На правах рукописи

Мелкозерова Оксана Александровна

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЯ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НЕУДАЧАМИ И МЕТОДЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Челябинск - 2017

Работа выполнена в научном отделении сохранения репродуктивной функции Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Башмакова Надежда Васильевна

Официальные оппоненты:

Стрижаков Александр Николаевич доктор медицинских наук, академик РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии, заведующий

Мальцева Лариса Ивановна доктор медицинских наук, профессор, Казанская государственная медицинская академия филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии №1, заведующий

Гзгзян Александр Мкртичевич доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации, кафедра акушерства, гинекологии и репродуктологии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2018 года в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.074.04 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте http://www.chelsma.ru

Автореферат разослан «_____»_____2018 г.

Ученый секретарь
объединенного диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор **Казачкова Элла Алексеевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Состояние репродуктивного здоровья населения России является фактором ее национальной безопасности. В стране сформировались реальные предпосылки для депопуляции за счет сокращения числа и ухудшения качества здоровья женщин репродуктивного возраста, высокой распространенности бесплодия и невынашивания беременности, ухудшения здоровья и уменьшения численности девочек-подростков – потенциальных матерей (Гинекология: национальное руководство. Под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова, И.Б. Манухина, В.Е. Радзинского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 1048 с.; Здравоохранение в России: статистический сборник. М.: Росстат, 2016. 543 с).

Значительные успехи репродуктивной медицины, достигнутые за последние десятилетия, не изменили проблему снижения демографических ресурсов нашей страны. По данным Всемирной организации здравоохранения частота бесплодных браков в России превышает 15%, что считается критическим уровнем для воспроизводства населения нации (Ермоленко К.С., Радзинский В.Е., Рапопорт С.И. Современное состояние проблемы реализации фертильной функции у женщин позднего репродуктивного возраста. Клиническая медицина. 2016. № 1. С.10-15.; The European health report 2015. Targets and beyond – reaching new frontiers in evidence. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2015. 150 с). Более чем тридцатилетняя история существования методов вспомогательной репродукции не привела к снижению распространенности бесплодного брака, а эффективность программ экстракорпорального оплодотворения не меняется уже многие годы и остается на уровне 30-40 % (Крылова Ю.М., Кветной И.М., Айламазян Э.К. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации. Журнал акушерства и женских болезней. 2013. №2. С. 63-74; Регистр ВРТ РАРЧ. Отчет за 2015 год. СПб., 2015. 29 с). «Последним непреодолённым рубежом» вспомогательных репродуктивных технологий, по мнению их создателя - Роберта Эдвардса, является нерецептивный эндометрий, и ситуация не изменилась за прошедшие десять лет с момента провозглашения этого постулата (Edwards R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? Reprod. Biomed. Online. 2006. Vol.13. P. 887-904). Маточный фактор бесплодия остается основной причиной репродуктивных неудач ЭКО при переносе эмбрионов хорошего качества, определяя до 70% в их структуре (Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Пальченко Н.А. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ. Обзор литературы. Проблемы репродукции. 2013. №4. С. 3-7).

Частота самопроизвольного прерывания беременности в России продолжает оставаться стабильно высокой, занимая от 15 до 23% всех зарегистрированных беременностей, при этом около 50% выкидышей приходится на долю привычного невынашивания беременности (Здравоохранение в России: статистический сборник. М.: Росстат, 2016. 543 с.; Малышкина А.И., Назарова А.О., Батрак Н.В. и др. Медико-социальная характеристика пациенток с привычным невынашиванием беременности Российский вестник акушера-

гинеколога. 2014. № 6. С. 43-48). В структуре ранних репродуктивных потерь неразвивающаяся беременность занимает доминирующее положение, определяя не только масштабы репродуктивных потерь, но и неблагоприятный репродуктивный прогноз (Стрижаков А.Н., Игнатко И.В. Ранние сроки беременности: осложнения и прогнозирование перинатальных исходов. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2012. №5. С. 5-12.; Радзинский, В.Е. Неразвивающаяся беременность: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 176 с).

Российская Федерация занимает лидирующие позиции в мире по распространенности неблагоприятных в отношении эндометрия медицинских практик, которые в том числе касаются завершения беременности хирургическим путем, при помощи кюретки. Производимое количество абортов в России в десятки раз превышает показатели стран с развитой системой планирования семьи (Ермоленко К.С., Радзинский В.Е., Рапопорт С.И. Современное состояние проблемы реализации фертильной функции у женщин позднего репродуктивного возраста. Клиническая медицина. 2016. №1. С.10-15).

При этом, несмотря на ряд фундаментальных отечественных научных исследований в России отсутствует рутинная практика постабортной реабилитации, как и реабилитации женщин после неразвивающейся беременности, повторных неудач ВРТ и единый четкий алгоритм их обследования. Предопределенность дальнейших репродуктивных неудач у таких пациенток вне полноценной комплексной патогенетически выверенной стратегии связана с крайне высоким риском формирования нарушений рецептивности эндометрия на фоне хронического эндометрита, являющегося отправной точкой патогенеза данных осложнений.

Назрела высокая необходимость систематизации большого массива данных о патологии рецептивности эндометрия, как причине нарушений репродуктивной функции женщин, изучения патогенетических механизмов ее формирования, клинических аспектов ее реализации с целью объективизации критериев диагностики нерецептивного эндометрия и создания персонифицированных клинических рекомендаций по лечению данной патологии.

Малоизучены вопросы влияния внутриутробных эпигенетических факторов на реализацию рецептивности эндометрия в репродуктивном возрасте. По данным Глобального Исследования ВОЗ ежегодно в мире рождается около 20 миллионов детей с низкой массой тела (<2500 г), из которых около 10,2 миллионов младенцев рождаются с низкой массой тела (LBW – low birth weight) в доношенном сроке (Black R.E. Global Prevalence of Small for Gestational Age. Births. Nestle Nutr. Inst. Workshop. Ser. 2015. Vol.81. P. 1-7). Это составляет 27% от всех родившихся живыми. Последние систематические обзоры подтверждают, что метаболические эффекты, связанные с низким весом при рождении проявляются в очень молодом возрасте и сохраняются в течение жизни. Доказано развитие у людей, рожденных с низкой массой тела, метаболического синдрома, ожирения, артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа и эндотелиальной дисфункции (Barker D.J. The origins of the developmental origins theory. J. Intern. Med. 2007. Vol.261. P.412-417.; Стрижаков А.Н., Игнатко И.В., Байбулатова Ш.Ш.

и др. Антенатальное метаболическое и эндокринное программирование при беременности высокого риска. Акушерство и гинекология. 2016. №10. С.39-47). Существуют единые эпигенетические механизмы формирования данной патологии, предопределяемые внутриутробно программируемым гиперметилированием промотерных областей ряда генов и модификацией гистонов (Kawai T., Yamada T., Abe K. et al. Increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators following inadequate maternal gestational weight gain. Sci Rep. 2015. Vol.5. P.14224-14232.; Сухих Г.Т., Осипьянц А.И., Мальцева Л.И. и др. Аномальное гиперметилирование генов hoxa10 и hoxa11 при бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом. Акушерство и гинекология. 2015. № 12. С. 69-74), которые во взрослом возрасте способны оказывать влияние на функционально-регенераторные возможности различных тканей человека, в том числе процессы пролиферации, сосудистого стромального ремоделирования, миграции иммунокомпетентных клеток, неоангиогенеза и регенерации в эндометрии. Подобных работ в мировой литературе немного и требуются дальнейшие исследования, подтверждающие эти положения.

В мире отсутствует единая методология определения рецептивности эндометрия и персонификации «имплантационного окна». Диагностические маркеры рецептивности эндометрия не стратифицированы по информативности, трудно воспроизводимы в рутинной клинической практике, и многие из них пока используются только в научных целях (Молекулярные механизмы заболеваний репродуктивной системы. Под ред. М.А. Пальцева. СПб.: Эко-вектор, 2017. 256 с.; Ниаури Д.А., Гзгзян А.М. Иммуногисто-химическая характеристика рецептивности эндометрия в циклах ЭКО. Акушерство и гинекология. 2014. № 9. С. 44-50; Казачков Е.Л., Казачкова Э.А. Воропаева Е.Е. и др. Морфофункциональная характеристика нарушений рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите. Архив патологии. 2014. №3. С.53-58.; Garrido-Gómez T., Ruiz-Alonso M., Blesa D. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. Fertil. Steril. 2013. Vol.99. P.1078-1085).

Серьезнейшей проблемой является отсутствие мер воздействия на нерецептивный эндометрий. Описанные в литературе способы повышения рецептивности эндометрия разрозненны и имеют весьма низкую доказательную базу. Эффективность гормональной терапии нерецептивного эндометрия недостаточна (Прегравидарная подготовка: клинический протокол. Под ред. В.Е. Радзинского. М.: Status Praesens, 2016. 80 с.; Мальцева Л.И., Никогосян Д.М. Эффективность микронизированного прогестерона для профилактики невынашивания беременности. Гинекология. 2015. Т.17, №2. С. 56-59). Средства, улучшающие микроциркуляцию и реологию крови, действуют на системном уровне. Проблема связана с отсутствием точки приложения для лечебного воздействия – изменения паттерна экспрессии рецепторных белков эндометрия (Молекулярные механизмы заболеваний репродуктивной системы. Под ред. М.А. Пальцева, СПб.: Эко-вектор, 2017. 256 с.; Kanzaki H. Uterine Endometrial Function. Osaka: Springer, 2017. 155 p).

Резюмируя обширную, но нередко противоречивую и фрагментарно изложенную информацию о различных аспектах проблемы репродуктивных неудач, связанных с нарушением рецептивной функции эндометрия, отметим, что эффективное восстановление фертильности и преодоление невынашивания беременности возможно лишь при комплексном подходе, предусматривающем объективный и четкий диагностический алгоритм, патогенетически обоснованную тактику лечения и реабилитации с позиций персонифицированной медицины.

Цель исследования

Улучшение репродуктивных исходов на основании применения патогенетически аргументированной системы лечебно-диагностических мероприятий у пациенток с репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия.

Задачи исследования

1. Определить клинико-анамнестические детерминанты, в том числе роль низкого веса при рождении, и нозологические формы гинекологических заболеваний, приводящие к нарушению рецептивности эндометрия.
2. Изучить молекулярно-генетические механизмы нарушения регуляции рецептивности эндометрия на основании обследования одноаллельных полиморфизмов генов рецепторов половых стероидов, регуляции ангиогенеза, эндотелиальной функции и тромбофилии у пациенток с репродуктивными неудачами, обусловленными «тонким» эндометрием.
3. Оценить морфофункциональные и ультраструктурные особенности «тонкого» эндометрия у пациенток с бесплодием и привычным невынашиванием беременности.
4. Исследовать молекулярно-биологические механизмы нарушений стромальной секреторной трансформации, сосудистого ремоделирования и миграции иммунокомпетентных клеток в «тонком» рефрактерном эндометрии у пациенток с повторяющимися репродуктивными неудачами и определить предикторы рецептивности эндометрия.
5. Разработать патогенетически обоснованную программу диагностических и лечебных мероприятий у пациенток с бесплодием и ранними репродуктивными потерями, обусловленными «тонким» эндометрием.
6. Оценить эффективность разработанной персонифицированной программы терапии и реабилитации пациенток с репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия.

Методология и методы исследования

Методология данной работы была основана на принципах доказательной медицины и складывалась из пяти этапов. На первом этапе предпринято проспективное сравнительное контролируемое исследование девочек-подростков с нарушением становления менструальной функции. Методология второго этапа –

открытое проспективное стратифицированное контролируемое исследование, предусматривающее комплексное обследование женщин репродуктивного возраста с маточным фактором бесплодия и невынашивания беременности для изучения патогенеза заболевания. На третьем этапе проведено ретроспективное сравнительное когортное исследование, включающее изучение механизмов нарушения имплантации при неразвивающейся беременности. Четвертый этап исследования - проспективное двойное слепое контролируемое исследование, направленное на изучение влияния энергии низкочастотного ультразвука на восстановление биологических параметров эндометрия. Пятый этап работы – сравнительное проспективное контролируемое исследование, предполагал оценку эффективности разработанной концепции лечебно-диагностических мероприятий.

Для реализации поставленной цели использовался комплексный подход, включающий клинико-анамнестические, молекулярно-генетические, молекулярно-биологические, ультразвуковые, доплероме-трические, бактериологические, бактериоскопические, патоморфологические, иммуногистохимические, электронно-микроскопические, масс-спектро-метрический, статистические методы исследования, а так же клинический метод проведения терапии по предложенному алгоритму, включающему медикаментозное лечение и местное применение физических факторов, с последующей оценкой эффективности лечения.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Исследование проводилось в соответствии с принципами доказательной медицины. Достоверность результатов работы обоснованность выводов и рекомендаций базируется на достаточном числе наблюдений с использованием рекомендуемых статистических методик и прикладных статистических пакетов программ Statistica 10.0 и SPSS 22.0. (IBM США).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на следующих мероприятиях: VI Международном конгрессе по репродуктивной медицине Казахстанской Ассоциации Репродуктивной Медицины «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: настоящее и будущее» (Алматы, 2014), VI Общероссийском семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2013, 2015, 2017), Научно-практической конференции с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии» (Екатеринбург, 2014), I Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству», (Санкт-Петербург, 2014), Общероссийской школе «Замершая беременность: от проблем к решениям» в рамках конгрессов: II, III, IV Общероссийского научно-практического семинара «Репродуктивный потенциал России: уральские чтения», (Екатеринбург 2015, 2017), «Ранние сроки беременности. Проблемы ВРТ», (Москва, 2015); Международном конгрессе «Репродуктивный потенциал семьи – гарантия безопасности государства» IV Конгресса акушеров-гинекологов Уральского Федерального округа (Екатеринбург, 2015); II Научно-практической конференции

с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья детей и подростков» (Москва, 2016), II Малышевских чтениях, посвященных 100-летию присвоения статуса "Повивально-гинекологического института" (Екатеринбург, 2016), Международной конференции «Неклассическое ЭКО: пути решения» (Екатеринбург, 2017), Научно-практической конференции акушеров-гинекологов УрФО «НИИ ОММ – 140 лет на страже здоровья матери и ребенка» (Екатеринбург, 2017), Научно-практической конференции акушеров-гинекологов УФО «Перинатальная медицина: достижения и пути развития» (Челябинск, 2017), 17th World Congress of the Academy of Human Reproduction (Rome, 2017), BIT`S Vth International Congress of Gynecology and Obstetrics-2017 (Prague, 2017).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным консультантом, д.м.н., проф. Н.В.Башмаковой. Дизайн исследования разработан лично диссертантом. Автором лично проведено обследование и лечение женщин групп наблюдения, получение и интерпретация результатов исследования.

Инструментальные исследования проводились совместно с отделением биофизических и лучевых методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением к.м.н. Косовцова Н.В. Лабораторные исследования осуществлялись совместно с лабораторией генетики ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением к.м.н. Третьякова Т.Б., лабораторией патоморфологии, иммунологии и клинической микробиологии ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением д.м.н., проф. Чистякова Г.Н. Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Клиническими предикторами заболеваний, приводящих к нарушению рецептивности эндометрия, являются неблагоприятные перинатальные факторы, органические поражения матки и/или травма эндометрия, хронический эндометрит, определяющие рецидивирующий характер ранних репродуктивных потерь с последующим развитием маточной формы вторичного бесплодия, резистентного к проведению вспомогательных репродуктивных технологий.

2. Генная сеть, включающая систему генов рецепторов половых стероидов, регуляторов ангиогенеза, эндотелиальной функции, гемостаза, регулирует процессы рецептивности эндометрия. Полиморфизм генов, входящих в эту систему, нарушение межгенных взаимодействий может определять изменение параметров рецептивности эндометрия и приводить репродуктивным потерям.

3. Структурными маркерами нарушения рецептивности эндометрия являются морфологические признаки хронического воспаления и его исходов,

либо диспластические процессы, сопровождающиеся нарушением формирования и созревания пиноподий, разобщения плотных межклеточных контактов и дисплазией клеток микроокружения.

4. Функциональными маркерами нарушения рецептивности эндометрия являются отсутствие полноценной стромальной секреторной трансформации, сосудистого ремоделирования и нарушение популяционного состава иммунокомпетентных клеток в имплантационном эндометрии.

