

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

1 (319)

**ҚАҢТАР – АҚПАН 2017 ж.
ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ 2017 г.
JANUARY – FEBRUARY 2017**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

**АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK**

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі, м. ғ. д., проф.

Ж. А. Арзықұлов

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К. проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А. проф., академик (Қазақстан)
Акшулаков С.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Алшынбаев М.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бисенбаев А.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ботабекова Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Қайдарова Д.Р. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С. проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А. prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunefeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Қазақстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Қазақстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2017

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
академик НАН РК, д.м.н., проф.

Ж. А. Арзыкулов

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., чл.-корр. (Казахстан), зам. гл. ред.
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Кайдарова Д.Р. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов
Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2017

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

academician of NAS RK, doctor of medical science, professor

Zh. A. Arzykulov

Abzhanov Arkhat prof. (Boston, USA),
Abelev S.K. prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A. prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Botabekova T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh. prof., corr. member. (Kazakhstan), deputy editor in chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Kaydarova D.R. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S. prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A. prof. (Moscow, Russia)
Lunefeld Bruno prof. (Israel)
Miyerbekov Ye.M. prof. (Kazakhstan)
Muminov T.A. prof., academician (Kazakhstan)
Purton Saul prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2017

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 319 (2017), 44 – 52

Yu. S. Krylova¹, V. O. Polyakova¹, A. M. Gzgzyan¹, V. N. Lokshin², I. M. Kvetnoy¹

¹FSBSI “The Research institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott”,
Saint Petersburg, Russia,

²«PERSONA» the International Centre of Clinical Reproduction, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: vyacheslavn19@rambler.ru

**ENDOMETRIOSIS GENITALIS EXTERNA,
IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS
OF ENDOMETRIUM IMPLANTATION RECEPTIVITY**

Abstract. The lack of implantation in cycles of in vitro fertilization (IVF) is one of the main problems of modern reproductive medicine. Implantation is a multifactorial process, it is difficult to imagine the existence of a single criterion, with which it is possible to determine the receptivity of the endometrium. However, the possibility of accurate diagnosis of the state of endometrium receptivity cannot be overestimated in terms of clinical relevance. Endometrial biopsy today remains the most common method to diagnose pathological conditions that lead to a significant reduction or loss of the ability of endometrial implantation.

Important one is the ability to predict the onset of implantation, since the detection of violations make it possible to avoid unnecessary emotional stress, not to carry out the support of the luteal phase and the hopeless refrain from embryo transfer, preserving them for the delayed transfer. We evaluated the possibility of using the immunohistochemical study with the assessment of key biological molecules involved in the formation of implantation window (LIF, ER, PR, Integrin, TGF- β 1, VEGF), for prognosis and diagnosis of disorders of the endometrium implantation receptivity in patients with external genital endometriosis. As a result of studies there have been verified informative immunohistochemical markers that have been used to create the IVF treatment outcome prediction algorithm. With the help of the developed model it is possible to predict the group with poor outcome of treatment that can reasonably plan the tactics of treatment measures and enhances the effectiveness of IVF treatment.

Key words: IVF, endometrium implantation receptivity, receptivity, "implantation window", LIF, VEGF, Integrin α V β 3, TGF β 1, ER, PR.

Ю. С. Крылова¹, В. О. Полякова¹, А. М. Гзгзян¹, В. Н. Локшин², И. М. Кветной¹

¹ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия,

²Международный центр клинической репродуктологии «PERSONA», Алматы, Казахстан

**НАРУЖНЫЙ ГЕНИТАЛЬНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ,
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
ИМПЛАНТАЦИОННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ**

Аннотация. Отсутствие имплантации в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) – одна из основных проблем современной репродуктологии. Имплантация является многофакторным процессом, трудно представить себе наличие единого критерия, с помощью которого возможно определить рецептивность эндометрия. Однако, возможность достоверной диагностики состояния рецептивности эндометрия трудно переоценить с точки зрения клинической значимости. Биопсия эндометрия на сегодняшний день остается наиболее распространенным методом, позволяющим диагностировать патологические состояния, приводящие к существенному снижению или утрате имплантационной способности эндометрия.

