циклы ВРТ. Среди женщин данной когорты у курящих наблюдался более низкий уровень эстрадиола во время стимуляции овуляции [151].

В связи с предвзятым отношением к курению в когорте пациенток, желающих забеременеть, женщины часто скрывают свои пагубные привычки от врачей и исследователей, потому данные популяционных исследований о влиянии курения на фертильность и имплантацию не представляются достоверными.

Нет однозначных данных касательно влияния такого фактора риска как стресс на удачу имплантации. В то время как в одних исследованиях авторы говорят о негативном влиянии, в других есть указания на положительный эффект от повышенного уровня кортизола в фолликулярной ткани.

Было показано, что повышенный уровень кортизола, приводит к 2,7-кратному увеличению вероятности выкидыша (95% ДИ = 1,2–6,2) в течение первых 3 недель после зачатия по сравнению с женщинами с низким уровнем кортизола. Производство кортизола в организме повышается в ответ на психологические, иммунологические и другие стрессовые факторы, что позволяет предположить, что он служит маркером, сигнализирующим женскому организму о том, что он находится не в лучших условиях для репродукции [173].

Это говорит о том, что предотвращение или уменьшение материнских факторов стресса может оказать положительное влияние на беременность в целом. В противопоставление этим данным, Miller N. et al установили, что психологический и физиологический стресс, клиническая тревога или депрессия, не оказывает существенного влияния на исход ЭКО. Более того, высокие концентрации фолликулярного кортизола могут оказывать положительное влияние на удачную имплантацию эмбриона [48].

Таким образом, множество существующих исследований, касающихся факторов риска неудач имплантации, как повторных, так и первичных, противоречат друг другу вследствие недостаточной систематизации данных, классификации этиологических факторов и унификации терминологии.

1.3 Преодоление ПНИ

Использование различных протоколов контролируемой стимуляции яичников является предметом обсуждения. Влияние агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (а-ГнРГ) в сравнении с антагонистами (ант-ГнРГ) в протоколе ЭКО на частоту имплантации оценивалось как самостоятельно, так и в сочетании с предварительным приемом оральных контрацептивов. В 2017 году был опубликован мета-анализ, продемонстрировавший, что в общей популяции ЭКО в группе, получавшей антагонисты, частота беременности была ниже, чем в группе, получавшей агонисты (ОР 0,89, 95% ДИ 0,82–0,96). Однако у пациенток, получавших антагонисты, была более низкая встречаемость синдрома гиперстимуляции яичников (ОР 0,63, 95% ДИ 0,50–0,81) [101]. Orvieto R. et al. (2015) предложили новый протокол ЭКО у пациенток с ПНИ, который включает использование как агонистов ГнРГ, так и антагонистов с введением агониста ГнРГ и двойного триггера ХГЧ для окончательного созревания фолликулов до трансвагинальной пункции (ТВП). Эмбрионы замораживали и затем переносили после повреждения эндометрия и гистероскопии в естественном цикле с модифицированной лютеиновой поддержкой, включавшей добавку прогестерона, ХГЧ и агонистов ГнРГ [129]. Это наблюдение подразумевает, что протоколы ЭКО оказывают существенное влияние на качество эмбрионов, ооцитов и восприимчивость эндометрия. Возможно, будущие исследования позволят разработать специальный протокол стимуляции в цикле ЭКО у пациенток с ПНИ для достижения существенных результатов в преодолении бесплодия.

Существуют множество исследований, проводивших оценку влияния различных методов лечения на частоту имплантации у пациенток с ПНИ. Литература последних лет в качестве терапии ПНИ предлагает варианты назначения антикоагулянтов, различные иммунологические методы, такие как как применение такролимуса, внутривенное введение иммуноглобулина (ВВИГ), внутриматочное введение моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), а также внутриматочная инфузию богатой тромбоцитами плазмы (PRP), гормонотерапию

и физиотерапию. Однако достаточных доказательств для создания рекомендаций по применению каких-либо конкретных методов для идиопатических ПНИ пока что не было разработано.

В исследовании 2018 года, оценившем эффективность использования низкомолекулярного гепарина совместно с преднизолоном, не было установлено положительного влияния на репродуктивные исходы: биохимические и клинические показатели частоты наступления беременности были одинаковыми в обеих группах (40,4% против 24,1% и 29,8% против 19%, $p = 0,063$ и $0,175$ соответственно) [20].

Такролимус является иммуносупрессивным препаратом, одобренным в настоящее время для предупреждения и лечения отторжения аллотрансплантата костного мозга, печени, почек и сердца, в том числе резистентного к стандартным режимам иммуносупрессивной терапии. В исследовании 2019 года Nakagawa K. et al. (2019) продемонстрировали эффективное преодоление ПНИ посредством такролимуса: 74 из 98 женщин группы ПНИ со средним количеством неудачных циклов ЭКО $5,4 \pm 2,8$ родили живых детей, включая четыре двухплодные беременности [127]. Однако в исследовании Hisano, M. et al. (2021) несмотря на продемонстрированную эффективность назначения такролимуса в лечении пациенток с привычными выкидышами, в группе пациенток с ПНИ положительных результатов достигнуто не было [30121].

ВВИГ также рассматривалось как возможная иммунологическая терапия для женщин, страдающих ПНИ с повышенным соотношением Th1/Th2, повышенными НК-клетками, ненормальным соотношением TNF α /IL-10 и аутоантителами. В метаанализе, проведенном Li et al. (2013), влияние данной терапии на частоту имплантации было изучено в шести исследованиях. Частота имплантации составила 34,3% у пациенток, которым вводили иммуноглобулины, и только 13,7% у пациенток, не получавших лечения или плацебо, с относительным риском 2,708 (95% ДИ, 1,302–5,629). Клиническая беременность наступила у 60,2% участниц, получавших иммуноглобулины, и у 39,3% пациенток, получавших плацебо или не получавших лечение. Использование ВВИГ было связано с достоверно более

высокой частотой клинических беременностей, а ОШ составил 1,475 (95% ДИ: 1,191–1,825). Частота живорождения у пациенток, которым внутривенно вводили иммуноглобулин составила 49,8% по сравнению с 31,6% в группе плацебо с относительным риском 1,616 (ДИ 95%, 1,243–2,101) [95].

Различные исследования показали, что у некоторых женщин с ПНИ иммунные клетки, обнаруживаемые в месте имплантации, не способны индуцировать экспрессию необходимых молекул, ответственных за имплантацию [93]. Учитывая важность роли иммунных клеток в наступлении и поддержании беременности, ученые использовали МКПК, чтобы вызвать первоначальное воспаление. МКПК состоят из В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и моноцитов, которые продуцируют необходимые для имплантации цитокины, соответственно, улучшают восприимчивость эндометрия. Yu N. et al. (2016) подтвердили, что частота имплантации была значительно выше в группе, получавшей внутриматочное введение МКПК, в сравнении с контрольной группой (23,66% против 11,43%) [92]. Однако Li S. et al. (2016) обнаружили, что от введения МКПК могут извлечь пользу только пациентки с четырьмя или более неудачами имплантации в анамнезе. У пациенток данной когорты наблюдалось значительное увеличение частоты имплантации (22% против 4,88%, $p = 0,014$), частоты наступления клинической беременности (39,58% против 14,29%, $p = 0,038$) и частоты живорождений на цикл переноса эмбрионов (33,33% против 9,58%, $P = 0,038$) после переноса замороженных эмбрионов [93]. В исследовании 2019 года Makrigiannakis S. et al. изучали влияние лечения МКПК на женщин с ПНИ в случае свежего переноса 3-дневных эмбрионов. Они продемонстрировали, что частота наступления беременности была статистически значимо выше, чем в их предыдущем исследовании с переносом 5-дневных эмбрионов (57,69% и 44,44% соответственно) [94].

Li J. et al провели метаанализ, который подтвердил, что использование Г-КСФ по сравнению с отсутствием лечения или плацебо было связано со значительно более высокой частотой наступления биохимических (ОР = 2,385 95% ДИ: 1,414, 4,023, $I^2 = 0,0\%$) и клинических беременностей (ОР 2,312, 95% ДИ:

1.444, 3.701, I2 = 0.0%) среди женщин с тонким эндометрием или повторными неудачами имплантации в общей популяции. Г-КСФ может быть важным фактором в улучшении репродуктивных результатов в определенных группах женщин, страдающих от ПНИ [107].

Многообещающим подходом для улучшения невосприимчивого эндометрия является внутриматочная инфузия богатой тромбоцитами плазмы (PRP). PRP представляет собой аутологичную концентрированную плазму, обогащенную тромбоцитами, и содержащую несколько факторов роста и цитокинов, которые высвобождаются из активированных тромбоцитов в случае травмы или воспаления. Было показано, что содержащиеся в PRP фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор стромальных клеток 1 (SDF-1), хемокиновый лиганд 5 (CCL5), сфингозин-1-фосфатаза (SPP) и фосфатидная кислота имеют прорегенеративную, пролиферативную, ангиогенную, хемотаксическую, провоспалительную и антиапоптотическую активность [106, 138]. Эффективность PRP в индукции развития эндометрия была также описана Zadehmodares et al. (2017) [184]. Исследование Mehrafza M. et al. (2019), сравнившее PRP-терапию с терапией Г-КСФ показало, что частота наступления беременности была значительно выше в группе PRP, чем в группе Г-КСФ (40,3% против 21,4%, $p = 0,025$) [37].

Физиотерапия обладает огромным, но до сих пор малоизученным потенциалом в лечении бесплодия. Многочисленные исследования последних лет продемонстрировали эффективность различных методов физиотерапии в улучшении репродуктивных исходов. Крупномасштабное десятилетнее ретроспективное исследование эффективности физиотерапии в преодолении бесплодия в результате анализа данных 1392 пациенток продемонстрировало значительное статистически значимое улучшение репродуктивного потенциала женщин в результате применения методов физического воздействия [160]. Существует множество исследований подтвердивших эффективность таких

методов как массаж, чрезкожная электроакупунктура, переменное магнитное поле низкой частоты, интерференционные токи, ток надтональной частоты, электроимпульсная терапия и многие другие [2, 10, 114, 156, 170, 171].

Данные относительно эффективности физиотерапии в программах ЭКО немногочисленны, однако электроимпульсная терапия зарекомендовала себя как действенный метод в лечении невосприимчивого эндометрия [9, 11]. Электроимпульсная терапия является видом воздействия тока на органы пациентки, в результате которого происходят изменения в биоэлектрических потенциалах мышечной и нервной тканей матки. Эта терапия стимулирует обмен веществ и омоложение в периферических нервных тканях, улучшая их способность проводить и отвечать на стимуляцию. Благодаря электростимуляции мышечные волокна последовательно сокращаются и расслабляются, что приводит к увеличению потребности тканей в питательных веществах и усилению кровотока в этой области. Это, в свою очередь, приводит к балансу про- и антиангиогенных факторов роста [17]. Шиканова О.Л. обнаружила, что электроимпульсная терапия значительно улучшила репродуктивные результаты у пациенток со сниженной фертильностью на 83% по сравнению с контрольной группой [17]. Терапия также привела к эхографическим изменениям, таким как улучшение кровотока, снижению концентрации VEGF и восстановлению репродуктивной функции [14, 17].

Другие исследования также показали, что низкочастотная магнитотерапия у женщин, проходящих ВРТ, может улучшить результаты на 37,5% [1]. Наблюдаемые результаты можно объяснить усилением кровообращения в маточных, аркуатных и лучевых артериях, выявленных при помощи эхографии. Исследования Силантьевой Е.С. показывают, что физиотерапия может усилить кровотоки, снизить индекс резистентности, увеличить количество кровеносных сосудов в строме эндометрия и миометрии и улучшить кровоток в маточной артерии, тем самым улучшая кровоснабжение функционального слоя. Иммуногистохимические исследования также показали, что физиотерапия может уменьшить экспрессию макрофагов, коллагена III и IV типа, эпидермальных и

трансформирующих факторов роста в эндометрии и нормализовать баланс рецепторов эстрогена и прогестерона [14]. Кроме того, было показано, что электроимпульсная терапия значительно увеличивает толщину эндометрия без активации пролиферации, фиброза или подавления апоптоза в пролиферирующем эндометрии [14].

Перспективным направлением физического воздействия является внутриполостная физиотерапия. Она выполняется с использованием многофункционального терапевтического инструмента с внутриполостным одиночным электродом и брюшными двойными электродами вне менструации. С помощью импульсной электростимуляции физиотерапия может стимулировать кровообращение в полости малого таза, улучшить состояние питания в местных тканях, повысить метаболизм и активировать локальную иммунную систему [12, 16, 19, 56, 61, 62, 79, 103, 150]. Предполагается, что физиотерапия может оказывать благотворное влияние на имплантацию, но лишь в нескольких исследованиях сообщалось об эффективности внутриполостной физиотерапии в контексте повышения восприимчивости эндометрия у пациенток с ПНИ [19, 61, 79].

1.4 Заключение

Повторные неудачи имплантации остаются сложной и многогранной проблемой с широким спектром этиологических факторов и патофизиологических механизмов, которые до сих пор малоизучены и зачастую остаются загадкой. К настоящему времени доказано, что основной причиной возникновения неудач имплантации является нарушение рецептивности эндометрия, в основе патогенеза которого у каждой отдельной пациентки лежат разные этиологические факторы и механизмы, включающие в себя изменения архитектоники, нарушенный иммунный статус, неоангиогенез, вазодилатацию, дефекты факторов свертывания, генетические факторы и даже нарушения биоценоза, роль и влияние которых требует тщательного изучения.

Дискуссионны сведения об иммунологических механизмах формирования несостоятельности эндометрия, особенно в отсутствие макроспического субстрата или диагностических признаков хронического эндометрита. Многообещающими

иммунологическими маркерами прогнозирования успешной имплантации в условиях субоптимальной рецептивности у пациенток с ПНИ являются uNK-клетки и Т-хелперы различных популяций в эндометрии в «окне имплантации».

Дизрегуляция активности стероидных гормонов в результате нарушенной экспрессии рецепторов может приводить как к изменениям архитектоники рецептивного эндометрия, так и к нарушениям экспрессии ключевых молекул успешной имплантации. Не систематизированы данные о роли маркера адгезии MUC1 и морфологии пиноподий в «окне имплантации» в условиях aberrантной экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону и иммунологической дизрегуляции.

Существует множество факторов риска ПНИ, из которых наиболее значимыми в литературе последних лет считаются возраст матери, курение, повышенный индекс массы тела и уровень стресса. Исследования, касающиеся факторов риска, как повторных, так и первичных неудач имплантации, противоречат друг другу вследствие недостаточной систематизации данных, классификации этиологических факторов и унификации терминологии. Выявление ключевых факторов риска у пациенток с ПНИ, а также определение их влияния на успешность имплантации поможет определить группы риска и служить веским основанием для применения специфических маркеров прогнозирования успешности имплантации и создания персонализированных подходов к преодолению бесплодия.

Из наиболее эффективных методов преодоления ПНИ исследователи выделяют правильный подбор протокола стимуляции овуляции, введение МКПК, Г-КСФ, PRP-терапию и физические методы воздействия. Физиотерапия остается контрверсионным методом, требующим изучения и оценки её влияния на архитектонику и рецептивность эндометрия, ауто- и паракринные механизмы регуляции и локальный иммунный статус, а в конечном итоге и на успешность имплантации и репродуктивные исходы.

Необходимость детального исследования этиологии, патогенетических механизмов, факторов риска, а также эффективности преодоления повторных

неудач имплантации для разработки полноценных протоколов лечения определило актуальность проведения настоящего исследования. Рекомендации для женщин с ПНИ должны различаться в зависимости от конкретной клинической ситуации. Лучший и в то же время самый сложный ответ — это персонализированная медицина, индивидуальный подход к каждой пациентке в зависимости от уникального набора характеристик.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование выполнялось в 2018–2022 гг. на клинической базе кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института РУДН (зав. кафедрой — д.м.н., проф., член-корр. РАН В. Е. Радзинский, ректор РУДН — д.ю.н., д.э.н., проф. О. А. Ястребов), ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко», в клинике «Мать и дитя» Кунцево и Клиническом госпитале Лапино «Мать и дитя» ООО «Хавен» (ген. директор — Б. А. Коноплев, Главный врач женского центра клиники — к.м.н. Д. П. Камилова, Главный врач Клинического госпиталя Лапино — к.м.н. Е. И. Спиридонова, заместитель главного врача по реабилитации — д.м.н. Е. С. Силантьева).

Исследование было проведено в два этапа. Первый этап был открытым наблюдением диагностическим проспективным. Второй этап был открытым проспективным рандомизированным неинтервенционным. Объектом исследования явились женщины с ПНИ, обратившиеся с целью преодоления бесплодия в клинику «Мать и дитя» Кунцево. На Рисунке 2 можно ознакомиться с дизайном исследования.



Рисунок 2 — Дизайн диссертационного исследования

Критериями включения в первый этап исследования являлись возраст от 20 до 42 лет; женское бесплодие; фертильная или субфертильная сперма партнера; наличие в анамнезе попыток переноса эмбриона; подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании; ПНИ в анамнезе (3 неудачных попытки селективного переноса свежих или размороженных эмбрионов у женщин моложе 35 лет и 2 — у женщин 35 лет и старше (согласно КР МЗ РФ «Женское бесплодие», 2021).

Критериями исключения из первого этапа исследования были наружный генитальный эндометриоз, аденомиоз II-III степени, субмукозные миоматозные узлы, полипы эндометрия, гиперплазия эндометрия (ГЭ), «тонкий» эндометрий на момент осуществления ПЭ; морфологически верифицированный хронический эндометрит без терапии антимикробными препаратами в анамнезе; пороки развития матки; цервикальный фактор бесплодия; наличие противопоказаний к проведению базовой программы ВРТ согласно приложению №2 к приказам №107н от 30.08.2012 г. (утратил силу в январе 2021 года) и №803н от 31.07.2020 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»; использование в программах ВРТ донорских ооцитов. В результате анализа 973 историй болезни в период с 2017 по 2021 годы были отобраны 57 пациенток, соответствовавших критериям включения/исключения, они составили основную группу пациенток с ПНИ.

Группу сравнения на первом этапе составили 30 пациенток, соответствующие вышеназванным критериям включения и исключения, но без ПНИ в анамнезе, успешно преодолевшие бесплодие с 1 или 2 попытки ЭКО с ПЭ. Все пациентки, включенные в исследование, дали добровольное информированное согласие на участие.

Основной задачей первого этапа диссертационного исследования было определение статистически значимых клинико-анамнестических факторов риска ПНИ на основании медицинских данных женщин изучаемой когорты. Каждой анализируемой характеристике пациентки присваивалось цифровое значение,

которое затем вносилось в многопольную таблицу. Итогом вышеописанной обработки медицинской документации явилась база данных, содержащая основную информацию об анамнезах жизни (семейное положение, условия труда, вредные привычки, перенесенные и хронические соматические заболевания), наследственных анамнезах (гинекологические и соматические заболевания у родственников 1-й и 2-й линий родства), акушерско-гинекологических анамнезах (менархе, коитархе, характеристики МЦ; беременности, роды, их течение, исходы и осложнения; гинекологические заболевания и оперативные вмешательства на органах малого таза) пациенток изучаемой когорты. В результате статистической обработки полученных данных были получены значимые клинко-анатомические предикторы ПНИ. На основании статистически значимых факторов риска была построена математическая модель прогнозирования неудач имплантации.

Также задачей первого этапа исследования был поиск патоморфологических и ИГХ маркеров эндометрия фазы пролиферации и фазы секреции пациенток с ПНИ. При оценке биоптатов эндометрия контрольная группа была представлена 30 соматически здоровыми женщинами возраста от 20 до 42 лет, успешно реализовавшими свою репродуктивную функцию путем естественного зачатия в течение последних 5 лет с учетом вышеперечисленных критериев исключения исследования.

Пациенткам обеих групп выполняли морфологическое и иммуногистохимическое исследования пайпель-биоптатов эндометрия в средней фазе пролиферации (8–10-й дни МЦ) и средней фазы секреции (7–8 дни после дня овуляции, рассчитанного на основании пика ЛГ в моче и данным сонографического исследования). В случае фиксации факта приёма гормональной терапии женщинами изучаемой когорты, терапия отменялась и перед проведением пайпель-биопсии выжидали 3 месяца.

Образцы брали только в том случае, если микробиом мочевыводящих путей пациентки был признан здоровым. Доступ к шейке матки осуществлялся в стерильной и чистой среде с использованием одноразовых зеркал. Pipelle de Cornier® вводился в матку через цервикальный канал с забором материала методом

вытягивания поршня инструмента, повторялся этот процесс минимум четыре раза. Затем инструмент извлекался, образец помещался в контейнер, заполненный раствором формалина, и хранился при температуре от +2 до +4 градусов Цельсия.

Биоптаты фиксировали 10% забуференным формалином, обрабатывали с помощью гистопроцессора Leica ASP 30 и заливали в парафин с помощью Leica EG 1150. Затем срезы окрашивали гематоксилином и эозином толщиной 4 мкм с помощью станции Leica ST 5010.

Материал рассматривался под микроскопом Leica DMLB, а для получения изображений использовалась цифровая камера Leica DFC 420. В полученных микропрепаратах эндометрий оценивался на предмет патоморфологических изменений.

Иммуногистохимическое исследование эндометрия проводили с антителами к CD4+ (Т-лимфоциты) – клон SP35 Ventana, CD8+ (Т-лимфоциты) – клон SP57 Ventana, CD20 (зрелые В-лимфоциты) – клон L26 фирмы DAKO, CD56+ NK – клон CD564 Leica Bond, CD138 на плазматические клетки – клон MI15, DAKO), MUC1 – клон MRQ-17 Cell marque, VWF – клон 36B11 Leica Bond, CD34 – клон QBEnd/10 Leica Bond, ER α – клон GF11 Leica Bond, PRA-AB – клон 1E2 Ventana. Иммуногистохимическое окрашивание производилось в иммуностейнере Ventana BenchMark Ultra IHdSH (США) Bond-Max (Германия). Для иммуноокрашивания использовали систему визуализации (Ultra-Vision TL-015-HD Lab Vision). Исследование экспрессии изучаемых иммуногистохимических маркеров проводилось в 3 неперекрывающихся полях зрения, при увеличении x400 с использованием микроскопа Leica DMLB с использованием цифровой камеры Leica DFC 420 (Германия).

ИГХ окрашивание антител к ER-A, PRA-AB оценивалось отдельно в железах и строме эндометрия, а окрашивание антител к CD4, CD8, CD20, CD34, CD56 и CD138 оценивалось только в строме эндометрия (ядра клеток). Отношение клеток поверхностного эпителия, окрашенных антителом к MUC1, к общему количеству эпителиальных клеток определяли во всех срезах эндометрия и выражали в процентах. Окрашивание антителом к MUC1 оценивалось в поверхностном

эпителии пиноподий. ИГХ окрашивание антителами к CD4, CD8, CD20, CD34, CD56 и CD138 оценивали как сумму DAB-позитивных клеток в полях зрения при 400-кратном увеличении. Для квантификации результатов оценки пиноподий и статистического сравнительного анализа были рассчитаны средние показатели количества пиноподий (плотность пиноподий, μm^{-2}).

Каждому анализируемому маркеру присваивалось цифровое значение, которое затем вносилось в многопольную таблицу. Итогом вышеописанной обработки медицинской документации явилась база данных, содержащая информацию об изучаемых маркерах каждой пациентки в средней фазе пролиферации и средней фазе секреции. В результате статистического анализа были получены значимые морфологические и ИГХ предикторы ПНИ. На основании статистически значимых маркеров ПНИ в средней стадии фазы секреции была построена математическая модель прогнозирования неудач имплантации.

Основной задачей второго этапа диссертационного исследования была оценка эффективности комплексного лечения пациенток с ПНИ в сравнении с монотерапией. Методом рандомизации пациентки основной группы первого этапа в количестве 57 женщин были стратифицированы на две подгруппы:

- I группа (n=29), в которой в 3 циклах, предшествующих переносу эмбрионов, пациентки получали прогестерон 10мг x 3 раза в день с 14-го по 25-й дни цикла согласно инструкции по применению. За 3–6 циклов до переноса эмбриона с целью достижения саногенетического эффекта с последующим восстановлением рецептивности проводили курс внутриполостной электроимпульсной терапии.

- II (n=28), в которой в 3 циклах, предшествующих переносу эмбрионов, пациентки получали прогестерон 10мг x 3 раза в день с 14-го по 25-й дни цикла согласно инструкции по применению.

Внутриполостная электроимпульсная терапия осуществлялась следующим образом. В течение всей манипуляции пациентка располагалась на кушетке лежа на спине с согнутыми в коленях и разведенными ногами. Полостной электрод

располагали в заднем своде влагалища, глубина введения была не менее 6см и ограничивалась препятствием дальнейшему введению. Другой накожный электрод располагали в надлобковой области. Чередовали прямую (положительную) и обратную (отрицательную) электростимуляцию по 10 мин. В начале манипуляции производилась регуляция силы тока планомерным увеличением до достижения пациенткой ощущений периодической безболезненной вибрации мышц передней брюшной стенки. Во время сокращений мышц брюшной стенки под вагинальным электродом допускались ощущения давления. Каждый сеанс длился 20 минут и проводился ежедневно утром, начиная с 6-го дня менструального цикла, в общей сложности 10 сеансов.

Пациенткам из группы I было рекомендовано использовать механическую контрацепцию в течение месяца, в котором проводилась физиотерапия, а также в течение двух месяцев после.

После лечения пациенткам обеих подгрупп осуществляли ЭКО и ПЭ. Стимуляцию суперовуляции осуществляли препаратами мочевых и рекомбинантных гонадотропинов, начиная со 2 дня менструального цикла, дозировку которых рассчитывали в соответствии с возрастом, антропометрическими данными, показателями гормональных исследований и овариальным резервом пациенток. Спустя 1,5 суток после назначения триггера финального созревания ооцитов (ХГ, рХГ или а-ГнРГ) через своды влагалища под контролем УЗИ с соблюдением правил асептики и антисептики аспирационной иглой производили трансвагинальную пункцию фолликулов (ТВП) и аспирацию ооцитов.

Эмбриолог изучал форму и зрелость ооцитов. Высококачественные ооциты затем оплодотворялись спермой партнера или донора в тот же день. Эмбриолог оценивал качество эмбрионов, наблюдая за количеством и формой бластомеров, наличием фрагментации и цитоплазматической фрагментацией на 3-й день. Качество эмбрионов на 5-й день развития определялось с помощью системы классификации Гарднера.

Если свежие эмбрионы не использовались в цикле стимуляции или если перенос планировался на более поздний срок, ранее замороженные эмбрионы размораживались и переносились во время четвертого цикла ЦГТ. Оценку ХГЧ в плазме осуществляли через 14 дней после переноса свежих/размороженных эмбрионов. На 21 сутки после переноса оценивали наличие плодного яйца в полости матки методом УЗИ и отмечали успех/неуспех имплантации и наступление клинической беременности. На сроке 5–6 недель беременности методом УЗИ оценивали наличие или отсутствие сердцебиения. Через 38–42 недели после переноса эмбрионов на основании медицинской документации выясняли исходы беременности. В случаях, если ведение беременности или родоразрешение осуществлялись не на базах проведения диссертационного исследования с пациенткой связывались по телефону для выяснения исхода. Методом статистического анализа на основании полученных данных осуществлялась сравнительная оценка эффективности комплексной терапии.

Методы статистического анализа

Для обработки полученных данных были использованы как методы параметрического, так и непараметрического анализа. Накопление и систематизацию данных производили в Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics v.26 (разработчик – IBM Corporation). Визуализацию полученных данных выполняли в программах Microsoft Office Word (2016), Microsoft Office Excel (2016), IBM SPSS Statistics v.26 и при помощи онлайн-инструментов StatTech v. 2.8.8 (<https://stattech.ru/>) и Lucidchart (<https://lucid.app/>).

Нормальность количественных данных определялась с помощью теста Шапиро-Уилка для выборок менее 50 и теста Колмогорова-Смирнова для выборок более 50. Данные, которые не соответствовали нормальному распределению, отображались с помощью медианы и нижнего и верхнего квартилей. Данные, которые соответствовали критериям нормальности, отображались в виде среднего и стандартного отклонения с 95% доверительными интервалами.