5. Существует два патогенетических варианта формирования синдрома рефрактерного эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами: на фоне хронического воспаления – воспалительный путь и на фоне регенераторно-пластической недостаточности, ассоциированной с внутриутробно-программируемой эндотелиальной дисфункцией – диспластический путь.

6. Программа диагностических мероприятий нерецептивного эндометрия должна сочетать единство и последовательность ультразвукового, доплерометрического, морфологического, иммуногистохимического исследования с обязательной гистероскопической визуализацией эндометрия.

7. Разработанная программа терапии, включающая хирургическую коррекцию органической патологии матки, персонифицированный подход к выбору гормональной терапии, элиминацию патогенной микрофлоры и внутриматочные орошения кавитированнымии растворами, с клинически обоснованным выбором лекарственного препарата, позволяет добиться функциональной полноценности эндометрия в 85,9 % при снижении ранних репродуктивных потерь в 3,3 раза и реализации репродуктивной функции у 69,34% женщин.

Научная новизна исследования

Впервые продемонстрировано влияние низкого веса при рождении на формирование к периоду пубертатного возраста высоких темпов и дисгармоничного характера физического и полового развития, которые сохраняются на протяжении жизни женщин и определяют ее соматическое и репродуктивное здоровье.

Доказано значение генетически детерминированного синдрома эндотелиальной дисфункции у девочек-подростков и женщин, рожденных с низким весом, в генезе нарушений функции эндометрия.

Определены ряд молекулярно-генетических предикторов формирования «тонкого» эндометрия у пациенток с бесплодием и невынашиванием беременности, образующих генную сеть посредством межгенных ассоциаций (NOS3 786 T>C, ESR1 397T>C, VEGF 2578 C>A, VEGF-A 634 G>C, VEGF-A 936C>T, PAI-1 675 5G>4G).

Выявлено, что межгенные взаимодействия генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов рецепторов-альфа к эстрадиолу ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) носят сильный синергический характер, что определяет роль эндотелиальной дисфункции в нарушении стероидной рецепции к эстрогенам.

Определена ассоциация молекулярно-генетических (VEGF-A 936C>T -936 T; VEGF-A 634 G>C -634C) и морфологических (гиповаскуляризация и аваскуляризация ворсин хориона) предикторов нарушения формирования маточно-плацентарной зоны эндометрия при неразвивающейся беременности.

Впервые проанализированы и описаны нормальные и патологические формы развития пиноподий и клеток микроокружения имплантационного эндометрия по данным сканирующей электронной микроскопии при различных видах нарушений репродуктивной функции женщин.

Установлены патоморфологические и ультраструктурные параллели в нарушении тканевой рецептивности эндометрия у женщин с бесплодием и невынашиванием беременности.

Впервые выявлены функциональные особенности нарушений рецептивности эндометрия (изменение соотношения экспрессии стероидных рецепторов, индукторов пролиферации, апоптоза и ангиогенеза, изменение популяции маточных киллеров) у женщин с репродуктивными неудачами, рожденных с низким весом.

Раскрыты два патогенетических варианта формирования нарушений рецептивности эндометрия у женщин с маточным фактором бесплодия и невынашивания беременности. Первый вариант связан с нарушением рецептивности эндометрия на фоне течения хронического эндометрита – воспалительный путь. Второй вариант обусловлен формированием его гипоплазии на фоне регенераторно-пластической недостаточности, ассоциированной с внутриутробно-программируемой эндотелиальной дисфункцией – диспластический путь.

Впервые исследованы молекулярные эффекты низкочастотной ультразвуковой кавитации при воздействии на ткань эндометрия in vivo. Показана активация неоангиогенеза, восстановление паттерна рецепторных белков, уменьшение воспалительной реакции стромы, восстановление баланса иммунокомпетентных клеток, элиминация патогенных и условно-патогенных возбудителей и восстановление рецептивности эндометрия при орошении полости матки кавитированными ультразвуком низкой частоты растворами.

Разработана и научно обоснована программа лечебно-диагностических мероприятий по реабилитации женщин с репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия, основанная на понимании патогенетических механизмов развития данной патологии, которая позволяет восстановить функциональные свойства и показатели рецептивности эндометрия у 85,9% женщин.

Теоретическая и практическая значимость работы

Расширены представления о роли одноаллельных полиморфизов генов эндотелиальной NO-синтазы, половых стероидных рецепторов ERα и PR, сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF-A, тканевого ингибитора активатора плазминогена 1 типа PAI-1, а так же фенотипических особенностей функции эндотелиальной системы, экспрессии рецепторов половых стероидов, регуляторов ангиогенеза в развитии нарушений рецептивности эндометрия.

Разработан и сконструирован аппарат для проведения ультразвукового кавитационного орошения полости матки с гистероскопической ассиситенцией, который сочетает возможность терапевтического воздействия на эндометрий кавитированных низкочастотным ультразвуком жидких лекарственных сред с прямой визуализацией патологического процесса в эндометрии (Патент № RU 2606495 C2 от 17.01.2017).

На основании исследования молекулярных маркеров рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами и фертильных здоровых женщин разработан способ оценки рецептивности эндометрия в период «имплантационного окна».

Проведен научный эксперимент, доказывающий на основании масс-спектрометрического исследования сохранение стабильности молекул гранулоцитарного колоне-стимулирующего фактора и интерферона гамма под воздействием ультразвука низкой частоты (25кГц) с экспозицией воздействия 5 минут.

Предложен способ лечения нарушений рецептивности эндометрия у пациенток с маточной формой бесплодия с применением кавитированного раствора гранулоцитарного колоне-стимулирующего фактора роста.

Предложен способ лечения нарушений рецептивности эндометрия у пациенток с привычным невынашиванием беременности на фоне хронического эндометрита хламидийной, микоплазменной и вирусной этиологии с применением кавитированного низкочастотным ультразвуком лекарственного раствора интерферона гамма.

Разработана система персонификации циклической гормональной терапии для коррекции нарушений рецептивности эндометрия.

Эффективность комплексной персонифицировнанной программы терапии подтверждена на основании глубокого динамического анализа данных клинического, молекулярно-биологического, морфологического, ультраструктурного, бактериологического и инструментального методов исследования, что демонстрирует уменьшение в 17 раз частоты клинических проявлений нарушения менструальной функции, снижением ранних репродуктивных потерь в 3,3 раза, восстановлением фертильности у 69,34% женщин с маточной формой бесплодия и завершения беременности живорождением у 50,5% женщин.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенной работы внедрены в клиническую практику ФГБУ «Уральский НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России (Екатеринбург), АО «Международный Центр репродуктивной медицины» (Санкт-Петербург), ЛПУ «Родильный дом №2» (Санкт-Петербург), КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (Барнаул), ГБУ «Курганская больница №2», МБУЗ ГКБ №7 (Екатеринбург), МЦ «Гармония» (Екатеринбург), МЦ «Женская клиника» (Екатеринбург), используются в учебном процессе в программах постдипломного обучения в ФГБУ «Уральский НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России, кафедры акушерства и гинекологии факультета повышения

квалификации и профессиональной подготовки ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет».

Публикации

Соискатель имеет 67 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 32 научные работы, в том числе 1 монография в соавторстве, 19 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также 4 статьи в зарубежных научных изданиях, цитируемых SCOPUS и РИНЦ. Соискателю выдан 1 патент на изобретение. По теме работы опубликовано 1 учебное пособие и 1 практическое руководство для врачей, 4 работы опубликованы в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов, 1 публикация в электронных научных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 424 страницах машинописного текста, иллюстрирована 69 рисунками и 85 таблицами и состоит из введения, обзора литературы, семи глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиографический указатель включает 433 источников, из них 146 — отечественных и 287 — зарубежный источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Настоящее исследование было проведено в период с 2011 по 2017 г. на базе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор Н.В. Башмакова).

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России. В соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2008 года все пациентки или их законные представители подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Для решения поставленных в настоящей работе цели и задач были определены основные методологические направления работы и выделены следующие этапы (рисунок 1).

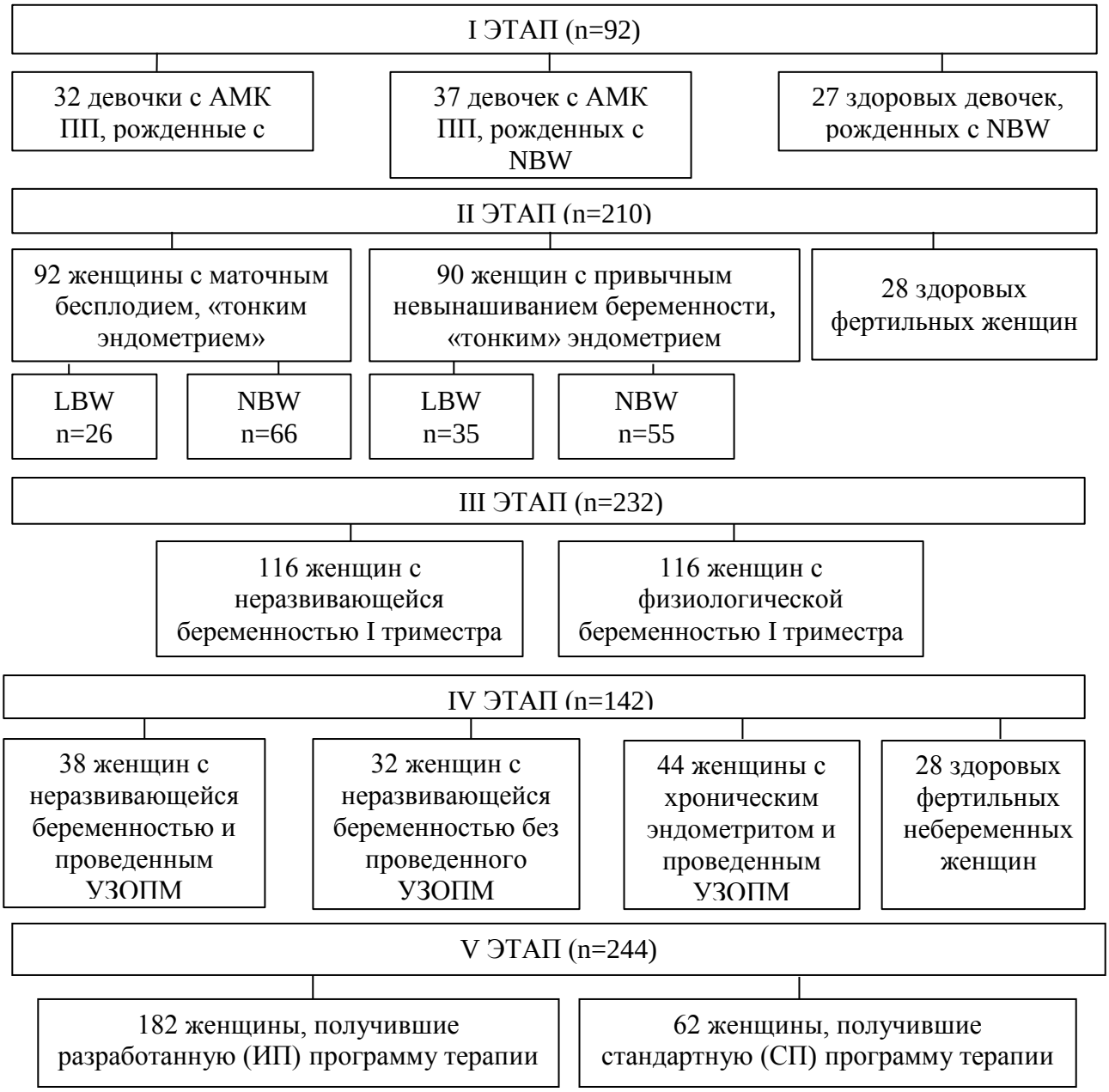


Рисунок 1 - Дизайн исследования

I этап. Исследование роли генетических и внутриутробных эпигенетических факторов в нарушении становления менструальной функции и рецептивности эндометрия

Методология первого этапа – проспективное сравнительное контролируемое исследование, предусматривало комплексное обследование 96 девочек-подростков с нарушением становления менструальной функции, стратифицированных в зависимости от действия внутриутробных эпигенетических факторов. Фактором стратификации основных групп наблюдения являлся уровень физического развития девочек при рождении.

Первую основную группу составили 32 девочки пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с синдромом задержки роста плода, страдающие с менархе аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода. Критерием включения пациенток в первую основную группу являлась оценка

физического развития при рождении менее 10 перцентили по росто-весовым показателям (Low birth weight - LBW). Вторую основную группу составили 37 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела при рождении: более 10 перцентили по росто-весовым показателям (Normal birth weight - NBW), страдающих с менархе аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода. Контрольную группу составили 27 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела (более 10 перцентили по росто-весовым показателям) с правильным ритмом менструации с менархе, гармоничным физическим и половым развитием, обратившиеся в научно-поликлиническое отделение института для профилактического осмотра.

Обследование девочек проводилось в раннюю фолликулярную фазу цикла. Критерии включения в исследование: возраст 12-15 лет, отсутствие опыта сексуальных контактов, наличие маточных кровотечений пубертатного периода для пациенток основных групп исследования, гестационный возраст на момент рождения 37 недель и более. Критерии исключения из исследования: наличие заболевания крови с нарушением гемостаза, наличие тяжелых экстрагенитальных заболеваний, наличие органической патологии половых органов, наличие специфических воспалительных заболевания и травм половых органов, наличие кровянистых выделений из половых путей неясного генеза в момент обращения, прием лекарственных препаратов, влияющих на свертывающую систему крови.

II этап. Исследование патогенетических факторов нарушения рецептивности эндометрия

Методология второго этапа – открытое проспективное стратифицированное контролируемое исследование, предусматривало комплексное обследование женщин с целью выяснения патогенетических механизмов нарушения рецептивности эндометрия по итогам анализа анамнестических данных, результатов клинико-лабораторных и функциональных методов исследования.

Исследование на данном этапе включало 210 женщин с нарушением репродуктивной функции по типу бесплодия и/или привычного невынашивания беременности с клиническими и ультразвуковыми признаками «тонкого» эндометрия. Первую группу составили 92 женщины с доминирующим маточным фактором бесплодия на фоне гипоплазии эндометрия: 1 А группа – 26 женщин, рожденных доношенными с низким весом (LBW); 1 В группа - 66 женщин, рожденные доношенными с нормальным весом (NBW). Вторую группу составили 90 женщин с привычным невынашиванием беременности на фоне гипоплазии эндометрия: 2 А группа – 35 женщин, рожденных доношенными с низким весом (LBW); 2 В группа - 55 женщин, рожденные доношенными с нормальным весом (NBW). Контрольную группу составили 28 здоровых фертильных женщин, не имеющих в анамнезе случаев невынашивания беременности, имеющих в анамнезе срочные роды через естественные родовые пути без отклонения от физиологического течения беременности и родового акта, закончившиеся рождением здоровых детей. Критерии включения в исследование:

репродуктивный возраст (18-45 лет), бесплодие с маточным фактором, ассоциированным с гипоплазией эндометрия (для пациенток первой группы), привычное невынашивание беременности, ассоциированное с гипоплазией эндометрия (для пациенток второй группы), гипоплазия эндометрия по данным УЗИ: М-эхо на 20-22 день цикла менее 8 мм (для пациенток основных групп), овуляторный менструальный цикл. Критерии исключения: возраст более 45 лет, онкологические заболевания, соматическая патология, при которой вынашивание беременности противопоказано, наличие заболеваний крови с нарушением гемостаза, аномалии кариотипа супругов, бесплодие, не ассоциированное с гипоплазией эндометрия.

Исследование эндометрия проводилось в день предполагаемого «окна имплантации» ЛГ+7, определяемого по данным мочевого теста на овуляцию, что составляло 20-22 день 28-дневного менструального цикла. Ультразвуковое исследование проводилось дважды в раннюю фолликулярную фазу и в период «имплантационного окна» (ЛГ+7).

III этап. Исследование роли генетической регуляции в нарушении стромального и сосудистого ремоделирования эндометрия при неразвивающейся беременности

Методология третьего этапа работы - ретроспективное сравнительное когортное исследование, включающее изучение механизмов нарушения имплантации при неразвивающейся беременности.