Важной представляется возможность прогнозировать наступление имплантации, так как при выявлении нарушений можно избежать лишней эмоциональной нагрузки, не проводить поддержку лютеиновой фазы и воздержаться от бесперспективного переноса эмбрионов, сохранив их для отсроченного переноса. Нами проведена оценка возможности использования иммуногистохимического исследования с оценкой ключевых биологических молекул участвующих в формировании имплантационного окна (LIF, ER, PR, Integrin, TGF- β 1, VEGF), для прогноза и диагностики нарушения имплантационной восприимчивости эндометрия, у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. В результате исследований были верифицированы информативные иммуногистохимические маркеры, которые были использованы для создания алгоритма прогноза исхода лечения методом ЭКО. С помощью разработанной модели возможно прогнозирование группы с неблагоприятным исходом лечения, что позволяет обоснованно планировать тактику ведения лечебных мероприятий и способствует повышению эффективности лечения методами ЭКО.

Ключевые слова: ЭКО, имплантационная восприимчивость эндометрия, рецептивность, «окно имплантации», LIF, VEGF, Integrin α V β 3, TGF β 1, ER, PR.

Бесплодный брак – важная медицинская, социальная и экономическая проблема. По данным ВОЗ его частота составляет 10–15% и не имеет тенденции к снижению. Недостаточная эффективность методов восстановления естественной фертильности человека стимулировала развитие новых вспомогательных репродуктивных технологий, в частности экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), результативность которого колеблется от 28,5 до 32,5 % [1]. Оптимизация эффективности ЭКО напрямую связана с решением ключевой проблемы репродуктологии – идентификации периода рецептивности (имплантационной восприимчивости эндометрия) для определения функциональной готовности эндометрия к имплантации бластоцисты [2]. Имплантационная восприимчивость эндометрия – комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия с четкими временными константами, которые определяют способность эндометрия обеспечить имплантацию эмбриона. Реализация рецептивности эндометрия осуществляется посредством генетических и молекулярных превращений, которые приводят к экспрессии большого количества биологически активных молекул, таких как цитокины, факторы роста, молекулы адгезии и др. Традиционно оценку рецептивности эндометрия проводят с помощью биопсии, позволяющей выявить недостаточность лютеиновой фазы [3]. Тем не менее, данный метод не позволяет получить полной информации о рецептивности эндометрия. Так, исследователи признают, что при гистологической визуализации невозможно выявить функциональные подпороговые нарушения имплантационной восприимчивости. Определение иммуногистохимическим методом сигнальных молекул обеспечивающих имплантационную способность эндометрия дает возможность для оценки функциональной готовности эндометрия к имплантации.

Нарушение функциональной активности эндометрия возможно и при нормальном морфологическом состоянии, что проявляется изменением баланса регуляторных молекул, обеспечивающих восприимчивость эндометрия. Основываясь на выявлении нарушений рецептивности возможно назначение комплексной терапии женщинам с сохраненным овуляторным циклом, способствующей трофическим и метаболическим процессам в эндометрии.

Целью исследования явилась верификация наиболее специфичных и значимых иммуногистохимических маркеров рецептивности эндометрия для разработки алгоритма прогноза исхода лечения методом ЭКО при наружном генитальном эндометриозе I-II степени.

Материал и методы: материал исследования составили 95 случаев биопсии эндометрия женщин, проходивших лечение методом ЭКО с последующим переносом эмбриона в полость матки, на базе ФГБНУ «НИИ АГиР имени Д. О. Отта». Для исследования были сформированы следующие группы. В I группу вошло 25 женщины с НГЭ I-II степени и положительным исходом программы лечения (эхографически подтвержденная беременность), II группу составили 30 женщин с НГЭ I-II степени, у которых беременность не наступила. В III группу, группу контроля, вошло 40 женщин, проходивших лечение в связи с мужским фактором бесплодия, и положительным исходом программы. В исследование были включены женщины с бесплодием в возрасте от 24 до 35 лет, уровень фолликулостимулирующего гормона в крови, определенный на 3–5 день менструального цикла (д.м.ц) у всех обследованных женщин не превышал 11 МЕ/л, при ультразвуковом исследовании на 3–5 д.м.ц определялось от 7 до 12 антральных фолликулов в максимальном эхографическом срезе яичников. Всем женщинам проводился стандартный протокол ЭКО или