Сравнение количественных характеристик, соответствующих критериям нормального распределения, осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Сравнение количественных характеристик, не соответствующих критериям нормального распределения, осуществляли с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Для сравнения процентных показателей при анализе четырехпольных условных таблиц использовался χ^2 -тест Пирсона или точный тест Фишера в зависимости от того, были ли ожидаемые значения больше 10 или меньше 10, соответственно. При анализе многопольных таблиц сопряженности для сравнения процентных показателей использовался тест χ^2 Пирсона.

Различия показателей принимались за значимые при $p < 0,05$.

Для оценки корреляции между категориальными измерениями использовалось отношение шансов (ОШ) путем определения отношения вероятностей наступления или не наступления результата в основной группе по сравнению с контрольной группой. Для оценки значимости ОШ были рассчитаны границы 95% ДИ, а значимые различия определялись при значении обеих границ больше или меньше единицы.

Прогностическое моделирование вероятности исхода проводилось с помощью логистической регрессии, а достоверность модели измерялась коэффициентом R^2 Найджелкерка. Диагностическая значимость количественных признаков для прогнозирования исхода анализировалась с помощью анализа ROC-кривой для определения оптимальных значений параметров, обеспечивающих наилучшее сочетание чувствительности и специфичности. Точка отсечения для количественного признака определялась по наибольшему значению индекса Юдена.

ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК

С целью выявления факторов риска ПНИ был проведён статистический сравнительный анализ группы женщин с ПНИ (I группа, основная, n=57) с группой контроля (II группа, n=30) на основании данных анамнеза. В группу контроля вошли пациентки с бесплодием маточного происхождения успешно преодолевшие бесплодие в программах ВРТ с первой или второй попытки.

Был выполнен анализ возраста пациенток и их партнёров на момент последней попытки переноса эмбриона. Статистический анализ показал, что медианный возраст пациенток основной группы составил 39,4 года ($Q_1 - Q_3$: от 35,5 до 41,3), а пациенток контрольной группы 37 лет ($Q_1 - Q_3$: от 35,3 до 39) (Рисунок 3). Таким образом, медиана возраста была на 2,4 года ниже в группе контроля в сравнении с основной группой, однако статистически значимые различия установлены не были ($p = 0,313$). Медианный возраст партнёров пациенток в обеих группах составил 40 лет ($Q_1 - Q_3$: 37-45 и 36,3-48, в I и II группах соответственно). При сравнении возраста партнёров пациенток в обеих группах также не удалось выявить статистически значимых различий ($p = 0,476$).

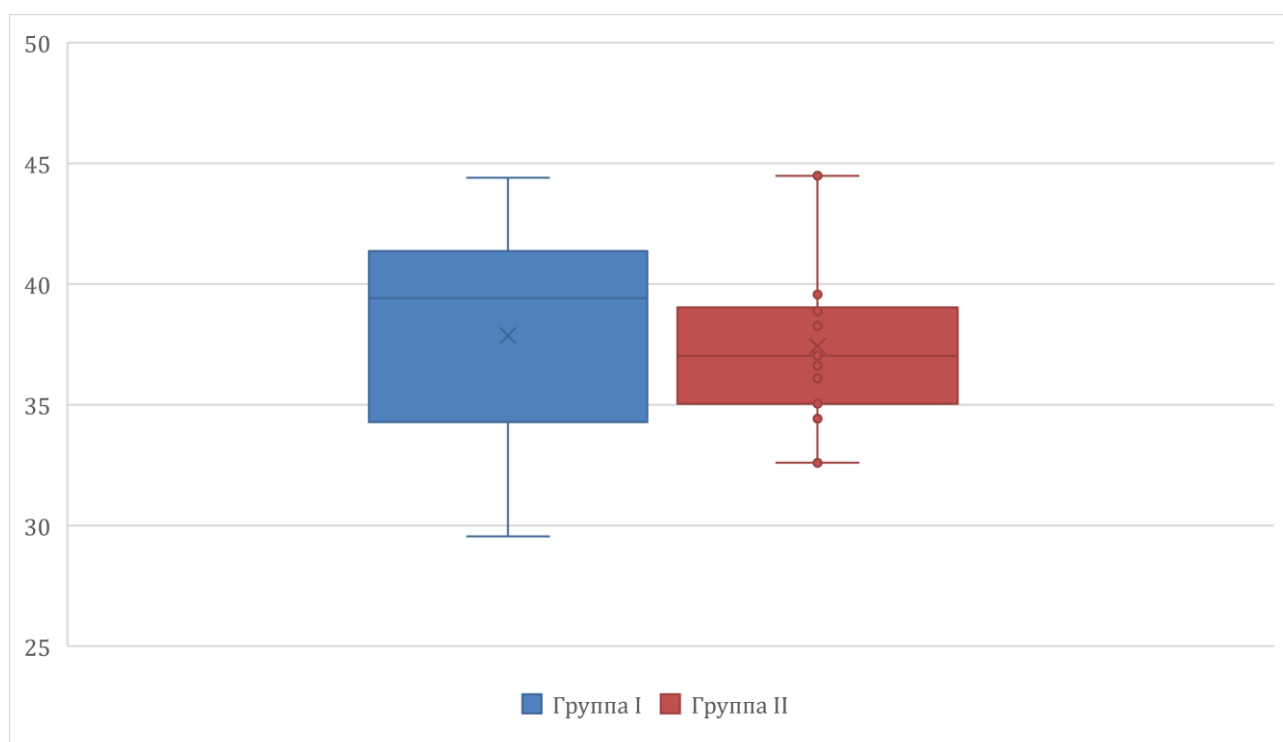


Рисунок 3 — Распределение возраста в изучаемых группах

Статистическая обработка антропометрических данных продемонстрировала, что медианный ИМТ в основной группе составил 23,8 кг/м² (Q₁ – Q₃: от 21,4 до 25,7 кг/м²), а в группе контроля 22,3 кг/м² (Q₁ – Q₃: от 20,8 до 23 кг/м²). Таким образом, в основной группе медианный ИМТ был на 1,5 кг/м² выше в сравнении с группой контроля, а сравнительный анализ выявил, что межгрупповое различие было статистически значимо ($p = 0,023$) (Рисунок 4), что позволяет расценивать ИМТ как фактор риска ПНИ.

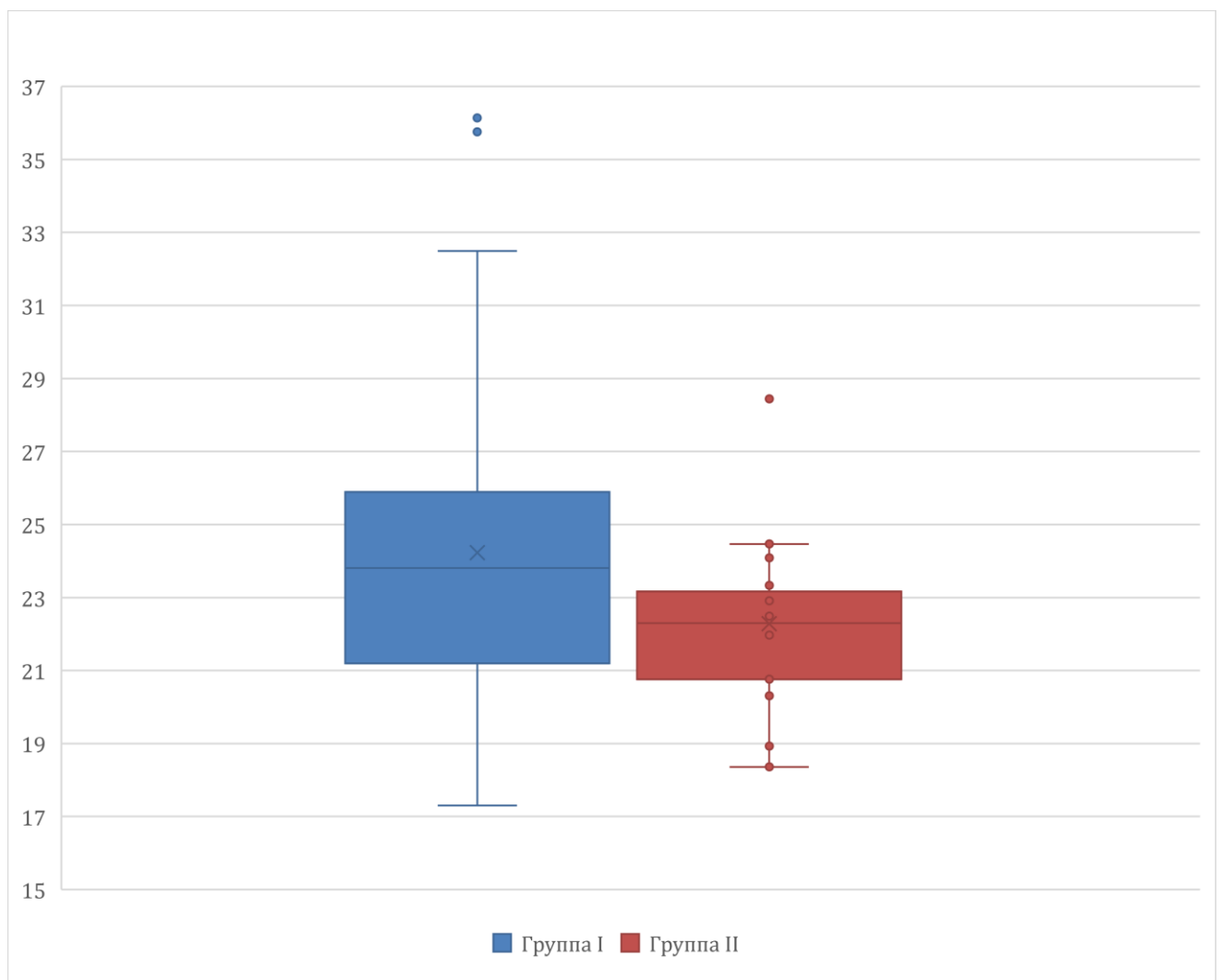


Рисунок 4 — Распределение ИМТ в обеих изучаемых группах

Для изучения взаимосвязи между вероятностью наступления клинической беременности и ИМТ в отношении риска ПНИ был проведен анализ ROC-кривой (Рисунок 5).

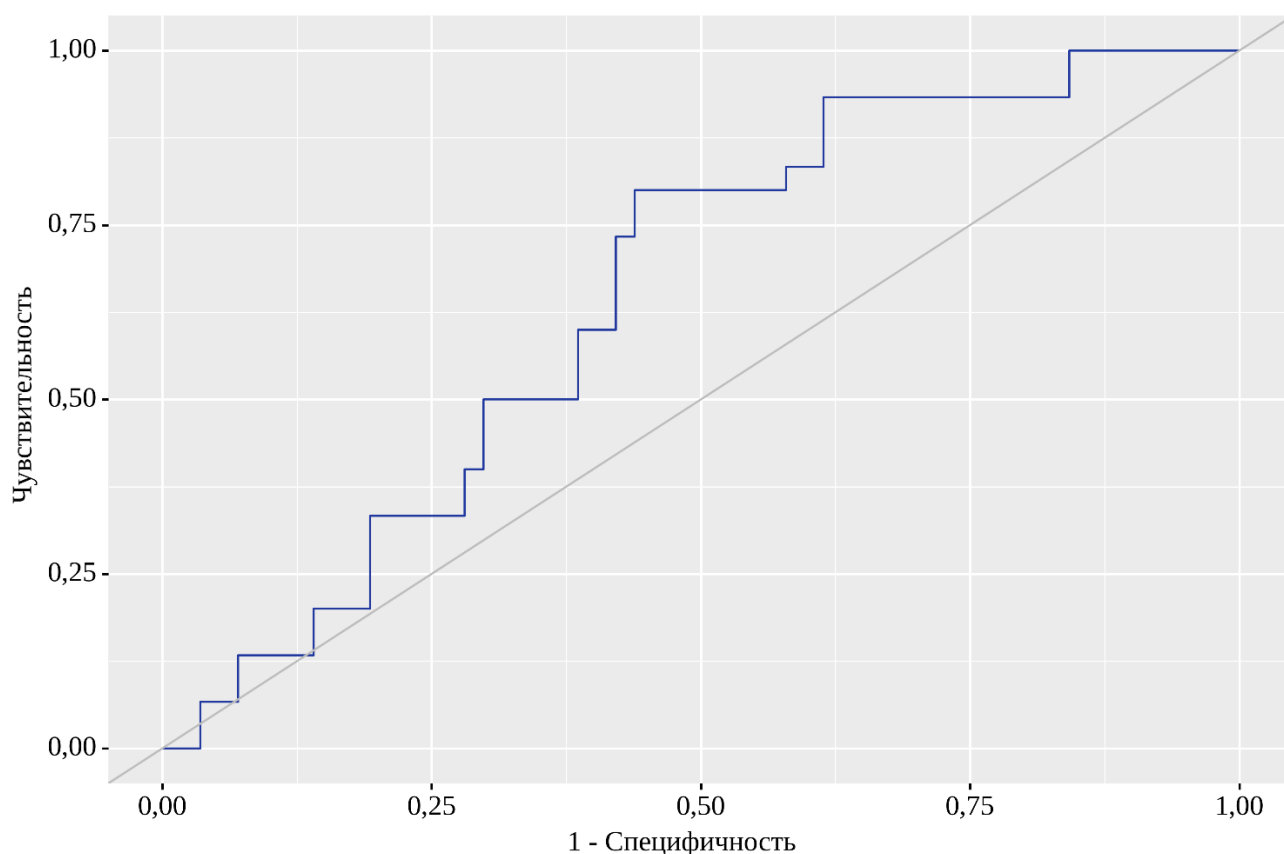


Рисунок 5 — ROC-кривая, характеризующая связь между преодолением бесплодия и ИМТ

Площадь под ROC-кривой составила $0,649 \pm 0,060$ с 95% ДИ: 0,531 – 0,766. Полученная модель была статистически значимой ($p = 0,023$). Используемая модель предсказывала беременность при ИМТ менее $23,338 \text{ кг/м}^2$. Ее точность в определении возможности наступления беременности (чувствительность) составила 80%, а точность в определении невозможности (специфичность) - 56,1%.

Следующим этапом анализа анамнестических характеристик было изучение вредных привычек пациенток (Таблица 1).

Таблица 1 — Распространенность вредных привычек в обеих группах

	Алкоголь, абс (%)	Курение, абс (%)
I группа (n=57)	5 (8,8)	20 (35,1)
II группа (n=30)	2 (6,7)	4 (13,3)
p	1,000	0,031

Исходя из полученных данных при оценке курения в анамнезе в зависимости от факта преодоления бесплодия с помощью методов ВРТ с 1 или 2 попытки были выявлены статистически значимые межгрупповые различия ($p = 0,031$). Шанс встретить факт курения в анамнезе пациенток с ПНИ был выше в 3,5 раза в сравнении с группой контроля, а отношение шансов наступления клинической беременности при курении в анамнезе составило 0,285 (ОШ = 0,285; 95% ДИ: 0,087 – 0,931), что позволяет расценивать курение как фактор риска ПНИ. При сравнении факта злоупотребления алкоголем в зависимости от группы не удалось выявить статистически значимых различий ($p = 1,000$).

Далее был проведен анализ ключевых характеристик анамнеза жизни пациенток в обеих группах (Таблица 2).

Таблица 2 — Сравнение анамнеза жизни пациенток в обеих группах

	Работает, абс (%)	Есть профессиональные вредности, абс (%)	Брак зарегистрирован, абс (%)
I группа (n=57)	37 (64,9)	3 (5,3)	49 (86,0)
II группа (n=30)	22 (73,3)	2 (6,7)	28 (93,3)
p	0,424	1,000	0,483

При оценке связи между социальным статусом, профессиональными вредностями и регистрацией брака с преодолением бесплодия не было выявлено различий ($p = 0,424$, $p = 1,000$, $p = 0,483$ соответственно).

Для определения возможного вклада генетических факторов в риск повторных неудач имплантации был проведен сравнительный статистический анализ наследственных заболеваний у пациенток в обеих группах (Таблица 3).

Таблица 3 — Анализ наследственности у пациенток изучаемой когорты

Наследственность	Заболевания ССС, абс (%)	СД, абс (%)	Онкологические процессы, абс (%)
I группа (n=57)	17 (29,8)	20 (35,1)	23 (40,4)
II группа (n=30)	10 (33,3)	4 (13,3)	8 (26,7)
p	0,737	0,031	0,205

При сравнении встречаемости СД у родственников 1 линии в I и II группах были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,031$). Шансы наличия СД у родственников 1 линии у пациенток контрольной группы были ниже в 3,514 раза, по сравнению пациентками I группы, различия шансов были статистически значимыми (ОШ = 3,509; 95% ДИ: 1,074 – 11,494), что позволяет рассматривать этот фактор, как вносящий вклад в риск развития ПНИ. При анализе встречаемости заболеваний ССС и онкологической заболеваемости у родственников 1 линии не удалось выявить статистически значимых межгрупповых различий ($p = 0,737$, $p = 0,205$, соответственно).

Далее для изучения возможного вклада в развитие ПНИ соматической заболеваемости был выполнен анализ распространенности хронических экстрагенитальных заболеваний в изучаемых группах. Наиболее распространенными соматическими заболеваниями в I группе были болезни ЖКТ, аллергии и ожирение или избыточная масса тела (24,64, 18,18 и 14,55%, соответственно). Во II группе наиболее распространёнными экстрагенитальными хроническими заболеваниями оказались заболевания мочевыделительной системы, аллергии и хронический тонзиллит (29,17, 16,67 и 16,67%, соответственно) (Рисунок 6).

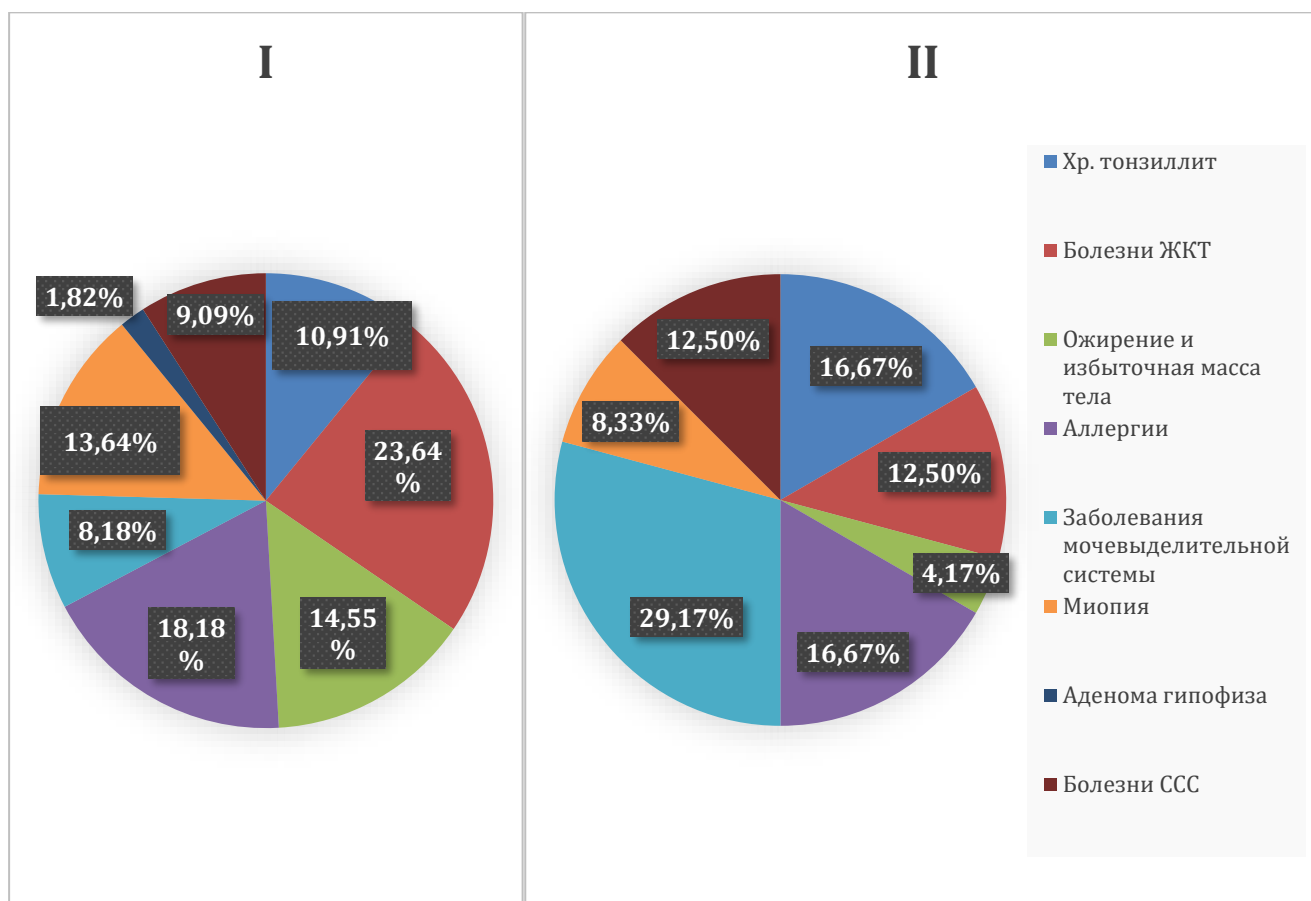


Рисунок 6 — Распространенность соматических заболеваний в изучаемых группах пациенток

Сравнительный анализ встречаемости экстрагенитальных хронических заболеваний по группам представлен в Таблице 4. Болезни ЖКТ у 80,6% пациенток изучаемой когорты были представлены хроническим гастритом, остальные 19,4% включали в себя ДЖВП и ЖКБ. Аллергические реакции были представлены как пищевыми аллергиями (75%), так и аллергическими реакциями на лекарственные средства в анамнезе (25%). Заболевания мочевыделительной системы были представлены хроническими циститами (86,9%) и пиелонефритами (13,1%). Встречаемость ожирения и избыточной массы тела составила 28,07% в I группе и 6,67% в контрольной группе, притом в I группе у 6 (10,5%) пациенток было ожирение I степени, а у 2 (3,5%) – ожирение II степени, в то время как во II группе ИМТ пациенток не превышал 28,44 кг/м². В I группе у двоих пациенток (3,5%) наблюдалась компенсированная микроаденома гипофиза.

Таблица 4 — Хронические соматические заболевания пациенток изучаемой когорты

	I группа (n=57)	II группа (n=30)	p
Хр. тонзиллит, абс (%)	12 (21,1)	8 (26,7)	0,554
Болезни ЖКТ, абс (%)	25 (43,9)	6 (20,0)	0,027
Ожирение и избыточная масса тела, абс (%)	16 (28,1)	2 (6,7)	0,019
Аллергии, абс (%)	20 (35,1)	8 (26,7)	0,424
Заболевания мочевыделительной системы, абс (%)	9 (15,8)	14 (46,7)	0,002
Миопия, абс (%)	15 (26,3)	4 (13,3)	0,164
Аденома гипофиза, абс (%)	2 (3,5)	0 (0,0)	0,543
Болезни ССС, абс (%)	10 (17,5)	6 (20,0)	0,779

В соответствии с представленной таблицей были установлены статистически значимые межгрупповые различия по распространенности болезней ЖКТ, ожирения и избыточной массы тела и заболеваний мочевыделительной системы у пациенток изучаемой когорты ($p = 0,027$, $p = 0,019$, $p = 0,002$, соответственно). Шансы встретить в анамнезе пациенток контрольной группы болезни ЖКТ были ниже в 3,125 раза по сравнению с группой пациенток с ПНИ, отношение шансов было статистически значимо (ОШ = 3,125; 95% ДИ: 1,108 – 8,771). Установленная закономерность может объясняться взаимосвязью между нарушениями гепатобилиарной системы и концентрациями половых стероидных гормонов [74, 164] или повышенной распространенностью избыточной массы тела в основной группе, и позволяет выделить заболевания ЖКТ как фактор риска ПНИ. Шансы превышения ИМТ $>24,9 \text{ кг/м}^2$ в группе контроля были ниже в 5,463 раза по сравнению с основной изучаемой группой, различия шансов были статистически

значимыми (ОШ = 5,464; 95% ДИ: 1,176 – 25,641), что также позволяет отнести избыточную массу тела и ожирение к факторам риска ПНИ.

При анализе распространённости таких заболеваний как хронический тонзиллит, аллергии, миопия, аденома гипофиза, болезни ССС значимых различий выявить не удалось ($p = 0,554$, $p = 0,424$, $p = 0,164$, $p = 0,543$, $p = 0,779$, соответственно).

В целях изучения вклада в развитие ПНИ нарушений менструального цикла следующим этапом был проведён сравнительный анализ количественных характеристик менструального цикла (Таблица 5).

Таблица 5 — Характеристики менструального цикла пациенток изучаемой когорты

		Me	Q ₁ – Q ₃	p
Возраст менрахе (лет)	I группа (n=57)	13	13 – 14	0,908
	II группа (n=30)	13	13 – 13,75	
Продолжительность менструального цикла (дней)	I группа (n=57)	28	28 – 30	0,006
	II группа (n=30)	28	28 – 28	
Длительность менструальных выделений (дней)	I группа (n=57)	5	5 – 6	0,025
	II группа (n=30)	5	4 – 5	
Возраст коитархе (лет)	I группа (n=57)	18	17 – 19	0,012
	II группа (n=30)	18	16 – 18	

При сравнении продолжительности менструального цикла и длительности менструальных выделений медианы показателей были идентичны и находились в пределах нормы FIGO (28 и 5 дней, соответственно) [123], однако были установлены статистически значимые межгрупповые различия ($p = 0,006$, $p = 0,025$, соответственно). В сравнении с пациентками контрольной группы вариабельность продолжительности менструального цикла была повышена среди пациенток с ПНИ и имела тенденцию к увеличению, длительность менструальных выделений также имела тенденцию к увеличению в I группе (Рисунки 7, 8), что может свидетельствовать о субклинической асинхронности трансформации эндометрия. При оценке возраста коитархе были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,012$), с тенденцией на его снижение в группе контроля. При сравнении возраста менархе не удалось выявить значимых различий ($p = 0,908$).