В исследование на данном этапе включены 116 женщин с неразвивающейся беременностью в первом триместре и 116 женщин с физиологической беременностью в первом триместре, которые предприняли артифициальный аборт. Основная группа по степени васкуляризации ворсин хориона была разделена на основную группу А (n=69), которую составили случаи неразвивающейся беременности с выявленными признаками гиповаскуляризации или аваскуляризация ворсин хориона по результатам морфологического исследования продуктов зачатия, и основную группу В (n=47), которую составили случаи неразвивающейся беременности с адекватной васкуляризацией ворсин хориона результатам морфологического исследования абортного материала. Критерии включения основную группу III этапа: неразвивающаяся беременность I триместра, один и более спонтанных выкидышей в анамнезе. Критерии исключения: многоплодная беременность, анатомические аномалии матки, тяжелые эндокринные нарушения у женщины, аномалии кариотипа супругов. Критерии включения в контрольную группу: беременные без случаев невынашивания беременности в анамнезе, имеющие одного и более здоровых детей, принявшие решение о медицинском прерывании настоящей беременности в I триместре, физиологически протекающая беременность I триместра, нормальный кариотип плода настоящей беременности. Критерий исключения из контрольной группы: невынашивание беременности в анамнезе.

IV этап. Исследование биологических эффектов воздействия на эндометрий низкочастотной ультразвуковой кавитации у пациенток с репродуктивными неудачами

Методология исследования – проспективное стратифицированное рандомизированное контролируемое исследование, направленное на изучение влияния низкочастотного ультразвукового кавитационного орошения полости матки на восстановление биологических параметров эндометрия.

На данном этапе в исследование были включены 114 женщин с бесплодием и гипоплазией эндометрия на фоне хронического эндометрита, а так же с неразвивающейся беременностью в первом триместре. После прерывания неразвивающейся беременности пациентки слепым методом были разделены на две группы, в которых для восстановления эндометрия применялось или не применялось низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение полости матки. Первую основную группу составили 38 женщин, которым после прерывания неразвивающейся беременности в комплексе терапии был проведен курс кавитационного ультразвукового орошения полости матки; вторую основную группу составили 32 женщины с неразвивающейся беременностью, в лечении которых не проводились внутриматочные орошения; третью основную группу составили 44 женщины с гистологически подтвержденным хроническим эндометритом, имеющие в анамнезе прерывание замершей беременности, после чего наступило вторичное бесплодие. Всем женщинам этой группы был проведен курс кавитационного орошения полости матки в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла. Контрольную группу составили 28 здоровых фертильных женщин, не имевших в анамнезе неразвивающейся беременности, родивших здоровых детей. Критерии включения в основные группы исследования: женщины с неразвивающейся одноплодной беременностью до 12 недель, женщины с неразвивающейся беременностью в анамнезе и вторичным бесплодием, страдающие хроническим эндометритом, подтвержденным гистологически. Критерии исключения: указание на аллергические реакции на используемые для обработки или орошения лекарственные средства, злокачественные новообразования любой локализации, прогрессирующая маточная беременность в первом триместре, тяжелая соматическая патология.

Прерывание замершей беременности проводилось методом электрической вакуум-аспирации плодного яйца с использованием аппарата Eschmann VP 35 при отрицательном давлении 80 kPa или пластиковым аспиратором объемом 60 мл (МВА) с использованием одноразовых пластиковых канюль Кармана от 4 до 12 номера в зависимости от срока беременности. Низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение полости матки начинали на третий день после аспирации плодного яйца по поводу неразвивающейся беременности ежедневно курсом из 5 процедур продолжительностью 3–5 минут, с мощностью воздействия 25 кГц, скоростью потока лекарственного средства 100-150 мл/мин.

У пациенток с бесплодием и хроническим эндометритом орошение полости матки проводилось на 7–9 день менструального цикла ежедневно курсом из 5 процедур той же продолжительностью и параметрами воздействия.

Использовалось три курса процедур. Для внутриматочных орошений использовался аппарат «Фотек» АК 100-25 с усовершенствованным внутриматочным наконечником АА 211.

V этап. Оценка эффективности разработанной персонифицированной программы реабилитации

Методология данного этапа работы – сравнительное проспективное контролируемое исследование – включало изучение эффективности персонифицированного подхода к восстановлению фертильности у пациенток с нарушением рецептивности эндометрия и повторными репродуктивными неудачами.

Первую группу составляли 182 пациентки с бесплодием и невынашиванием беременности, ассоциированными с гипоплазией эндометрия и нарушением его рецептивности, получавших разработанную комплексную программу диагностики и терапии. Вторую группу составили 62 женщины, в лечении которых было использовано стандартное ведение. Контрольную группу составили 28 здоровых фертильных женщин.

В динамике комплексной персонифицированной терапии анализировались жалобы пациенток, данные клинического осмотра, ультразвукового исследования органов малого таза с доплерометрией, состояния микробиоценоза репродуктивного тракта, морфо-функционального и ультраструктурного состояния эндометрия в период «окна имплантации», динамика экспрессии половых стероидных рецепторов, факторов апоптоза пролиферации, ангиогенза и локального иммунитета в эндометрии. Анализу подвергнуты репродуктивные исходы у пациенток после проведенных программ терапии.

Клинико-анамнестическое обследование включало: сбор анамнеза, жалоб, гинекологическое обследование. Физическое развитие пациенток оценивали по результатам соматоскопии и антропометрии. Для комплексной оценки уровня полового развития девочек-подростков использовали методику, предложенную Таннером (1969), с современными поправками. По показаниям пациенткам выполняли диагностическую или лечебно-диагностическую гистероскопию, либо гистерорезектоскопию под внутривенной анестезией с использованием оборудования Karl Storz®. Показания и обследование перед проведением оперативного вмешательства регламентированы Порядком №572-н от 01.1.2012 г.

Ультразвуковое сканирование органов малого таза с доплерометрией. УЗИ органов малого таза проводилось на аппарате Voluson 8 (General Electric®) с использованием мультичастичного абдоминального датчика с частотой 3,5-5 МГц и полостного трансвагинального конвексного датчика частотой 6,5 на 5-11 и 20-22 день менструального цикла. Особое внимание уделяли исследованию срединного маточного М-эха. Энергетическая доплерометрия проводилась в режиме ЦДК с оценкой систолодиастолических индексов, индексов резистентности и пульсационных индексов маточного и овариального кровотока.

Микробиологические методы исследования. Проводилось исследование отделяемого половых органов при первом визите пациенток и в динамике, в следующий менструальный цикл после завершения терапии. Забор материала для

исследования вагинального микробиоценоза осуществляли из заднебокового свода влагалища, с помощью урогенитальных зондов, соскоб материала из цервикального канала осуществляли стерильным ватным тампоном, аспирационную биопсию эндометрия проводили с помощью кюретки Pipelle-PAMP de Cornie после тщательной обработки шейки матки раствором антисептика. Материал помещался в специальные транспортные системы с условиями анаэробиоза и исследовался микроскопическим и культуральным методами. Для проведения микроскопического исследования на двух предметных стеклах готовили мазки из вагинального секрета, фиксировали в смеси Никифорова и окрашивали по Граму.

Культуральное исследование биоценоза половых путей проводили с использованием молекулярно-генетических методов исследования (технологии «ФЕМОФЛОР 16»). Материал исследовали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора реагентов «Проба НК» и «Фемофлор 16» фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Амплификацию с детекцией в режиме «реального времени» осуществляли на приборе IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System фирмы BIO-RAD (США). Количество ДНК искомого материала в образце определяли с помощью программного обеспечения и выражали в геном-эквивалентах (ГЭ), которое пропорционально количеству микроорганизмов.

ПЦР-диагностику для идентификации специфических фрагментов ДНК уреаплазмы, микоплазмы, хламидии, гонореи, кандиды, гарднереллы, трихомонады осуществляли путем забора материала из цервикального канала цитологической щеточкой (Cytobrush). Титр более 10^4 геном-эквивалентов (ГЭ) для условно-патогенных инфектов считали диагностическим.

Гистологическое исследование. Проводилась световая (обзорная) микроскопия биоптатов эндометрия, полученных при биопсии эндометрия на 20-22 день менструального цикла. Материалы биоптатов эндометрия для гистологического исследования фиксировали в 10% нейтральном формалине, заключали в парафин, делали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Carl Zeiss Primo Star.

На гистологических препаратах оценивалась структура эндометрия (состояние стромы, железистого аппарата, соответствие эндометрия фазе менструального цикла, развитие сосудов стромы эндометрия). В ворсинчатом хорионе анализировались морфологические особенности стромы ворсин, трофобластического эпителия и элементы эмбрионально-ворсинчатого кровотока. Диагностировались воспалительные изменения, острые нарушения кровообращения и дистрофические изменения в исследуемых структурах.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование эндометрия проводилось на 20-22 день 28-дневного менструального цикла. Определялось состояние рецепторного аппарата, локального иммунитета, пролиферативной активности, апоптоза, ангиогенеза, лимфоангиогенеза, рецептивности эндометрия. Для ИГХ-исследования использовали двухэтапный стрептавидин-биотин-пероксидазный

метод с демаскировкой антигена и применением стандартных наборов моноклональных и поликлональных антител фирмы «Bond RTU Primary» и «DAKO», США. На парафиновых срезах по стандартной методике с предварительной демаскировкой антигенов в СВЧ-печи с использованием соответствующих стандартных антител выявляли следующие маркеры: ERα, PR, p53, bcl-2, CD34, CD3, CD20, CD138, CD56, Ki67, p16, VEGF-A, VEGFR-1, CD62L, M-CSF, HIF-1alpha, LIFR, LIF, Noxa. Проявление реакции осуществлялось системой визуализации «Dako Cytomation». Для визуализации первичных антител использовали безбиотиновую систему детекции Super Sensitive Polymer-HPR Detection System (Biogenex). Для иммуногистохимического исследования использовали серийные парафиновые срезы. Результаты реакции рецепторов к эстрогенам и прогестеронам идентифицировались по ядерному или мембранному окрашиванию клеток для соответствующих маркеров с оценкой процента окрашенных клеток и интенсивностью окраски клеток. Экспрессию рецепторов к эстрогенам и прогестеронам оценивали по 3-балльной шкале (слабая, средняя и выраженная степени). Для оценки уровня экспрессии антигенов Ki-67, bcl-2, p16, NOXA в железах подсчитывались индексы пролиферации и апоптоза – отношение количества окрашенных ядер клеток к общему числу ядер в процентах при подсчете не менее 400 ядер. Экспрессия Ki-67, bcl-2, p16, NOXA в строме оценена путем подсчета количества окрашенных ядер в поле зрения при увеличении 400, при этом изучали не менее 10 полей зрения. Экспрессию CD3, CD20, CD56, CD138 оценивали путем подсчета позитивно окрашенных клеток в поле зрения при увеличении 400 при подсчете не менее 10 полей зрения. Экспрессию CD34, HIF-1α, VEGF-A и VEGF-R определяли в эпителии, строме эндометрия и эндотелии сосудов. Активность проявлялась в виде окрашивания мембраны и цитоплазмы эпителиальных и эндотелиальных клеток. Экспрессию CD62L, M-CSF, LIF, LIF-R определяли на мембранах клеток поверхностного эпителия желез эндометрия путем подсчета количества окрашенных клеток в поле зрения при увеличении 400, при этом изучали не менее 10 полей зрения. Для анализа результатов ИГХ реакций использовали метод гистологического счета H-score по формуле: HS =1a+2b+3c, где a – % слабо окрашенных клеток, b – % умеренно окрашенных клеток, c – % сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах.

Сканирующая электронная микроскопия эндометрия. Для исследования в трансмиссионном электронном микроскопе эндометрий в течение 30 мин при 37°C центрифугировали с 2,5% раствором глютарового альдегида на 0.1M фосфатном буфере (pH7.2). Глютаровый альдегид добавляли в соотношении 20:1. Центрифугирование проводили в течение 15 мин при 1000 об\мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 1-2 мл глютарового альдегида. Фиксация продолжалась от 60 мин до 7 суток (Holstein, Roosen-Runge, 1981). Далее материал промывали фосфатным буфером, фиксировали 1% осмиевой кислотой на фосфатном буфере, обезвоживали в серии спиртов (50° - 5 мин, насыщенный раствор уранилацетата в 70° спирте - 12-14 час, 96° спирт - 1 час, 100° - 1 час, абсолютный ацетон - 30 мин). Заливку производили в смесь эпон-аралдит

(Mollenhauer, 1964) после предварительной пропитки в 3 смесях эпоксидной смолы и ацетона (1:2, 1:1, 2:1) по 1 часу при 20°С. Полимеризацию осуществляли 24 час при 37°С и 24 час при 56°С. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме UltraCutl 11, окрашивали цитратом свинца (Mi Honig, 1961) и изучали в электронном микроскопе JEM 100S. Для исследования в сканирующем электронном микроскопе часть материала после обезвоживания высушивали в критической точке возгонки углекислоты и просматривали в растровом электронном микроскопе «Hitachi-S350», Япония. Оценивались наличие пиноподий, степень их развития в соответствие с фазой менструального цикла, состояние секреторных клеток, морфология ресничных клеток, величина межклеточных контактов. Ультраструктурное исследование эндометрия проводилось совместно с «Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова», НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского (директор – академик РАН Скулачев В.П.), отдел электронной микроскопии (руководитель д.б.н., проф. Брагина Е.Е.).

Молекулярно-генетические методы исследования. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК женщин и продуктов их зачатия, выделенные с использованием коммерческих комплектов реагентов «Цитолизин» ТУ 9398-108-01897593-10, и образцы ДНК плодов, полученные из ворсин хориона с применением коммерческих наборов реагентов «Сорб С» и протоколов для выделения ДНК фирмы ООО «ИнтерЛабСервис», Россия. Для оценки количества выделенной геномной ДНК использовали набор реагентов «КВМ», предназначенных для контроля взятия материала для метода ПЦР (НПО «ДНК-Технология», Россия). В исследование брали не менее 1,0 нг геномной ДНК на реакцию. Исследовали следующие полиморфные варианты генов: гены рецепторов половых стероидов: ESR1 351A > G (rs9340799, xbal), ESR1 397T > C (rs2234693, Pvull), PGR 660 A>G (rs1042838), гены регуляции эндотелиальной функции: NOS3 786T>C (rs2070744), NOS3 894G>T (rs1799983), гены регуляции ангиогенеза: VEGF-A 936 C>T (rs 3025039), VEGF-A -634 G>C (rs 2010963), гены тромбофилии: PAI-1 675 4G/5G (rs 1799889), ITGA3 1565 T/C (rs5918), ITGA2 807 C/T (rs1126643). Образцы ДНК выделяли из свежей цельной крови, взятой в количестве 2 мл в одноразовую пробирку с 0,1 мл 6%-ного ЭДТА, используя комплект для выделения ДНК лейкоцитов цельной крови «Цитолизин» (Россия ТУ 9398-108-01897593-10). Затем проводили аллель-специфичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в «режиме реального времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации с использованием комплекта реагентов и протоколов фирмы ООО «ТестГен» (Россия). Детекция и интерпретация результатов исследования осуществлялась программным обеспечением прибора ДТ-96 производства НПО «ДНК-Технология».

Иммуноферментный анализ. Содержание маркеров функционального состояния эндотелия и регуляторов ангиогенеза в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с рекомендациями производителей наборов реагентов. Детекцию проводили на иммуноферментных анализаторах «Wallac 1420 (Victor2)» фирмы «PerkinElmer» (Финляндия) и

«Multiskan MCC/340» фирмы Labsystems (Финляндия). Уровень сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF-A) определяли с помощью коммерческих тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия). Определение эндотелина-1 проводилось на аппарате «Multiskan MCC/340» фирмы «Labsystems» (Финдляндия) с помощью наборов «Biomedica» (Австрия) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты оценивались по величине отклонения исследуемого образца от стандартного значения в мкмоль/л. Исследование уровней общего и эндотелиального оксида азота выполнялось с использованием наборов реагентов фирмы «R&DSystems» (США/Канада) на аппарате Tecan (Sunrise, Австралия). Концентрированный раствор нитрат редуктазы разводился деионизированной или дистиллированной водой при комнатной температуре до объема 300мл. Все исследуемые образцы и стандартные растворы дублировались. Показатели оптической плотности исследуемых образцов сравнивались со стандартными кривыми в дубликате. Результаты оценивались по величине отклонения исследуемого образца от стандартного значения в мкмоль/л.