ЭКО с интрацитоплазматической инъекцией сперматозоидов (ИКСИ) с применением антагонистов гонадотропина-рилизинг гормона. Для поддержки лютеиновой фазы цикла применялся микронизированный прогестерон. Проводили перенос только морфологически качественных эмбрионов на четвертые или пятые сутки культивирования. Средняя доза рекомбинантных гонадотропинов, количество полученных ооцитов и перенесённых эмбрионов не отличались в исследуемых клинических группах. Диагностика беременности проводилась путем определения хорионического гонадотропина человека в крови на 14 день после переноса эмбрионов в полость матки и ультразвуковым методом на 21 день. Формируя группы исследования мы максимально стандартизировали все показатели, так что бы единственной переменной в исследовании была имплантационная восприимчивость эндометрия.

Биопсию эндометрия выполняли в период предполагаемого окна имплантации на 7-9 день после овуляции в цикле, предшествующем циклу ЭКО, с помощью аспирационной кюретки Pipelle de Cornier ("Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd.). Овуляция подтверждалась ультразвуковым методом и путем определения пика лютеинизирующего гормона в моче. Полученные образцы эндометрия обрабатывали по стандартной методике с получением парафиновых блоков. Гистологическое исследование проводилось в соответствии с критериями, предложенными Mazur и Kurman [5], на основании которых были отобраны образцы, содержащие эндометрий средней стадии фазы секреции без признаков воспалительного процесса и фиброза. В сомнительных случаях, использовали дополнительную окраску по методу Ван-Гизона а для выявления хронического воспаления, иммуногистохимическим методом определяли субпопуляции лейкоцитов CD20, CD138.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) проводилось на депарафинизированных и дегидратированных срезах толщиной 4–6 мкм с использованием авидин-биотинового иммунопероксидазного метода. Определяли уровни экспрессии: лейкемия ингибирующего фактора (LIF) (Anti-LIF, Abcam (ab135629), 1:100); сосудистого эндотелиального фактора роста типа А (VEGF-A) (Anti-VEGF-A, Abcam (ab28775), 1:50); трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) (Anti-TGF-β1, Novocastra, 1:40); рецепторов к эстрогену, тип альфа (ER) (Anti-ER, DAKO (1D5), 1: 35); рецепторов к прогестерону, тип А (PR) (Anti-PR, DAKO (636), 1: 35); интегрин альфа пять бета три (Integrin αVβ3) (Anti- Integrin αVβ3, Abcam (ab7166), 1:250).

Для количественной оценки иммуногистохимической реакции получали изображения с использованием камеры Nikon DXM 1200 и программного обеспечения «ACT-1», версия 2.12, фиксацию изображения производили на увеличении x40. Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование микрофотографий с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений Морфология 5.2. (ВидеоТест, Россия). В каждом случае анализировали весь материал, исключая поля зрения, содержащие дефекты окрашивания и артефакты.

Результаты реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию (ER, PR), оценивали по системе подсчета «histochemical score» (HS). Максимальное значение HS 300 баллов.

Интенсивность реакций с антигенами, локализованными в цитоплазме и на мембранах клеток (LIF, VEGF-A, Integrin αVβ3, TGF-b1) оценивали по двум показателям – относительной площади экспрессии и оптической плотности. Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Первый показатель отражает экспрессию исследуемого маркера в клеточной популяции, и второй – в отдельных клетках. Оценка иммуногистохимической реакции проводилась в двух гистологических структурах эндометрия – строме и железах.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» версия 6.0, StatSoft Inc. (США) с использованием методов параметрической и непараметрической статистики.

Описательная статистика включала подсчет среднего значения (M), стандартной ошибки среднего (m). Оценка межгрупповых различий значений признаков проводилась с использованием t-критерия Стьюдента и рангового U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$ (95 %-уровень значимости) и $p < 0,01$ (99 %-уровень значимости).