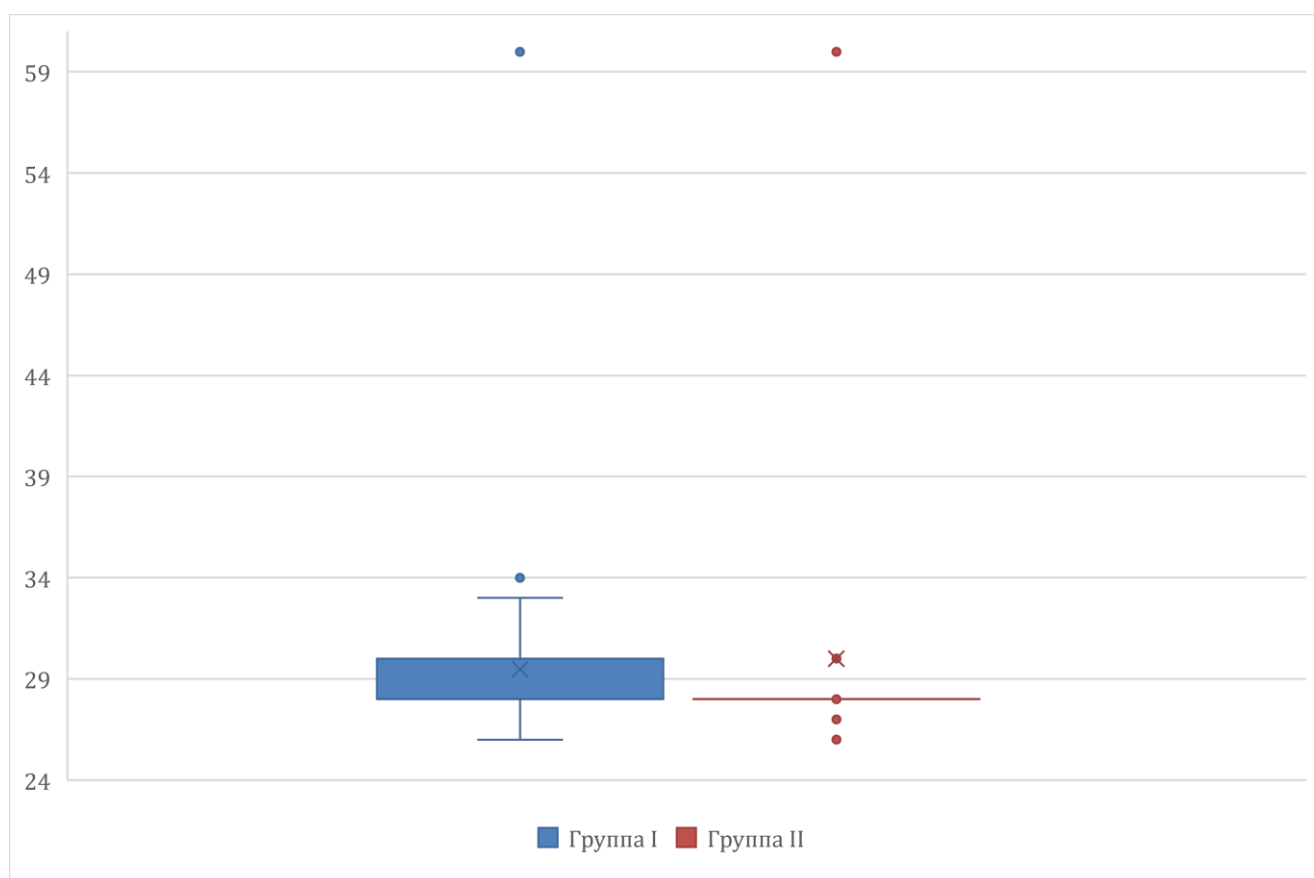


Рисунок 7 — Анализ вариабельности длительности менструального цикла пациенток в обеих группах

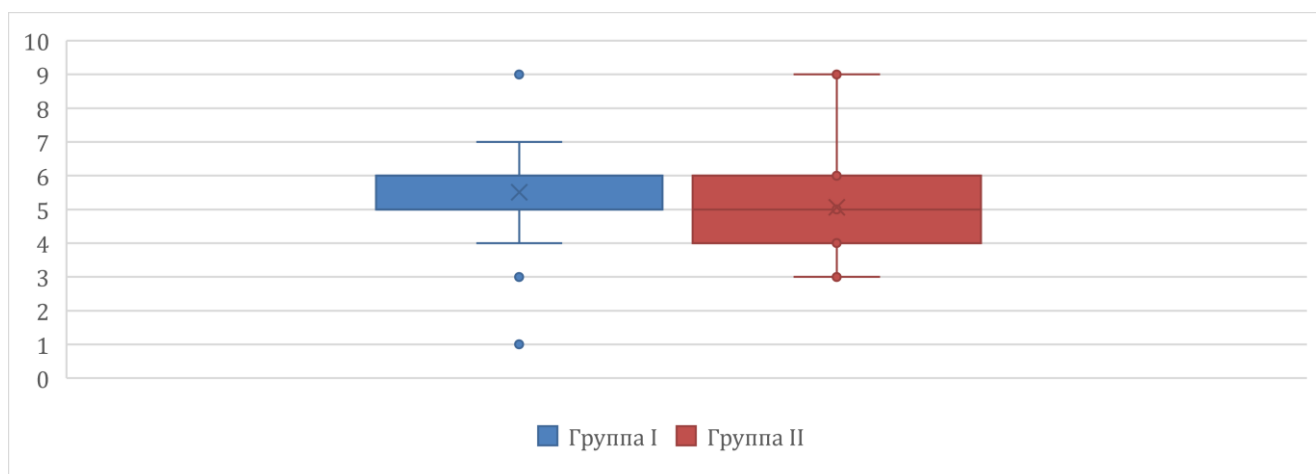


Рисунок 8 — Сравнительный анализ продолжительности менструальных выделений пациенток изучаемой когорты

Следующим этапом было изучение качественных характеристик менструальной функции пациенток изучаемой когорты (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительный анализ характеристик менструаций пациенток изучаемой когорты

	I группа (n=57)	II группа (n=30)	p
Нерегулярные менструации, абс (%)	3 (5,3)	2 (6,7)	1,000
Регулярные менструации, абс (%)	54 (94,7)	28 (93,3)	
Умеренные менструации, абс (%)	40 (70,2)	24 (80,0)	0,130
Скудные менструации, абс (%)	4 (7,0)	4 (13,3)	
Обильные менструации, абс (%)	13 (22,8)	2 (6,7)	
Безболезненные менструации, абс (%)	47 (82,5)	24 (80,0)	0,779
Болезненные менструации, абс (%)	10 (17,5)	6 (20,0)	
Менструации установились не сразу после менархе, абс (%)	7 (12,3)	8 (26,7)	0,134
Менструации установились сразу после менархе, абс (%)	50 (87,7)	22 (73,3)	

Во время анализа таких характеристик как регулярность, обильность, болезненность менструальных выделений, а также факта установления цикла сразу после менархе статистически значимых различий выявить не удалось ($p = 1,000$, $p = 0,130$, $p = 0,779$, $p = 0,134$, соответственно).

Следующим этапом была проведена оценка влияния гинекологического анамнеза на успешность преодоления бесплодия методом сравнительного статистического анализа (Таблицы 7, 8).

Таблица 7 – Сравнительный анализ встречаемости заболеваний в гинекологическом анамнезе пациенток изучаемой когорты

Заболевания в гинекологическом анамнезе	I группа (n=57)	II группа (n=30)	p
N93.9 Аномальное маточное и влагалищное кровотечение неуточненное, абс (%)	14 (24,6)	2 (6,7)	0,041
N60.9 Доброкачественная дисплазия молочных желез, абс (%)	19 (33,3)	6 (20,0)	0,191
N88 Другие невоспалительные болезни шейки матки, абс (%)	20 (35,1)	10 (33,3)	0,870
N84.0 Полипы эндометрия, абс (%)	27 (47,4)	3 (10,0)	< 0,001
D25 Миома матки, абс (%)	29 (50,9)	4 (13,3)	< 0,001
N71.1 Хронический эндометрит, абс (%)	42 (73,7)	6 (20,0)	< 0,001
N85.0 Гиперпластические процессы эндометрия, абс (%)	11 (19,3)	9 (30,0)	0,259
A50-A64 Инфекции, передаваемые половым путём, абс (%)	34 (59,6)	10 (33,3)	0,020

Таблица 8 – Сравнительный анализ встречаемости оперативных вмешательств в гинекологическом анамнезе пациенток изучаемой когорты

Оперативные вмешательства в гинекологическом анамнезе	I группа (n=57)	II группа (n=30)	p
Раздельные диагностические выскабливания, абс (%)	45 (78,9)	16 (53,3)	0,013
Операция кесарево сечение, абс (%)	19 (33,3)	6 (20,0)	0,191

Исходя из полученных данных при анализе встречаемости в гинекологическом анамнезе АМК, РДВ, полипов эндометрия, миомы матки, хронического эндометрита и ИППП были выявлены статистически значимые межгрупповые различия ($p = 0,041$, $p = 0,013$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,020$) (Рисунок 9).

При анализе встречаемости ДДМЖ, эктопии шейки матки и операции кесарево сечение статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,134$, $p = 0,191$, $p = 0,870$, $p = 0,574$, соответственно).

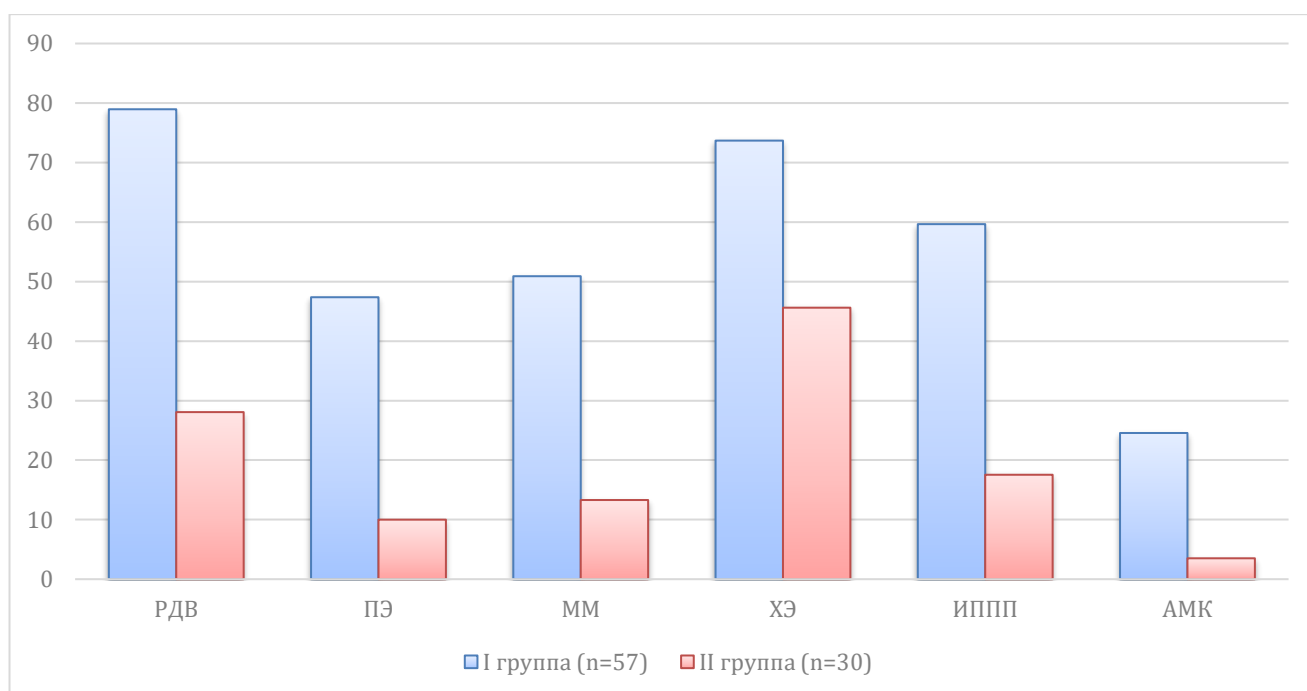


Рисунок 9 — Распространенность гинекологических заболеваний и операций в анамнезе с установленными статистически значимыми различиями

При установленных статистически значимых различиях был выполнен расчёт отношения шансов и доверительного интервала (Таблица 9).

Таблица 9 — Вклад гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств в анамнезе в развитие ПНИ

Заболевания и оперативные вмешательства в анамнезе	Шанс	Отношения шансов	95% доверительный интервал
Раздельные диагностические выскабливания	3,281	3,279	1,258 – 8,547
Полипы эндометрия	8,100	8,130	2,202 – 29,411
Миома матки	6,732	6,711	2,083 – 21,739
Хронический эндометрит	11,200	11,236	3,831 – 32,258
Инфекции, передаваемые половым путём	2,957	2,959	1,172 – 7,462

Таким образом, среди гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств в анамнезе пациенток изучаемой когорты к факторам риска развития повторных неудач имплантации можно отнести наличие полипов эндометрия, миомы матки, гистологически верифицированного хронического эндометрита, ИППП и РДВ в анамнезе.

Следующим этапом был выполнен анализ репродуктивного анамнеза пациенток изучаемой когорты (Таблица 10).

Таблица 10 – Анализ репродуктивного анамнеза пациенток

	I группа (n=57)	II группа (n=30)	p
Неразвивающиеся беременности, абс (%)	12 (21,1)	10 (33,3)	0,210
Аборты, абс (%)	28 (49,1)	18 (60,0)	0,334
Роды, абс (%)	24 (42,1)	18 (60,0)	0,112
Первичное бесплодие	17 (29,8)	10 (33,3)	0,737
Вторичное бесплодие	40 (70,2)	20 (66,7)	
Гормональная контрацепция, абс (%)	29 (50,9)	12 (40,0)	0,574
Барьерные методы, абс (%)	17 (29,8)	12 (40,0)	
Естественные методы контрацепции, абс (%)	11 (19,3)	6 (20,0)	

Исходя из полученных данных при анализе репродуктивного анамнеза не было выявлено статистически значимых различий ($p = 0,210$, $p = 0,334$, $p = 0,112$, $p=0,737$, $p = 0,574$, соответственно).

Далее был выполнен анализ длительности бесплодия и количества попыток переноса эмбриона в зависимости от группы (Таблица 11).

Таблица 11 — Анализ длительности бесплодия в зависимости от группы

	Длительность бесплодия (лет)			p
	Me	Q ₁ – Q ₃	n	
I группа (n=57)	6	4 – 10	57	< 0,001
II группа (n=30)	4	2 – 5	30	

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о значительных различиях ($p < 0,001$) в продолжительности бесплодия, измеряемой в годах, между различными группами исследования. В частности, контрольная группа имела

значительно меньшую продолжительность бесплодия по сравнению с группой пациенток с ПНИ. Это расхождение, вероятно, связано с повторяющимися неудачами имплантации, с которыми столкнулась последняя группа.

При изучении количества попыток в обеих группах также были установлены статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,001$). В I группе медиана количества попыток составила 4 ($Q_1 - Q_3: 3 - 5$), а в контрольной – 2 ($Q_1 - Q_3: 2 - 2$), что очевидно также является уже следствием снижения имплантационного потенциала пациенток с ПНИ.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Иммуногистохимическое исследование эндометрия изучаемой когорты в средней стадии фазы пролиферации

Целью исследования было выявление маркеров нарушений имплантации в эндометрии пациенток, страдающих ПНИ. Для достижения этой цели применялись строгие критерии отбора: отсутствие каких-либо аномалий эндометрия, трехмесячный перерыв в гормональной терапии, включая месяц биопсии эндометрия и возраст до 45 лет. Благодаря такому методическому подходу, исследование было направлено на получение точных и надежных результатов в определении маркеров имплантации у пациенток с ПНИ.

Группу морфологического контроля составили 30 фертильных женщин до 45 лет, имевших в анамнезе 2 и более родов доношенными здоровыми детьми и не имеющих нарушений фертильности, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Медиана возраста обследованных женщин как с ПНИ, так и в группе контроля, статистически значимо не различалась (39,4 против 39,0 лет, $p=0,245$).

Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе осуществлялось патоморфологическая и иммуногистохимическая оценка эндометрия в средней стадии фазы пролиферации с ключевыми иммунологическими маркерами.

При патоморфологическом исследовании гистологических препаратов эндометрия, окрашенных гематоксилином и эозином, у пациенток основной группы маточные железы морфологически соответствовали средней стадии фазы пролиферации, в части образцов определялись невыраженные фокусы уплотнения стромы эндометрия за счет «завихрений», преимущественно вокруг маточных желез, и мелкие очаги воспалительной инфильтрации, а также умеренное утолщение стенки кровеносных сосудов, что может соответствовать слабо выраженному хроническому эндометриту (Рисунок 10 а, б).

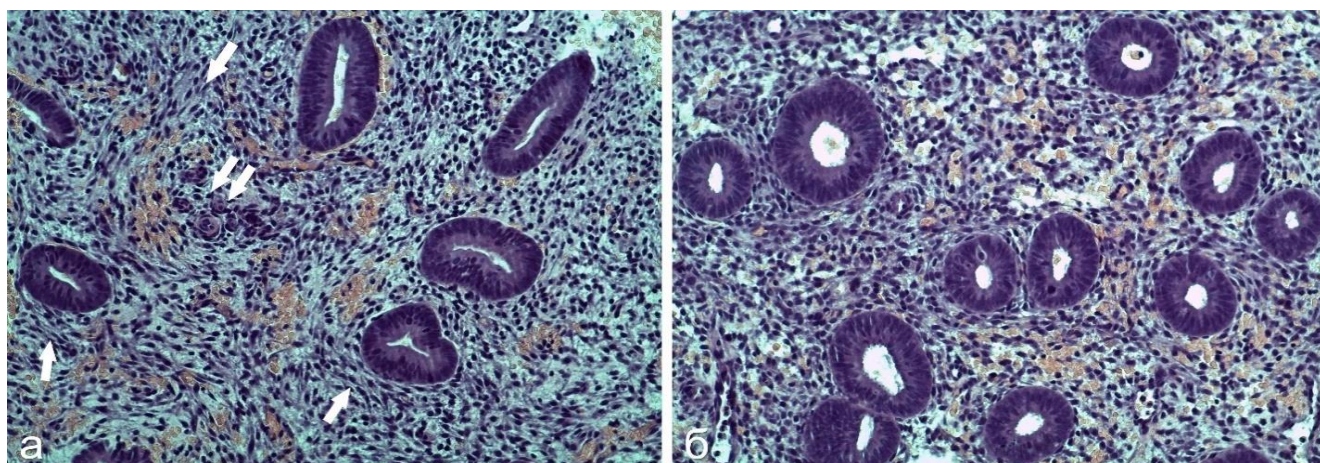


Рисунок 10 — Патоморфологическое исследование гистологических препаратов эндометрия средней стадии фазы пролиферации, окрашенных гематоксилином и эозином, ув. x200 (а – основная группа, ПНИ, эндометрий соответствует средней стадии фазы пролиферации, в строме и вокруг маточных желез определяются мелкие фокусы фиброза в виде «завихрений» (стрелка), утолщение стенок мелких артериальных сосудов (двойная стрелка), б – группа морфологического контроля, эндометрий соответствует средней стадии фазы пролиферации), окраска гематоксилином и эозином

Для уточнения клеточного состава лейкоцитов и оценки состояния локального иммунитета следующим этапом было иммуногистохимическое исследование с последующим сравнительным анализом. Изучаемыми маркерами локального иммунитета пациенток были CD4+, CD8+, CD56+, CD20+, CD138+.

В первую очередь был проведён статистический сравнительный анализ экспрессии маркера натуральных киллеров (Таблица 12).

Таблица 12 — Сравнительный анализ экспрессии CD56+NK клеток в биоптатах пациенток изучаемых когорт

	CD56+, клетки		p
	Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	9	7 – 15	<0,001
II группа (n=30)	5	3 – 8	

При сравнительном анализе было отмечено статистически значимое увеличение экспрессированных CD56+ клеток у пациенток, страдающих ПНИ (медианное значение превышало в 1,8 раза) по сравнению с результатами группы морфологического контроля ($p < 0,001$) при ИГХ анализе биоптатов эндометрия в средней стадии фазы пролиферации (Таблица 12). Несмотря на то, что медианные значения экспрессированных CD56+ клеток в обеих группах не выходили за пределы пороговых для постановки диагноза хронический эндометрит (10 клеток) [88], у единичных пациенток с ПНИ в биоптатах эндометрия были отмечены превышения значений в 2–3 раза, что могло свидетельствовать о слабо выраженном воспалительном процессе (Рисунок 11), подобных результатов не наблюдалось в биоптатах пациенток морфологического контроля.

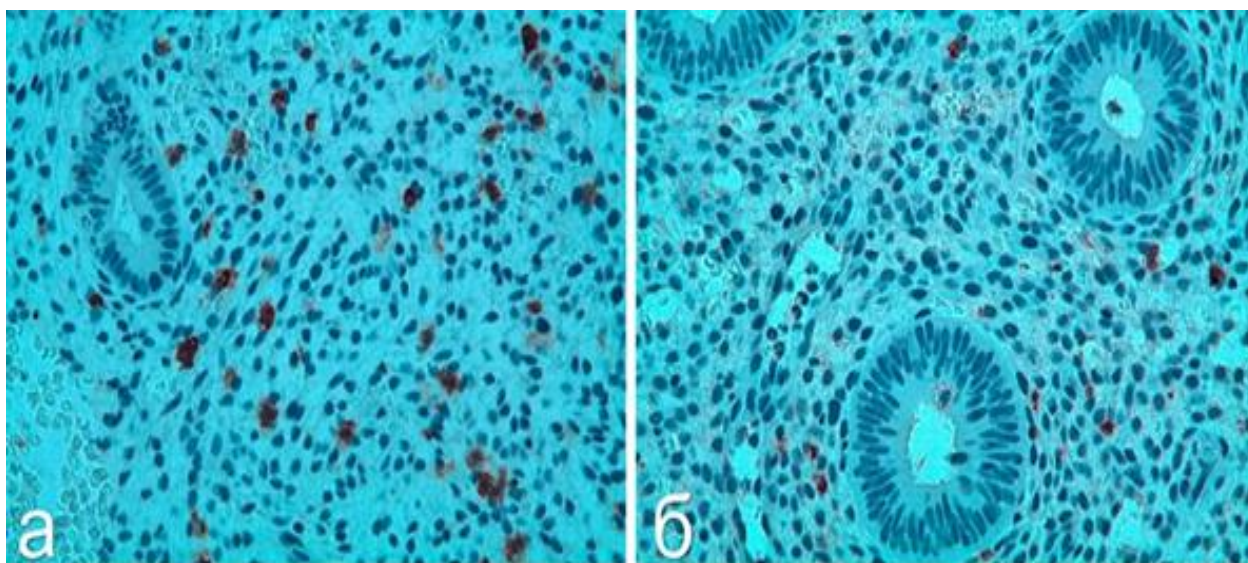


Рисунок 11 — ИГХ, экспрессия CD56+ в биоптатах эндометрия в средней стадии фазы пролиферации, ув. x400 (а — основная группа, ПНИ, положительная экспрессия CD56+, 34 клетки в поле зрения; б — группа морфологического контроля, положительная экспрессия CD56+; 7 клеток в поле зрения)

Далее был проведен сравнительный анализ экспрессии CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитарных субпопуляций лейкоцитов (Таблица 13).

Таблица 13 – Сравнительный анализ экспрессии CD4+ и CD8+ клеток в биоптатах пациенток изучаемых когорт

	CD4+		p	CD8+		p
	Me	Q ₁ – Q ₃		Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	2	2 – 6	0,038	14	8 – 37	0,137
II группа (n=30)	4	2 – 6		10	6 – 16	

Согласно полученным данным у пациенток с ПНИ была отмечена статистически значимая сниженная экспрессия регуляторных CD4+клеток (медианное значение было меньше в 2 раза, $p = 0,038$) (Рисунок 12 в, г) и повышенная экспрессия цитотоксических CD8+ клеток (в 1,4 раза, $p = 0,119$) по сравнению с группой морфологического контроля (Рисунок 12 д, е).

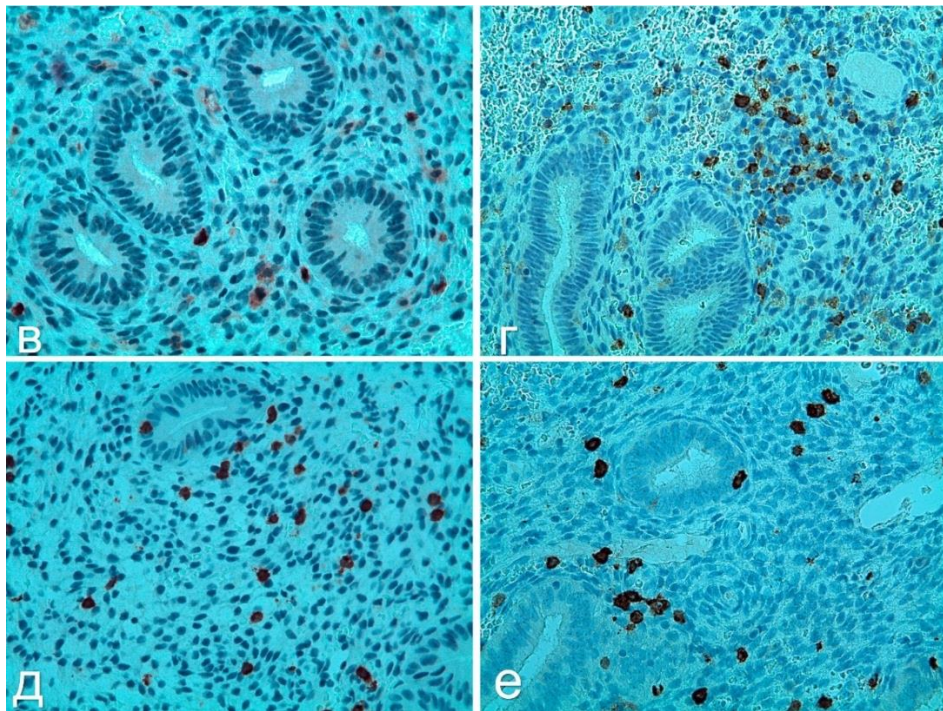


Рисунок 12 — ИГХ, экспрессия CD4+ и CD8+ клеток в биоптатах эндометрия пациенток изучаемых когорт в средней стадии фазы пролиферации, ув. x400 (в — основная группа, экспрессия CD4+; г — группа морфологического контроля, экспрессия CD4+; д — основная группа, экспрессия CD8+; е — группа морфологического контроля, положительная CD8+)

Так как статистически значимых межгрупповых различий между экспрессиями цитотоксических субпопуляций Т-лимфоцитов CD8⁺ в биоптатах эндометрия пациенток с ПНИ и группой контроля установлено не было, для уточнения выраженности иммунной дисрегуляции был рассчитан показатель соотношения цитотоксических CD8⁺ и регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов и проведён его сравнительный статистический анализ (Таблица 14).

Таблица 14 – Сравнительный анализ соотношения экспрессии CD4⁺ и CD8⁺

	CD4 ⁺ /CD8 ⁺		p
	Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	0,162	0,143 – 0,188	< 0,001
II группа (n=30)	0,387	0,375 – 0,400	

Согласно полученным данным в соотношениях CD4⁺/CD8⁺ были установлены статистически значимые межгрупповые различия (p < 0,001). Таким образом, комплексное патоморфологическое исследование продемонстрировало дисбаланс в местном иммунитете эндометрия у пациенток с ПНИ между регуляторными и цитотоксическими Т-лимфоцитами в пользу последних за счет снижения CD4⁺ клеток и увеличения CD8⁺клеток, что отличает местный иммунитет здоровых женщин из группы морфологического контроля.

Одновременно было выявлено статистически значимое увеличение CD20⁺ клеток у пациенток с ПНИ в сравнении с группой контроля (Таблица 15).

Таблица 15 — Сравнительный анализ экспрессии CD20⁺ клеток у пациенток изучаемой когорты

	CD20 ⁺		p
	Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	2	1 – 3	0,017
II группа (n=30)	1	1 – 2	

Были отмечены единичные случаи повышения количества CD20+ клеток до 6 (Рисунок 13 а, б), одновременно в эндометрии у этих же пациенток (10,5%) с ПНИ были диагностированы единичные CD138+ (1-2 плазматические клетки) (Рисунок 13 в, г), что позволяет предположить, что хроническая инфекция или аномальное воспаление в эндометрии не являются ведущей причиной наблюдаемых изменений в экспрессии иммунных клеток.