Масс-спектрометрический метод использовался для оценки стабильности молекул препаратов Filgrastim® и Ингарон® до и после воздействия на них ультразвука частотой 25 кГц в течение 5 минут. Анализ растворов проводился методом прямой инжекции анализируемых смесей в режиме электрораспылительной ионизации при детектировании положительных ионов. Масс-спектры записаны на квадрупольно-времяпролётном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения maXis impact HD, Bruker Daltonik GmbH. После вскрытия ампулы 0,04 или 0,08 мл раствора переносили во флакон, разводили водой (вода для инъекций 0,2 мл), добавляли ацетонитрил (0,2 мл) и пропионовую кислоту (0,1 мл). Через 10-15 мин. после приготовления раствор вводили в источник масс-спектрометра при скорости 240 мкл/ч с помощью шприцевого насоса модели 100 (фирма KD Scientific Inc., Holliston, MA). Регистрировали положительные ионы в режиме электрораспыления (ESI) со стандартным источником ионизации в диапазоне масс от 50 до 6000 Da в модифицированном предустановленном методе «Tune_pos_High» с оптимизацией чувствительности для области высоких масс. Калибровка масс – внешняя НРС, по сигналам калибровочной смеси G1969–85000 (Agilent Technologies). Обработку масс-спектров проводили в программном пакете Compass for oTOF series 1.7 (oTOF Control 3.4; Bruker Compass Data Analysis 4.2). Исследование выполнялось совместно с институтом органического синтеза УрО РАН (руководитель д.х.н., академик В.Н. Чарушин), группа хроматомасс-спектрометрии (руководитель к.х.н. И.Н.Ганебных).

Математические методы. Статистическую обработку результатов иследований проводили с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel» (2010), «StatSoft Statistica 10.0» (StatSoft, США), SPSS Statistics версия 22.0 (IBM Microsoft, США). В случае подчинения распределения признака закону нормального распределения данные представляли в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков в

независимых группах осуществляли с использованием процедуры однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). При отклонении распределения признака от закона нормального распределения, данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, P25-P75). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (Kruskel-Wallis), при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков в зависимых группах (до и после лечения) осуществляли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное значение и относительную величину в процентах, проверку статистических гипотез осуществляли с использованием критерия хи-квадрат ($\chi 2$). Критический уровень значимости различий (p), при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, устанавливали равным 0,025 (критерий Краскела-Уоллиса) и $p<0,05$ (критерий Вилкоксона). Для выявления взаимосвязи переменных проводили расчет коэффициента ранговой корреляции по Спирмену. Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия $\chi 2$, а также при сравнении с параболой DeFinetti. Различия по частоте аллелей и генотипов между группами оценены критерием $\chi 2$ Пирсона. Для оценки ассоциации генотипов и аллелей с преэклампсией рассчитаны отношения шансов (odds ratio, OR) с 95 % доверительным интервалом (confidence interval, CI). Зависимость чувствительности и специфичности классификации функции прогноза исследовали методом ROC-анализа. Для построения модели прогноза использовались методы линейной регрессии и дискриминантного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Социально-биологический портрет женщин с репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия: старший репродуктивный возраст (60,86%), высшее образование (91,77%), служащие (83%), имеющие «опыт» повторных репродуктивных неудач (74,39%).

Антропометрические особенности женщин, рожденных с низким весом, характеризуются формированием к возрасту пубертатного периода пограничено высокого индекса массы тела (24,3 (22,41 - 26,19) кг/см^2), который сохраняется на протяжении жизни женщин (27,3 (21,56 – 28,5) кг/см^2), определяя ее соматическое и репродуктивное здоровье (рисунок 2).

Наследственность пациенток групп наблюдения, рожденных с низким весом, наиболее часто была отягощена сахарным диабетом (31,3%) и артериальной гипертензией (64,9%), а сердечно-сосудистые заболевания (34,61%), ожирение (19,3%) и болезни свертывающей системы крови (15,38%) определяют их соматический портрет [25,27].

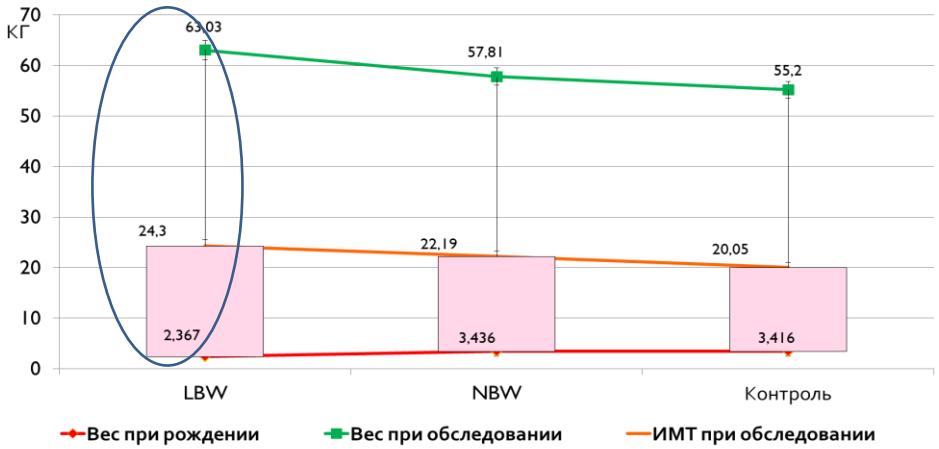


Рисунок 2 – Динамика антропометрических данных девочек-подростков

Становление менструальной функции у пациенток, рожденных с низким весом, характеризуется ранним менархе (10,88±0,31 лет), опережением темпов и дисгармоничным характером полового развития (Ma4,28±0,16; Ax4,02±0,16; Pb3,96±0,21; Me10,94±0,31), дебютом менархе с аномальных маточных кровотечений, которые отличаются длительным рецидивирующим течением (57,4%) [12]. В репродуктивном возрасте менструальная функция женщин с рефрактерным эндометрием характеризуется гипоменструальным синдромом (64,23%) с нарушением ритма менструаций (31,42%) и альгодисменореей (21,21%).

Основной нозологией, формирующей клиническую картину «тонкого» эндометрия, является хронический эндометрит, с равной частотой реализации при бесплодии (68,47%) и невынашивании беременности (63,63%). Структура органических поражений матки, приводящих к нарушению рецептивности эндометрия, представлена синдром Ашермана в 76,92%, пороками развития матки (7,69%), субмукозной миомой матки (15,39%).

Длительная персистенция условно-патогенной и патогенной микрофлоры характерна для пациенток с привычным невынашиванием беременности; в то же время в половине случаев наблюдений: 44,56% пациенток с бесплодием и 66,44% пациенток с невынашиванием беременности, выделить возбудителя заболевания не удалось [2,3].

Доминирующее положение в структуре ранних репродуктивных потерь у пациенток с «тонким» эндометрием принадлежит неразвивающейся беременности (63,83%) [1,15]. Показана высокая частота хирургического аборта в анамнезе у пациенток с бесплодием (40,21%), ассоциированным с «тонким» эндометрием.

У половины (48,88%) женщин с привычным невынашиванием беременности на фоне гипоплазии эндометрия постепенно формируется вторичное бесплодие, которое является, как правило, исходом нескольких случаев неразвивающейся беременности. Вторичному бесплодию только у трети пациенток (35,48%) предшествовали роды, а у большинства женщин (64,52%) - серия медицинских абортов и неразвивающихся беременностей.

В структуре исходных причин бесплодия, ассоциированного с «тонким» эндометрием, ведущее место занимает трубно-перитонеальный фактор (34,78%),

однако в целом этиология бесплодия на фоне гипоплазии эндометрия носила сочетанный характер.

Среди пациенток, рожденных с низким весом, достоверно чаще, чем в других группах наблюдения, отмечалось первичное бесплодие (29,51%; p<0,01). В структуре причин бесплодия у них достоверно чаще выступали эндокринные факторы, что составило 26,9% против 6,06% у женщин, рожденных с нормальным весом (p=0,001). Повторные неудачные попытки ЭКО встречаются у 45,66% женщин с бесплодием и тонким эндометрием и только у 11,2% женщин с тонким эндометрием и привычным невынашиванием беременности (p=0,17).

Показатели тропных гипофизарных и периферических стероидных гормонов не имели достоверных различий в группах наблюдений и не выходили за пределы референсных интервалов. Отмечаемая тенденция к снижению уровня периферических стероидных гормонов в сыворотке крови пациенток с «тонким» эндометрием свидетельствует о снижении их овариальной продукции, происходящем у части пациенток [12].

При исследовании функции эндотелиальной системы у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста, страдающих АМК ПП, отмечались снижение концентрации стабильных конечных метаболитов оксида азота в сыворотке периферической крови. Так, концентрация общего нитрита (II) у девочек, рожденных с LBW, была достоверно ниже, чем в группе контроля (10,71 (6,89÷17,29) мкмоль/л против 18,39 (14,58÷23,62) мкмоль/л в контроле; p=0,003), в два раза был снижен уровень нитрита (III) NO_3 (9,47 (5,72÷14,56) мкмоль/л против 17,25 (12,88÷22,19) мкмоль/л в контроле; p=0,004), концентрация эндоглина – в 1,4 раза в сравнении с контрольными значениями (6,52 (4,58÷7,15) нг/мл против 9,13 (7,46÷10,14) нг/мл; p=0,001). Отмечались достоверно более низкие значения эндотелина-1 – 0,47 (0,42÷4,80) фмоль/мл, против 1,34 (0,45÷4,74) фмоль/мл в контрольной группе; p=0,015. Уменьшение содержания основных стабильных метаболитов NO в сыворотке периферической крови девочек, рожденных с низким весом, может свидетельствовать о наличии у них проявлений эндотелиальной дисфункции. При этом отмечался дисбаланс вазоконстрикторов и вазодилататоров, связанный не только со снижением концентрации стабильных метаболитов NO, но и уменьшении сывороточной концентрации эндотелина-1, продуцируемого эндотелиальными клетками [8, 12].

Оценка функционального состояния эндотелиальной системы женщин репродуктивного возраста, страдающих нарушением репродуктивной функции, обусловленной «тонким» эндометрием, продемонстрировала значительное снижение концентрации основных стабильных метаболитов NO в сыворотке периферической крови в группе женщин, рожденных с низким весом. Содержание общего нитрита (II) NO_2^- в основной группе женщин с LBW определялось статистически значимо ниже аналогичного показателя в группе контроля (14,34 (10,23÷20,83) мкмоль/л против 20,39 (14,58÷23,62) мкмоль/л; p=0,006); уровень эндогенного нитрита (II) NO_2^- был в 2 раза ниже такового в группе сравнения (1,54 (1,18÷2,24) мкмоль/л против 3,19 (1,28÷5,26) мкмоль/л; p=0,001) и в 1,6 раза ниже контрольных значений (1,54 (1,19÷2,24) мкмоль/л против 2,65 (2,24÷5,80)

мкмоль/л, p=0,003). Концентрация нитрата (NO_3^-) в сыворотке крови женщин с LBW имела ту же тенденцию к снижению, но отличия не были достоверными (таблица 27). Уровень эндотелина-1 в группах наблюдения достоверно не отличался, однако среди женщин с LBW медиана его была наивысшая [14].

Выявлено угнетение продукции индукторов ангиогенеза в группе LBW-женщин в 4,6 раза - 42,12 (15,36÷77,29) мкмоль/л против 195,05 (78,21÷301,85) мкмоль/л в контроле; p=0,001, и в группе NBW-женщин – в 3,5 раза в сравнении с контрольной группой 56,16 (28,12÷84,05) мкмоль/л против 195,05 (78,21÷301,85) мкмоль/л в контроле; p=0,001. Межгрупповые отличия концентрации антиангиогенного фактора - растворимого рецептора к VEGF, а также маркера аномального VEGF-независимого ангиогенеза - эндоглина достоверно не отличались в группах наблюдения [8].

Обусловленное эндотелиальной дисфункцией уменьшение биодоступности и дефицит эндогенного и общего оксида азота, связанное с этим изменение соотношения модуляторов сосудистого тонуса приводит к нарушению релаксации сосудов, увеличению периферического сосудистого сопротивления, гипоперфузии тканей, что может лежать в основе формирования «тонкого» эндометрия и нарушения его рецептивности [7,8].

Дисфункция эндотелия усугубляется дисбалансом факторов регуляции ангиогенеза и повышением чувствительности сосудов к вазопрессорным стимулам [7,8].

Генная сеть, включающая систему генов рецепторов половых стероидов, регуляторов ангиогенеза, эндотелиальной функции, гемостаза, регулирует процессы рецептивности эндометрия.

Выявлено, что носительство полиморфного аллеля С в локусе 786 гена эндотелиалной NO-синтазы у девочек, рожденных с низкой массой тела, ассоциировано с повышенным риском нарушения становления менструальной функции, проявляющееся аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода (OR=2,56; 95%CI 1,01-6,50; p=0,04), а в репродуктивном возрасте связано с повышенным риском формирования «тонкого» рефрактерного эндометрия и репродуктивными неудачами: для женщин с бесплодием OR=6,173 (1,83-20,83); p=0,001; для женщин с привычным невынашиванием беременности OR=4,902 (1,69-14,08); p=0,002 [13,18,22].

Определено, что носительство полиморфизма Pvull-CC ESR1 повышает риск нарушения становления менструальной функции, проявляющееся аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода (OR=4,58; 95%CI; 0,97-21,68; p=0,04), а в репродуктивном возрасте повышает риск развития привычного невынашивания беременности, обусловленного «тонким» эндометрием (OR=6,79 (1,94-23,75); p=0,01) [13,15,22].

Наличие у женщины и\или плода генотипа -936 CT или -936 TT гена VEGF-A повышает риск неразвивающейся беременности в первом триместре (OR=1,51,CL95%: 1-2,27, p=0,048), при этом риск формирования гиповаскуляризации или аваскуляризации ворсин хориона ассоциирован с

носительством у женщины генотипа -634 CC или -634 GC гена VEGF-A (OR=1,87, CL95% 1,02-3,44, p=0,04) [15].

Риск развития репродуктивных неудач, обусловленных гипоплазией эндометрия, ассоциирован с носительством полиморфного аллеля A гена VEGF 2578 C>A: для пациенток с бесплодием (OR=2,73 (1,36-5,45); p=0,01) и невынашивнием беременности (OR=4,61 (2,19-9,71); p=0,01) и с носительством полиморфного аллеля 675 4G (675 5G4G & 675 4G4G) гена PAI-1 675 5G>4G: для пациенток с бесплодием (OR=8,45 (3,96-18,21); p=0,0018) и невынашивнием беременности (OR=9,98(4,61-21,74);p=0,001) [22].

Проанализированы результаты гистологического исследования «тонкого» эндометрия пациенток групп наблюдения, полученных в период предполагаемого «окна имплантации». У 63,74% (116) пациенток отмечается картина выраженного 25,2% (46) или умеренного 38,5% (70) дисхронизма в трансформации желез эндометрия, наиболее часто сопряженная с отставанием в созревании желез, их неравномерным распределением в строме 53,85% (98) со скоплениями в периваскулярных областях, что может способствовать неравномерному формированию полей пиноподий и площадки для имплантции бластоцисты [19, 21].

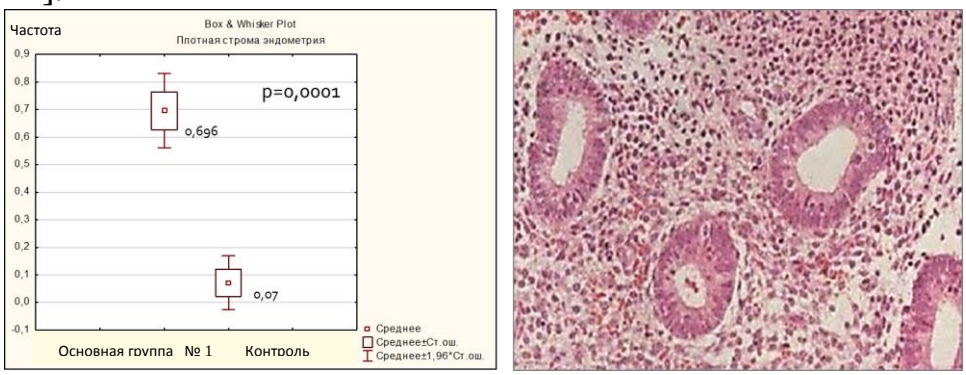


Рисунок 3 - Уплотнение стромального матрикса и его обеднение сосудистой сетью у пациентки с бесплодием и «тонким» эндометрием, 22 день цикла. Окраска гематоксилин и эозин, увеличение х 400

Признаки стромального фиброза определялись у 73,67% (134) пациенток с «тонким» эндометрием, против 10,71% (3) в контрольной группе (p=0,0001). Параллельно отмечалось обеднение васкуляризации стромального матрикса эндометрия у 36,95% (34) пациенток с бесплодием и 48,89% (44) с невынашиванием беременности на фоне гипоплазии эндометрия против 7,14% (2) в контрольной группе; p<0,01[15, 21].