Прогнозирование исходов ЭКО осуществлялось с помощью дискриминантного анализа и построения деревьев классификации. В список потенциальных предикторов вошли переменные (с предварительно определенной сопряженностью с наступлением беременности), имеющие уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. Состояние рецепторного аппарата эндометрия в условиях ВРТ исключительно важно. Это обуславливает выбор схемы стимуляции, а также может указывать на недостаточность восприимчивости даже к сильным гормональным стимулам. Подготовка эндометрия к nidации blastocysts невозможна без воздействия на него эстрадиола и прогестерона путем взаимодействия с соответствующими стероидными рецепторами.

Полученные результаты по экспрессии рецепторов ER и PR в исследуемых группах, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона в стромальном и железистом компоненте эндометрия в исследуемых группах, баллы

Группа	ER строма	ER железы	PR строма	PR железы
I	45,2±4,9	70,3±7,6	150,7±16,4	84,5±9,2
II	92,2±10,0*, **	75,2 ±8,2**	100,0±10,9*, **	73,2±8,0**
III	75,5±8,2	47,4±5,2	167,7±18,2	95,4±10,3

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при $p < 0,05$.
**Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Полученные данные по экспрессии ER в стромальном и железистом компонентах демонстрируют увеличение показателей в подгруппе с отрицательным исходом ($p < 0,005$), однако более низкие уровни ER в группе положительного исхода так же несколько отличаются от контроля.

Экспрессия PR была на высоком уровне как в группе НГЭ и положительного исхода так и в контроле и находилась в пределах нормального «окна имплантации». А в подгруппе с отрицательным исходом отмечается достоверное снижение уровня PR как в стромальном, так и в железистом компоненте.

Экспрессия LIF отмечалась преимущественно в железах и люминальном эпителии, экспрессия в стромальном компоненте выявлялась у женщин с подтвержденным гистологически и иммуногистохимически хроническим воспалением в эндометрии, поэтому, данные женщины были исключены из исследования.

Во время фаз аппозиции и адгезии blastocysts LIF является промежуточным звеном во взаимодействии между материнскими децидуальными лейкоцитами и внедряющимся трофобластом [6].

Полученные результаты по экспрессии LIF в исследуемых группах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Экспрессия LIF в железистом компоненте эндометрия в исследуемых группах

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	—	27,7±1,3	—	0,230±0,13
НГЭ	8,3±1,6*, **	14,5±1,6	0,176±0,04*, **	0,228±0,06

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при $p < 0,05$.
**Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Рассматривая полученные результаты, мы наблюдали максимальные значения экспрессии LIF в контрольной группе. В группах женщин с НГЭ значения снижены относительно контроля и колеблются в пределах 14-10 % в подгруппах с положительным исходом и демонстрируют резкое снижение как относительной площади ниже 10 % так и оптической плотности ниже 0,200 у.е. в подгруппах с отрицательным исходом.

Интегрин $\alpha V\beta 3$ участвует в начальном прикреплении бластоцисты и регулирует межклеточные взаимодействия. Его экспрессия наблюдается как в стромальном, так и в железистом компоненте эндометрия [6]. Результаты экспрессии интегрина $\alpha V\beta 3$ в эндометрии женщин исследуемых группах представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Экспрессия интегрина $\alpha V\beta 3$ в стромальном компоненте эндометрия в исследуемых группах

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	–	5,5±0,4	–	0,159±0,029
НГЭ	2,2±0,8**	2,4±0,7	0,076±0,03*,**	0,170±0,039

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при $p < 0,05$.
 **Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при $p < 0,05$.

В группе женщин с наружным генитальным эндометриозом показатели экспрессии интегрина $\alpha V\beta 3$ по площади и оптической плотности были наименьшими по сравнению с контролем. При сопоставлении подгрупп между собой различий не выявлено ($p > 0,05$).

Таблица 4 – Экспрессия интегрина $\alpha V\beta 3$ в железистом компоненте эндометрия в исследуемых группах

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	–	14,1±2,0	–	0,289±0,018
НГЭ	6,8±0,6*,**	8,4±0,8	0,186±0,014*,**	0,244±0,026