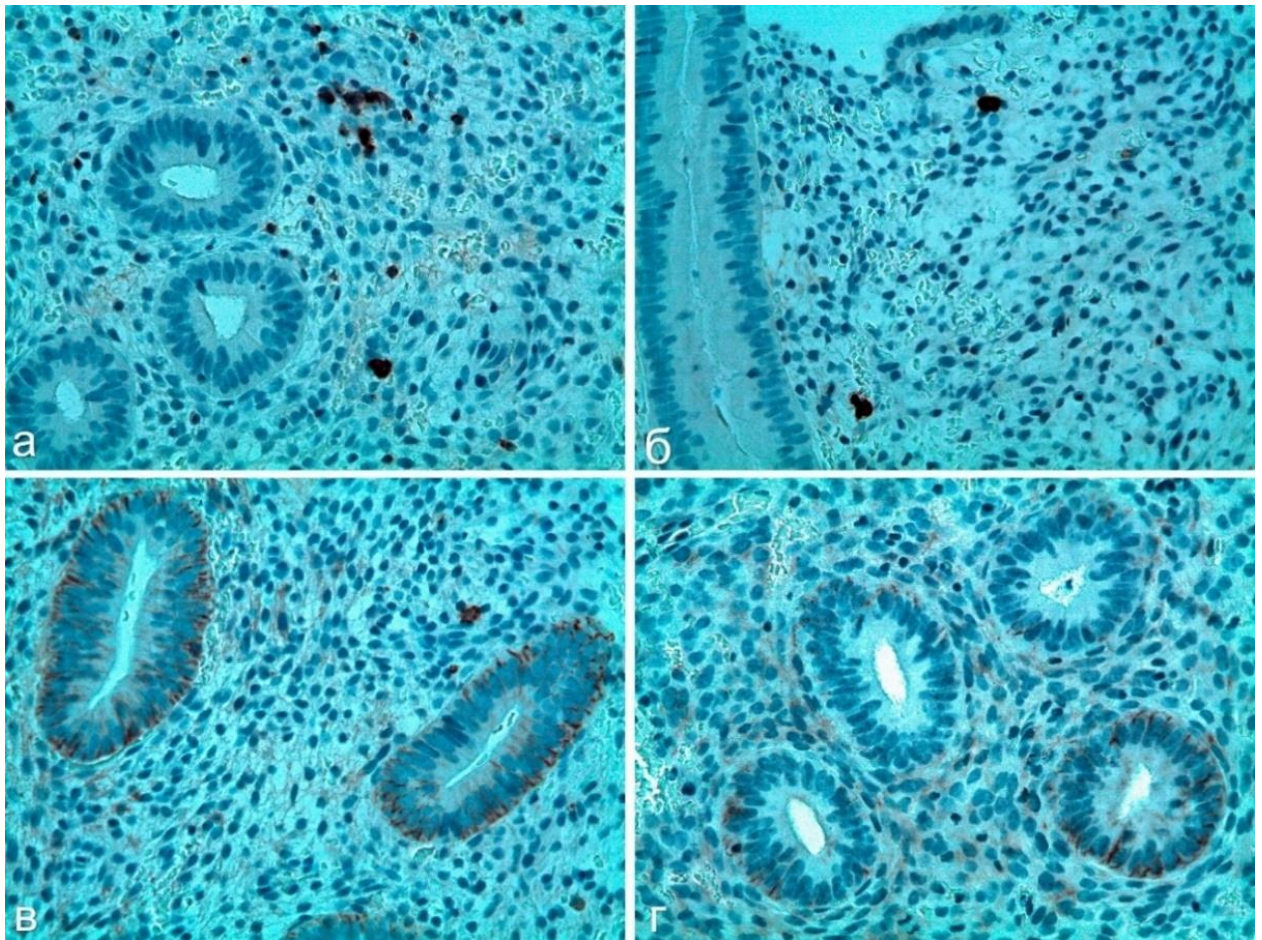


Рисунок 13 — ИГХ, экспрессия CD20+ и CD138+ клеток в биоптатах эндометрия пациенток изучаемых когорт в средней стадии фазы пролиферации, ув. x400 (а — основная группа, ПНИ, положительная экспрессия CD20+, 6 клеток в поле зрения; б — группа морфологического контроля, положительная экспрессия CD20+, 2 клетки в поле зрения; в — основная группа, ПНИ, положительная экспрессия CD138+, 2 клетки в поле зрения; г — группа морфологического контроля, негативная экспрессия CD138+, 0 клеток в поле зрения)

Вышеизложенные результаты иммуногистохимического исследования сочетаются с патоморфологическими находками, свидетельствующими о наличии слабо выраженного хронического эндометрита у 11% пациенток с ПНИ.

4.2 Иммуногистохимическое исследование эндометрия в период «окна имплантации» (на 7-й день после пика концентрации ЛГ) в средней фазе секреции

На следующем этапе исследования осуществлялась патоморфологическая и иммуногистохимическая оценка биоптатов эндометрия, полученных в период «окна имплантации» (на 7-й день после пика концентрации ЛГ) с ключевыми иммунологическими маркёрами и маркёрами рецептивности.

При морфологической оценке у пациенток с повторными неудачами имплантации по сравнению с фертильным контролем установлены изменения имплантационной состоятельности эндометрия, характеризующиеся, прежде всего, уменьшением числа зрелых и созревающих пиноподий, вплоть до их отсутствия на апикальной поверхности эндометрия (морфологически ранняя стадия фазы секреции) на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, (Рисунок 14 а, б).

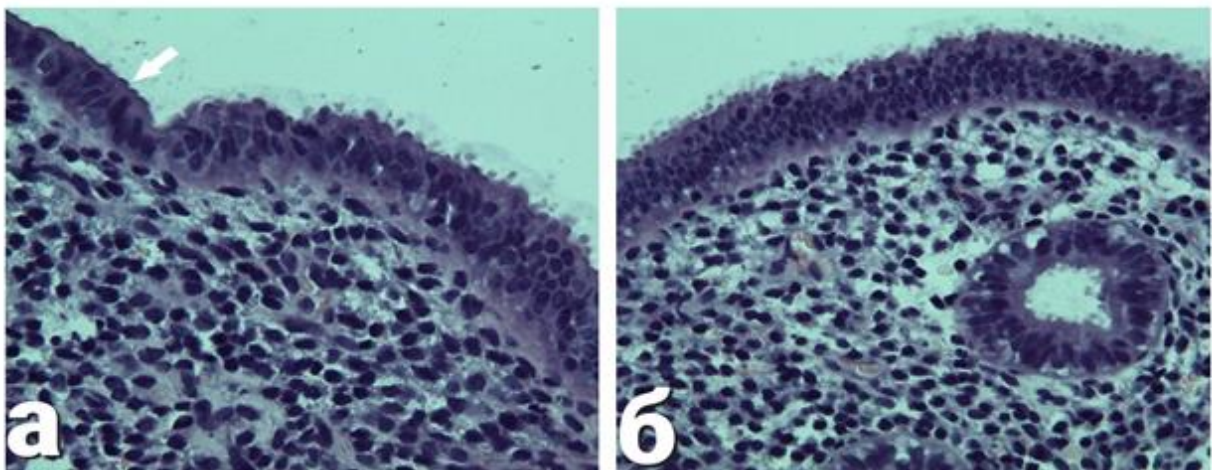


Рисунок 14 — эндометрий соответствует ранней – средней стадии фазы секреции, окраска гематоксилином и эозином, ув. x400 (а – фокус отсутствия пиноподий (стрелка) при ПНИ; б – равномерное расположение пиноподий в группе морфологического контроля)

Для квантификации полученных результатов оценки пиноподий и статистического сравнительного анализа были рассчитаны средние показатели количества пиноподий (плотность пиноподий, $\mu\text{м}^{-2}$) и проведено ИГХ биоптатов эндометрия с антителом к MUC1 с последующим выявлением межгрупповых различий (Таблица 16).

Таблица 16 — Сравнительный анализ плотности пиноподий, $\mu\text{м}^{-2}$ и экспрессии MUC1

	Пиноподии, плотность, $\mu\text{м}^{-2}$		p	MUC1, %		p
	Me	Q ₁ – Q ₃		Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	0,031	0,028 – 0,034	<0,001	24,031	18,943 – 39,017	<0,001
II группа (n=30)	0,022	0,018 – 0,027		48,349	42,601 – 65,514	

Исходя из полученных данных при сравнении плотности пиноподий были выявлены существенные различия, медиана плотности в I группе была выше в 1,4 раза в сравнении с группой морфологического контроля ($p < 0,001$), что свидетельствует о меньшем диаметре и недостаточном созревании пиноподий в результате нарушений секреторной трансформации эндометрия.

Вместе с тем были выявлены статистически значимые межгрупповые различия при сравнении DAB-позитивных клеток при реакции с маркером MUC1 при иммуногистохимическом исследовании, медиана процента окрашенных клеток у пациенток с ПНИ была ниже в 2 раза в сравнении с группой морфологического контроля ($p < 0,001$). На фотографиях микропрепаратов определялась неравномерная окраска, а в фокусах отсутствия пиноподий у пациенток с ПНИ выявлялось её полное отсутствие (Рисунок 15 в) по сравнению с группой морфологического контроля, где реакция на всем протяжении на апикальной поверхности эндометрия равномерная положительная.

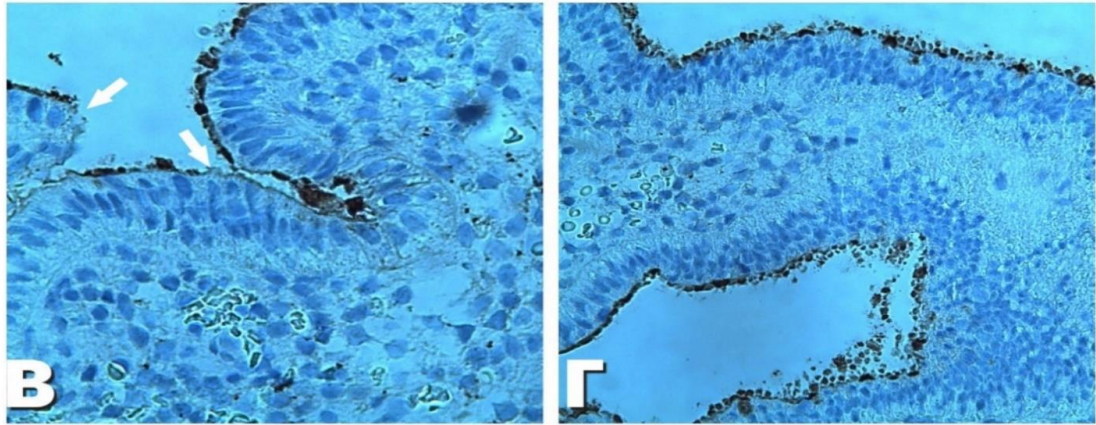


Рисунок 15 — ИГХ с антителом к MUC1, эндометрий средней стадии фазы секретиции, ув. x400 (в – фокусы отсутствия или уменьшения экспрессии на апикальной поверхности эндометрия (стрелки) у пациентки с ПНИ; г – равномерное распределение пиноподий у пациентки группы морфологического контроля)

С целью сравнительного анализа процессов ангиогенеза в эндометрии у пациенток с ПНИ и группы морфологического контроля было проведено иммуногистохимическое исследование с маркерами VWF (фактор Виллебранда) и CD34.

Продемонстрировано недостоверное увеличение числа кровеносных сосудов, экспрессии их в эндотелии в группе пациенток с ПНИ (Рисунки 16, 17).

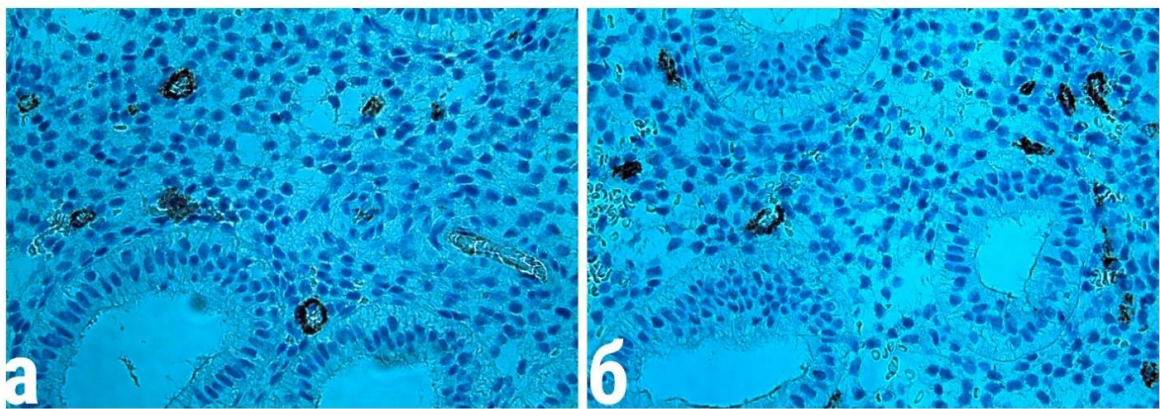


Рисунок 16 — ИГХ с антителом к VWF, ув. x400 (а – положительная экспрессия в эндотелии кровеносных сосудов у пациентки с ПНИ; б – пациентка группы морфологического контроля)

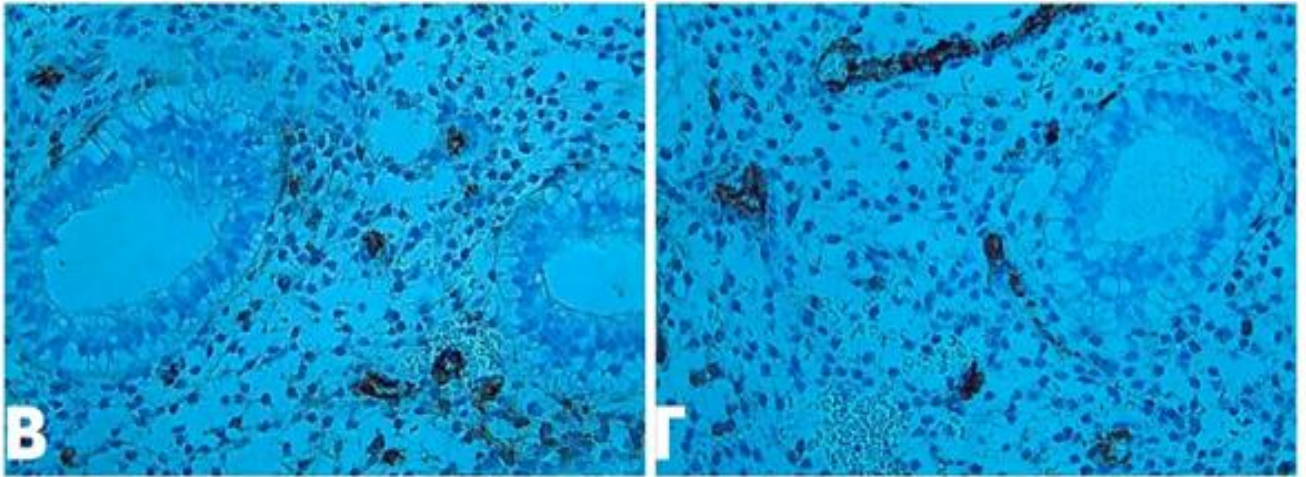


Рисунок 17 — ИГХ с антителом к CD34+, ув. x400 (в – положительная экспрессия в эндотелии кровеносных сосудов у пациентки с ПНИ; г – пациентка группы морфологического контроля)

Следующим этапом была оценка и сравнительный анализ иммуногистохимических реакций с антителами к половым гормонам ER α и PR-AB (Таблица 17).

Таблица 17 — Сравнительный анализ экспрессии маркеров ER α и PR-AB в строме и железах эндометрия

		Me	Q ₁ – Q ₃	p
ER α железы, %	I группа (n=57)	34,626	31,085 – 50,657	<0,001
	II группа (n=30)	23,142	20,982 – 34,048	
ER α стромы, %	I группа (n=57)	10,956	9,765 – 14,631	<0,001
	II группа (n=30)	8,407	6,680 – 10,579	
PR-AB железы, %	I группа (n=57)	40,435	24,774 – 52,148	<0,001
	II группа (n=30)	16,271	14,133 – 20,452	
PR-AB стромы, %	I группа (n=57)	52,351	36,759 – 67,538	<0,001
	II группа (n=30)	77,297	60,103 – 85,988	

Согласно полученным данным при оценке экспрессии маркеров ER α и PR-AB в строме и железах эндометрия были выявлены существенные межгрупповые различия ($p < 0,001$). Обращает на себя внимание достоверное увеличение экспрессированных клеток с антителом к ER α в железах и строме эндометрия у пациенток с ПНИ (Рисунок 18 а) и достоверное снижение экспрессии к рецепторам PR α -AB в строме эндометрия при одновременном увеличении этого маркера в эпителии маточных желез (Рисунок 18 в) по сравнению с группой морфологического контроля (Рисунок 18 б, г).

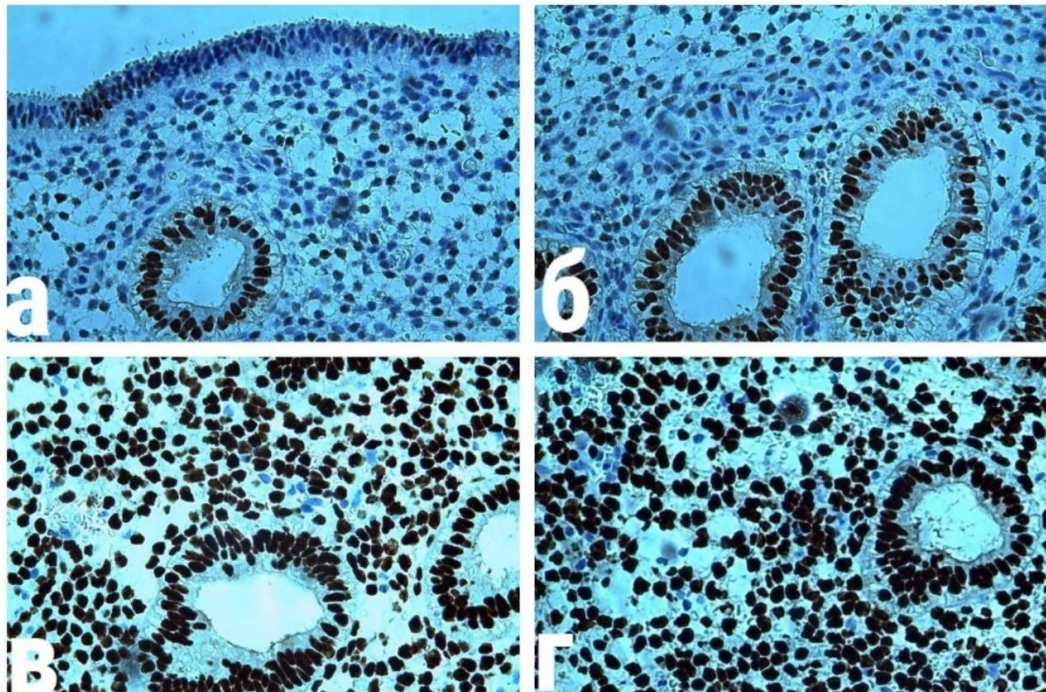


Рисунок 18 — ИГХ, экспрессии маркеров ER α и PR-AB в строме и железах эндометрия, ув. х400 (а, б — положительная экспрессия к рецепторам ER α в железах и строме эндометрия в обеих исследовательских группах; в — положительная экспрессия к рецепторам PR-AB в железах при уменьшении числа положительных клеток в строме эндометрия у пациентки с ПНИ; г — положительная равномерная экспрессия к рецепторам PR-AB в железах и строме эндометрия у пациентки группы морфологического контроля)

Выявленная aberrантная экспрессия рецепторов к эстрогену и прогестерону обуславливает нарушения рецептивной способности эндометрия в окне имплантации у пациенток с ПНИ. Дизрегуляция активности стероидных гормонов в результате нарушенной экспрессии их рецепторов является ключевым звеном патогенеза нарушений архитектоники эндометрия, приводя к имплантационной несостоятельности.

На предыдущем этапе исследования была проведена иммуногистохимическая оценка показателей местного иммунитета в эндометрии пациенток с ПНИ, морфологически соответствующего средней стадии фазы пролиферации, продемонстрировавшая дисбаланс между Т-лимфоцитами (CD4+, CD8+) в пользу CD8+, а также двухкратное увеличение CD56+клеток НК. На данном этапе было также выполнено иммуногистохимическое исследование с вышеуказанными маркерами в период «окна имплантации» (средняя стадия фазы секреции) (Таблицы 18–20, Рисунки 19, 20).

Таблица 18 — Сравнительный анализ экспрессии CD4+ и CD8+ клеток в биоптатах пациенток изучаемых когорт в период окна имплантации

	CD4+		p	CD8+		p
	Me	Q ₁ – Q ₃		Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	4	3 – 7	0,036	16,000	10 – 39	0,002
II группа (n=30)	6,5	4 – 9		9,000	3,25 – 14,75	

Согласно полученным данным у пациенток с ПНИ в биоптатах эндометрия в период «окна имплантации» была отмечена статистически значимая сниженная экспрессия регуляторных CD4+клеток (медианное значение было меньше в 1,6 раза, $p = 0,036$) (Рисунок 19 а, б) и статистически значимая повышенная экспрессия цитотоксических CD8+ клеток (в 1,8 раза, $p = 0,002$) по сравнению с группой морфологического контроля (Рисунок 19 в, г).

Таблица 19 — Сравнительный анализ соотношения экспрессии CD8+ и CD4+ в период окна имплантации

	CD4+/CD8+		p
	Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	0,250	0,175 – 0,400	< 0,001
II группа (n=30)	0,655	0,560 – 0,969	

Согласно полученным данным в соотношениях CD4+/CD8+ были установлены статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,001$). Таким образом, комплексное патоморфологическое исследование продемонстрировало сохранение дисбаланса в местном иммунитете эндометрия у пациенток с ПНИ между регуляторными и цитотоксическими Т-лимфоцитами в пользу последних за счет снижения CD4+ клеток и увеличения CD8+клеток в период «окна имплантации» (Рисунок 19 а-г).

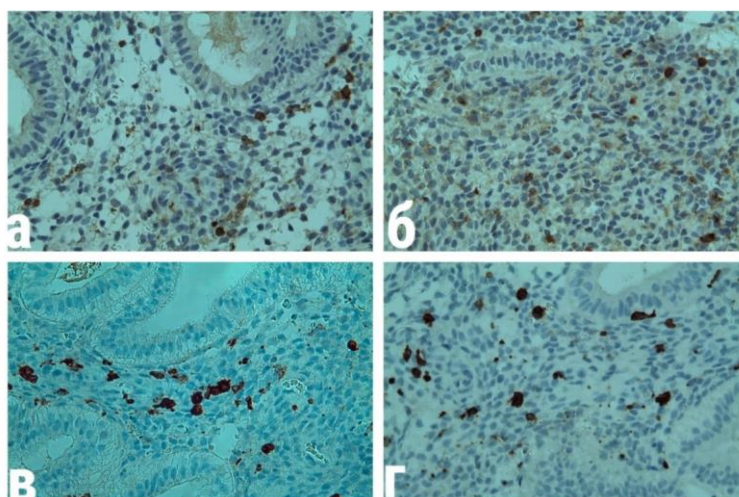


Рисунок 19 — ИГХ, экспрессия CD4+ и CD8+ клеток в биоптатах эндометрия пациенток изучаемых когорт в период окна имплантации, ув. x400 (а – основная группа, положительная экспрессия CD4+, 8 клеток в поле зрения; б – группа морфологического контроля, положительная экспрессия CD4+, 14 клеток в поле зрения; в – основная группа, положительная экспрессия CD8+, 21 клетка в поле зрения; г – группа морфологического контроля, положительная экспрессия CD8+; 14 клеток в поле зрения)

Таблица 20 — Сравнительный анализ экспрессии CD56+NK клеток в биоптатах пациенток изучаемых когорт в период окна имплантации

	CD56+, клетки		p
	Me	Q ₁ – Q ₃	
I группа (n=57)	11	9 – 16	<0,001
II группа (n=30)	5	3 – 10	

При сравнительном анализе в период «окна имплантации», так же, как и в пролиферативной фазе было отмечено статистически значимое увеличение экспрессированных CD56+ клеток у пациенток, страдающих ПНИ (медианное значение превышало в 2,2 раза) по сравнению с результатами группы морфологического контроля (p <0,001) при ИГХ анализе биоптатов эндометрия в средней стадии фазы пролиферации.

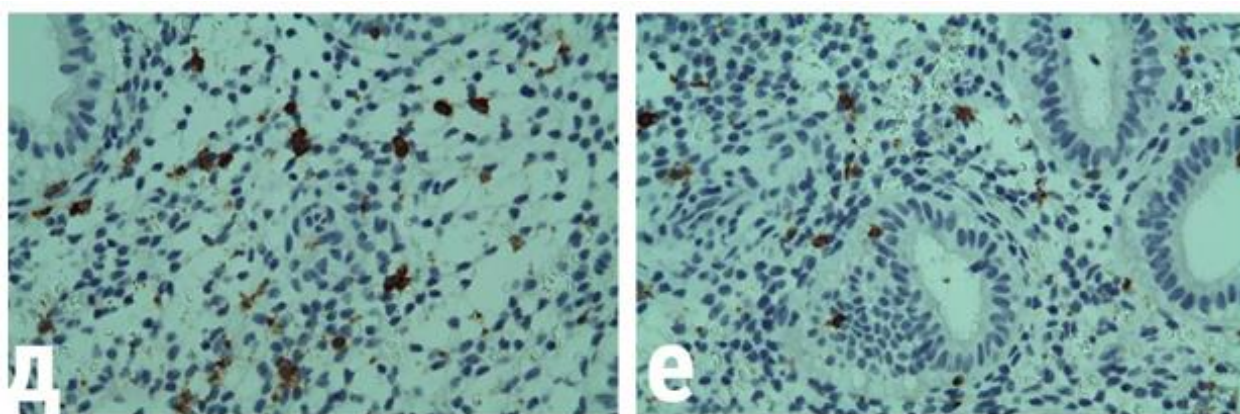


Рисунок 20 — ИГХ, экспрессия CD56+ клеток в биоптатах эндометрия пациенток изучаемых когорт в период окна имплантации, ув. x400 (д – положительная экспрессия CD56+, 28 клеток в поле зрения у пациентки с ПНИ; е – положительная экспрессия CD56+, 10 клеток в поле зрения у пациентки группы морфологического контроля)

ГЛАВА 5. МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДОВ ВРТ У ПАЦИЕНТОК С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ

5.1 Математическая модель прогнозирования успешности имплантации на основании клинико-anamнестических факторов

После анализа данных анамнеза на предыдущем этапе исследования (глава 3) были выявлены следующие факторы риска ПНИ (Таблица 21).

Таблица 21 — Клинико-anamнестические факторы риска развития ПНИ

	Отношения шансов	95% доверительный интервал	p
ИМТ	-	-	0,023
Курение сейчас или в анамнезе	0,285	0,087 – 0,931	0,031
СД у родственников 1 линии	0,285	0,087 – 0,931	0,031
Болезни ЖКТ	0,320	0,114 – 0,902	0,027
ИМТ > 24,9 кг/м ²	0,183	0,039 – 0,859	0,019
Продолжительность менструального цикла	-	-	0,006
Длительность менструальных выделений	-	-	0,025
Аномальные маточные кровотечения в анамнезе	0,219	0,046 – 1,040	0,041
Раздельные диагностические выскабливания в анамнезе	0,305	0,117 – 0,795	0,013
Полипы эндометрия	0,123	0,034 – 0,454	< 0,001
Миома матки	0,149	0,046 – 0,480	< 0,001
Хронический эндометрит	0,089	0,031 – 0,261	< 0,001
ИППП	0,338	0,134 – 0,853	0,020
Длительность бесплодия	-	-	< 0,001

На основании полученных статистически значимых клинико-анамнестических факторов методом бинарной логистической регрессии была разработана математическая модель прогнозирования успешной имплантации в программе ЭКО с ПЭ. Для построения математической модели прогноза успешности имплантации методом пошагового подбора с расчетом скорректированного отношения шансов и после учета других предикторных переменных в модели было отобрано 5 факторов: длительность бесплодия, наличие в анамнезе АМК, миомы матки, ХЭ и ИППП. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%, \text{ где}$$

$$z = 4,667 - 1,674X_{\text{ММ}} - 2,506X_{\text{ХЭ}} - 0,459X_{\text{Дл.бесплодия}} - 2,254X_{\text{ИППП}} - 2,362X_{\text{АМК}},$$

а P – вероятность наступления успешной имплантации с 1 или 2 попытки,

$X_{\text{ММ}}$ – наличие миомы матки в анамнезе (0 – нет, 1 – есть),

$X_{\text{ХЭ}}$ – наличие ХЭ в анамнезе (0 – ХЭ нет, 1 – ХЭ есть),

$X_{\text{Дл.бесплодия}}$ – длительность бесплодия (лет),

$X_{\text{ИППП}}$ – наличие ИППП в анамнезе (0 – нет, 1 – есть),

$X_{\text{АМК}}$ – АМК в анамнезе (0 – нет, 1 – есть).

Модель включила 63,1% факторов риска, влияющих на успех имплантации, как было определено по коэффициенту R_2 Найджелкерка. На основании статистического анализа установлено, что шансы успешной имплантации уменьшались при наличии миомы матки в анамнезе в 5,334 раза, при ХЭ — в 12,262 раза, при ИППП — в 9,523 раза, при АМК — в 10,614 раза. При увеличении длительности бесплодия на 1 год шансы успешной имплантации уменьшались в 1,583 раза. Характеристики связи предикторов модели с вероятностью успешной имплантации представлены в Таблице 22.

Таблица 22 — Характеристики связи предикторов модели с вероятностью успешной имплантации

Предикторы	Нескорректированное отношение шансов (unadjusted odds ratio, COR)		Скорректированное отношение шансов (adjusted odds ratio, AOR)	
	COR; 95% ДИ	p	AOR; 95% ДИ	p
Наличие миомы матки в анамнезе	0,149; 0,046 – 0,480	0,001	0,187; 0,038 – 0,918	0,039
Наличие ХЭ в анамнезе	0,089; 0,031 – 0,261	< 0,001	0,082; 0,018 – 0,365	0,001
Длительность бесплодия	0,771; 0,649 – 0,918	0,003	0,632; 0,475 – 0,840	0,002
Наличие ИППП в анамнезе	0,338; 0,134 – 0,853	0,022	0,105; 0,018 – 0,598	0,011
АМК в анамнезе	0,219; 0,046 – 1,040	0,056	0,094; 0,010 – 0,862	0,036

С помощью ROC-анализа была построена кривая для определения зависимости между вероятностью успешной имплантации и значением логистической функции Р (Рисунок 21).