У пациенток основных групп наблюдения достоверно реже в образцах эндометрия в период «окна имплантации» при световой микроскопии определялись пиноподии. Менее чем у трети пациенток с бесплодием - в 28,26% (26) случаев, и менее, чем у половины пациенток с привычным невынашиванием – в 40,0% (36) случаев при микроскопии в период «окна имплантации» определялись пиноподии (рисунок 4). В контрольных образцах эндометрия зрелые пиноподии определялись у 82,14% женщин, что достоверно выше, чем у женщин с бесплодием (p=0,008) и невынашиванием беременности (p=0,014) [19, 21].

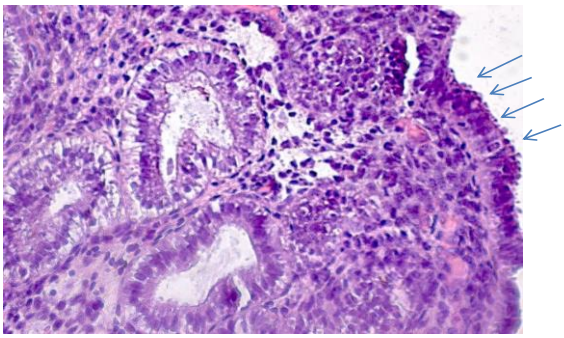


Рисунок 4 - Пиноподии на поверхности мембран желез эндометрия выражены слабо и представлены менее чем в половине клеток. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение х 400

Характерная морфологическая картина хронического эндометрита с лимфоидной инфильтрацией стромы, формированием микрополипов, достоверно чаще определялась у женщин с привычным невынашиванием беременности 73,33% (66), нежели у пациенток с бесплодием 32,61% (30); p=0,008. Это может свидетельствовать о наличии у них более длительного течения воспалительного процесса с наличием морфологических проявлений в виде исходов воспаления, а именно – стромального фиброза и склеротических изменений сосудов функционального слоя эндометрия, либо свидетельствовать о наличии других причин формирования «тонкого» эндометрия [2, 27].

Ультраструктурная морфологическая картина «тонкого» эндометрия в период «имплантационного окна» у пациенток с бесплодием (рисунок 5) характеризовалась высокой частотой гипоплазии и аплазии пиноподий (67,39±6,98% в группе с бесплодием, против 14,28±6,73% в контроле; p=0,001), наличием плотных межклеточных контактов между секреторными клетками эндометрия (69,56±6,90% против 7,14±4,95%; p=0,0001), гетероморфностью секреторных клеток (15,22±5,45%, в контроле не обнаружено; p=0,000) в сочетании с атипией клеток микроокружения (50,00±7,45% против 7,14±4,95% в контрольной группе; p=0,0001). У пациенток с невынашиванием беременности (рисунок 6), проблема связана с хронометрическим отставанием в созревании пиноподий (66,67±7,02% против 21,42±7,89%; p=0,001), асинхронном их развитии (46,67±4,73% против 14,28±6,73% в контроле; p=0,004), а также частом нарушении разобщения межклеточных контактов в период «имплантационного окна» (84,44±5,40% против 7,14±4,95% в контоле; p=0,0001). Зрелые пиноподии визуализировались в половине исследованных образцов эндометрия у женщин с невынашиванием беременности (55,56±7,41), однако их поля также располагались неравномерно, концентрируясь в основном в устьях маточных желез (рисунок 7) [21, 23].

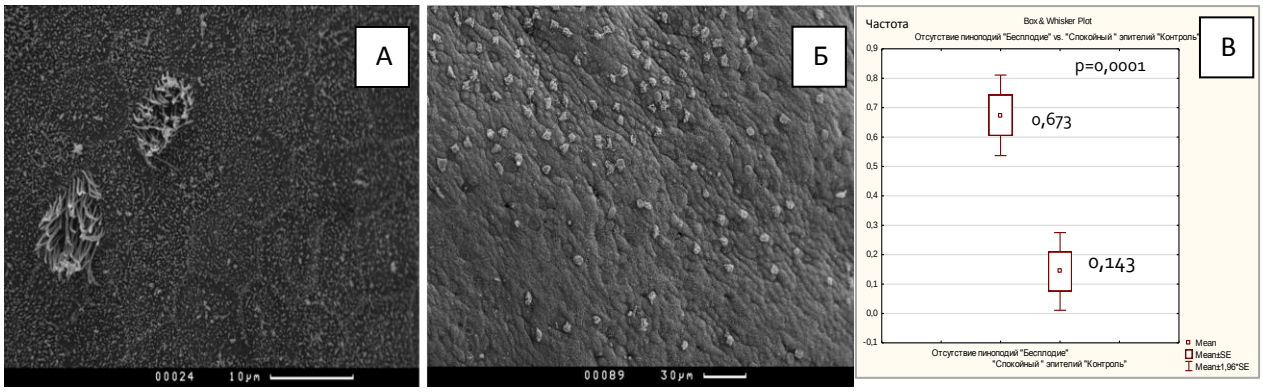


Рисунок 5 А, Б – Гладкая апикальная поверхность желез эндометрия и отсутствие пиноподий, плотные, хорошо выраженные межклеточные контакты. СЭМ поверхностного эпителия эндометрия. В – Распределение частот выявления аплазии и гипополазии пиноподий в имплантационном эндометрии у пациенток с бесплодием в сравнении с контрольной группой

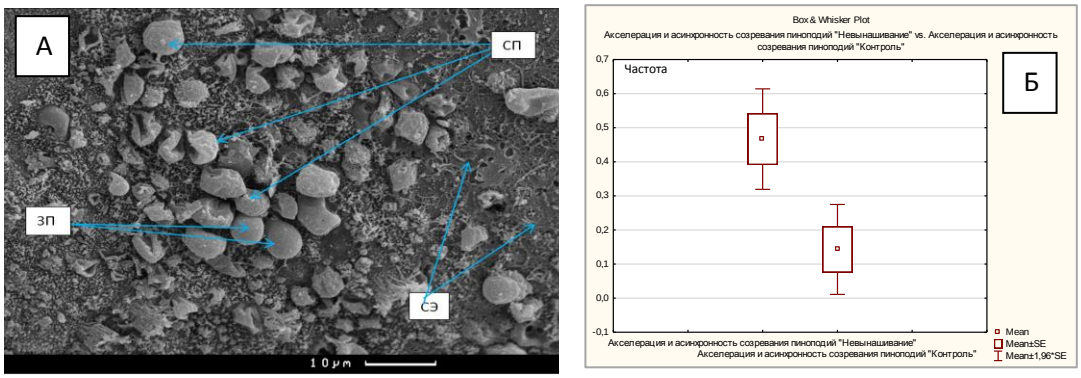


Рисунок 6 А - Асинхронность созревания пиноподий: поля «спокойного» эпителия (СЭ) сочетаются с островками зрелых (ЗП) и созревающих (СП) пиноподий. СЭМ поверхностного эпителия эндометрия. Б – Распределение частот выявления акселерации и асинхронности созревания пиноподий в имплантационном эндометрии у пациенток с привычным привычным невынашиванием беременности в сравнении с контрольной группой

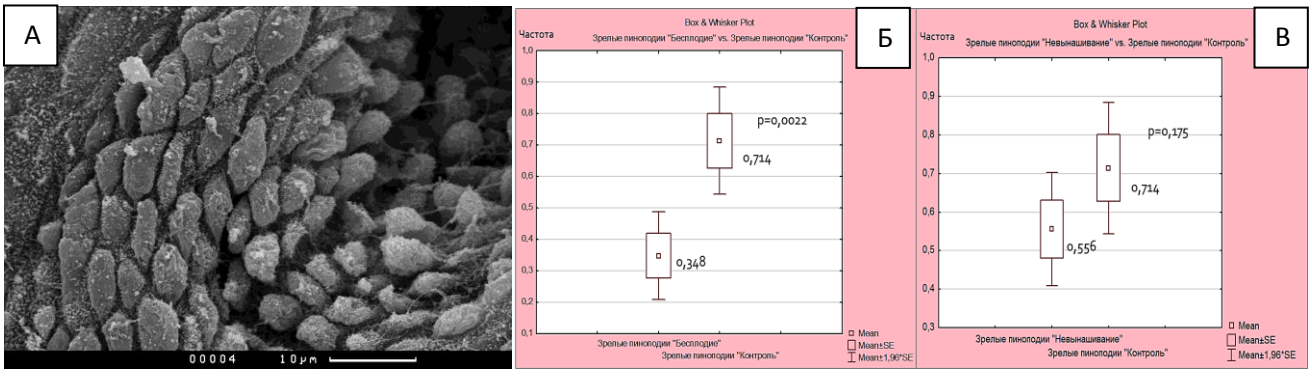


Рисунок 7 А - Зрелые пиноподии и неплотные межклеточные контакты в устье маточной железы. СЭМ поверхностного эпителия эндометрия. Б, В – Распределение частот выявления зрелых пиноподий в имплантационном эндометрии женщин групп наблюдения

Молекулярно-биологические механизмы нарушения стромальной секреторной трансформации «тонкого» эндометрия проявляются

гиперэкспрессией рецепторов к эстрадиолу-альфа (231,09±8,76 баллов против 95,53±15,30 баллов в контроле, p=0,004) (рисунок 8) [28], депрессией p53-зависимого апоптоза (34,86±5,68% против 81,81±7,68% в контроле; p=0,015) и повышением активности bcl-2 в строме и железах «тонкого» эндометрия (71,38±1,71% против 23,00±30,7% в контроле, p=0,009) [24].

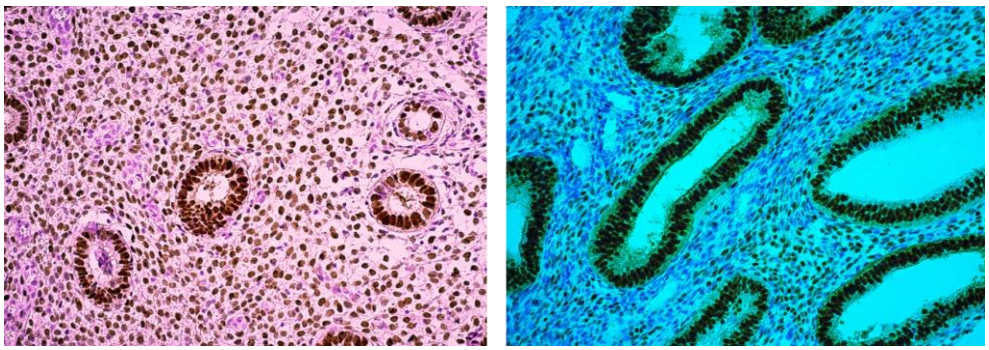


Рисунок 8 - Интенсивная экспрессия ERα в ядрах стромы и желез имплантационного эндометрия. ИГХ: моноклональные антитела к ERα, клон 6F11, 21 день цикла, увеличение х 400

Нарушение сосудистого ремоделирования «тонкого» эндометрия характеризуется бедной экспрессией в строме эндотелиальных маркеров CD34 (20,88±0,77 кл. против 37,99±1,23 кл. в контроле, p=0,016) и ангиогенных факторов роста VEGF-A (216,00±9,05 баллов против 268,00±10,38 в контроле; p=0,018) с формированием антиангиогенного статуса в эндометрии, определяемого снижением соотношения VEGF-A/VEFG-R1 (5,16±0,37 против 11,22±2,95 в контроле; p<0,05) [28].

Нарушение популяции иммунокомпетентных клеток в «тонком» эндометрии сопровождается бедной экспрессией CD56+ в строме (32,51±2,14 кл.п/зр против 47,8±2,13 кл.п/зр, p=0,016) и железах (7,32±1,12 кл.п/зр против 14,56±2,14 кл.п/зр, p=0,021) эндометрия у пациенток с бесплодием, что определяет низкий уровень стромального (68,06±3,90 против 185,56±4,31; p=0,012) и железистого пула (123,55±12,02 против 165,56±13,16; p=0,043) рецепторов к LIF и снижение экспрессии LIF (рисунок 9) в апикальных железах эндометрия (107,74±5,77 против 137,22±10,19; p=0,014).

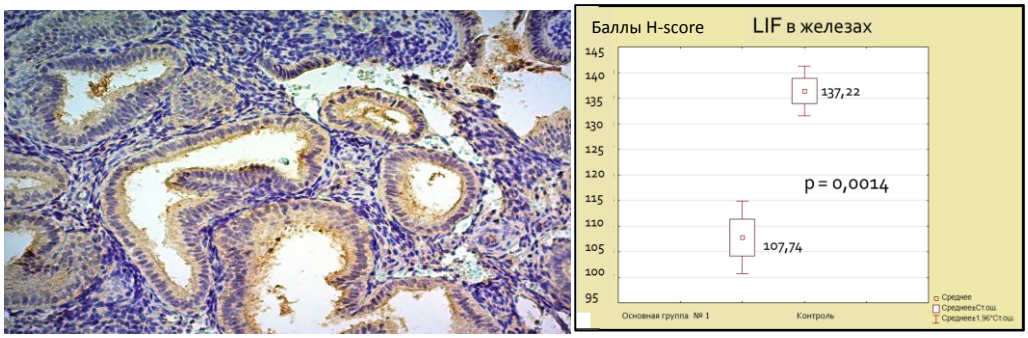


Рисунок 9 - Слабая цитоплазматическая экспрессия LIF в железах эндометрия при нарушении его рецептивных свойств; ИГХ – поликлональные антитела; увеличение х 400

У пациенток с привычным невынашиванием беременности, напротив, определяется высокий уровень экспрессии CD56+ в строме (77,86±1,24 кл.п/зр против 47,8±2,13 кл.п/зр, p=0,017) и железах эндометрия (28,74±1,16 кл.п/зр против14,56±2,14 кл.п/зр, p=0,034), определяющий его цитотоксичность [28].

Принципиальной особенностью рефрактерного эндометрия у женщин, рожденных с задержкой внутриутробного роста, является низкий уровень экспрессии ERα (82,5±22,01против 126,65±11,06; p=0,029) и PR (138,25±9,57 против 268,44±7,50; p=0,017) в строме «тонкого» эндометрия и более глубокий характер описанных выше нарушений при идентичной их направленности.

Одной из серьезных проблем является объективная диагностика рецептивности эндометрия. Методом дискриминантного анализа определены значимые иммуногистохимические параметры функционального состояния эндометрия, определяющие его рецептивность, и построено следующее прогностическое правило определения рецептивности эндометрия [26, Приоритетная справка № 2017120910 от 14.06.2017]:

$$d = -1{,}389\,x_1 + 0{,}022x_2 - 0{,}044x_3 - 0{,}019x_4 + 0{,}041x_5 + 0{,}006x_6 + 0{,}015x_7 - 3{,}248 \quad (1)$$

где: x_1 – индекс ER/PR в строме эндометрия (отношение баллов H-score для определения ядерной экспрессии ER и PR в строме),
x_2 – p53 в железах эндометрия (% окрашенных ядер в поле зрения),
x_3 – bcl 2 в строме эндометрия (% окрашенных ядер в поле зрения),
x_4 – CD56 + в строме эндометрия (% окрашенных клеток),
x_5 – Ki67 в строме эндометрия (% окрашенных ядер в поле зрения),
x_6 – LIF-R в железах эндометрия (баллы H-score),
x_7 – LIF в железах эндометрия (баллы H-score),
При $d > 0$ эндометрий характеризуется как рецептивный;
при $d \leq 0$ эндометрий характеризуется как нерецептивный. Чувствительность метода составляет 91,3%, специфичность 93,7%.