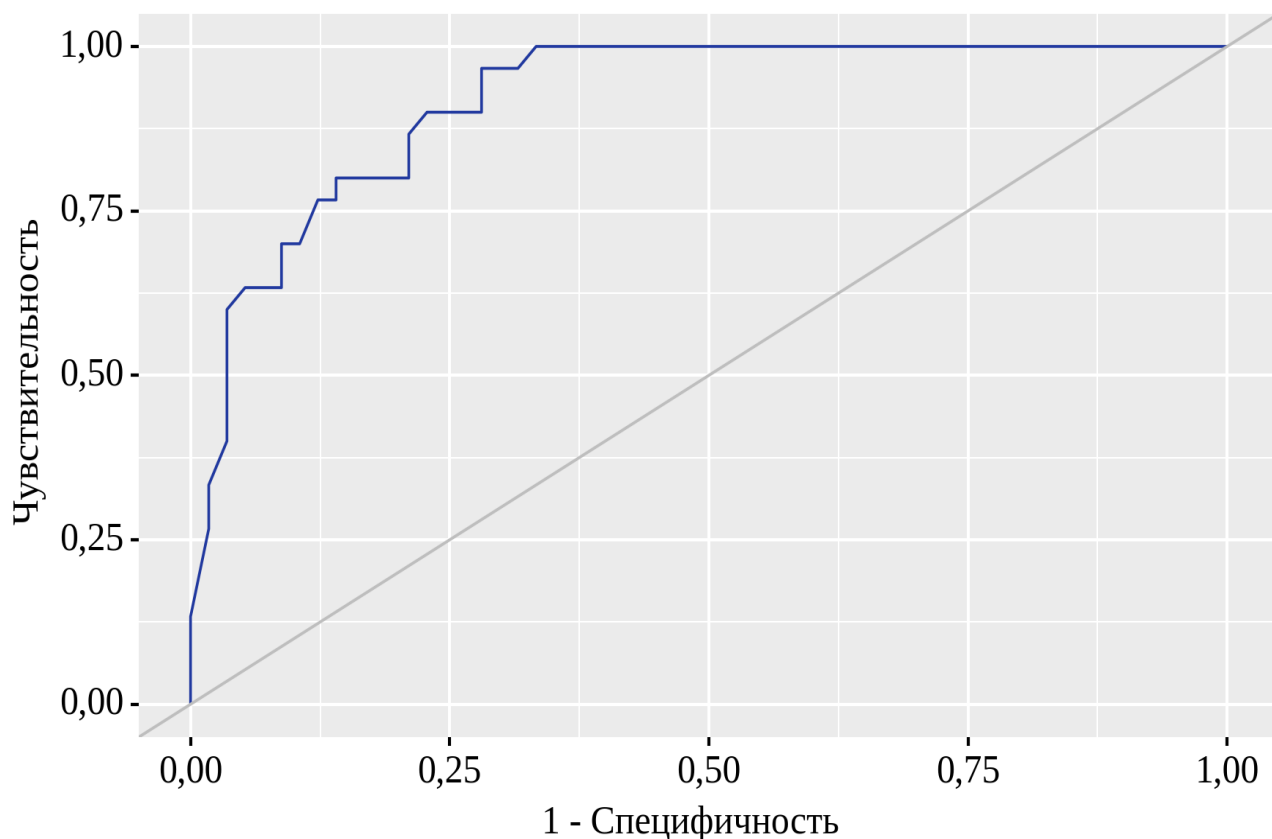


Рисунок 21 – График, демонстрирующий зависимость между вероятностью успешной имплантации и выходом логистической функции P, представленный в виде ROC-кривой

ROC-кривая дала площадь $0,918 \pm 0,036$, с 95% доверительным интервалом 0,847 - 0,989. Модель была признана статистически значимой с величиной p менее 0,001. Оптимальный порог для логистической функции P был определен как 0,356, при этом успешная имплантация прогнозировалась, когда значение логистической функции P было равно или больше этого значения. Модель продемонстрировала чувствительность и специфичность 80,0% и 80,7%, соответственно (как показано на Рисунке 22). Рассчитанные положительное и отрицательное прогностическое значения также составили 80,6% и 80,1%, соответственно.

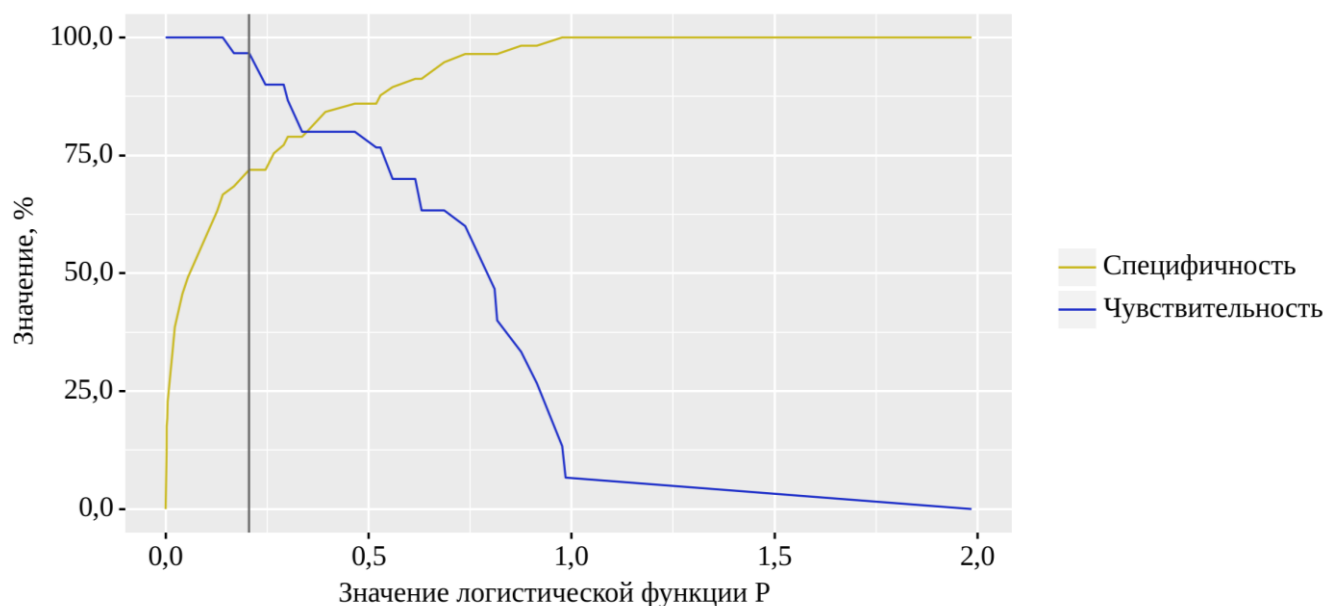


Рисунок 22 — Оценка точности и достоверности модели на основе варьирования пороговых значений в рамках логистической функции P

5.2 Математическая модель прогнозирования успешности имплантации на основании морфологических и иммуногистохимических предикторов

В результате проведенного ранее сравнительного статистического анализа результатов морфологического и ИГХ исследований в «окне имплантации» (глава 4), были выявлены прогностически значимые маркеры клинической ситуации повторных неудач имплантации: плотность пиноподий ($\mu\text{м}^{-2}$), MUC1, E α железы, E α строма, PR-AB железы, PR-AB строма (%), CD4+, CD8+, CD4+/CD8+, CD56+ (клетки).

На основании выделенных статистически значимых маркеров методом бинарной логистической регрессии была разработана математическая модель прогнозирования успешной имплантации в программе ЭКО с ПЭ. Для построения математической модели прогноза успешности имплантации методом пошагового подбора с расчетом скорректированного отношения шансов и после учета других предикторных переменных в модели было отобрано 3 маркера: MUC1, E α строма, PR-AB железы. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%, \text{ где}$$

$$z = 11,857 + 0,119X_{\text{MUC1}} - 0,484X_{\text{Ега строма}} - 0,497X_{\text{PR-AB железы}}$$

а Р – вероятность наступления успешной имплантации,

X_{MUC1} – MUC1, %,

$X_{\text{Ега строма}}$ – Ега строма, % ,

$X_{\text{PR-AB железы}}$ – PR-AB железы, %

Сгенерированная регрессионная модель оказалась высоко значимой, с р-значением менее 0,001. Кроме того, коэффициент R_2 Найджелкерка указывает на то, что модель объясняет большую часть (87,3%) оцененных маркеров, играющих роль в успехе имплантации. На основании статистического анализа было установлено, что шансы успешной имплантации при увеличении MUC1 на 1% увеличивались в 1,126 раза, а увеличении Ега строма на 1% уменьшались в 1,622 раза. При увеличении реакции PR-AB в железах на 1% шансы уменьшались в 1,644 раза. В Таблице 23 показана корреляция между факторами, используемыми для прогнозирования успешной имплантации, и вероятностью успешного исхода.

Таблица 23 — Характеристики, определяющие связь между предикторами, используемыми в модели, и вероятностью успешной имплантации

Предикторы	Нескорректированное отношение шансов (unadjusted odds ratio, COR)		Скорректированное отношение шансов (adjusted odds ratio, AOR)	
	COR; 95% ДИ	p	AOR; 95% ДИ	p
MUC1, %	1,061; 1,031 – 1,092	<0,001	1,126; 1,029 – 1,232	0,009
Ега строма, %	0,764; 0,643 – 0,908	0,002	0,617; 0,438 – 0,868	0,006
PR-AB железы%	0,727; 0,616 – 0,857	<0,001	0,608; 0,433 – 0,854	0,004

Кривая на Рисунке 23 была получена с помощью ROC-анализа, который исследовал корреляцию между вероятностью успешной имплантации и значением логистической функции P.

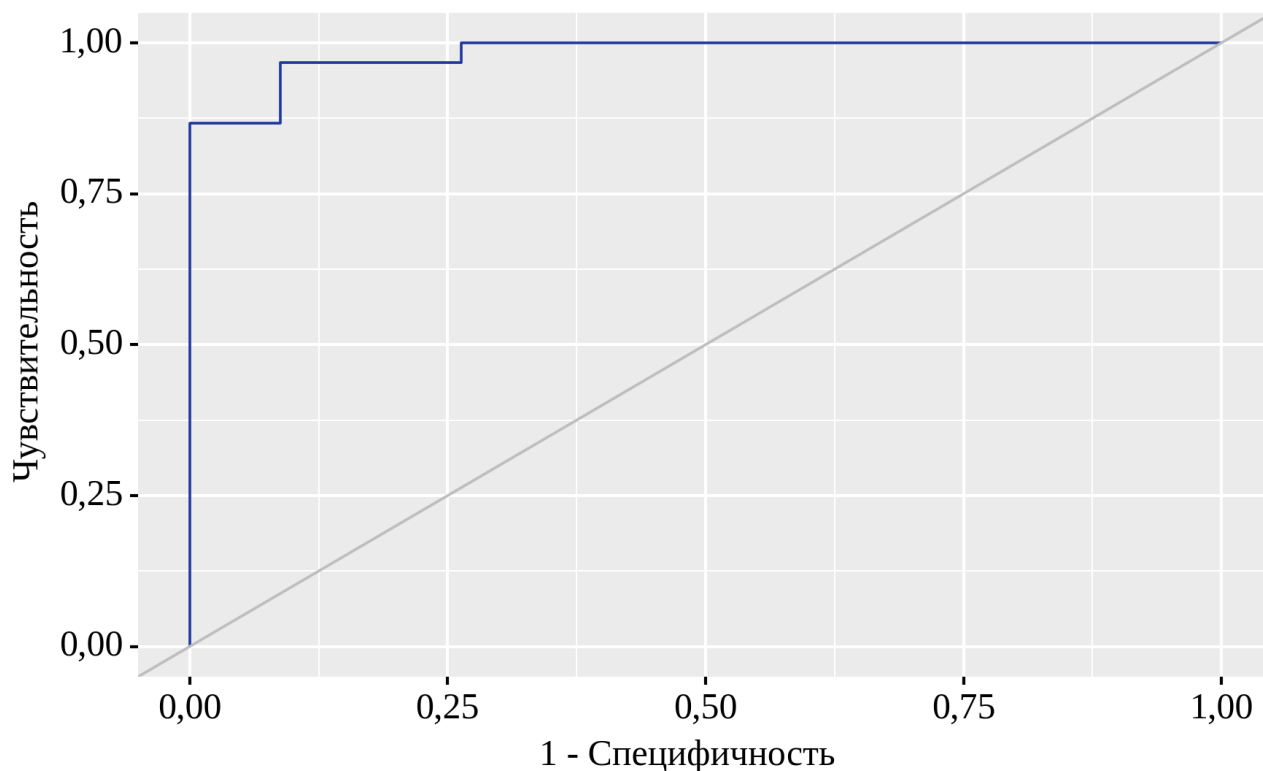


Рисунок 23 — График, демонстрирующий зависимость между вероятностью успешной имплантации и выходом логистической функции P, представленный в виде ROC-кривой

ROC-кривая показала площадь 0,982 с 95% доверительным интервалом от 0,949 до 1,000, что указывает на высоко значимую модель ($p < 0,001$). Оптимальная точка отсечения, определенная по наибольшему значению индекса Юдена, была установлена на пороге 0,339 для логистической функции P. Это значение использовалось для прогнозирования успешной имплантации с чувствительностью 96,7% и специфичностью 91,2% (как показано на Рисунке 24). Кроме того, модель имела высокую положительную прогностическую ценность 91,7% и отрицательную прогностическую ценность 96,5%.

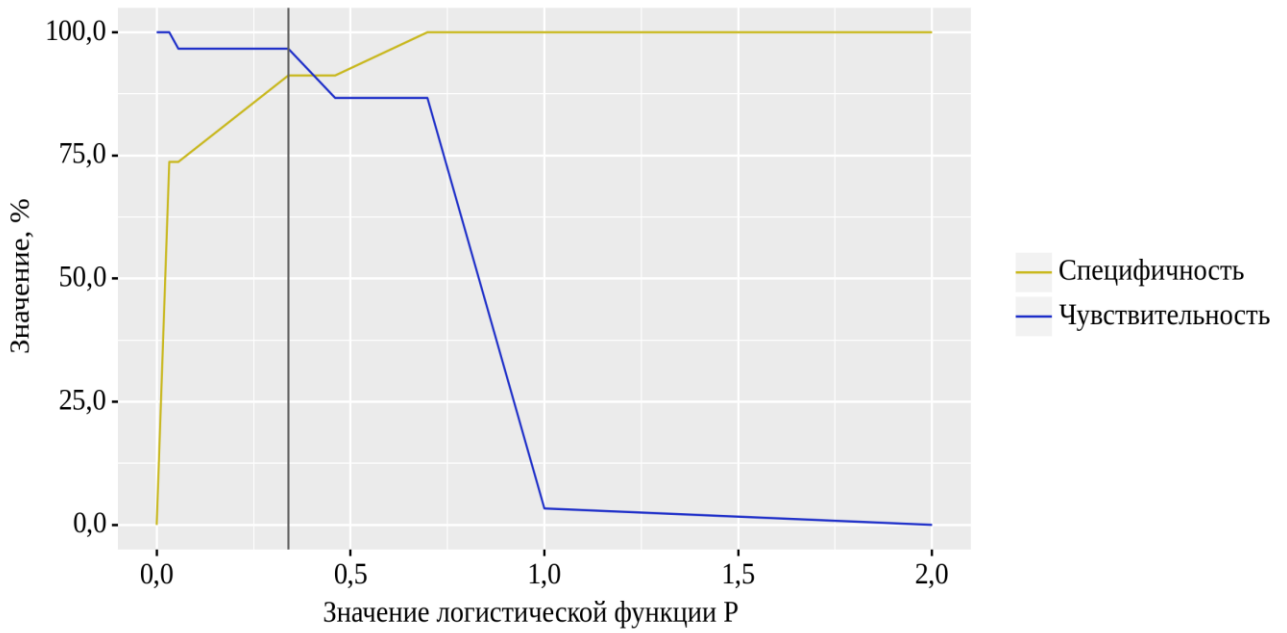


Рисунок 24 — Оценка точности модели в зависимости от порогового значения логистической функции P , с точки зрения ее способности правильно определять истинно положительные и отрицательные результаты

ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ

Основной задачей следующего этапа диссертационного исследования была оценка эффективности комплексного лечения пациенток с ПНИ. Методом рандомизации пациентки основной группы первого этапа в количестве 57 женщин были стратифицированы на две подгруппы:

— I группа (n=29), в которой в 3 циклах, предшествующих переносу эмбрионов, пациентки получали дидрогестерон 10мг х 3 раза в день с 14-го по 25-й дни цикла согласно инструкции по применению. За 3–6 циклов до переноса эмбриона с целью достижения саногенетического эффекта с последующим восстановлением рецептивности им проводили курсом внутриполостную электроимпульсную терапию.

— II (n=28), в которой в 3 циклах, предшествующих переносу эмбрионов, пациентки получали дидрогестерон 10мг х 3 раза в день с 14-го по 25-й дни цикла согласно инструкции по применению.

Все пациентки изучаемой когорты также получали прогестерон в цикле переноса (микронизированный прогестерон 200мг 1 капсула х 3 раза в день вагинально ежедневно или дидрогестерон 10мг х 3 раза в день) со дня пункции фолликула и до 12 недели беременности.

Пациенткам из группы I было рекомендовано использовать механическую контрацепцию в течение месяца, в котором проводилась физиотерапия, а также в течение двух месяцев после.

Обе группы были сопоставимы по показателям возраста, уровня антимюллерова гормона (АМГ), ИМТ, количества антральных фолликулов (КАФ), показателя м-эхо в цикле переноса, количества и качества переносимых эмбрионов ($p > 0,05$, Таблица 24).

Таблица 24 — Общие характеристики и характеристики циклов в обеих группах

	Возраст женщины (лет)	Возраст мужчины (лет)	АМГ (нг/мл)	ИМТ (кг/м ²)	КАФ
I группа (n=29)	36,977±4,793	42,31±3,59	2,3±3,2	23,7± 3,594	9,3±5,2
II группа (n=28)	38,796±3,681	43,19±6,21	2,2±4,3	24,779±4,743	10,1±4,7
p	0,115	0,944	0,443	0,336	0,729

В процессе исследования было перенесено в общей сложности 68 эмбрионов, в том числе 35 в группе комплексной терапии и 33 — в контрольной группе. В большинстве случаев (79,3% и 82%, I и II группа соответственно) в целях исключения осложнений, согласно рекомендациям [5, 13], был осуществлен перенос одного эмбриона. По одной беременности двойней наблюдались в обеих группах: в группе комплексной терапии беременность двойней завершилась самопроизвольным абортom на раннем сроке, а в группе монотерапии своевременными родами. Результаты просуммированы на Рисунке 25.

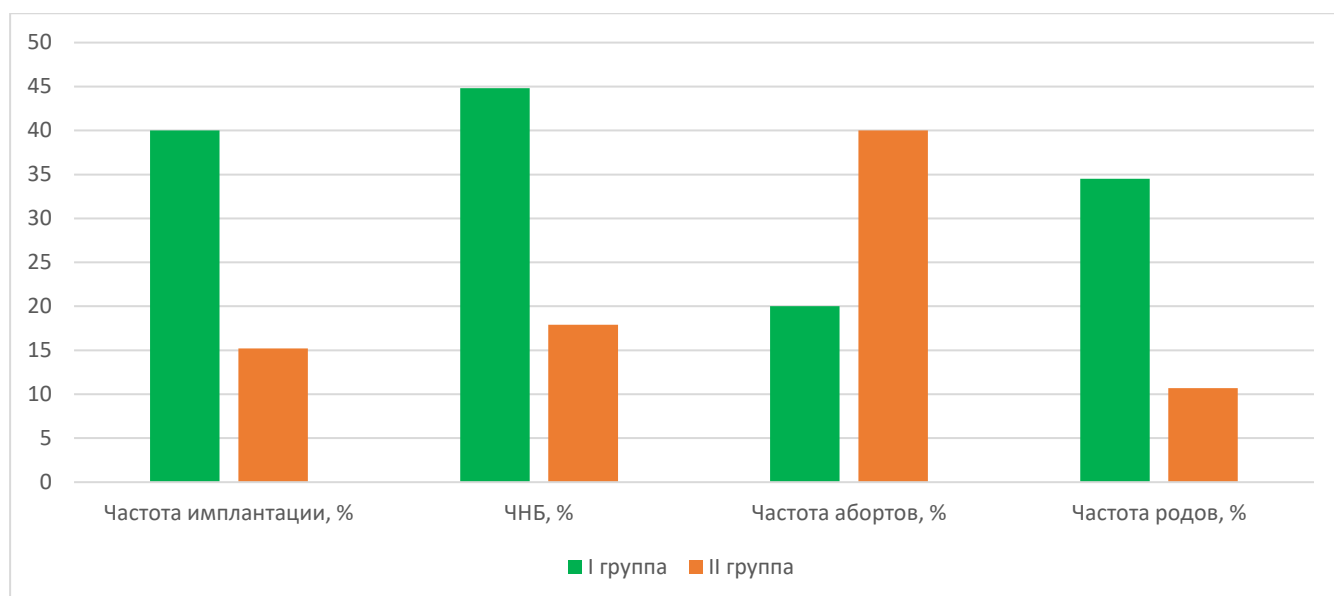


Рисунок 25 — Исходы переноса эмбрионов в изучаемой когорте пациенток

Были выявлены статистически значимые различия в исходах между двумя группами в отношении частоты имплантации и частоты наступления беременности. Показатель частоты абортс был в 2 раза выше в группе монотерапии, однако выборка была слишком маленькая для проведения статистического анализа. В группе комплексной терапии частота имплантации была выше в 2,6 раза (40% против 15,2%, $p=0,031$), частота наступления беременности (ЧНБ) выше в 2,5 раза (44,8% против 17,9%, $p=0,045$), а частота живорождения выше в 3,2 раза (34,5% против 10,7%, $p=0,056$).

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повторные неудачи имплантации — это относительно новая нозологическая единица в области вспомогательных репродуктивных технологий, которая является предметом активного изучения и дискуссии как среди клиницистов, так и исследователей. Каждая девятая пара в Европе и США страдает от нарушений имплантации, и, по различным оценкам, ПНИ возникает в 15–20% случаев переноса эмбрионов при экстракорпоральном оплодотворении [83, 104]. Таким образом, ПНИ является значимой проблемой как для медицинских работников, так и для бесплодных пар. Практикующие ВРТ специалисты вынуждены сталкиваться с довольно низким процентом успеха, усугубляя психологический стресс бесплодных пар [39, 154], не говоря уже о финансовом бремени для обеих сторон из-за повторных неуспешных циклов.

Если отбросить качество эмбрионов как критический фактор успеха имплантации, то основным объектом изучения становится эндометрий [63]. В этом случае возникает задача выяснить, какие инструменты может применить практикующий врач для оптимизации методов прогнозирования рецептивной способности эндометрия и её улучшения, и являются ли они эффективными с точки зрения достижения клинической беременности и последующего живорождения в популяции пациенток с ПНИ.

Случаи повторных неудач имплантации могут иметь определенные общие черты, которые важны для понимания патогенетических особенностей и разработки методов прогнозирования и преодоления бесплодия. Гормональная регуляция стероидами, в основном овариальными эстрогеном и прогестероном, влияет на экспрессию генов в клетках эндометрия, и баланс между рецепторами имеет фундаментальное значение для успешной децидуализации, имплантации и поддержания беременности. Изменение уровня эстрогена и прогестерона и их рецепторов во время лютеиновой фазы изменяет рецептивность эндометрия путем сложной паракринной регуляции [77]. Кроме того, эндометрий посредством рецепторов способен изменять и точно регулировать стероиды, поступающие из крови, внутриклеточно, чтобы создать оптимальную среду для своих функций.

Местная регуляция стероидов, известная как интракринология, контролируется стероидогенными ферментами, которые активируют или деактивируют эстроген и другие циркулирующие стероиды [91].

Как было подробно рассмотрено в обзоре литературы 2022 года, эндометрий обеспечивает контрольную точку имплантации, которую необходимо пройти, чтобы ограничить риск материнских инвестиций в неудачную беременность [115]. Сложное взаимодействие между стероидогенезом, локальным иммунитетом и микробиомом обеспечивает эту биосенсорную роль эндометрия. Изменение уровней стероидных гормонов, а также экспрессии рецепторов к ним в функциональном слое эндометрия и строме с течением менструального цикла приводят к значительным изменениям состава локального иммунитета, в результате чего маточные НК-клетки становятся преобладающим типом лейкоцитов в матке во время имплантации, а Т-хэлперы создают иммунотолератную среду для имплантации [172]. Клетки функционального слоя эндометрия подвергаются воспалительному стрессу, создавая прогестероноустойчивые стареющие клетки, уязвимые для разрушения (и последующей менструации). Однако сотрудничество прогестерон-зависимых децидуальных клеток и uNK-клеток позволяет преобразовать строму в децидуальный матрикс, способный к имплантации [172]. Таким образом, локальный иммунный профиль эндометрия имеет огромное количество характеристик, которые, по-видимому, нарушены у пациенток с ПНИ.

Представленные выше данные подтверждают значимость выбранной для исследования темы. Цель исследования заключалась в повышении уровня успешности ВРТ у женщин, страдающих от ПНИ при бесплодии. Для достижения этой цели в ходе исследования были изучены основные причины и потенциальные факторы риска, связанные с неудачами ВРТ. Кроме того, в ходе исследования были разработаны и оценены методы повышения эффективности преодоления бесплодия у пациенток из исследуемой группы.

7.1 Клинико-anamнестические факторы риска повторных неудач имплантации

Статистический сравнительный анализ пациенток с ПНИ ($n=57$) с группой контроля, в которую вошли пациентки успешно преодолевшие бесплодие с 1 или 2 попытки ЭКО ($n=30$), показал, что группы были сопоставимы ($p < 0,05$) по таким факторам как возраст; употребление алкоголя; трудоустройство; наличие профессиональных вредностей; регистрация брака; заболевания ССС и онкологические процессы у родственников 1 линии; экстрагенитальные болезни, за исключением болезней ЖКТ и ожирения; возраст менархе; регулярность, объем и болезненность менструаций; встречаемость ДЗМЖ; эктопии шейки матки; гиперпластических процессов эндометрия, операций кесарево сечение, родов, абортов и неразвивающихся беременностей в анамнезе, и виды используемой контрацепции. Таким образом, вышеперечисленные факторы не оказывают влияние на преодоление бесплодия у пациенток с ПНИ.

Статистическая обработка антропометрических данных продемонстрировала, что медианный ИМТ в группе пациенток с ПНИ составил $23,8 \text{ кг/м}^2$ ($Q_1 - Q_3$: от $21,4$ до $25,7 \text{ кг/м}^2$), а в группе фертильного контроля $22,3 \text{ кг/м}^2$ ($Q_1 - Q_3$: от $20,8$ до 23 кг/м^2). Таким образом, в основной группе медианный ИМТ был на $1,5 \text{ кг/м}^2$ выше в сравнении с группой контроля, а сравнительный анализ выявил, что межгрупповое различие было статистически значимо, что позволяет расценивать ИМТ как фактор риска ПНИ. Исследования, анализирующие влияние ИМТ и процента жировой ткани в организме на результаты ЭКО проводятся уже давно [52, 54, 162]. В подтверждение полученным нами данным недавний систематический обзор и мета-анализ показали, что ИМТ связан с более низкой частотой живорождения у женщин, проходящих процедуру ЭКО/ИКСИ, в том числе с более низкой частотой имплантации [26, 51]. Кроме того, в ретроспективном когортном исследовании 2018 года, в котором анализировалось 51 198 пациенток, изучалось влияние ИМТ на результаты ЭКО. Результаты показали, что избыточный вес или более высокий ИМТ ассоциируется с неудачными результатами ВРТ [53, 162]. Основным эффектом повышенного ИМТ

у женщин с избыточным весом и ожирением является повышенный уровень накопления липидов в жировых тканях и других метаболически-активных органах, что приводит к клеточной липидной токсичности, воспалению, окислительному стрессу и развитию метаболических дисфункций [153]. Избыточный вес и ожирение связаны с изменениями в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси, что приводит к нарушениям менструальной функции, овуляции и рецептивности эндометрия [167]. Ожирение — это системное и тканеспецифическое состояние, которое приводит к хроническому воспалению и окислительному стрессу, что вызывает нерегулируемый и постоянный синтез и секрецию хемокинов и цитокинов [175] клетками врожденного иммунитета и адипокинов (например, лептина и липокалина) адипоцитами [97]. Цитокины и адипокины выбрасываются в кровеносное русло, вызывая воспалительную реакцию как в яичниках, так и в эндометрии [86, 130]. Результаты, позволяющие выделить повышенный ИМТ как фактор риска ПНИ, полученные в данном диссертационном исследовании, соотносятся с научными данными последних лет.

При ретроспективной оценке историй болезни женщин изучаемой когорты на предмет табакокурения в анамнезе было установлено, что отношение шансов наступления клинической беременности при установленном факте курения в анамнезе продолжительностью более 1 года составляет 0,285 (ОШ = 0,285; 95% ДИ: 0,087 – 0,931), что позволяет расценивать данную вредную привычку как фактор риска ПНИ. Связь между курением табака и женским бесплодием в естественных циклах постоянно регистрируется в эпидемиологических исследованиях [147]. В недавно проведенном проспективном исследовании было продемонстрировано, что курение нарушает экспрессию ангиогенных и децидуальных специфических факторов в строме эндометрия, нарушая секреторную трансформацию и приводя к нарушению процессов имплантации [70]. Полученные в настоящем исследовании результаты не противоречат данным последних лет. В метаанализе 2018 года было показано, что курение среди женщин в программах ЭКО снижает частоту наступления беременности и живорождения [35]. Все вышеописанное позволяет выделить курение как фактор риска ПНИ.

Наиболее распространенными соматическими экстрагенитальными заболеваниями при ретроспективном анамнезе историй болезни у пациенток с ПНИ были болезни ЖКТ, аллергии и ожирение или избыточная масса тела (24,64, 18,18 и 14,55%, соответственно). В группе пациенток, преодолевших бесплодие с I или II попытки ЭКО, наиболее распространёнными экстрагенитальными хроническими заболеваниями оказались заболевания мочевыделительной системы, аллергии и хронический тонзиллит (29,17, 16,67 и 16,67%, соответственно). Статистически значимо чаще у пациенток с ПНИ встречались заболевания ЖКТ (ОШ = 0,320; 95% ДИ: 0,114 – 0,902). Болезни ЖКТ у 80,6% пациенток изучаемой когорты были представлены хроническим гастритом, остальные 19,4% включали в себя ДЖВП и ЖКБ. Установленная закономерность может объясняться взаимосвязью между нарушениями гепатобилиарной системы и концентрациями половых стероидных гормонов [74, 164] или повышенной распространенностью избыточной массы тела среди пациенток с ПНИ. Вышеописанное позволяет выделить заболевания ЖКТ как фактор риска развития ПНИ.

При статистической оценке количественных характеристик менструального цикла были установлены значимые различия между пациентками с ПНИ и пациентками, успешно преодолевшими бесплодие с 1 или 2 попытки. Вариабельность продолжительности менструального цикла, как и длительности менструальных выделений были повышены среди пациенток с повторными неудачами имплантации и имели тенденцию к увеличению. Данное наблюдение может свидетельствовать о субклинической асинхронности трансформации эндометрия [27]. Неоднократно в литературе было показано, что вариабельность характеристик менструального цикла может иметь предиктивное значение в контексте оценки репродуктивного потенциала [116, 149].

Сравнительный анализ встречаемости заболеваний и оперативных вмешательств в гинекологическом анамнезе пациенток изучаемой когорты выявил статистически значимые межгрупповые различия при анализе встречаемости РДВ, АМК, полипов эндометрия, миомы матки, гистологически верифицированного хронического эндометрита и ИППП.

Шансы встретить РДВ в гинекологическом анамнезе пациенток с ПНИ были выше в 3,281 раза в сравнении с анамнезом пациенток контрольной группы, различия шансов были статистически значимыми (ОШ = 0,305; 95% ДИ: 0,117 – 0,795). Исследования последних лет демонстрируют значительное снижение частоты наступления беременности после РДВ в программах ВРТ (16,7% против 38,5 и 27,9%, соответственно; $p = 0,008$), а также частоты имплантации (11,1% против 30,5% и 17,7, соответственно; $p < 0,001$) [65]. Распространено предположение, что кюретаж полости матки может оказывать пагубное влияние на стволовые клетки в базальном слое эндометрия, что приводит к потенциальному негативному воздействию на его регенерацию в будущем [65].

Согласно полученным нами данным, несмотря на успешно проведенные гистерорезектоскопии, частота имплантации все равно остается сниженной у пациенток с полипами эндометрия и миоматозными узлами в анамнезе по сравнению с женщинами, у которых этих состояний никогда не было. Было установлено, что вероятность наличия миомы матки любой локализации в анамнезе в 6,732 раза выше в группе ПНИ по сравнению с теми, кто успешно забеременел в результате 1 или 2 попыток ЭКО. Эта разница в вероятности была статистически значимой (ОШ = 0,149; 95% ДИ: 0,046 - 0,480). Кроме того, вероятность обнаружения полипов эндометрия была в 8,1 раза выше в группе ПНИ по сравнению с контрольной группой, причем разница в вероятности была статистически значимой (ОР = 0,123; 95% ДИ: от 0,034 до 0,454). Две гипотезы могут объяснить подобные результаты. Высокая распространенность внутриматочных новообразований в анамнезе когорты пациенток с ПНИ приводит к более высокой распространенности повторных внутриматочных вмешательств, которые сами по себе являются фактором риска развития хронического эндометрита, а следовательно, и сниженной рецептивности эндометрия [65]. Также подобные результаты статистического анализа можно объяснить, если рассматривать образование полипов эндометрия и субмукозных узлов матки как симптомы нарушений, лежащих на более глубоких структурных уровнях. По данным различных авторов полипы эндометрия могут возникать в результате

провоспалительных изменений клеточного состава локального иммунитета эндометрия, что приводит к значительному отклонению от нормальной физиологической воспалительной реакции, снижая характерное самоограничение функционального слоя и приводя к избыточной пролиферации [131]. У пациенток, предрасположенных к образованию миомы матки или полипов эндометрия наблюдается аномально высокая локальная выработка гликоделина в эндометрии, что может также нарушать рецептивность эндометрия даже после удаления структурных аномалий [131]. Кроме того, было установлено, что полипы эндометрия развиваются в условиях нарушенной экспрессии генов LIF, HOXA10 и HOXA11 — признанных биомаркеров рецептивности эндометрия [21, 102]. Было отмечено, что среди пациенток с идиопатическим бесплодием и полипами эндометрия в анамнезе распространенность ХЭ значительно выше по сравнению с фертильными женщинами (22,6% против 8,6%), в то время как сам ХЭ как таковой, как будет показано ниже, является фактором риска ПНИ [141]. Таким образом, наличие как полипов эндометрия, так и миомы матки в анамнезе могут рассматриваться как факторы риска ПНИ.

Абсолютно всем пациенткам и основной и контрольной группы, у которых в анамнезе присутствовал морфологически подтвержденный ХЭ, было проведено лечение, которое включало антибактериальную терапию. Однако, проведенный нами ретроспективный анализ установил, что сам факт наличия ХЭ в анамнезе, даже с учетом лечения, является значимым фактором риска развития ПНИ. Шанс наличия в прошлом диагноза хронического эндометрита был значительно выше в группе ПНИ, с 11,2-кратным увеличением по сравнению с контрольной группой. Статистический анализ выявил значительную разницу в шансах: ОШ составило 0,089, с 95% ДИ от 0,031 до 0,261. Существуют данные, демонстрирующие, что у пациенток с ПНИ, получавших антибиотики по поводу морфологически подтвержденного ХЭ, не наблюдается улучшения показателей клинической беременности [33]. Некоторые авторы предполагают, что нарушение здорового бактериального микробиома матки при слепом, кумулятивном применении антибиотиков может само по себе негативно повлиять на репродуктивные

результаты [87, 155]. Поиск идеального режима персонализированного назначения антибактериальной терапии пациенткам с морфологически верифицированным хроническим эндометритом все еще продолжается, поскольку необходимо одновременно учитывать несколько аспектов, таких как выбор препарата, его дозировку, продолжительность и время лечения, последующее восстановление нормального биоценоза эндометрия, а также метод оценки эффективности. Все это позволяет рассматривать морфологически подтвержденный хронический эндометрит в анамнезе как фактор риска ПНИ даже после проведенного лечения антимикробными препаратами.

В группе пациенток с ПНИ статистически значимо чаще встречались перенесенные в прошлом ИППП. Шансы встретить данные инфекции в анамнезе пациенток с успешной имплантацией с 1 или 2 попытки были ниже в 2,957 раза (ОШ = 0,338; 95% ДИ: 0,134 – 0,853). Инфекции, передаваемые половым путём ассоциированы с самопроизвольным абортom, хориоамнионитом, преждевременным разрывом плодных оболочек, внематочной беременностью, преждевременными родами и мертворождением [140]. В мета-анализе 2020 года, включившем 107 исследований было продемонстрировано, что хламидийная инфекция ассоциирована с повышенным риском нескольких неблагоприятных исходов, связанных с беременностью и репродукцией, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода [140]. Исследование, проведенное в 2022 году, подтверждает полученные нами данные и демонстрирует, что частота имплантации в программах ЭКО значительно ниже у пациенток с ИППП в анамнезе даже с учетом полной элиминации возбудителей в сравнении с женщинами, у которых подобных инфекций никогда не было [55]. Подобные результаты могут объясняться высокой вероятностью восходящего распространения ИППП с формированием хронического течения и развитием ХЭ, а как уже было описано выше даже после лечения хронический эндометрит остаётся фактором риска развития ПНИ.

При сравнении распространенности первичного и вторичного бесплодия в обеих группах пациенток не было установлено статистически значимых различий

($p=0,737$). При сравнении длительности бесплодия, а также количества попыток были закономерно установлены статистически значимые различия (Me: 6 лет против 4, $p < 0,001$; Me: 4 попытки против 2, $p < 0,001$). Подобные результаты объясняются критериями включения в группу ПНИ.

На основании полученных статистически значимых клинико-анамнестических факторов методом бинарной логистической регрессии была разработана математическая модель прогнозирования успешной имплантации в программе ЭКО с ПЭ, учитывающая 5 предикторов: длительность бесплодия, наличие в анамнезе АМК, миомы матки, ХЭ и ИППП (модель 1, 80% чувствительность, 80,7% специфичность). При подготовке к процедурам ЭКО и ПЭ целесообразно распределить пациенток с бесплодием маточного генеза и не имеющих структурных аномалий матки, на группы в зависимости от их индивидуального риска неудачи имплантации с помощью математической Модели 1. Это позволяет сформировать когорту для дальнейшего более детального обследования эндометрия.

Нарушение рецептивности эндометрия сложно оценить, помимо гистероскопии и морфологического исследования до сих пор не существует рутинных методов прогнозирования успешности имплантации у пациенток-кандидаток на ЭКО. Последние годы исследователи ведут активный поиск новых высоко чувствительных и точных маркеров прогнозирования ПНИ, однако доказательства для внедрения какого-либо подхода из предложенных подходов в клиническую практику довольно слабые [38, 49, 59, 168, 180].

Среди всех элементов, влияющих на неудачу имплантации эмбрионов высокого качества, иммунная система описывается исследованиями и как ключевая, и как наиболее контраверсионная [73, 132]. В большинстве существующих исследований изучался только один или несколько маркеров локального иммунитета, что имеет ограниченное значение, особенно в вопросе такого сложного процесса, как имплантация [18, 89]. В последние годы было выдвинуто предположение, что основной причиной ПНИ является иммунный дисбаланс, а репродуктивная иммунология играет ведущую роль в повторных

неудачах имплантации, однако до сих пор механизмы этих изменений остаются плохо изученными [73, 75]. Таким образом, исследование местного иммунитета эндометрия может помочь женщинам с необъяснимыми ПНИ в циклах ЭКО [105].

Исследование иммунологических нарушений как возможного звена патогенеза нарушения репродуктивной функции, безусловно, остаётся контраверсионным вопросом, а опубликованные данные остаются противоречивыми, особенно в исследованиях иммунологического профиля периферической крови, поскольку считается, что показатели распределения и созревания клеток иммунитета в значительной степени подвержены влиянию факторов внешней среды, а потому не пользуются доверием в широком научном сообществе [111, 117]. В связи с этим последние годы проводимые исследования иммунологического аспекта бесплодия в большей степени сосредоточены на составе лейкоцитарных популяций и экспрессии цитокинов непосредственно в эндометрии. Никто не спорит с тем, что иммунная система, и, в особенности, маточные естественные клетки-киллеры и связанные с ними цитокины, играют ключевую роль в процессе имплантации [174]. Однако в настоящее время полное описание лейкоцитов в эндометрии, или полный иммунофенотип матки, не определен. Несмотря на попытки, до сих пор не существует общепринятой методики комплексной оценки присутствующих клеточных популяций [159] или консенсуса относительно их интерпретации.

Ткань эндометрия в течение многих лет подвергалась различным гистологическим и иммуногистохимическим исследованиям, и действительно, многое известно о происходящих изменениях в развитии и присутствующих иммунных популяциях [104, 105]. Еще в 1996 году исследователи на малой выборке продемонстрировали, что у пациенток с привычным невынашиванием в биоптате эндометрия может быть изменено соотношение CD4 и CD8 положительных Т-клеток, теми же авторами было продемонстрировано пагубное присутствие В-лимфоцитов и негативное влияние на течение беременности увеличения экспрессии CD56- естественных клеток-киллеров в эндометрии [100]. Совсем недавно в небольшой когорте пациенток с ПНИ или привычным выкидышем были

отмечены различия в экспрессии генов, ответственных за локальный иммунитет [113], а отклонения в соотношении цитокинов, в частности, мРНК IL-15/Fn-14, а также мРНК IL-18/TWEAK, позволили выдвинуть предложение о "чрезмерной активации", а также «недостаточной активации» диалога иммунных клеток, что потенциально может объяснить основу проблемы в некоторых случаях ПНИ [105]. В целом, вариации в популяции NK-клеток, экспрессия вариантов Т- и В-лимфоцитов были предложены в качестве причин снижения имплантационного потенциала [69].

В связи с вышеописанным одной из ключевых задач диссертационного исследования был поиск морфологических и иммуногистохимических маркеров нарушений иммунологического профиля в эндометрии у пациенток с бесплодием маточного генеза в отсутствие структурных аномалий и ПНИ. У всех 57 пациенток, включенных в проспективный этап исследования, была проведена ИГХ оценка биоптатов, полученных путем пайпель-биопсии эндометрия, на 8-10-й (в среднюю стадию фазы пролиферации) и на 7-й день после пика ЛГ («окно имплантации», в среднюю стадию фазы секреции) в сравнении с группой морфологического контроля. Оценка иммунологического профиля в фазу пролиферации включала изучение экспрессии маркеров CD4+, CD8+, CD20+, CD56+ и CD138+ в строме эндометрия.

7.2 Роль факторов местного иммунитета в фазе пролиферации в патогенезе повторных неудач имплантации

Эндометриальные гранулоциты (большие гранулярные лимфоциты) относятся к особой популяции естественных NK-киллеров. По сравнению с типичными естественными киллерами эндометриальные гранулоциты отличаются высокой экспрессией CD56 (адгезивная молекула, участвующая в реакции цитотоксичности) при отсутствии других маркеров NK-клеток, а именно CD16 и CD57.

Популяция лейкоцитов эндометрия состоит в основном из маточных естественных клеток-киллеров (uNK), макрофагов и Т-клеток и заметно отличается от таковой в периферической крови [186]. Количество CD56+ клеток изменяется в

течение менструального цикла, с резким увеличением в середине секреторной фазы, начинающейся через 6-7 дней после всплеска ЛГ, что является началом предполагаемого времени имплантации [185].

Приблизительно 10% НК-клеток стромы эндометрия являются CD56+CD16+, которые похожи, но не идентичны периферическим НК-клеткам, в то время как 90% популяции имеют различные фенотипы CD56 и CD16 [185, 186]. Субпопуляции маточных НК-клеток можно подразделить на два класса, которые отличаются маркерами, а также функциональными свойствами: цитотоксический класс CD56+CD16+ и проангиогенный класс CD56+CD16- [42, 125, 169]. Данные, полученные в нашем исследовании, продемонстрировали статистически значимое повышение маркера CD56+, что свидетельствует о повышении плотности цитотоксической субпопуляции НК-клеток, а также позволяет косвенно предположить снижение плотности проангиогенной субпопуляции в строме эндометрия пациенток с ПНИ.

На сегодняшний день выделено множество Т-лимфоцитарных субпопуляций лейкоцитов, имеющих различную экспрессию антигенов и функциональную активность. Особенный интерес с позиции имплантационного потенциала представляют Foxp3+ регуляторные Т клетки, которые являются уникальным представителем супрессивных CD4+ Т-хелперов, участвующих в реализации иммунной толерантности к собственным и чужеродным антигенам у людей и мышей [69, 169, 186]. Было показано, что во время имплантации и беременности происходит увеличение числа регуляторных Т-клеток периферической крови как у людей [126, 157], так и у мышей [22], а дальнейшие исследования выявили, что стимуляция плода алло-антигенами является основной движущей силой в увеличении числа регуляторных Т-клеток [146]. Повышение уровня регуляторных Т-клеток в день переноса эмбрионов было связано с более высокой частотой имплантации [134]. Данные, полученные в нашем исследовании, продемонстрировали относительное статистически значимое снижение экспрессии CD4+клеток в строме пациенток с ПНИ, что позволяет предположить снижение иммуносупрессивной активности Т-регуляторных клеток в эндометрии.

Повышенная экспрессия CD8+клеток предполагает повышение концентрации цитотоксических Т-лимфоцитов, что является следствием недостаточной супрессивной активности регуляторных Т-хелперов в строме эндометрия пациенток с ПНИ. В-лимфоциты (CD20+) в неизменном эндометрии единичные (обычно 1-3 клетки), а в случаях развития хронического воспаления в эндометрии в зависимости от степени выраженности воспалительного процесса число CD20+ клеток может увеличиваться. В нашем исследовании у пациенток с ПНИ с наличием слабо выраженного хронического эндометрита число CD20+ клеток увеличивалось до 6. Одновременно в эндометрии у этих же пациенток с ПНИ были диагностированы единичные CD138+ (1-2 плазматические клетки), что позволяет предположить, что хроническая инфекция в эндометрии не является ведущей причиной наблюдаемых изменений в экспрессии иммунных клеток.

Таким образом, в основе патогенеза имплантационной несостоятельности пациенток с ПНИ в фазу пролиферации лежит иммунологический дисбаланс в строме эндометрия, субстратом которого является недостаточная концентрация проангиогенных НК-клеток, регуляторных супрессивных Т-хелперов, а также повышение плотности цитотоксического класса НК- и Т-клеток, что свидетельствует о нарушенном иммунном балансе еще на стадии пролиферации у пациенток с ПНИ.

7.3 Роль факторов местного иммунитета в фазе секреции и «окне имплантации» в патогенезе повторных неудач имплантации

Следующим этапом исследования было изучение изменений местного иммунитета у пациенток с ПНИ в «окне имплантации». В средней лютеиновой фазе маточные натуральные киллеры (uNK) становятся доминирующими лимфоцитами, составляя >30% клеток в строме эндометрия, их количество увеличивается на всех стадиях лютеиновой фазы [117]. Как описывалось выше, CD56+uNK-клетки являются частью врожденной иммунной системы и отличаются от своих периферических аналогов НК-клеток, проявляя пониженную цитотоксичность и демонстрируя высокую экспрессию поверхностного маркера CD56 и низкую экспрессию CD16, однако при активации они способны вызывать клеточный

апоптоз в клетках-мишенях [98]. В условиях высоких концентраций прогестерона количество CD56+CD16- uNK-клеток увеличивается и их роль в секреторной фазе заключается в ремоделировании сосудов эндометрия, ангиогенезе и модуляции фето-материнского взаимодействия [158]. Отмеченное в исследовании повышение экспрессии CD56+клеток свидетельствует о вероятном смещении экспрессии uNK-клеток в сторону их цитотоксических форм CD16+. Крайне важным результатом исследования эндометрия «окна имплантации» является также подтверждение сохранения выявленного в пролиферативной фазе нарушения в местном иммунитете у пациенток с ПНИ в сторону увеличения числа CD8+клеток Т-супрессоров, и снижения числа CD4+клеток Т-хелперов, ответственных за реализацию иммунной толерантности к собственным и чужеродным антигенам [158]. Дисбаланс между Т-лимфоцитами в пользу CD8+клеток и увеличение числа CD56+NK, зафиксированные как в период «окна имплантации», так и в средней стадии фазы пролиферации, могут быть расценены как ведущие иммунологические звенья в патогенезе развития ПНИ. Они в совокупности формируют два ключевых звена — снижение иммунологической толерантности к полуаллогенной бластоцисте, а также нарушение процессов нормального ангиогенеза в строме эндометрия женщин с повторными неудачами имплантации.

Нарушения иммунитета и сохраняющаяся воспалительная инфильтрация со смещением баланса лимфоцитов в сторону цитотоксических форм, как в пролиферативной фазе, так и в секреторной может быть объяснено нарушением секреторной трансформации и изменением экспрессии рецепторов к половым стероидным гормонам, что нарушает архитектуру и морфологию рецепторного эндометрия, снижая ангиогенез и приводя к снижению имплантационного потенциала. Данная гипотеза была подтверждена в исследовании обнаруженной aberrантной экспрессией рецепторов к эстрогену и прогестерону в строме и функциональном слое эндометрия в среднюю фазу секреции у пациенток с ПНИ в сравнении с контрольной группой. Суммарным следствием данных нарушений является снижение экспрессии маркера адгезии MUC1 на апикальной поверхности эндометрия, сопровождающее количественное снижение числа пиноподий,

местами вплоть до полного их отсутствия у пациенток с ПНИ в сравнении с морфологическим контролем. Это можно объяснить тем, что в эндометрии пациенток с ПНИ пиноподии не достигают состояния полного созревания. По этой же причине была отмечена более высокая плотность пиноподий у пациенток с ПНИ.

Исследования неоднократно демонстрировали, что трансмембранный муцин MUC1 и MUC16 являются двумя основными муцинами, присутствующими на поверхности эпителиальных клеток эндометрия, однако их функция в репродуктивном процессе еще не до конца выяснена [80]. Способность эмбриона прикрепляться к поверхности эндометрия, по-видимому, связана с тонким балансом между адгезивными и антиадгезивными свойствами поверхностного гликокаликса — богатого муциновыми белками поверхностного слоя эндометрия, который может действовать как естественный барьер для прикрепления эмбриона [58, 68, 119]. Исследования *in vivo* на трансгенной мышшиной модели показали, что потеря MUC1 в местах имплантации коррелирует с прикреплением эмбриона, однако у людей экспрессия MUC1 высока во время перимплантации, что указывает на его возможную роль в этом процессе [31, 58]. По данным исследований последних лет экспрессия MUC1 в эндометрии infertильных пациенток значительно отличается от фертильного контроля [120]. Это позволяет предположить, что MUC1 у человека может способствовать первоначальному распознаванию и адгезии между MUC1 и эмбрионом, что впоследствии может способствовать успешной имплантации [120]. Вышеописанное позволяет расценивать MUC1 как надежный высокоинформативный маркер имплантационного потенциала эндометрия.

Таким образом, патогенез нарушений рецептивности у пациенток с ПНИ можно объяснить нарушением локального иммунологического баланса в эндометрии, опосредованного изменением экспрессии рецепторов половых стероидных гормонов. Субстратом нарушения локального иммунитета является низкая экспрессия проангиогенных НК-клеток, регуляторных супрессивных Т-хелперов, а также повышение плотности цитотоксического класса НК- и Т-клеток,

что формирует снижение иммунологической толерантности к полуаллогенной бластоцисте.

Полученные данные подтверждают зависимости между экспрессией изучаемых маркеров и процессом имплантации бластоцисты. Это позволило сформулировать и схематически отобразить механизм неудач ВРТ у пациенток с ПНИ в отсутствие структурных аномалий матки (Рисунок 26).

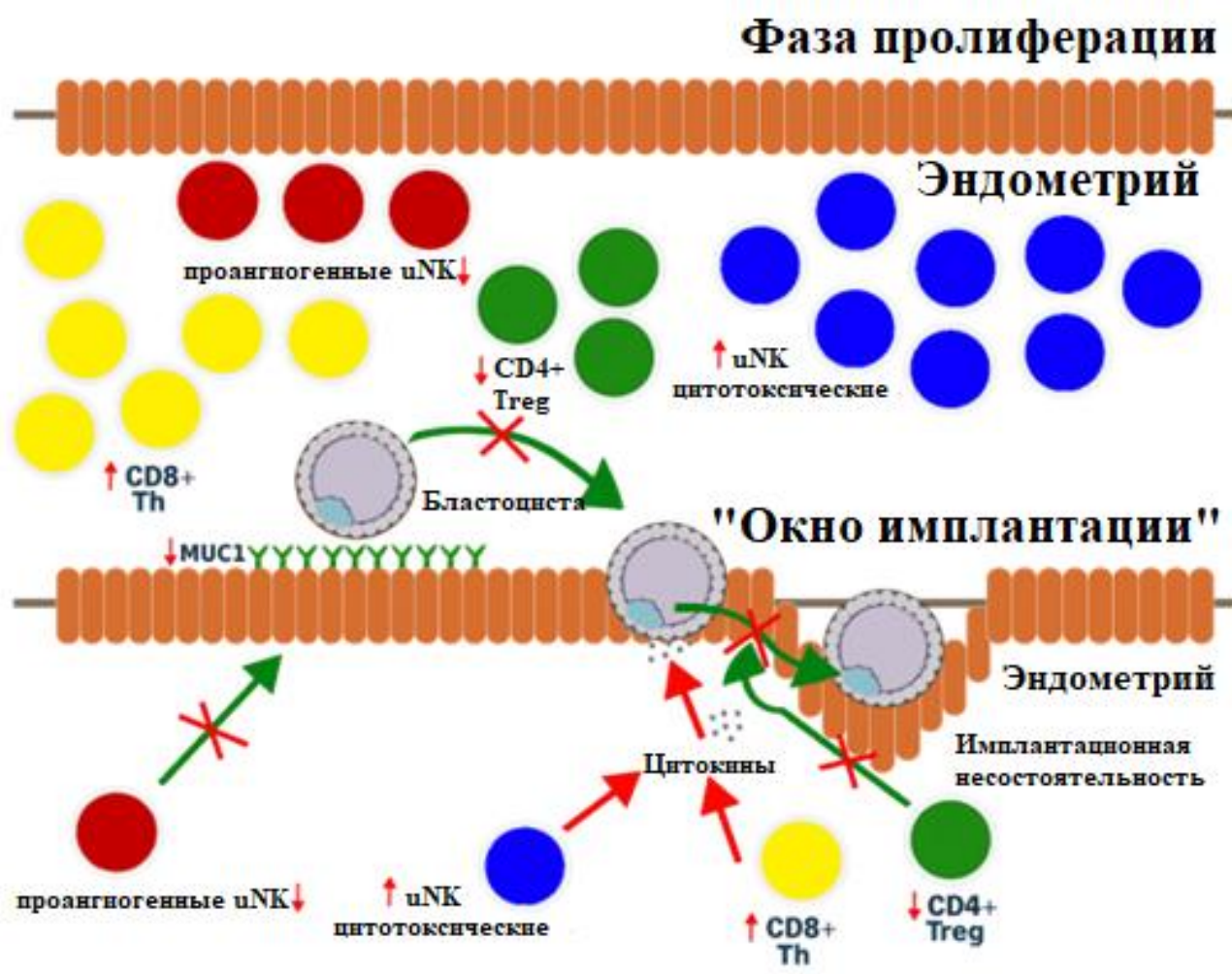


Рисунок 26 – Патогенез ПНИ в отсутствие структурных аномалий матки

На основании выделенных статистически значимых ИГХ маркеров в «окне имплантации» методом бинарной логистической регрессии была разработана математическая модель прогнозирования успешной имплантации в программе ЭКО с ПЭ, учитывающая 3 предиктора: MUC1, Е α строма, PR-АВ железы (модель

2, 96,7% чувствительность, 91,2% специфичность). При высоком риске неудачи имплантации, рассчитанном на основании математической модели 1, пациентке необходимо углубленное обследование с оценкой морфофункционального состояния эндометрия в «окне имплантации» и прогнозирование риска неудачи имплантации на основании предложенной математической модели 2.