С целью изучения диагностической значимости УЗИ в оценке рецептивности эндометрия проведен корреляционный анализ ультразвуковых критериев эндометрия и клинических, гистологических и ультраструктурных характеристик эндометрия, определяющих его рецептивность. Не получено достоверных корреляционных связей между толщиной М-Эхо и плотным характером стромального компонента эндометрия (p=0,47), равномерным распределением желез (p=0,56) и наличием зрелых пиноподий как по данным световой микроскопии (p=0,32), так и по данным СЭМ (p=0,40) [26]. Таким образом, толщина М-Эхо не может считаться достаточным критерием, определяющим состояние рецептивности эндометрия. Достоверную диагностическую ценность имеет определение эхо-структуры эндометрия в период «имплантационного окна». Наличие трехслойной эхоструктуры эндометрия положительно коррелировало со своевременным созреванием желез (r=0,33; p=0,000), и напротив, отрицательно коррелировало с признаками диссинхронизма (отставание/опережение) в созревании желез эндометрия (r= -0,17; p=0,025), имела положительную корреляцию с васкуляризацией стромы (r=0,197; p=0,008) и наличием зрелых пиноподий по данным световой

микроскопии (r=0,174;p=0,02). Достоверные отрицательные корреляции получены с гипоплазией и асинхронизмом в созревании пиноподий по данным СЭМ (r= -0,210; p=0,004) [26]. Таким образом, трехслойная эхо-структура эндометрия может свидетельствовать о правильном ритме созревания желез эндометрия, структурных перестройках апикальной поверхности мембран желез и стромальной трансформации эндометрия в период «имплантационного окна», определяющих его рецептивность.

Наибольшее диагностическое значение в интерпретации рецептивных свойств эндометрия по данным ультразвукового исследования имеет перистальтика эндометрия. Наличие перистальтики эндометрия сильно положительно коррелировало с толщиной М-эхо (r=0,155; p=0,035), структурой и толщиной JZ (r=0,138; p=0,009), секреторной трансформацией желез эндометрия (r=0,718; p=0,000), выраженностью сосудистого компонента стромы (r=0,210; p=0,004) и ультраструктурными характеристиками пиноподий (r=0,360; p=0,000) [26]. Таким образом, именно наличие правильной перистальтической волны (от внутреннего зева к дну матки) при проведении ультразвукового исследования является ультразвуковым критерием рецептивного эндометрия.

Чувствительность метода УЗИ в выявлении синехий в полости матки в сравнении с гистероскопической верификацией составила 26,31% (10/38). Специфичность метода составила 64,8%. Площадь под ROC-кривой составила 0,64±0,059 Cl95% [0,524÷0,756]; p=0,008 [26].

Слабая диагностическая способность УЗИ в определении внутриматочных синехий диктует необходимость проведения гистероскопии для верификации диагноза при подозрении на любую внутриматочную органическую патологию. По нашим данным проведение диагностической гистероскопии у пациенток с репродуктивными неудачами на прегравидарном этапе после завершения терапии увеличивало шанс наступления беременности ($\chi 2$=5,613; OR=2,430 Cl95% [1,151 ÷ 5,128]; p<0,05) [26].

Структура микробиоты эндометрия пациенток в зависимости от репродуктивных исходов представлена на рисунке 10.

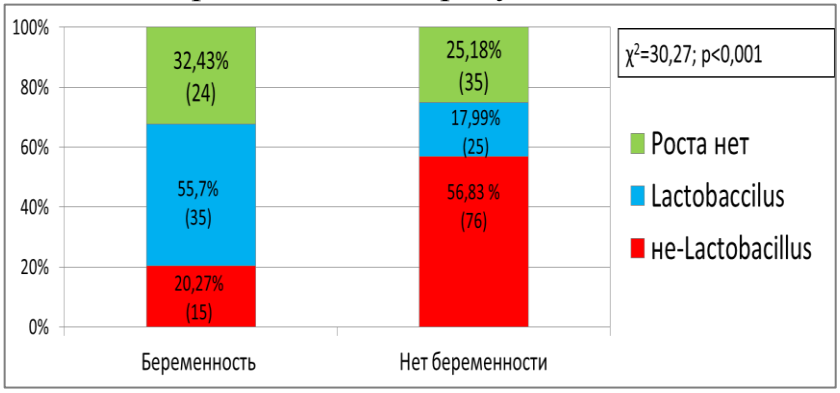


Рисунок 10 - Сравнительный анализ микробиоты эндометрия в зависимости от репродуктивных исходов, (n=210; %)

По данным многомерного факторного анализа выявлена достоверная зависимость репродуктивных исходов пациенток групп наблюдения от характера микробиоты эндометрия ($\chi 2$=30,27; p<0,001). Наличие бактерий не-Lactobacillus в

эндометрии коррелирует с негативными последствиями для репродуктивной функции и может рассматриваться как отдельная причина нарушения рецептивности эндометрия, неудач имплантации и потерь беременности [26].

Представленные данные диктуют необходимость исследования микробиома эндометрия в комплексе диагностических мероприятий по поводу нарушения рецептивности эндометрия. Повторное исследование микробиома эндометрия оправдано в случае отсутствия клинического эффекта от терапии и негативных результатах обследования вагинальной микрофлоры.

На основании проведенных исследований нами разработан алгоритм диагностических мероприятий у пациенток с маточным фактором бесплодия и невынашивания беременности (рисунок 11) [26].

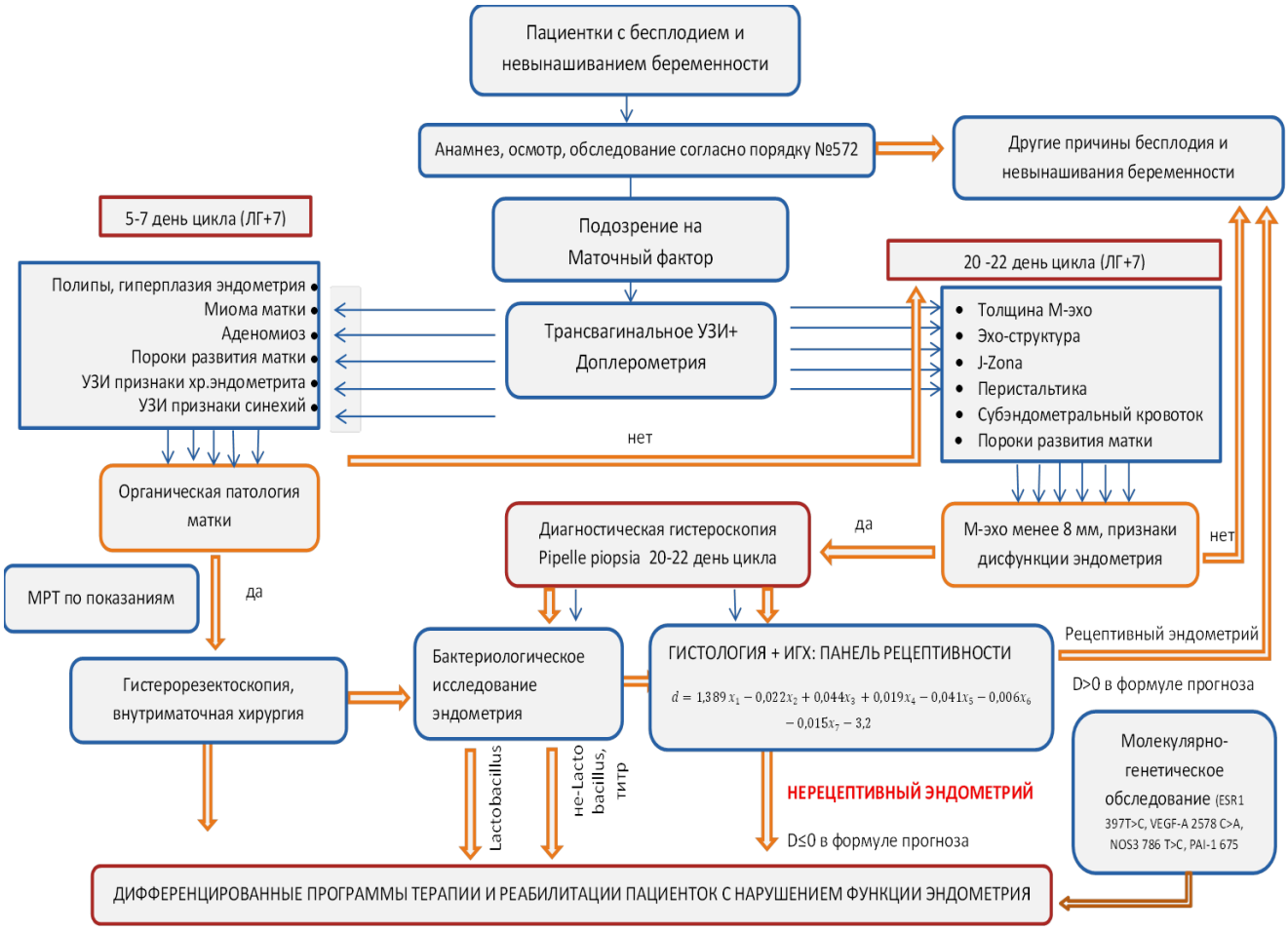


Рисунок 11 - Алгоритм обследования пациенток с маточным фактором бесплодия и невынашивания беременности

Разработанная индивидуализированная программа терапии (рисунок 12), включала хирургическую коррекцию органической внутриматочной патологии, персонифицированный подход к выбору гормональной терапии, элиминацию патогенной микрофлоры и внутриматочные орошения кавитированнымии растворами, с клинически обоснованным выбором лекарственного препарата [31].

	Бесплодие + LBW		Бесплодие + NBW		Привычное невынашивание + LBW		Привычное невынашивание + NBW	
ИГХ	CD138+	CD138-	CD138+	CD138-	CD138+	CD138-	CD138+	CD138-
Антибактериальная терапия	Антибактериальная терапия при наличии патогенного возбудителя в титре более чем 10^5 КОЕ/мл по чувствительности микробного агента							
Циклическая гормональная терапия 3 – 4 мес	Трансдермально эстрадиол 2-4 мг/сут Дидрогестерон 20 мг/сут либо микронизированный прогестерон 200-400мг		Трансдермально эстрадиол 1-2 мг/сут Дидрогестерон 20 мг/сут либо микронизированный прогестерон 200-400мг		Трансдермально эстрадиол 2-4 мг/сут Дидрогестерон 30-40 мг/сут либо микронизированный прогестерон 400-600мг		Трансдермально эстрадиол 1-2 мг/сут Дидрогестерон 30-40 мг/сут либо микронизированный прогестерон 400-600мг	
НУЗО: физ.раствор	+	+	+	+	+	+	+	+
НУЗО: антисептик			+				+	
НУЗО: физ.раствор + INFɣ	+				+			
НУЗО: глюкоза 5% + G-CSF		+		+		+		+
Молекулярное исследование	Наличие полиморфных генотипов генотипов PAI 675 4G>5G, NOS3 786 T>C, VEGF-A 2578 C>A					Низкий генетический риск тромбофилии и эндотелиальной дисфункции		
Гепариноиды ± НМГ/дезагреганты	Сулодексид 500-1000 мг/сутки под контролем коагулограммы 3-4 мес до зачатия, при неэффективности – в сочетании с НМГ и/или дезагрегантами							

Рисунок 12 - Программа индивидуализации лечебной тактики при гипопластических процессах эндометрия

Элиминация патогенной микрофлоры репродуктивного тракта проводилась при выявлении ее в посевах из матки в диагностически значимом титре в соответствии с чувствительностью к антибактериальному препарату с параллельными мероприятиями по реабилитации микробиоценоза репродуктивных органов (фунгицидные средства по показаниям, препараты лактобактерий).

Циклическая гормональная терапия включала трансдермальное применение эстрадиола в дозе 1-4 мг/ сутки (максимальная суточная доза до 6 мг/сутки) с 5 по 25 день цикла, а также поддержку лютеиновой фазы цикла с применением дидрогестерона 20-40 мг/сутки либо вагинальных форм микронизированного прогестерона 200-600 мг/сутки [31].

При назначении циклической гормонотерапии следует учитывать вес пациентки при рождении, ИМТ на момент осмотра и характер нарушения репродуктивной функции. Более высокая доза трансдермального эстрадиола (2-4 мг/сут) показана пациенткам с низким весом при рождении (LBW), страдающим бесплодием и привычным невынашиванием беременности, на фоне «тонкого» эндометрия, а также, больным синдромом Ашермана. Пациенткам, страдающим привычным невынашиванием на фоне гипоплазии эндометрия, показаны средние дозы эстрадиола и более высокие дозы гестогенов: дидрогестерон 30-40 мг/сутки,

либо 400-600 мг вагинального микронизированного прогестерона. Продолжительность циклической гормональной терапии должна составлять 3-6 месяцев [29].

В комплексе восстановления и реабилитации «тонкого» эндометрия важное место занимают процедуры кавитационного ультразвукового орошения полости матки лекарственными растворами. Процедуры проводили в фолликулярную фазу цикла, начиная на 7-9 день курсом из 5-7 процедур, продолжительностью 5 минут. Для орошения использовали аппарат «Фотек» АК 100 – 25 с усовершенствованным внутриматочным наконечником АА- 211 в режиме «селект» с частотой 25 кГц скоростью потока лекарственного вещества 100 мл/мин. Пациенткам после неразвивающейся беременности орошения начинали с 3 дня после опорожнения полости матки, используя те же физические параметры [29, 30]. Пациенткам с синдромом Ашермана кавитационное орошение полости матки начинали с 3 дня после внутриматочной хирургии, используя описанные выше физические параметры [29].

Кратность курсов процедур определялась индивидуально и составляла не менее 3 курсов по 5-7 процедур для пациенток с маточным фактором бесплодия и синдромом Ашермана и не менее 2 курсов по 5-7 процедур для пациенток с привычным невынашиванием беременности [29, 30, 31].

Выбор лекарственного вещества для орошения полости матки осуществляли исходя из клинической ситуации. Стартовым лекарственным препаратом для орошения являлся физиологический раствор – 0,9% раствор натрия хлорида. Эффект орошения в данном случае определяется физическими факторами воздействия на биологические ткани ультразвуковых волн [30,31].

Пациенткам с выявленным по данным ИГХ CD138+ проводили первый курс орошений раствором антисептика, последующие – физиологическим раствором. Пациенткам с выявленным по данным ИГХ CD138+, рожденным с низким весом, в особенности имеющим в этиологии эндометрита хламидийную, микоплазменную и вирусную инфекции [11, Приоритетная справка № 2017120908 от 14.06.2017], было обосновано проведение курса орошений с раствором интерфероном гамма (Ингрон®, РЛС № ЛС-001330, 2010-08-27) в дозе 500 000 МЕ в разведении на 400 мл физиологического раствора 5 процедур. Пациенткам, эндометрий которых не экспрессирует CD138-, проводили 1-2 курса орошений физиологическим раствором, а затем однократный курс орошений раствором Филграстима® (РЛС № П N011221/02 2005-10-14) в дозе 300мкг/мл в разведении 6 мл препарата на 200 мл 5% раствора декстрозы [28, Приоритетная справка № 2017120906 от 14.06.2017].

Проведенный масс-спектрометрический анализ молекул действующих веществ лекарственных препаратов Filgrastim® и Ингарон ® до и после их обработки низкочастотным ультразвуком в спектре диапазона 20-25 кГц в течение 300 секунд свидетельствовал о стабильном состоянии молекул и отсутствии их фрагментации на фоне ультразвукового воздействия [28].

Оценка эффективности разработанной программы проводилась путем проспективного сравнительного контролируемого исследования двух вариантов

наблюдения женщин с репродуктивными неудачами, ассоциированными с «тонким» эндометрием. Стандартная программа (СП) предполагала общеклиническое обследование, при отсутствии противопоказаний назначение циклической гормональной терапии в сочетании с антибактериальной терапией при верификации патогенного возбудителя бактериоскопическим методом в отделяемом из цервикального канала в диагностически значимом титре по чувствительности к нему препарата, с последующим клинико-лабораторным наблюдением. Индивидуализированная программа лечебно-диагностических мероприятий (ИП) описана выше.

На фоне стандартной программы терапии (СП) статистически значимого снижения частоты нарушений ритма менструаций и увеличения продолжительности менструальных выделений не отмечалось, но наблюдалось снижение частоты гипоменструального синдрома (до лечения - 40,32% (25), после лечения - 17,74% (11); p=0,012). Частота вторичной аменореи на фоне СТ сохранялась на прежнем уровне (9,68% (6) - 8,06% (5); p>0,05). Применение ИП способствовало нормализации ритма менструаций у 98,9% пациенток. Увеличилась средняя продолжительность менструаций (от 3,99±0,16 дней до 5,65±0,15; p=0,042), и ее объем, таким образом достоверно снизилось число пациенток, предъявляющих жалобы, характерные для гипоменструального синдрома (36,81% (67) против 3,29% (6); p=0,001). Удалось добиться купирования вторичной аменореи у всех пациенток, получавших ИП терапии. Частота альгодисменореи на фоне ИП снизилась в два раза 21,98% (40) - 10,99% (20); p=0,012. В то же время изменения частоты альгодисменореи на фоне СП терапии не отмечалось [9, 28].