7.4 Эффективность комплексной терапии

Вышеописанные результаты позволяют предположить, что вместо иммуносупрессивных терапевтических средств, которые рекомендуются во многих случаях иммунных нарушений и не показали себя эффективными в случаях ПНИ [133], более полезным может оказаться применение неспецифических стимулирующих методов, таких как физиотерапевтическое саногенетическое воздействие. Персонализированное активизирующее лечение различными методами, в том числе физическими, уже демонстрировало успех в улучшении клинической частоты наступления беременности у пациенток с эндометриальным фактором бесплодия [2, 10, 12, 14, 16, 17, 19, 56, 61, 62, 79, 114, 150, 171].

Перспективным методом физического воздействия является внутривлагалищная электроимпульсная терапия при абдоминально-вагинальном расположении электродов, выполняемая с использованием многофункционального терапевтического инструмента с вагинальным и брюшным электродами. С помощью термотерапии и электроимпульсной стимуляции воздействие стимулирует кровообращение в полости малого таза, а следовательно и повысить метаболизм и реорганизовать локальную иммунную функцию [81, 90, 108, 182, 183]. Таким образом, ускоряя восстановление и регенерацию поврежденных клеток, изменяя метаболизм цитотоксических продуктов локального иммунитета и регенерацию соединительных тканей электроимпульсная терапия способна влиять на селективность и рецептивность эндометрия в фазе секреции. Сообщалось, что электроимпульсная физиотерапия полезна для пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ) [81, 90, 108, 182, 183]. Однако влияние физиотерапии на рецептивность эндометрия оценивали лишь в нескольких исследованиях [90].

В нашем исследовании были выявлены статистически значимые различия в исходах между двумя группами в отношении исходов ВРТ. Комплексное лечение, включающее циклическую гормональную терапию и воздействие синусоидальными модулированными токами повысило эффективность в сравнении с традиционной терапией: в 2,6 раза (40% против 15,2%, $p=0,031$) увеличило частоту имплантации, в 2,5 раза (44,8% против 17,9%, $p=0,045$) частоту наступления клинической беременности, и в 3,2 раза (34,5% против 10,7%, $p=0,056$) частоту живорождения.

Таким образом, может быть предложен новый алгоритм ведения пациенток, страдающих бесплодием маточного генеза и повторными неудачами имплантации в отсутствие структурных аномалий, позволяющая значительно улучшить исходы в данной когорте пациенток.

Проведенное диссертационное исследование позволило разработать алгоритм преодоления повторных неудач имплантации, представленный на Рисунке 27.

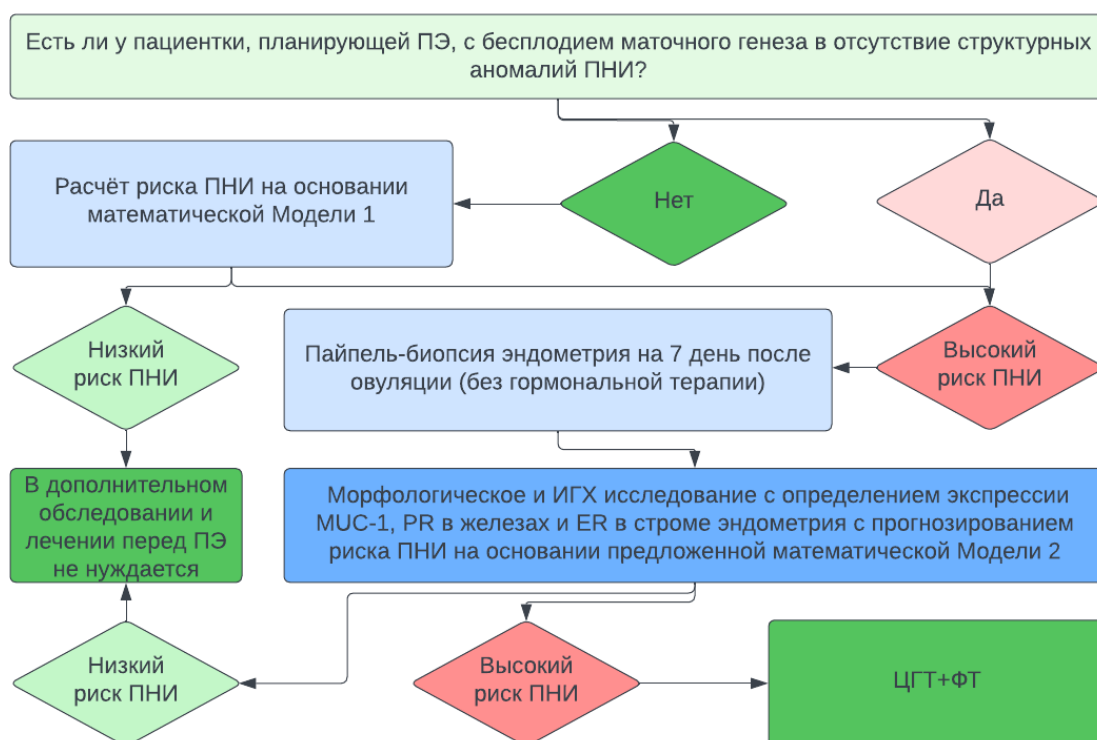


Рисунок 27 – Алгоритм преодоления повторных неудач имплантации в отсутствие структурных аномалий матки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В программах ВРТ большинству женщин так и не удается забеременеть после переноса эмбрионов. При отсутствии органических структурных аномалий и исключении эмбрионального фактора ПНИ остаются загадкой в повседневной практике врачей акушеров-гинекологов из-за сложностей в поиске, классификации и преодолении этиологических факторов. Структурные изменения эндометрия, такие как его недостаточный рост или снижение васкуляризации вполне объясняют эндометриальный фактор маточного бесплодия, в то время как идиопатические неудачи имплантации, ассоциированные с аномальным перекрестным взаимодействием между эмбрионом и эндометрием, остаются главным вопросом и требуют выяснения.

В результате диссертационного исследования были установлены клиничко-анамнестические, морфологические и иммуногистохимические предикторы ПНИ у пациенток с маточным генезом бесплодия. Существенно расширены и углублены представления об этиологии и преимущественной роли локальной иммунологической дисрегуляции в патогенезе данных нарушений. Основная причина неудачного исхода ВРТ у лиц, страдающих ПНИ и не имеющих каких-либо структурных проблем матки, была определена как иммунологическая.

В результате морфологического и иммуногистохимического исследования биоптатов эндометрия в средней фазе пролиферации и в период «окна имплантации» установлены морфофункциональные закономерности локального иммуногенеза у пациенток с бесплодием маточного генеза и повторными неудачами имплантации. Расширены представления о вкладе иммунологических детерминантах патогенеза повторных неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного генеза в отсутствие структурных аномалий матки в имплантационную несостоятельность эндометрия.

Был разработан новый алгоритм ведения пациенток, страдающих бесплодием маточного происхождения и повторными неудачами имплантации, использование которых позволяет повысить ($p < 0,05$) частоту имплантации в 2,6

раза ($p=0,031$), наступления клинической беременности в 2,5 раза ($p=0,045$) и живорождения – в 3,2 раза ($p=0,056$).

В результате диссертационного исследования были сформулированы следующие выводы:

1. Клинико-anamнестическими факторами риска повторных неудач имплантации у пациенток с бесплодием маточного генеза являются: хронический эндометрит (ОШ = 11,2; 95% ДИ: 3,8 – 32,2), полипэктомия (ОШ = 8,1; 95% ДИ: 2,2 – 29,4), миомэктомия (ОШ = 6,7; 95% ДИ: 2,0 – 21,7) в анамнезе; ожирение или избыточная масса тела (ОШ = 5,4; 95% ДИ: 1,1 – 25,6); курение (ОШ = 3,5; 95% ДИ: 1,0 – 11,4), отдельные диагностические выскабливания (ОШ = 3,2; 95% ДИ: 1,2 – 8,5) и болезни системы пищеварения (ОШ = 3,1; 95% ДИ: 1,1– 8,7) в анамнезе.

2. Достоверные отличия состояния локального иммунитета эндометрия в фазе пролиферации у пациенток изучаемой когорты формируют: увеличение экспрессии маркеров цитотоксических маточных натуральных киллеров [9 клеток ($Q_1 - Q_3$: 7 – 15) против 5 ($Q_1 - Q_3$: 3 – 8), $p<0,001$], снижение экспрессии регуляторных Т-хелперов [2 клетки ($Q_1 - Q_3$: 2 – 6) против 4 ($Q_1 - Q_3$: 2 – 6), $p=0,038$], а также нарушение соотношения экспрессии CD4+ к CD8+ [0,162 ($Q_1 - Q_3$: 0,143 – 0,188) против 0,387 ($Q_1 - Q_3$: 0,375 – 0,4), $p<0,001$] и повышение экспрессии В-лимфоцитов [2 клетки ($Q_1 - Q_3$: 1 – 2) против 1 ($Q_1 - Q_3$: 1 – 2), $p=0,017$].

3. В сравнении с фертильными женщинами для пациенток изучаемой когорты в период «окна имплантации» характерны более высокая экспрессия в эндометрии маркеров клеток натуральных маточных киллеров [11 клеток ($Q_1 - Q_3$: 9 – 16) против 5 ($Q_1 - Q_3$: 3 – 10), $p <0,001$], более низкая экспрессия маркеров супрессивных Т-хелперов [4 клетки ($Q_1 - Q_3$: 3 – 7) против 6,5 ($Q_1 - Q_3$: 4 – 9), $p=0,036$], повышение экспрессии цитотоксических Т-клеток [16 клеток в поле зрения ($Q_1 - Q_3$: 10 – 39) против 9 ($Q_1 - Q_3$: 3,25 – 14,75), $p=0,002$] и снижение соотношения экспрессии маркеров супрессивных Т-хелперов к маркерам цитотоксических Т-лимфоцитов [0,250 ($Q_1 - Q_3$: 0,175 – 0,400) против 0,655 ($Q_1 - Q_3$: 0,560 – 0,969), $p <0,001$]. Снижение рецептивности эндометрия, выражающееся

в значимо более низкой экспрессии маркеров адгезии [24,031% ($Q_1 - Q_3$: 18,943 – 39,017) против 48,349% ($Q_1 - Q_3$: 42,601 – 65,514), $p < 0,001$] и более высокой плотности пиноподий [$0,031 \mu\text{m}^{-2}$ ($Q_1 - Q_3$: 0,028 – 0,034) против $0,022 \mu\text{m}^{-2}$ ($Q_1 - Q_3$: 0,0181– 0,027) ($p < 0,001$)] подтверждает нарушения иммунного гомеостаза в период «окна имплантации».

4. Математическая модель, разработанная на основании клинико-анамнестических предикторов, позволяет стратифицировать пациенток с бесплодием маточного происхождения, имеющих показания к ЭКО и ПЭ, по степени риска повторных неудач имплантации с чувствительностью 80,0% и специфичностью 80,7% (Модель 1). Разработанная на основании иммуногистохимических предикторов математическая модель позволяет повысить эффективность прогнозирования персонального риска повторных неудач имплантации у этих пациенток с чувствительностью 96,7% и специфичностью 91,2% (Модель 2).

5. Комплексное лечение, включающее циклическую гормональную терапию и воздействие синусоидальными модулированными токами, значимо повышает эффективность преодоления бесплодия в сравнении с традиционной терапией: частота успешной имплантации среди получивших комплексное лечение выше в 2,6 раза (40,0% против 15,2%, $p=0,031$), частота наступления клинической беременности — в 2,5 раза (44,8% против 17,9%, $p=0,045$), частота живорождения — в 3,2 раза (34,5% против 10,7%, $p=0,056$).

Как результат диссертационного исследования были сформулированы **практические рекомендации:**

На основании результатов диссертационного исследования были сформулированы практические рекомендации:

1. На этапе планирования ЭКО и ПЭ целесообразно стратифицировать пациенток с бесплодием маточного происхождения (при отсутствии структурных аномалий матки) на группы риска с помощью предложенной математической Модели 1 прогнозирования персонального риска повторных неудач имплантации.

2. При низком риске повторных неудач имплантации пациентка не нуждается в дополнительном обследовании перед началом программы ВРТ.

3. При высоком риске будущей повторной неудачи имплантации пациентке необходимо углублённое обследование с оценкой морфофункционального состояния эндометрия в период «окна имплантации» и дополнительное прогнозирование риска повторной неудачи имплантации на основании предложенной математической Модели 2.

4. При высоком персональном риске повторных неудач имплантации улучшение репродуктивных исходов (наступление беременности и живорождение) у пациенток с маточным генезом бесплодия в отсутствие структурных аномалий матки может быть достигнуто комплексным лечением, включающим циклическую гормонотерапию и воздействие электроимпульсными токами.

Перспективами дальнейшей разработки темы могут быть исследования, посвященные углубленному изучению состояния локального иммунитета эндометрия пациенток с идиопатическими повторными неудачами имплантации на больших выборках с широким спектром изучаемых маркеров. Особый интерес могут представлять исследования экспрессии молекулярно-биологических маркеров локальных иммунологических нарушений с использованием метода проточной цитометрии при имплантационной несостоятельности эндометрия с целью поиска высоко чувствительных, простых и экономически рентабельных методов прогнозирования успеха имплантации, а также оценка различных саногенетических методов повышения рецептивности и селективности эндометрия у пациенток изучаемой когорты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а-ГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- АМГ – антимюллеров гормон
- ант-ГнРГ – антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- АФС – антифосфолипидный синдром
- ВВИГ - внутривенное введение иммуноглобулина
- ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ГЭ – гиперплазия эндометрия
- ДИ – доверительный интервал
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИГХ – иммуногистохимия
- ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
- ИЛ-18 – интерлейкин-18
- ИМТ – индекс массы тела
- ИППП – инфекции, передаваемые половым путем
- КАФ – количество антральных фолликулов
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- МКПК - мононуклеарных клеток периферической крови
- МЦ – менструальный цикл
- ОР - отношение риска
- ОШ – отношение шансов
- ПНИ – повторные неудачи имплантации
- ПЭ – перенос эмбрионов
- рХГ – рекомбинантный хорионический гонадотропин
- СД – сахарный диабет
- ТБ – трубное бесплодие
- ТВП – трансвагинальная пункция
- УЗИ – ультразвуковое исследование

- ФНО – фактор некроза опухоли
- ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
- ХЭ – хронический эндометрит
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
- BCL6 – белок 6 В-клеточной лимфомы (B-cell lymphoma 6)
- CCL5 - хемокиновый лиганд 5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5)
- CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
- CDC – центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention)
- EGF - эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor)
- ER – рецепторы к эстрогену
- ERA - анализ рецептивности эндометрия (Endometrial receptivity analysis)
- ESHRE – Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology)
- FIGO – международная федерация акушеров-гинекологов
- hCG-LH – рецептор - рецептор лютеинизирующего гормона/хорионического гонадотропина
- hDP 200 – human decidua-associated protein 200)
- HGF - фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte growth factor)
- HOXA10 – гомеобоксный белок A10 (Homeobox A10)
- IGF1 - инсулиноподобный фактор роста 1 (Insulin-like growth factor 1)
- IL-15 – интерлейкин-15 (Interleukin-15)
- LIF – лейкемия-ингибирующий фактор (Leukemia inhibitory factor)
- MUC1 – муцин-1
- NK – естественные/натуральные киллеры (Natural Killer)
- PDGF - тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor)
- PR – рецепторы к прогестерону
- PRP – богатая тромбоцитами плазма (Platelet-rich plasma)
- SPP - сфингозин-1-фосфатаза (Sphingosine-1-phosphate)
- TGF- β – трансформирующий ростовой фактор бета (Transforming growth factor beta)

TNF – фактор некроза опухоли

uNK – маточные естественные/натуральные киллеры (Uterine Natural Killer)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor)

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева, К.У. Оптимизация подготовки эндометрия в программе ЭКО и ПЭ у пациенток с нарушениями маточной гемодинамики: дис. канд. мед. наук: 14.00.01. – М., 2009. – 156 с.
2. Волкова, Е. Ю. Прегравидарная подготовка женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием: дис. канд. мед. наук: 14.01.01. – М., 2014. – 145 с.
3. Деряева, А. Г. Репродуктивное здоровье женского населения в Российской Федерации (обзор) / А. Г. Деряева, В. П. Косолапов, Г. В. Сыч // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2019. – № 75. – С. 38-47.
4. Значение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Е. В. Кулакова, Ю. С. Драпкина, Н. П. Макарова [и соавт.] // Профилактическая медицина. – 2022. – Т. 25. – № 2. – С. 7-12.
5. Клинические рекомендации – Женское бесплодие – 2021-2022-2023 (По состоянию на 16.01.2022 на сайте МЗ РФ).
6. Корсак, В. С. Регистр ВРТ Российской Ассоциации Репродукции Человека. Отчет за 2019 год / В. С. Корсак, А. А. Смирнова, О. В. Шурыгина // Санкт-Петербург: Российская Ассоциация Репродукции Человека. – 2021. – 54 с.
7. Логинов, Д. М. Традиционные и новые паттерны демографического поведения современной городской молодёжи / Д. М. Логинов. // Народонаселение. — 2021. — № Т. 24. — № 2. — С. 165-178.
8. Макаренцева, А. О. Динамика вступления в материнство в современной России / А. О. Макаренцева // Мир России. Социология. Этнология. – 2022. – Т. 31. – № 1. – С. 162–182.
9. Мартынов, С.А. Возможности электротерапии в подготовке пациенток с хроническим эндометритом к программам ВРТ: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01 / Мартынов Сергей Александрович. – М., 2005. – 24 с.

10. Петров, Ю. А. Современные аспекты лечения хронического эндометрита / Ю. А. Петров // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11–3. – С. 563–565.
11. Пономаренко, Г. Н. Физиотерапия в репродуктивной гинекологии / Г. Н. Пономаренко, Е. С. Силантьева, Е. Ф. Кондрина. — СПб. : ИИЦ ВМА, 2008. — 118 с.
12. Прегравидарная подготовка пациенток с хроническим эндометритом и ее эффективность / Н. И. Фадеева, О. А. Скоропадская, И. М. Левченко [и соавт.] // *Мать и дитя в Кузбассе*. – 2017. – № 1. – С. 24-28.
13. Протокол лечения «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации». МЗ РФ 21 февраля 2019 года № 15-4/466-07
14. Силантьева, Е. С. Физические методы структурно-функционального ремоделирования эндометрия у женщин с нарушением репродуктивной функции: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.01 / Силантьева Елена Суликовна. – М., 2008. – 261с.
15. Социокультурная детерминация позднего деторождения и меры семейно-демографической политики в области рождаемости (на материалах Республики Мордовия) / Л. И. Савинов, Т. В. Соловьева, Д. А. Бистяйкина, А. С. Карасева. // *Женщина в российском обществе*. — 2020. — № 1. — С. 101-112.
16. Физические факторы в восстановительном лечении больных хроническим эндометритом, ассоциированным с бесплодием / Цаллагова Л.В., Золоева И.А., Майсурадзе Л. [и соавт.] // *Медицинские новости Грузии*. – 2022. – Т. 322. – № 1. – С. 100-105.
17. Шишканова, О. Л. Оптимизация тактики лечения хронического эндометрита у пациенток с нарушением репродуктивной функции с использованием импульсной электротерапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.01 / Шишканова Оксана Леонидовна. – М., 2008. – 25с.
18. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and

recurrent miscarriage / J. Huang, H. Qin, Y. Yang [et al.] // *Reproduction*. – 2017. – Vol. 153. – P. 749-758.

19. Acupuncture in improving endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / Y. Zhong, F. Zeng, W. Liu [et al.] // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. – 2019. – Vol.19. – №1. – P.61.

20. Administration of prednisolone and low molecular weight heparin in patients with repeated implantation failures: a cohort study / C. Siristatidis, K. Dafopoulos, W. El-Khayat [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. – 2018. – Vol. 34, № 2. – P. 136-139.

21. Al Chami, A. Endometrial Polyps and Subfertility / A. Al Chami, E. Saridogan. // *J Obstet Gynaecol India*. – 2017 Feb. – 67(1). – P. 9-14.

22. Aluvihare, V. R. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus / V. R. Aluvihare, M. Kallikourdis, A. G. Betz. // *Nat Immunol*. – 2004 Mar. — 5(3). – P. 266-271.

23. Are uterine natural killer and plasma cells in infertility patients associated with endometriosis, repeated implantation failure, or recurrent pregnancy loss? / N. Freitag, S.J. Pour, T.N. Fehm [et al.] // *Arch Gynecol Obstet*. – 2020. – Vol. 302, №6. – P.1487-1494.

24. ART implantation failure and miscarriage in patients with elevated intracellular cytokine ratios: response to immune support therapy / C. Harrity, L. Shkrobot, D. Walsh, K. Marron // *Fertility Research and Practice*. – 2018. – Vol. 4. – P. 7.

25. Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. – Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services. – 2018.

26. Association Between MitoScore, BMI, and Body Fat Percentage as a Predictive Marker for the Outcome of In-Vitro Fertilization (IVF) / H. Arora, I. Collazo, J. Eisermann [et al.]. – Text : electronic // *Cureus*. — 2022. — 14(7). — P. e27367.

27. Associations between drinking water disinfection byproducts and menstrual cycle characteristics: A cross-sectional study among women attending an infertility clinic

/ Y.L. Deng, Q. Luo, X.Q. Yuan [et al.] – Text : electronic // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2022. – Vol. 241. – P. 113931.

28. Ballester, B. The role of mucin 1 in respiratory diseases / B. Ballester, J. Milara, J. Cortijo. – Text : electronic // Eur Respir Rev. — 2021 Feb 2. — 30(159). — P. 200149.

29. Bashiri, A. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions / A. Bashiri, K. I. Halper, R. Orvieto. // Reproductive Biology and Endocrinology.- 2018.- 16(1).- P. 121.

30. Changes in the T-helper 1 and 2 cell populations during pregnancy in tacrolimus-treated women with repeated implantation failure and recurrent pregnancy loss / M. Hisano, K. Nakagawa, J. Kwak-Kim [et al.] // Human Fertility (Cambridge). – 2021. – P. 1-8.

31. Characterization of Epigenetic and Molecular Factors in Endometrium of Females with Infertility / G. Skliutė, R. Baušytė, D. Ramašauskaitė, R. Navakauskienė – Text : electronic// Biomedicines. – 2022. – Vol. 10, № 6. – P. 1324.

32. Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure / K. Kitaya, Y. Nagai, W. Arai [et al.] – Text : electronic // Mediators of Inflammation. – 2019. – Vol. 2019. – P. 4893437.

33. The effectiveness of intrauterine antibiotic infusion versus oral antibiotic therapy in the treatment of chronic endometritis in patients during IVF (in vitro fertilization) procedures / M. Lunčan, A. Huniadi, E. Bimbo-Szuhai [et al.] – Text : electronic // BMC Women's Health. – 2022. – Vol.22. – No.1. – P.529.

34. Chu, K.Y. Consideration of gender differences in infertility evaluation / K.Y. Chu, P. Patel, R. Ramasamy // Current Opinion in Urology. – 2019. – Vol. 29. – № 3. – P.267-271.

35. Cigarette smoking impairs clinical outcomes of assisted reproductive technologies: A meta-analysis of the literature / M. C. Budani, S. Fensore, M. Di Marzio, G. M. Tiboni // Reproductive Toxicology. – 2018. – Vol. 80. – P. 49-59.

36. Clinical validation of pinopode as a marker of endometrial receptivity: A randomized controlled trial / Z. Qiong, H. Jie, W. Yonggang [et al.]. – Text : electronic // *Fertility and Sterility*. – 2017. – Vol.108. – P.513–517.e2.
37. Comparing the Impact of Autologous Platelet-rich Plasma and Granulocyte Colony Stimulating Factor on Pregnancy Outcome in Patients with Repeated Implantation Failure / M. Mehrafza, R. Kabodmehri, Z. Nikpouri [et al.] // *Journal of Reproduction and Infertility*. – 2019. – Vol.20. – №1. – P.35-41.
38. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis / L. Craciunas, I. Gallos, J. Chu [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Vol. 25, № 2. – P.202-223.
39. Psychosocial correlates of fertility-related quality of life among infertile women with repeated implantation failure: The mediating role of resilience / Y. Ni, L. Huang, E. Zhang [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Psychiatry*. – 2022. – Vol.13. – P.1019922.
40. Cumulative delivery rate per aspiration IVF/ICSI cycle in POSEIDON patients: a real-world evidence study of 9073 patients / S.C. Esteves, H. Yarali, L.N. Vuong [et al.] // *Human Reproduction*. – 2021. – Vol. 36. – №8. – P.2157-2169.
41. Current possibilities of diagnostics and treatment of immunological causes of female infertility / K. Malíčková, Z. Amrusová, S. Belvončíková [et al.] // *Casopis Lékaru Českých*. – 2021. – Vol.160. – №1. – P.5-13.
42. Decidualization-derived cAMP regulates phenotypic and functional conversion of decidual NK cells from CD56dimCD16- NK cells / X. Jin, L. Cui, W. Zhao [et al.] // *Cellular and Molecular Immunology*. – 2021. – Vol. 18. – P. 1596-1598.
43. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists / D. Cimadomo, L. Craciunas, N. Vermeulen [et al.] // *Human Reproduction*. – 2021. – Vol. 36. – № 2. – P.305-317.
44. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure / G. Sacks, Y. Yang, E. Gowen [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2012. – Vol. 67, № 5. – P. 434-442.

45. Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure / S. Moustafa, S.L. Young. – Text : electronic // *F1000 Research*. – 2020. – Vol.9. – P.F1000 Faculty Rev-208.
46. Diaz-Nuñez, M. Recurrent Miscarriage and Implantation Failure of Unknown Cause Studied by a Panel of Thrombophilia Conditions: Increased Frequency of FXIII Val34Leu Polymorphism / M. Diaz-Nuñez, A. Rabanal, A. Expósito [et al.] // *Journal of Reproduction and Infertility*. – 2019. – Vol. 20. – № 2. – P.76-82.
47. Ding, X. Strategies to Identify Genetic Variants Causing Infertility / X. Ding, J.C. Schimenti // *Trends in Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 8. – P.792-806.
48. Does stress affect IVF outcomes? A prospective study of physiological and psychological stress in women undergoing IVF / N. Miller, E.H. Herzberger, Y. Pasternak [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2019. – Vol.39. – №1. – P.93-101.
49. Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? / R. Bassil, R. Casper, N. Samara, [et al.]. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.- 2018.- 35(7).- P. 1301-1305.
50. Early steps of embryo implantation are regulated by exchange of extracellular vesicles between the embryo and the endometrium / J. Szuszkiewicz, K. Myszczyński, Z.P. Reliszko [et al.]. – Text : electronic // *FASEB Journal*. – 2022. – Vol. 36, № 8. – P. e22450.
51. The influence of male and female overweight/obesity on IVF outcomes: a cohort study based on registration in Western China / X. Liu, S. Shi, J. Sun [et al.] // *Reproductive Health*. – 2023. – Vol.20. – No.1. – P.3.
52. Effect of body mass index on pregnancy outcomes in a freeze-all policy: an analysis of 22,043 first autologous frozen-thawed embryo transfer cycles in China / J. Zhang, H. Liu, X. Mao [et al.] // *BMC Medicine*. – 2019. – Vol. 17. – P. 114.
53. Effect of body weight on early hormone levels in singleton pregnancies resulting in delivery after in vitro fertilization / R.B. Mejia, T.W. Cox, E.B. Nguyen [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2018. – Vol. 110. – P.1311-1317.

54. Effect of body weight on metabolic hormones and fatty acid metabolism in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization: a pilot study / L. Bou Nemer, H. Shi, B.R. Carr [et al.] // *Reproductive Sciences*. – 2019. – Vol. 26. – P.404-411.
55. Effect of previous Chlamydia Trachomatis infection on the outcomes of ivf/icsi treatment: a retrospective study / Zhang D, Wang Z, Hu X [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2022. – Vol.22. – № 1. – P.305.
56. Effectiveness of electroacupuncture for thin endometrium in infertile women: study protocol for a single-blind, randomized controlled trial / F. Li, H. Lu, X. Wang [et al.] // *Trials*. – 2021. – Vol.22. – №1. – P.73.
57. Effects of combined acupuncture and intracavitary short-wave physiotherapy on endometrial receptivity in IVF-ET / S. Zhengao, L. Fang, Z. Jianwei [et al.] // *The Journal of Reproductive Medicine*. – 2012. – Vol.21. – P.447–450.
58. Effects of endocrine-disrupting chemicals on endometrial receptivity and embryo implantation: a systematic review of 34 mouse model studies / D. Caserta, F. Costanzi, M. P. De Marco [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*.- 2021.- 18(13).- P. 6840.
59. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: a retrospective, two-centers study / T. Hashimoto, M. Koizumi, M. Doshida [et al.] // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 16. – P. 290–296.
60. Efficacy of therapies and interventions for repeated embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis / A. Busnelli, E. Somigliana, F. Cirillo [et al.] // *Scientific Reports*.- 2021.- 11(1).- P. 1747.
61. Electroacupuncture facilitates implantation by enhancing endometrial angiogenesis in a rat model of ovarian hyperstimulation / W. Chen, J. Chen, M. Xu [et al.] // *Biology of Reproduction*.- 2019.- 100(1).- P. 268-280.
62. Electroacupuncture Improves Pregnancy Outcomes in Rats with Thin Endometrium by Promoting the Expression of Pinopode-Related Molecules / J. Xi, J. Cheng, C.C. Jin [et al.]. – Text : electronic // *BioMed Research International*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6658321.

63. Endometrial factors in the implantation failure spectrum: protocol of a Multidisciplinary observational cohort study in women with Repeated Implantation failure and recurrent Miscarriage (MURIM Study) / L. Stevens Brentjens, D. Habets, J. Den Hartog [et al.] // *BMJ Open*. – 2022. – Vol. 12, № 6. – P. e056714.
64. Endometrial scratching in women with one failed IVF/ICSI cycle-outcomes of a randomised controlled trial (SCRaTCH) / N.E. van Hoogenhuijze, F. Mol, J.S.E. Laven, E.R. Groenewoud [et al.] // *Human Reproduction*. – 2021. – Vol. 36. – № 1. – P. 87-98.
65. Endometrial thickness following early miscarriage in IVF patients - is there a preferred management approach? / G. Karavani, H. Alexandroni, D. Sheinin, U.P. Dior [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2021. – Vol. 19. – P. 93.
66. Epigenetic control of embryo-uterine crosstalk at peri-implantation / S. Kong, C. Zhou, H. Bao [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – Vol. 76. – P. 4813-4828.
67. European Society of Human Reproduction and Embryology: ART fact sheet, January 2022.
68. Evaluation of Muc1 Gene Expression at The Time of Implantation in Diabetic Rat Models Treated with Insulin, Metformin and Pioglitazone in The Normal Cycle and Ovulation Induction Cycle / R. Zarei, P. Nikpour, B. Rashidi [et al.] // *International Journal of Fertility and Sterility*. – 2020. – Vol. 14. – № 3. – P. 218-222.
69. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure / Y. Li, S. Yu, C. Huang [et al.]. – Text : electronic // *Fertility and Sterility*. – 2020. – Vol.113. – №1. – P.187-196.e1.
70. Exposure to cigarette smoke affects endometrial maturation including angiogenesis and decidualization / N. Kida, A. Nishigaki, M. Kakita-Kobayashi [et al.] // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2021. – Vol. 20. – P. 108-118.
71. Fauser, B.C. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes / B.C. Fauser // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2019. – Vol. 38, № 2. – P.133-137.

72. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis / N. Sermondade, S. Huberlant, V. Bourhis-Lefebvre [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Vol. 25, № 4. – P. 439-451.
73. Franasiak, J.M. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos / J.M. Franasiak, R.T. Scott // *Fertility and Sterility*. – 2017. – Vol. 107. – №6. – P.1279-1283.
74. Fröhlich, E. Insight into Potential Interactions of Thyroid Hormones, Sex Hormones and Their Stimulating Hormones in the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / E. Fröhlich, R. Wahl // *Metabolites*. – 2022. – Vol. 12. – №8. – P.718.
75. Garcia-Velasco, J.A. Introduction: Immunology and assisted reproductive technology in the 21st century / J.A. Garcia-Velasco // *Fertil Steril*. – 2017. – Vol. 107. – №6. – P.1267-1268.
76. Kim, J. Non-invasive evaluation of embryo quality for the selection of transferable embryos in human in vitro fertilization-embryo transfer / J. Kim, J. Lee, JH. Jun // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. – 2022. – Vol.49. – No.4. – Pp.225-238.
77. Guo, B. Regulatory mechanism of embryo implantation / B. Guo // *Sheng Li Xue Bao*. – 2020. – Vol. 72. – P. 105-114.
78. Hernández-Vargas, P. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes / P. Hernández-Vargas, M. Muñoz, F. Domínguez // *Human Reproduction Update*. – 2020. – Vol. 26. – P. 264-301.
79. High-frequency electroacupuncture improves endometrial receptivity via regulating cell adhesion molecules and leukemia inhibitory factor / signal transducer and activator of transcription signaling pathway / F. You, X. Du, T. Zhang [et al.] // *Bioengineered*. – 2021. – Vol. 12. – № 2. – P. 10470-10479.
80. Highly glycosylated MUC1 mediates high affinity L-selectin binding at the human endometrial surface / L.W. Francis, S.N. Yao, L.C. Powell [et al.] // *J Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19. – №1. – P.50.

81. Hong, X. Clinical study of combined VLH-D pelvic therapeutic and traditional Chinese medicine enema treatment on chronic pelvic inflammatory disease / X. Hong // *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*. – 2006. – Vol. 15. – P. 1158.
82. Horner, P. J. What Can Serology Tell Us About the Burden of Infertility in Women Caused by Chlamydia? / P.J. Horner, G.E. Anyalechi, W.M. Geisler – Text : electronic // *Journal of Infectious Disease*. – 2021. – Vol. 224 (12 Suppl 2) – P. S80-S85.
83. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence / A. Busnelli, M. Reschini, L. Cardellicchio [et al.]. – Text : electronic // *Reproductive BioMedicine Online*.- 2020.- 40(1).- P. 91-97.
84. Immediate versus delayed frozen embryo transfer in women following a failed IVF-ET attempt: a multicenter randomized controlled trial / J.Y. Song, F.Y. Dong, L. Li [et al.]. – Text : electronic // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 131.
85. Immune checkpoints and reproductive immunology: Pioneers in the future therapy of infertility related disorders? / L. Mohamed Khosroshahi, F. Parhizkar, S. Kachalaki, [et al.]. – Text : electronic // *International Immunopharmacology*. – 2021. – Vol.99. – Pp.107935.
86. Impact of body mass index (BMI) on the success rate of fresh embryo transfer in women undergoing first in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) treatment / H. Chen, J. Li, S. Cai [et al.] // *International Journal of Obesity (London)*. – 2022. – 46(1). – P. 202-210.
87. Impact of chronic endometritis in infertility: a SWOT analysis / J.J. Espinós, F. Fabregues, J. Fontes [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2021. – Vol. 42. – №5. – P.939-951.
88. Increased expression of angiogenic cytokines in CD56+ uterine natural killer cells from women with recurrent miscarriage / X. Chen, Y. Liu, W.C. Cheung [et al.] // *Cytokine*. – 2018. – Vol. 110. – 272-276.
89. Increased levels of CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5+ CD4+ T cells, and associated factors Bcl-6, CXCR5, IL-21 and IL-6 contribute to repeated implantation

failure. / Q. Gong, Y. Zhu, N. Pang [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2017. – Vol. 14, №6. – P.5931-5941.

90. Intracavitary physiotherapy is not inferior to endometrial scratching in patients with recurrent implantation failure / Q. Zhang, B. Zhang, J. Yan [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2014. – Vol. 291. – №1. – P.173–177.

91. Intracrine regulation of estrogen and other sex steroid levels in endometrium and non-gynecological tissues; pathology, psychiatry, and drug discovery / G. Konings, L. Brentjens, B. Delvoux [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 940.

92. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by HCG improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study / N. Yu, B. Zhang, M. Xu [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 76. – P. 212-216.

93. Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure / S. Li, J. Wang, Y. Cheng, D. Zhou, T. Yin, W. Xu [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2017. – Vol.119. – P.15–22.

94. Intrauterine CRH-treated PBMC in repeated implantation failure / A. Makrigiannakis, T. Vrekoussis, F. Makrygiannakis, H. Ruso, SN. Kalantaridou, T. Gurgan. – Text : electronic // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol.49. – P.e13084.

95. Intravenous immunoglobulin treatment for repeated IVF/ICSI failure and unexplained infertility: a systematic review and a meta-analysis / J. Li, Y. Chen, C. Liu [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2013. – Vol.70. – №6. – P.434-447.

96. 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, Y. Ben Kraiem, L. Placais, et al. // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Warsaw). – 2019. – Vol. 67. – P. 225-236.

97. Kuroda, M. Adipocyte death and chronic inflammation in obesity / M. Kuroda, H. Sakaue // *Journal of Medical Investigation*. – 2017. – Vol. 64. – P. 193-196.

98. Kwak-Kim, J. Clinical implication of natural killer cells and reproduction / J. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2008. – Vol. 59. – P. 388-400.

99. Kwak-Kim, J. Introduction of the special issue, "Clinical reproductive immunology" / J. Kwak-Kim, N. Sung, W. Saab, A. Fukui – Text : electronic // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2021. – Vol. 85. – P. e13415.

100. Lachapelle, M. H. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome / M. H. Lachapelle, P. Miron, R. Hemmings, D. C. Roy // *Journal of Immunology*. – 1996. – Vol 156. – P 4027-4034.

101. Lambalk, C. B. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type / C. B. Lambalk, F. R. Banga, J. A. Huirne [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2017. – Vol 23. – P 560-579.

102. Large, Non-Cavity Distorting Intramural Leiomyomas Decrease Leukemia Inhibitory Factor in the Secretory Phase Endometrium / B. Pier, C. Crellin, A. Katre [et al.] // *Reproductive Sciences*. – 2020. – Vol.27. – №2. – P.569-574.

103. Lawson, S. Pelvic Floor Physical Therapy and Women's Health Promotion / S. Lawson, A. Sacks // *Journal of Midwifery & Women's Health*. – 2018. – Vol 63. – P 410-417.

104. Lédée N. The uterine immune profile: A method for individualizing the management of women who have failed to implant an embryo after IVF/ICSI / N. Lédée, M. Petitbarat, L. Prat-Ellenberg [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2020. – Vol 142. – P.103207.

105. Lédée, N. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization / N. Lédée, M.

Petitbarat, L. Chevrier [et al.] // American Journal of Reproductive Immunology. – 2016. – Vol 75. – P 388-401.

106. Lee, J. W. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups / J. W. Lee, O. H. Kwon, T. K Kim [et al.] // Arch Plast Surg. – 2013. – Vol 40. – P 530-535.

107. Li, J. The effect of G-CSF on infertile women undergoing IVF treatment: a meta-analysis / J. Li, S. Mo, Y. Chen // Systems Biology in Reproductive Medicine. – 2017. – Vol.63. – №4. – P.239–247.

108. Liping, X. Pelvic inflammatory disease therapeutic apparatus for the observation and nursing of chronic pelvic inflammatory disease / X. Liping // Journal of Minimally Invasive Medicine. – 2013. – Vol.8. – P.119–121.

109. Localization of Mucin 1 in endometrial luminal epithelium and its expression in women with reproductive failure during implantation window / F. Wu, D. Mao, Y [et al.] // Journal of Molecular Histology. – 2019. – Vol. 50. – № 6. – P. 563-572.

110. Logistic regression analyses of factors affecting the euploidy of blastocysts undergoing in vitro fertilization and preimplantation genetic testing / Z. Zhang, L. Zhang, Y. Wang [et al.]. – Text : electronic // Medicine (Baltimore). – 2022. – Vol.101. – №26. – P.e29774.

111. Maecker, H. T., Standardizing immunophenotyping for the human immunology project / H.T. Maecker, J.P. McCoy, R. Nussenblatt // Nature Reviews Immunology. – 2012. – Vol.12. – №3. – P.191–200.

112. Main actors behind the endometrial receptivity and successful implantation / L. Governini, F.P. Luongo, A. Haxhiu, [et al.] – Text : electronic // Tissue Cell. – 2021. – Vol. 73. – P. 101656.

113. Marron, K. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations / K. Marron, D. Walsh, C. Harrity // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2019. – Vol.36. – №2. – P.199-210.

114. Massage therapy improves in vitro fertilization outcome in patients undergoing blastocyst transfer in a cryo-cycle / J. Okhowat, M. Murtinger, M. Schuff [et al.] // Alternative Therapies in Health and Medicine. – 2015. – Vol.21. – №2. – P.16-22.

115. Maternal selection of human embryos in early gestation: insights from recurrent miscarriage / J. J. Brosens, P. R. Bennett, V. M. Abrahams [et al.] // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – 131. – P. 14-24.

116. Menstrual cycle length and modern living: a review / L. R. Campbell, A. L. Scalise, B. T. DiBenedictis, S. Mahalingaiah. // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. – 2021. – 28(6). – P. 566-573.

117. Moffett, A. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction / A. Moffett, N. Shreeve // *Human Reproduction*. – 2015. – Vol.30. – №7. – P.1519-1525.

118. Mol, B. W. Unexplained Infertility / B.W. Mol, R.J. Hart // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2020. – Vol.38. – №1. – P.1-2.

119. Morphological features of the secretory phase endometrium in women with unexplained infertility / Ö. Karaođlan, Y. Kuyucu, İ.F. Ürünsak, D. Gümürdülü [et al.] // *Ultrastructural Pathology*. – 2021. – Vol. 45. – P. 243-256.

120. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS endometriosis / L. Margarit, A. Taylor, H. Roberts [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2010. – Vol.95. – P. 5320–5339.

121. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients / N.A. Hey, T.C. Li, P.L. Devine [et al.] // *Human Reproduction*. – 1995. – Vol. 10. – P. 2655–2662.

122. MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers / W. Chen, Z. Zhang, S. Zhang [et al.]. – Text : electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – 22(12). – P. 65-67.

123. Munro, M. G. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions / M. G. Munro, HOD. Critchley, I. S. Fraser [et al.] // *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. – 2018. – Vol.143. – №3. – P.393-408.

124. Nik Hazlina, N. H. Worldwide prevalence, risk factors and psychological impact of infertility among women: a systematic review and meta-analysis / N.H. Nik

Hazlina, M.N. Norhayati, I. Shaiful Bahari [et al.]. – Text : electronic // *BMJ Open*. – 2022. – Vol.12. – №3. – P.e057132.

125. NK cells that differ in expression of Nkp46 might play different roles in endometrium / C. Mai, A. Fukui, R. Takeyama [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2021. – Vol.147. – Pp.103367.

126. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset / D.A. Somerset, Y. Zheng, M.D. Kilby [et al.] // *Immunology*. – 2004. – Vol. 112, № 1. – P. 38-43.

127. Obstetric and perinatal outcome of the women with repeated implantation failures or recurrent pregnancy losses who received pre- and post-conception tacrolimus treatment / K. Nakagawa, J. Kwak-Kim, M. Hisano [et al.]. – Text : electronic // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2019. – Vol.82. – №2. – P.e13142.

128. Ojosnegros, S. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques / S. Ojosnegros, A. Seriola, AL. Godeau, A. Veiga // *Human Reproduction Update*. – 2021. – Vol.27. – №3. – P.501-530.

129. Orvieto, R. A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures--a case report / R. Orvieto, M. Brengauz, B. Feldman // *Gynecological Endocrinology*. – 2015. – Vol.31. – №6. – P.435-437.

130. Overweight and obesity significantly reduce pregnancy, implantation, and live birth rates in women undergoing In Vitro Fertilization procedures / J. García-Ferreyra, J. Carpio, M. Zambrano [et al.] // *JBRA Assist Reprod*. – 2021. – Vol. 25. – №3. – P.394-402.

131. Ozyurt, R. Endometrial polyps prevent embryo implantation via creatine and lactate pathways / R. Ozyurt, N. Turktekin // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2022. – Vol.26. – №9. – P.3278-3281.

132. Pathare, A. D. S. Downregulation of genes related to immune and inflammatory response in IVF implantation failure cases under controlled ovarian stimulation / A.D.S. Pathare, K. Zaveri, I. Hinduja. – Text : electronic // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2017. – Vol.78. – №1. – P. 10.1111/aji.12679.

133. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles / C. M. Boomsma, M. S. Kamath, S. D. Keay, N. S. Macklon. – Text : electronic // The Cochrane Database of Systematic Reviews.- 2022.- 6(6).- CD005996.

134. Periodic elevation of regulatory T cells on the day of embryo transfer is associated with better in vitro fertilization outcome / W.J. Wang, F.J. Liu, X. Zhang [et al.] // Journal of Reproductive Immunology. – 2017. – Vol. 119. – P. 49-53.

135. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles / X.Y. Jin, L.J. Zhao, D.H. Luo [et al.] // Human Reproduction. – 2017. – Vol. 32. – P. 2394-2403.

136. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- β 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss / B. Xu, X. Sun, L. Li [et al.] // Fertility and Sterility. – 2012. – Vol. 98. – P. 389-395.

137. Pirtea, P. Recurrent Implantation Failure-Is It the Egg or the Chicken? / P. Pirtea, D. de Ziegler, J.M. Ayoubi // Life (Basel). – 2021. – Vol.12. – №1. – P.39.

138. Platelet aggregates-induced human CD34⁺ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro / K. Stellos, P. Seizer, B. Bigalke [et al.]// Seminars in Thrombosis and Hemostasis. – 2010. – Vol. 36. – P. 139–145.

139. Pourakbari, R. Cell therapy in female infertility-related diseases: Emphasis on recurrent miscarriage and repeated implantation failure / R. Pourakbari, H. Ahmadi, M. Yousefi, L. Aghebati-Maleki. – Text : electronic // Life Sciences. – 2020. – Vol.258. – P.118181.

140. Pregnancy and fertility-related adverse outcomes associated with Chlamydia trachomatis infection: a global systematic review and meta-analysis / W. Tang, J. Mao, K.T. Li [et al.] // Sexually Transmitted Infections. – 2020. – Vol. 96, № 5. – P. 322-329.

141. Prevalence of chronic endometritis in patients with endometrial polyps and unexplained infertility / A. Volodarsky-Perel, A. Badeghiesh, G. Shrem [et al.] // Fertility and Sterility. – 2019. – Vol. 112. – P. e332

142. Quinn, K. E. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions / K.E. Quinn, B.C. Matson, M. Wetendorf, K.M. Caron – Text : electronic // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2020. – Vol.501. – P.110644.
143. Rahimi, R. Effect of Hope-oriented group counseling on mental health of infertile women with failed IVF cycles: a randomized controlled trial / R. Rahimi, S. Hasanpour, M. Mirghafourvand, K. Esmaeilpour // *BMC Psychiatry*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 286.
144. Rock, J. Biopsy studies of human endometrium, criterion of dating and information about amenorrhea, menorrhoea, and tissue ovulation / J. Rock, M.K. Bartlett. – Text : electronic // *Journal of the American Medical Association*. – 1937. – Vol. 108. – P. 2022.
145. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure / E. Bastu, M. F. Mutlu, C. Yasa [et al.]. – Text : electronic // *Fertil Steril [Internet]*. – 2015. – 103. – P. 1059–1064.e2.
146. Rowe, J.H. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen / J.H. Rowe, J.M. Ertelt, L. Xin, S.S. Way // *Nature*. – 2012. – Vol. 490. – № 7418. – P. 102-106.
147. S. A. Carson. Diagnosis and management of infertility: a review / S. A. Carson, A. N. Kallen. // *Journal of the American Medical Association*.- 2021 Jul 6.- 326(1).- P. 65-76.
148. Seshadri, S. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis / S. Seshadri, S.K. Sunkara // *Human Reproduction Update*. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 429-438.
149. Shea, A. A. The extent and causes of natural variation in menstrual cycles: Integrating empirically-based models of ovarian cycling into research on women's health / A. A. Shea, V. J. Vitzthum. // *Drug Discovery Today: Disease Models*. — 2020. — 32 Part B. — P. 41-49.
150. Shen, L. Effects of Pelvic Floor Muscle Massage on the Pregnancy Outcome of Frozen Embryo Transfer in Patients with Thin Endometrium / L. Shen. – Text :

electronic // Computational and Mathematical Methods in Medicine. – 2022. – Vol. 2022. – P. 2803363.

151. Smoking and infertility: a committee opinion / A. Penzias, K. Bendikson, S. Butts [et al.] // Fertility and Sterility. – 2018. – Vol. 110. – № 4. – P. 611-618.

152. Smoking Decreases Endometrial Thickness in IVF/ICSI Patients / A. Heger, M. Sator, K. Walch, D. Pietrowski // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2018. – Vol. 78. – P. 78-82.

153. Snider, A.P. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality / A.P. Snider, J.R. Wood. – Text : electronic // Reproduction. – 2019. – Vol. 158. – P. R79-R90.

154. Stanhiser, J. Psychosocial Aspects of Fertility and Assisted Reproductive Technology / J. Stanhiser, A.Z. Steiner // Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. – 2018. – Vol. 45, № 3. – P. 563-574.

155. Successful Implantation and Live Birth Following Autologous Platelet-rich Plasma Treatment for a Patient with Recurrent Implantation Failure and Chronic Endometritis / K. Sfakianoudis, M. Simopoulou, N. Nitsos [et al.] // In Vivo. – 2019. – Vol. 33, № 2. – P. 515-521.

156. Sun, B. Successful pregnancy in a woman with bilateral fallopian tube obstruction and diminished ovarian reserve treated with electroacupuncture: A case report / B. Sun, Z. Liu // Medicine. – 2019. – Vol. 98, № 38. – P. e17160.

157. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia / B. Santner-Nanan, M.J. Peek, R. Khanam [et al.] // Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 183, № 11. – P. 7023-7030.

158. Szekeres-Bartho, J. The Role of Progesterone in Feto-Maternal Immunological Cross Talk / J. Szekeres-Bartho // Medical Principles and Practice. – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 301-307.

159. Tang, A. W. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review / A.W. Tang, Z. Alfircic, S. Quenby // Human Reproduction. – 2011. – Vol. 26, № 8. – P. 1971–1980.

160. Ten-year Retrospective Study on the Efficacy of a Manual Physical Therapy to Treat Female Infertility / A.D. Rice, K. Patterson, L.B. Wakefield [et al.] // *Alternative Therapies in Health and Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 3. – P. 36-44.

161. The combined impact of maternal age and body mass index on cumulative live birth following in vitro fertilization. / R.H. Goldman, L.V. Farland, A.M. Thomas [et al.] – Text : electronic // *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. – 2019. – Vol. 221. – №6. – P.617.e1-617.e13.

162. The effect of female body mass index on in vitro fertilization cycle outcomes: a multi-center analysis / R. Kudesia, H. Wu, K. Hunter Cohn [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2018. – Vol. 35. – P. 2013–2023.

163. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women / A.W. Horne, E. N. Lalani, R.A. Margara [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2005. – 72. – P. 216–229.

164. The Hepatoprotective and Hepatotoxic Roles of Sex and Sex-Related Hormones / L. Xu, Y. Yuan, Z. Che [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 939631.

165. The Importance of Small Non-Coding RNAs in Human Reproduction: A Review Article / B. Kamalidehghan, M. Habibi, SS. Afjeh [et al.] // *Applied Clinical Genetics*. – 2020. – Vol. 13. – P. 1-11.

166. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF / B.S. Shapiro, S.T. Daneshmand, J. Desai [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2016. – Vol. 33, № 1. – P. 50-55.

167. The role of female obesity on in vitro fertilization outcomes / M. Kasum, S. Oreškovic, E. Cehic [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. – 2017. – Vol. 34. – P. 184–188.

168. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan, A. Kan, J. Hitkari [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2018. – Vol. 35. – P. 683–692.

169. Three Types of Functional Regulatory T Cells Control T Cell Responses at the Human Maternal-Fetal Interface / M. Salvany-Celades, A. van der Zwan, M. Benner [et al.]. – Text : electronic // *Cell Reports*. – 2019. – Vol. 27. – № 9. – Pp. 2537-2547.e5.
170. Transcutaneous electrical acupuncture point stimulation improves pregnancy outcomes in patients with recurrent implantation failure undergoing in vitro fertilisation and embryo transfer: a prospective, randomised trial / Z. Shuai, X. Li, X. Tang [et al.] // *Acupuncture in Medicine*. – 2019. – Vol. 37, № 1. – P. 33-39.
171. Treating female infertility and improving IVF pregnancy rates with a manual physical therapy technique / B.F. Wurn, L.J. Wurn, C.R. King [et al.] // *Medscape General Medicine*. – 2004. – Vol. 6. – № 2. – P. 51.
172. Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction / I. Díaz-Hernández, D. Alecsandru, J.A. García-Velasco, F. Domínguez // *Human Reproduction Update*. – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P.720-746.
173. Valsamakis, G. Stress, female reproduction and pregnancy / G. Valsamakis, G. Chrousos, G. Mastorakos // *Psychoneuroendocrinology*. – 2019. – Vol. 100. – P. 48-57.
174. Van Mourik, M. S. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment / M.S. van Mourik, N.S. Macklon, C.J. Heijnen // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 85. – № 1. – P. 4–19.
175. Varfolomeev, E. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease / E. Varfolomeev, D. Vucic // *Cytokine*. – 2018. – Vol. 101. – P. 26-32.
176. Wang F. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells / F. Wang, A.E. Qualls, L. Marques-Fernandez, F. Colucci // *Cell and Molecular Immunology*. – 2021. – Vol. 18. – № 9. – P. 2101-2113.
177. Wasilewski, T. Biochemistry of infertility / T. Wasilewski, M. Łukaszewicz-Zajac, J. Wasilewska, B. Mroczko // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2020. – Vol.508. – P.185-190.

178. Wei, Y. Organoids as Novel Models for Embryo Implantation Study / Y. Wei, C. Zhang, G. Fan, L. Meng // *Reproductive Sciences*. – 2021. – Vol. 28. – № 6. – P. 1637-1643.

179. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? / I. Santillán, I. Lozano, J. Illán [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2015. – Vol. 108. – P. 142-148.

180. Window of implantation transcriptomic stratification reveals different endometrial subsignatures associated with live birth and biochemical pregnancy / P. Díaz-Gimeno, M. Ruiz-Alonso, P. Sebastian-Leon [et al.] – Text : electronic // *Fertility and Sterility*. – 2017. – Vol. 108. – № 4. – P.703-710.e3.

181. Wu, F. Decreased MUC1 in endometrium is an independent receptivity marker in recurrent implantation failure during implantation window / F. Wu, X. Chen, Y. Liu [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 60.

182. Xuehua, H. Clinical observation of vaginal and abdominal physical therapy on infertility women with gynecologic inflammation / H. Xuehua // *Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine*. – 2007. – Vol. 31. – P. 479-480.

183. Yuling Z, Fengyan X, Suxin H, Suping X. Clinical study of VLH-D therapeutic apparatus for the treatment of chronic pelvic inflammatory disease / Z. Yuling, X. Fengyan, H. Suxin, X. Suping // *Journal of North China Coal Medical College*. – 2003. – P. 204.

184. Zadehmodarres S, Salehpour S, Saharkhiz N, Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study / S. Zadehmodarres, S. Salehpour, N. Saharkhiz, L. Nazari // *JBRA Assisted Reproduction*. – 2017. – Vol. 21. – № 1. – P. 54-56.

185. Zhang, J. The immune potential of decidua-resident CD16+CD56+ NK cells in human pregnancy / J. Zhang, S. J. Lye // *Human Immunology*. – 2021. – Vol.82. – №5. – P. 332-339.

186. Zhang, P. Decidual vasculopathy and spiral artery remodeling revisited II: relations to trophoblastic dependent and independent vascular transformation /

P. Zhang // Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. – 2022. – Vol.35. – №2. – P. 395-401.