По данным УЗИ на фоне СП и ИП терапии происходит увеличение толщины М-Эхо, однако его достоверное увеличение получено только в группе пациенток, получивших ИП (от 5,08±0,38 мм до 9,19±0,37 мм; p=0,001). После лечения по ИП средний показатель М-Эхо статистически неотличим от контрольных значений (9,19±0,37 мм против 10,17±0,45 мм; p>0,05), в то время как средний показатель М-Эхо в группе пациенток, получивших СП не достигает целевых значений 8 мм и продолжает оставаться статистически значимо ниже контрольных значений (7,01±0,47 мм против10,17±0,45 мм; p=0,015). Средний прирост толщины эндометрия на фоне СП значимо ниже, чем на фоне ИП терапии (1,43±0,12 мм против 4,11±0,11мм; p=0,001). Частота визуализации неоднородной эхо-структуры у пациенток на фоне ИП терапии снизилась в десять раз (28,57% - 2,19%; p<0,001), частота локации гиперэхогенных сигналов в области базальной мембраны эндометрия снизилась в семь раз (35,71% - 5,49%; p<0,001), гиперэхогенной линии смыкания листков эндометрия – в 3,5 раза (40,21% - 12,09%; p<0,001). Восстановление трехслойного паттерна эндометрия продемонстрировали 90% (162) пациенток группы ИП терапии и только 65% (40) женщин, получивших СП лечения. Эффективность ИП терапии в восстановлении перистальтики эндометрия в два раза выше, чем СП терапии: 77,47% против 32,36%; p=0,01 [9].

На фоне проведения ИП терапии визуализация концевых ветвей артериального сосудистого дерева матки (базальные и спиральные артерии) статистически значимо улучшилась (от 17,58% (32) до 69,23% (126); p=0,001) и приблизилась к показателям фертильных здоровых женщин (75,0% (21); p>0,05). Распределение кровотока в ЦДК стало равномерным. После применения ИП терапии отмечается статистически значимое снижение индекса резистентности (0,93±0,11 против 0,48±0,14; p=0,04) и систоло-диастолического соотношения в этих сосудах (2,11±0,13 против 1,54±0,17; p=0,37), что свидетельствует об увеличении кровотока в дистальных артериальных ветвях маточного сосудистого дерева после ИП терапии. На фоне СП терапии также наблюдалось снижение среднего показателя RI в спиральных артериях, не достигающее уровня достоверности (от 0,92±0,36 до 0,62±0,28; p>0,05).

Изменение количественного и качественного состава вагинальной микробиоты по данным ПЦР Real-Time после завершения ИП терапии демонстрирует достоверное повышение количества Lactobacillus spp., снижение в 2 раза содержания Streptococcus spp., в 5 раз - концентрации Gardnerella vaginalis, Porphyromonas spp., Prevotella bivia, в 1,8 раз уровня Eubacterium spp. и в 4,6 раза - Ureaplasma (urealyticum+parvum). Во всех основных группах наблюдения удалось добиться абсолютной элиминации патогенных возбудителей: отмечалось достоверно значимое увеличение доли Lactobacills spp. в результатах посевов из полости матки. У пациенток группы с бесплодием (9,78% против 55,34%; p<0,017) и с привычным невынашивнием беременности (11,11% - 74,44%; p<0,017) удалось добиться доминирования лактофлоры в структуре микробиома эндометрия [3].

Анализ морфологической картины эндометрия в динамике СП показал, что увеличение числа образцов, демонстрирующих картину средней стадии фазы секреции – 80,43% в группе пациенток с бесплодием и 68,89% в группе пациенток с невынашиванием беременности (против 71,73% и 57,77% соответственно), после чего данные показатели достоверно неотличимы от контрольных значений 74,42% (p>0,05). На фоне СП отмечались как увеличение плотности сосудистой сети, так расширение просвета сосудов стромы эндометрия. Наиболее выраженные изменения коснулись пациенток группы бесплодия. Данные изменения наблюдались у 56,52% женщин с бесплодием (до лечения – у 36,95%) и 62,22% женщин с невынашиванием беременности (до лечения 48,89%), и достоверно не отличались от контрольных значений 78,57% (p>0,017). На фоне СП статистически значимых изменений частоты стромального фиброза эндометрия получено не было. В 43,47% образцов эндометрия у женщин с бесплодием после СП определялись пиноподии (до лечения 28,26%, p>0,017), в контроле – в 82,14%. У пациенток с невынашиванием беременности количество пиноподий в образцах эндометрия на фоне СП практически не изменилось – 44,44% (до лечения 40,00%, p >0,017) [19, 20].

На фоне комплексной ИП терапии большинство образцов эндометрия в период «окна имплантации» демонстрировали картину средней стадии фазы секреции - 82,61% в группе женщин с бесплодием, 71,11% в группе женщин с

невынашиванием (до лечения соответственно 71,73% и всего 57,77%), что сопоставимо с контрольными значениями 74,42% (p>0,017). После ИП у 73,91% женщин с бесплодием и 66,67% женщин с невынашиванием беременности удалось добиться морфологической картины стромальной децидуализации эндометрия (до лечения эти показатели составляли всего 21,73% и 28,89% соответственно p1=0,012, p2=0,008), что достоверно неотличимо от контрольных значений 85,71% (p>0,017). У 67,39% женщин с бесплодием и у 64,44% женщин с невынашиванием беременности на фоне ИП терапии в образцах эндометрия отмечалась адекватная васкуляризация стромы (до лечения 36,95% и 48,89% соответственно; в контроле 78,57%; p<0,017) [28].

Отмечалось достоверное увеличение пула зрелых пиноподий в образцах эндометрия в период «окна имплантации» у женщин с бесплодием по сравнению с исходной картиной (69,56% против исходного 28,26%, p=0,0015). У пациенток с невынашиванием беременности отмечалась та же тенденция, не достигшая, однако, уровня достоверности [31]. Полное восстановление морфофункциональной картины эндометрия, исчезновение периваскулярных и перигландулярных лимфоидных инфильтратов в строме эндометрия наблюдалось у 62,22% пролеченных женщин с привычным невынашиванием беременности (хронический эндометрит после комплексного лечения был верифицирован у 11,11%, против 73,33% до лечения, p=0,014). В группе женщин с бесплодием и хроническим эндометритом, нормализация морфофункциональной картины эндометрия произошла у 10,8% (исходно хронический эндометрит в этой группе женщин определялся у 32,61%, после комплексного лечения – у 21,73%, p>0,017; в контроле – 7,14%) [4,10,17].

По данным ИГХ отмечена нормализация пула ERα в строме и железах эндометрия в среднюю лютеиновую фазу цикла во всех группах наблюдения до уровня, статистически соответствующего контрольным значениям. При этом после лечения исчезают достоверные отличия в уровне экспрессии ERα в железах имплантационного эндометрия пациенток с бесплодием, которые отмечались до начала терапии (231,09±8,76 баллов, против 198,47±18,68 баллов в контроле, p=0,044 до лечения и 222,78±14,22 баллов против 198,47±18,68 в контроле, p>0,05, после терапии). Важным представляется повышение до уровня контрольных значений экспрессии рецепторов к прогестерону в строме эндометрия женщин с невынашиванием беременности в динамике терапии (247,97±10,17 баллов до лечения против 284,00±4,96 баллов после терапии; p=0,023, в контроле 263,47±17,13 баллов). За счет этого происходит нормализация соотношения экспрессии ERα/PR в строме эндометрия у данных пациенток, что характеризуется преобладанием пула прогестероновых рецепторов в строме имплантационного эндометрия (1,01±0,34 до лечения против 0,36±0,03 после лечения; p=0,042) [4, 5, 28].

На фоне терапии наблюдалось снижение стромальной экспрессии CD20+ до уровня, соответствующего здоровым фертильным женщинам (с 25,71±5,42 клеток в п/зр до 2,75±0,26 клеток в п/зр; p=0,001 у пациенток с бесплодием, и с 20,38±4,93 клеток в п/зр до 8,50±2,03 клеток в п/зр; p=0,012 у пациенток с

невынашиванием беременности). Изменение стромальной экспрессии uNK CD56+ на фоне лечения у женщин с бесплодием связано с достоверным увеличением экспрессии CD56+ в строме эндометрия (от 35,21±2,14 клеток в п/зр до 45,75±3,18 клеток в поле зрения; p=0,013), в то же время у пациенток с невынашиванием беременности значение экспрессии CD56+ приходят в соответствии с показателями здоровых фертильных женщин, достоверно снижаясь (77,86±1,24 клеток в п/зр против 43,78±2,85 клеток в п/зр; p=0,012). У пациенток с невынашиванием беременности после лечения произошло снижение уровня CD56+ до значений, статистически сопоставимых со здоровыми фертильными женщинами (28,74±1,16 клеток в п/зр до лечения и 13,38±2,26 клеток в п/зр после терапии; p=0,034; в контроле 14,56±2,14 клеток в п/зр) [28].

На фоне терапии отмечалось достоверное снижение экспрессии маркера хронического эндометрита CD138 в строме эндометрия в основных группах терапии: у пациенток с бесплодием с 21,81±3,41 клеток в п/зр до 7,23±2,78 клеток в п/зр; p=0,035, у пациенток с невынашиванием беременности с 25,7±3,24 клеток в п/зр до 13,23±1,28 клеток в п/зр; p=0,021 [28]. В образцах имплантационного эндометрия пациенток основных групп наблюдения на фоне ИП терапии отмечается достоверное повышение уровня экспрессии фактора, ингибирующего лейкемию (LIF), как у пациенток с бесплодием (107,74±5,77 баллов против143,33±6,20; p=0,016), так и у женщин с невынашиванием беременности (107,74±5,77 баллов против 127,14±8,43 баллов; p=0,042). В то же время у пациенток группы с бесплодием на фоне терапии отмечался значительное повышение стромальной рецепции LIF-R (67,74±10,92 баллов против 103,75±8,49 баллов; p=0,001) [28].

Отмечено достоверное увеличение экспрессии CD34 у пациенток с бесплодием в динамике терапии (20,88±0,77 клеток в п/зр против 33,83±3,63клеток в п/зр; p=0,035). Строма эндометрия женщин с невынашиванием беременности после терапии имела более высокую экспрессию VEGF-A (240,80±8,19 баллов до лечения против 267,50±12,83 баллов после терапии; p=0,039). В группе пациенток с бесплодием данный исходно низкий показатель VEGF-A после терапии статистически неотличим от контрольных значений (216,00±9,05 баллов до терапии, 231,67±14,16 баллов после лечения и 268,00±10,38 баллов в контроле; p>0,05) [28].

У 35 (47,95%) пациенток с маточным фактором бесплодия, ассоциированным с гипоплазией эндометрия, и у 36 (56,25%) с привычным невынашиванием беременности на фоне «тонкого» эндометрия наступила спонтанная беременность; в 42,25 % случаев исходом были спонтанные роды: у 14 и 16 женщин соответственно [31].

Общая эффективность разработанной ИП восстановления рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами составила 69,34% (95/137). Общая эффективность СП лечения в отношении восстановления фертильности и преодоления невынашивания беременности у женщин с «тонким» эндометрием составила 47,7% (21/44), что достоверно ниже аналогичного показателя эффективности ИП терапии (p>0,05). На фоне ИП терапии в 3,3 раза

снизился показатель ранних репродуктивных потерь [31]. Показатель рождения живых детей у пациенток репродуктивными неудачами, обусловленными «тонким» эндометрием, получивших лечение с применением ИП терапии, статистически значимо превышал аналогичный показатель в группе пациенток, получивших СП терапии (50,53% против 18,18%; $p<0,05$) [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги исследованию, следует признать высокую эффективность разработанной комплексной программы лечебно-диагностических мероприятий в восстановлении морфологических и функциональных характеристик эндометрия, улучшении репродуктивных исходов у пациенток с нарушением рецептивности эндометрия. Перспективами дальнейших исследований должны стать изучение эффективности и безопасности применения новых лекарственных препаратов для проведения кавитационных орошений полости матки и применение клеточных технологий для восстановления рецептивности при неэффективности предложенной программы терапии.

В Ы В О Д Ы

1. Клинико-анамнестические особенности женщин, рожденных с низким весом, характеризуются формированием к возрасту пубертатного периода пограничко высокого индекса массы тела (24,3 (22,41 - 26,19) кг/см^2), который сохраняется на протяжении жизни женщин (27,3 (21,56 – 28,5) кг/см^2) и определяет ее соматическое и репродуктивное здоровье.

Основной нозологией, определяющей клиническую картину «тонкого» эндометрия, является хронический эндометрит, с равной частотой ассоциированный с бесплодием (68,47%) и привычном невынашивании беременности (63,63%). Доминирующее положение в структуре ранних репродуктивных потерь у пациенток с «тонким» эндометрием принадлежит неразвивающейся беременности (63,83%).

У половины (48,88%) женщин с привычным невынашиванием беременности на фоне гипоплазии эндометрия в исходе формируется вторичное бесплодие, которому у 67,39% женщин предшествуют медицинские аборты и неразвивающиеся беременности. Частота повторных неудач вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с «тонким» эндометрием достигает 45%.

2. Риск репродуктивных неудач, обусловленных нарушением рецептивности эндометрия, ассоциирован с носительством полиморфного аллеля А гена VEGF 2578 C>A: для пациенток с бесплодием (OR=2,73 (1,36-5,45); p=0,01) и невынашивнием беременности (OR=4,61 (2,19-9,71); p=0,01) и с носительством полиморфного аллеля 675 4G гена PAI-1 675 5G>4G: для пациенток с бесплодием (OR=8,45 (3,96-18,21); p=0,001) и невынашивнием беременности (OR=9,98 (4,61-21,74); p=0,001).

Носительство полиморфизма pVull-CC гена ESR1 397T>C ассоциировано с повышенным риском нарушения становления менструальной функции, проявляющегося аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода (OR=4,58 (0,97-21,68) p=0,04) и риском развития в репродуктивном возрасте

невынашивания беременности, обусловленного «тонким» эндометрием (OR=6,79 (1,94-23,75); p=0,01).

У женщин, рожденных с низким весом, определяется достоверно более высокая частота генотипов, содержащих полиморфный аллель -786C гена эндотелиалной NO-синтазы NOS3 786 T>C: для женщин с бесплодием OR=6,173 (1,83-20,83); p=0,001; для женщин с невынашиванием беременности OR=4,902 (1,69-14,08); p=0,002; для девочек OR=2,56 (1,01-6,50); p=0,04.

3. Морфологическая картина «тонкого» эндометрия характеризуется отставанием секреторной трансформации желез эндометрия (63,25%), уплотнением стромы (73,67%) и нарушением ее васкуляризаци (57,08%). Гистологические признаки хронического эндометрита доминируют (73,33%) в образцах «тонкого» эндометрия женщин с невынашиванием беременности, и встречаются значительно реже (32,61%) в образцах эндометрия женщин с бесплодием, где преобладает картина стромального фиброза (69,56%) и склеротических изменений сосудов функционального слоя эндометрия (21,73%).

Ультраструктурная картина поверхностного эпителия имплантационного эндометрия у пациенток с бесплодием характеризуется аплазией и гипоплазией пиноподий (67,39%), плотными межклеточными контактами (69,53%), гетероморфностью секреторных клеток (15,22%) в сочетании с атипией клеток микроокружения (50%). У пациенток с невынашиванием беременности отмечается асинхронное развитие пиноподий (46,67%) и отсутствие разобщения межклеточных контактов в период «имплантационного окна» (84,44%).

4. Молекулярно-биологические механизмы нарушения стромальной секреторной трансформации «тонкого» эндометрия обусловлены гиперэкспрессией рецепторов к эстрадиолу-альфа (231,09±8,76 баллов против 95,53±15,30 баллов в контроле, p=0,004), депрессией p53-зависимого апоптоза (34,86±5,68% против 81,81±7,68% в контроле; p=0,015) и повышением активности bcl-2 в строме и железах «тонкого» эндометрия (71,38±1,71% против 23,00±30,7% в контроле, p=0,009).

Нарушение сосудистого ремоделирования «тонкого» эндометрия характеризуется бедной экспрессией в строме эндотелиальных маркеров CD34 (20,88±0,77 кл. против 37,99±1,23 кл. в контроле, p=0,016) и ангиогенных факторов роста VEGF-A (216,00±9,05 баллов против 268,00±10,38 в контроле; p=0,018) с формированием антиангиогенного статуса в эндометрии, определяемого снижением соотношения VEGF-A/VEFG-R1 (5,16±0,37 против 11,22±2,95 в контроле; p<0,05).

Нарушение популяции иммунокомпетентных клеток в «тонком» эндометрии сопровождается бедной экспрессией $CD56^{bright}$+ в строме (32,51±2,14 кл.п/зр против 47,8±2,13 кл.п/зр, p=0,016) и железах (7,32±1,12 кл.п/зр против 14,56±2,14 кл.п/зр, p=0,021) эндометрия у пациенток с бесплодием, что определяет низкий уровень стромального (68,06±3,90 против 185,56±4,31; p=0,012) и железистого пула (123,55±12,02 против 165,56±13,16; p=0,043) рецепторов к LIF и снижение экспрессии LIF в апикальных железах эндометрия (107,74±5,77 против 132,22±10,19; p=0,023).

5. Разработанная программа диагностических мероприятий у пациенток с репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия, предусматривает выделение предикторов внутриутробно-программируемых заболеваний, факторов инфекционного риска, оценку ультразвуковых, доплерометрических и морфофункциональных характеристик эндометрия, диагностическую гистероскопию и определение рецептивности эндометрия по разработанной модели прогноза, что позволяет с точностью 92,5% диагностировать нарушения рецептивности эндометрия и детализировать их причину.

В лечебной программе восстановления рецептивности эндометрия патогенетически обоснованы: персонифицированная циклическая гормональная терапия, элиминация патогенной микрофлоры с восстановлением микробиоценоза генитального тракта, внутриматочные орошения кавитированными растворами, с персонифицированным выбором лекарственных препаратов для их проведения.

6. Эффективность комплекса лечебно-диагностических мероприятий в рамках разработанной концепции доказывает восстановление функциональных свойств и показателей рецептивности эндометрия у 85,9 % женщин, позволяет снизить ранние репродуктивные потери в 3,3 раза, способствует восстановлению фертильности у 69,34% женщин и завершению беременности родами живым ребенком у 50,53% пациенток репродуктивными неудачами, обусловленными нарушением рецептивности эндометрия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Пациенткам, предъявляющим жалобы на бесплодие, две и более неудачные попытки применения вспомогательных репродуктивных технологий, либо две и более ранних репродуктивных потери в первом триместре беременности, при подозрении на маточный фактор в генезе репродуктивных неудач на 5-7 день цикла проводят ультразвуковое исследование малого таза для исключения органической внутриматочной патологии. При её выявлении проводят гистероскопию/ гистерорезектоскопию с внутриматочной хирургией, по показаниям с лапароскопической ассистенцией, и биопсию эндометрия с бактериологическим, гистологическим и иммуногистохимическим исследованием.

При отсутствии органической патологии матки на 20-22 день цикла проводят ультразвуковое исследование с доплерометрией сосудов матки с описанием: толщины маточного эха, эхографической структуры эндометрия, толщины и структуры базальной мембраны, перистальтики эндометрия, наличия субэндометрального кровотока в цветовом доплеровском картировании.

В случае выявления нарушений в двух и более описанных признаках, в том числе толщины маточного эха менее 8 мм, показана диагностическая гистероскопия на 20-22 день цикла и пайпель-биопсия эндометрия. Обосновано проведение гистероскопии разработанным аппаратом для кавитационного орошения полости матки с гистероскопической ассистенцией [32], позволяющим сочетать гистероскопию с одновременным прицельным орошением полости матки кавитированными растворами под контролем зрения.

Дают гистологическое заключение эндометрия с описанием следующих параметров: равномерность распределения и стадия созревания желез; плотность стромы; васкуляризация стромы; наличие пиноподий на поверхности эпителия желез в световой микроскопии; признаки хронического эндометрита.

При исследовании образцов эндометрия методом иммуногистохимии определяют следующие параметры: ER_{α}, PR, p53, bcl-2, CD56+, LIF, LIF-R, CD138+. На основании разработанной формулы прогноза (1) делают заключения о рецептивности эндометрия.

В случае нерецептивного эндометрия проводят комплексную индивидуализированную программу терапии, включающую персонифицированную циклическую гормональную терапию, элиминацию патогенной микрофлоры с восстановлением микробиоценоза генитального тракта, внутриматочные орошения кавитированными растворами, с персонифицированным выбором лекарственных препаратов для их проведения. Полный алгоритм программы обследования описан выше.

Критериями эффективности терапии являются величина маточного эха более 8 мм на 20-22 день цикла, трехслойная и равномерная эхоструктура эндометрия, визуализация субэндометрального кровотока в цветовом доплеровском картировании. В этих случаях проводят пайпель биопсию эндометрия на 20-22 день цикла.

Морфологическими критериями окончания лечения являются – равномерное распределение желез в средней стадии фазы секреции, отсутствие признаков стромального фиброза, отсутствие экспрессии CD138+ в эндометрии, визуализация пиноподий. Определяют рецептивность эндометрия по данным иммуногистохимического исследования, используя описанный выше способ (1). В случае положительного заключения о рецептивном эндометрии разрешается планирование беременности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мелкозерова, О.А. Энергия низкочастотного ультразвука в терапии и профилактике хронического эндометрита как патогенетического фактора неразвивающейся беременности / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, О.В. Пацюк, Д.В. Погорелко // Российский вестник акушера-гинеколога. - 2012. - №5. - С. 31 - 35.**

2. Мелкозерова, О.А. Потенциал ультразвукового кавитационного орошения полости матки в предимпантационной реабилитации эндометрия после неразвивающейся беременности / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Г.Н. Чистякова, Д.В. Погорелко // Женский доктор. – 2013. – №2. – С.26-30.

3. **Башмакова, Н.В. Возможности низкочастотной ультразвуковой кавитации в восстановлении эндометрия у пациенток с неразвивающейся беременностью в анамнезе / Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, Г.Н. Чистякова, Д.В. Погорелко // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2013. – Т. 12, № 6. – С. 14 -18.**

4. **Башмакова, Н.В. Воздействие низкочастотного ультразвука на рецепторное поле эндометрия: возможности реабилитации после**

регрессирующей беременности / Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, М.А. Чистяков, Д.В. Погорелко // Проблемы репродукции. – 2014. - № 3. – С. 87-94.

5. **Мелкозерова, О.А. Энергия низкочастотного ультразвука в восстановлении рецепторного поля эндометрия после неразвивающейся беременности / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Д.В. Погорелко, М.А. Чистяков // Акушерство и гинекология. – 2014. - № 7. – С. 61-67.**

6. **Погорелко, Д.В. Использование иммунологических показателей в оценке эффективности применения низкочастотного ультразвука для лечения женщин с хроническим эндометритом / Д.В. Погорелко, О.А. Мелкозерова // Российский иммунологический журнал. - 2014. - Т. 8 (17), № 3. - С. 372-374.**

7. **Башмакова, Н.В. Синдром эндотелиальной дисфункции в генезе маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с внутриутробной задержкой роста / Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, Е.В. Волкова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – Т.13, № 5. – С. 48-52.**

8. **Башмакова, Н.В. Маркеры дисфункции эндотелия при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, И.В. Данькова, Е.В. Волкова, Г.Н. Чистякова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 19-24**.

9. **Мелкозерова, О.А. Эффект ультразвуковой кавитации в восстановлении эндометрия у пациенток с хроническим эндометритом после прерывания регрессирующей беременности / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Е.Ю. Глухов, Д.В. Погорелко, А.М. Богданова, Г.Н. Чистякова // Практическая медицина. – 2015. – Т. 86, № 1. – С. 140-146.**

10. **Melkozerova, O.A. Impact of low-frequency ultrasound on endometrial receptors: possibilities of rehabilitation after non-developing pregnancy / O.A. Melkozerova, N.V. Bashmakova, M.A. Chistyakov, D.V. Pogorelko, G.N. Chistyakova // Gynecological Endocrinology. – 2015. – Vol. 31, Suppl.1. – P.27-30.**

11. **Lisovskaya, T.V. Morphological characteristics of endometrium in patients of reproductive age with viral hepatitis type C / T.V. Lisovskaya, G.B. Malgina, T.A. Perepletina, M.A. Chistyakov, I.V. Dankova, O.A. Melkozerova // Gynecological Endocrinology. – 2016. – Vol. 32. – P. 41-44.**

12. **Волкова, Е.В. Влияние дисфункции эндотелия на становление репродуктивного потенциала девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / Е.В. Волкова, О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, И.В. Данькова, Е.В. Волкова, Г.Н. Чистякова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. - 2016.- № 2.- С. 67-77.**

13. **Melkozerova, O.A. The molecular and genetic aspects of adolescent girls anomalous uterine bleeding: the role of endothelial dysfunction syndrome / O.A. Melkozerova, N.V. Bashmakova, E.V. Volkova, T.B. Tretyakova, P.B. Tsyvian // Gynecological Endocrinology. – 2016. – Vol.32. – P. 23-26.**

14. **Мелкозерова, О.А. Молекулярно-генетические аспекты фетального программирования аномальных маточных кровотечений пубертатного периода: роль синдрома эндотелиальной дисфункции / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Е.В. Волкова, Т.Б. Третьякова, Г.Н. Чистякова // Проблемы репродукции. – 2016. – Т. 22, № 3. - С. 28-37.**

15. **Мелкозерова, О.А. Морфологический и молекулярный субстрат нарушения формирования маточно-плацентарной зоны эндометрия при неразвивающейся беременности / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Н.С. Демченко, Т.Б. Третьякова, Н.Р. Шабунина-Бассок // Проблемы репродукции. - 2016. – Т.22, №4. – С. 13-19.**

16. **Мелкозерова, О.А. Внутриутробно программируемая эндотелиальная дисфункция в генезе аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с синдромом задержки роста плода / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Е.В. Волкова, Г.Н. Чистякова, И.В. Данькова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2016. – Т. 15, № 3. - С. 17-23.**

17. **Мелкозерова, О.А. Уровень внутриклеточных и сывороточных цитокинов у женщин с неразвивающейся беременностью до и после применения низкочастотного ультразвукового кавитационного орошения полости матки / О.А. Мелкозерова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, Д.В. Погорелко, И.А. Газиева // Цитокины и воспаление. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 192-197.**

18. **Мелкозерова, О.А. Молекулярно-генетические предикторы аномальных маточных кровотечений девочек, рожденных с синдромом задержки внутриутробного роста / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Е.В. Волкова, Т.Б. Третьякова // Акушерство и гинекология. – 2016. - № 11. – С. 95-100.**

19. **Мелкозерова, О.А. Проблемы коммуникации эмбриона и эндометрия: маркеры нарушений и механизмы влияния / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, А.В. Есарева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2016. – №5. - С. 29 -36.**

20. Есарева, А.В. Энергия низкочастотного ультразвука в восстановлении тканевого уровня рецептивности эндометрия у пациенток с маточной формой бесплодия / А.В. Есарева, О.А. Мелкозерова, В.Е. Брагина // Материалы XVII Всероссийского научного форума «Мать и дитя». – Москва. – 2016. – С. 159-160.

21. **Мелкозерова, О.А. Ультраструктурная и морфологическая характеристика тканевой рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, А.В. Есарева, Г.Н. Чистякова, Е.Е. Брагина, О.Г. Барлит // Уральский медицинский журнал. – 2017. - № 8. – С. 79-87.**

22. **Мелкозерова, О.А. Молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами, рожденных с низким весом / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Т.Б. Третьякова, П.Б. Цывьян // Уральский медицинский журнал. – 2017. - №9. – С. 128 – 137.**

23. Есарева, А.В. Морфологические и ультраструктурные маркеры рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами, обусловленными гипоплазией эндометрия / А.В. Есарева, О.А Мелкозерова, Г.Н. Чистякова, Е.Е. Брагина, О.Г. Барлит // Материалы научно-практической конференции «Перинатальная медицина – от истоков к современности». – Екатеринбург. – 2017. – С. 22.

24. **Chistyakova, G.N. Local Immunity Status and Apoptosis Reactions in Endometrium of Women with a History of Non-Developing Pregnancy / G.N. Chistyakova, I.I. Remizova, O.A. Melkozerova, D.V. Pogorelko, A.V. Esareva // Annals of Clinical and Laboratory Research. - 2017. -Vol.5. - №3. - 198-203.**

25. Melkozerova, O.A. Intrauterine programming of endothelial dysfunction in the genesis of anomalous uterine bleeding in adolescent girls born with low birth weight [Электронный ресурс] / O.A. Melkozerova, N.V.Bashmakova, E.V. Volkova, T.B. Tretyakova, P.B. Tsyvyan // Materials of 17th World Congress of the Academy of Human Reproduction. Rome. - 2017. - Режим доступа: http://hr2017.humanrepacademy.org/abstractbook/links/text.php?id=5842 (дата обращения 01.11.2017)

26. **Мелкозерова, О.А. Программа диагностики нарушений рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Г.Н. Чистякова // Уральский медицинский журнал. – 2017. - №9. – С. 119-127.**

27. Melkozerova, O.A. The molecular and genetic aspects of adolescent girls anomolous uterine bleeding: the role of endothelial dysfunction syndrome / O.A. Melkozerova, N.V.Bashmakova, E.V. Volkova, T.B. Tretyakova, P.B. Tsyvyan // Conference Abstract Book of BIT's 5th International Congress of Gynecology and Obstetrics. - Prague, Czech Republic. - 2017. – P. 219.

28. **Мелкозерова, О.А. Тканевые и молекулярные эффекты кавитированных растворов в восстановлении показателей рецептивности эндометрия у пациенток с маточной формой бесплодия / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Г.Н. Чистякова, А.В. Есарева, О.Г. Барлит, А.А. Гиниятова // Проблемы репродукции. – 2017. - №5. – С. 73-83.**

29. Восстановление эндометрия после неразвивающейся беременности с использованием низкочастотного ультразвукового кавитационного орошения полости матки: учебное пособие для врачей / О.А. Мелкозерова, Н.В. Башмакова, Г.Н. Чистякова, Е.Ю. Глухов и др., Екатеринбург, 2017. – 57 с.

30. Ультразвуковая кавитация в профилактике и лечении акушерско-гинекологических заболеваний: практическое руководство для врачей / Т.А. Обоскалова, Е.Ю. Глухов, О.А. Мелкозерова и др. – Екатеринбург, 2017.– 124 с.

31. Кавитированные растворы в репродуктивной медицине: научная монография / Сост.: В.Е. Радзинский, Е.Ю. Глухов, Н.В. Башмакова, О.А. Мелкозерова, и др.; под ред. В.Е. Радзинского, Е.Ю. Глухова. - М.: Редакция Status Praesens, 2017. – 344 с.

32. **Патент на изобретение № 2606495 от 10.01.2017. Российской Федерации. Аппарат для ультразвукового кавитационного орошения полости матки**

гистероскопической ассистенцией / Н.В. Башмакова, Е.Ю. Глухов. О.В. Пацюк, С.Л. Локшин, Д.В. Погорелко, Ю.В. Кононов, Г.С. Бучок. Заявка № 2014144236 от 31.10.2014. Опубликована 10.01.2017. - Бюллетень № 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

bcl-2 – транскрипционный ингибитор апоптоза клеток
ERα – рецептор к эстрадиолу альфа
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
HIF-1α – гипоксией индуцируемый фактор
Ki-67 – маркер пролиферации клеток
LBW - low birth weight for gestation age – низкий вес при рождении
LIF – лейкемию ингибирующий фактор
NBW – normal birth weight for gestation age – нормальный вес при рождении
NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза
NOXA – проапоптотический протеин, участвующий в p53-зависимом апоптозе
NS – no significant – отсутствие достоверных различий; $p>0,05$.
p-53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
PAI-1 – ингибитор тканевого активатора плазимногена
PR – рецептор к прогестерону
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
VEGF-R – рецептор к сосудистый эндотелиальный фактор роста
АМК ПП – аномальные маточные кровотечения пубертатного периода
ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИП – индивидуализированная программа терапии
НБ – невынашивание беременности
СП – Стандартная программа терапии
СЭМ - сканирующая электронная микроскопия
УЗИ – ультразвуковое исследование
УЗО ПМ – ультразвуковое орошение полости матки
ХЭ - хронический эндометрит

На правах рукописи

Мелкозерова Оксана Александровна

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЯ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НЕУДАЧАМИ И МЕТОДЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Челябинск – 2017