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при $p < 0,05$.
 **Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Полученные данные демонстрируют прямую связь показателей экспрессии интегрина $\alpha V\beta 3$ с положительным исходом. В подгруппах женщин с наступившей беременностью показатели площади варьировались от 8 до 14 % в то время как в подгруппах с отрицательным исходом составила 6,8 %. Величина оптической плотности так же была максимальна высокая в группе контроля а минимальна в группе НГЭ и отрицательным исходом программы.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста является важнейшим регулятором ангиогенеза, митогеном для эндотелиальных клеток сосудов. Экспрессия VEGF-A отмечалась только в стромальном компоненте эндометрия и отсутствовала в поверхностном и железистом эпителии. Результаты экспрессии VEGF-A в эндометрии женщин исследуемых групп представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Экспрессия VEGF-A в стромальном компоненте эндометрия

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	–	8,7±1,9	–	0,201±0,07
НГЭ	11,2±1,8**	10,1±1,9	0,182±0,007*	0,230±0,04

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при $p < 0,05$.
 **Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Экспрессия VEGF-A в строме эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом достоверно не отличалась по площади внутри группы, однако оптическая плотность в подгруппе с положительным исходом выше, чем с отрицательным. В сравнении с контролем у женщин с НГЭ показатели экспрессии VEGF в строме выше в два раза по площади экспрессии ($p < 0,05$).

TGF β 1 является представителем факторов роста, его экспрессия выявляется во всех структурах эндометрия: строме, железистом компоненте и люминальном эпителии. Экспрессия в железистом компоненте превышает экспрессию в строме. Результаты экспрессии TGF β 1 в эндометрии женщин исследуемых групп представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 – Экспрессия TGFβ1 в стромальном компоненте эндометрия

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	–	4,4±0,8	–	0,240±0,017
НГЭ	2,1±0,3*,**	4,4±1,0	0,230±0,019*,**	0,208±0,005

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при p<0,05.
**Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при p<0,05.

При сравнении подгрупп между собой достоверно более высокие показатели относительной площади в группе с положительным исходом, а показатели оптической плотности в подгруппе с отрицательным. При сравнении с контрольной группой подгруппа с отрицательным исходом имеет более низкие значения относительной площади (p<0,05), а между подгруппами с положительным исходом различий не выявлено.

Таблица 7 – Экспрессия TGFβ1 в железистом компоненте эндометрия

Фактор	Относительная площадь экспрессии (ОТП), %		Оптическая плотность (ОП), у.е	
	«-» исход	«+» исход	«-» исход	«+» исход
Контроль	–	11,8±1,4	–	0,198±0,013
НГЭ	10,9±1,9	11,7±1,8	0,203±0,012	0,205±0,010

*Отличия в сравниваемых группах по исходу достоверны при p<0,05.
**Отличия в сравниваемых группах с контролем достоверны при p<0,05.

При сравнении подгрупп между собой и контрольной достоверных различий выявлено не было.

Следующим этапом нашей работы была оценка информативности иммуногистохимических маркеров для прогнозирования исхода экстракорпорального оплодотворения в группе женщин с наружным генитальным эндометриозом. Для этого мы использовали метод дискриминантного анализа, который показал, что наиболее информативны при прогнозе исхода цикла ЭКО в группе женщин с наружным генитальным эндометриозом: относительная площадь экспрессии LIF; относительная площадь экспрессии и оптическая плотность интегрин αVβ3 в железистом и стромальном компоненте эндометрия а так же относительная площадь экспрессии фактора роста TGFβ1 и VEGF-A в стромальном компоненте эндометрия.

Использование пошаговой процедуры включения переменных на основе статистики Уилкса позволило рассчитать дискриминантные функции:

$$P = 0,04 \cdot A + 126,0 \cdot B + 3,7 \cdot C - 23,5 \quad (6)$$

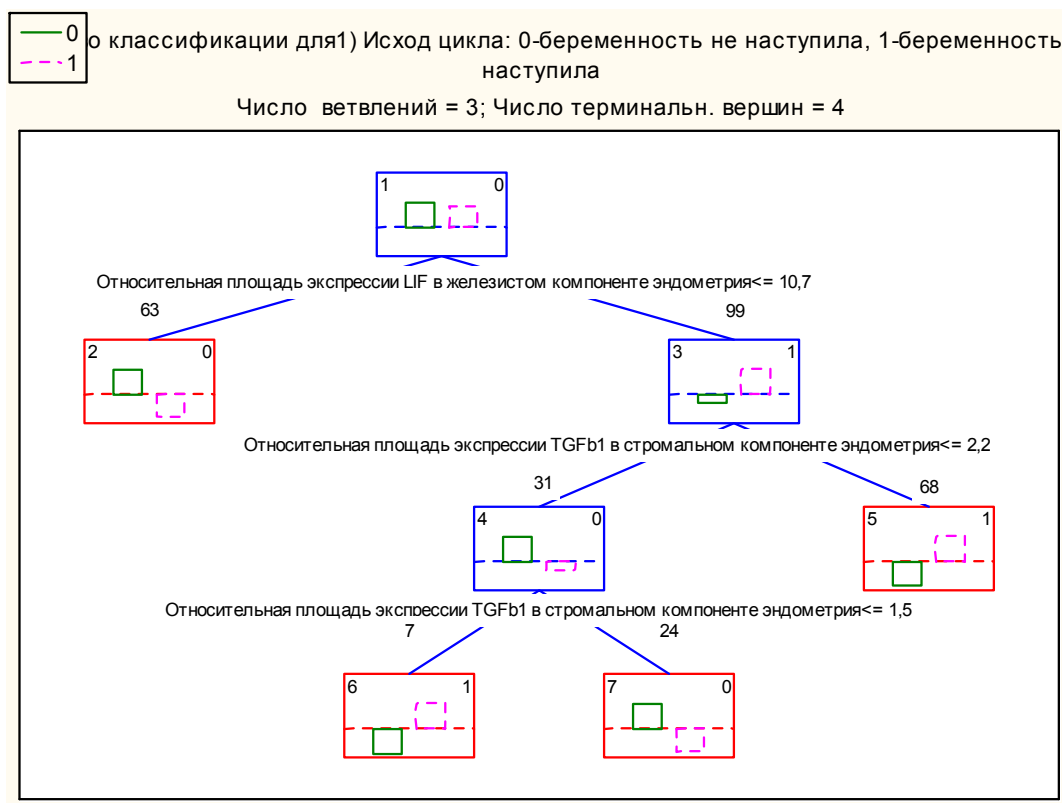
$$O = 0,09 \cdot A + 83,9 \cdot B + 1,9 \cdot C - 13,4, \quad (7)$$

где P – дискриминантная функция положительного исхода ЭКО; O – дискриминантная функция отрицательного исхода ЭКО; A – экспрессия PR в железистом компоненте эндометрия; B – оптическая плотность экспрессии LIF в железистом компоненте эндометрия; C – относительная площадь экспрессии TGFβ1 в стромальном компоненте эндометрия

Все входящие в дискриминантные функции переменные достоверно отличаются от нуля. Испытание полученной модели на группе проверки выявило 89,1 % правильной дискриминации. Кросс-проверка на группе обучения показала несколько меньшие, но также высокие результаты: 88,8 % правильных ответов.

Алгоритм прогнозирования исходов экстракорпорального оплодотворения по данным экспрессии иммуногистохимических маркеров разрабатывали с помощью деревьев классификации – метода, позволяющего соотносить объекты к тому или иному классу в зависимости от соответствующих значений одной или нескольких независимых (предикторных) переменных. Построение дерева классификации позволило на основе решающих правил классифицировать объекты. Выбор

наилучшего дерева был проведен на основе наименьшей цены (доли неправильно классифицированных наблюдений). Был выбран прогноз с наименьшим процентом неправильных классификаций (рисунок). Анализ дерева классификации показал, что наиболее информативные показатели при прогнозировании исхода ЭКО: относительная площадь экспрессии TGFβ1 в стромальном компоненте эндометрия (ранг-100), относительная площадь экспрессии LIF в железистом компоненте эндометрия (ранг-84) и оптическая плотность экспрессии LIF в железистом компоненте эндометрия (ранг-71).



Дерево классификации принятия решения.

Примечание. Прямоугольниками обозначены узлы решения. В прямоугольниках слева указан номер узла, справа к какому классу (группе) он относится. Над узлами обозначены количество наблюдений, приходящихся на этот узел, под ним – условие разделения по ветвям.

Условия разделения обследованных следующее: если значение переменной, соответствует или равно условию, указанному под узлом решения, то выбирается левая ветвь, в противном случае – правая. Таким образом, мы смещаемся по ветвям до конечного узла, который указывает нам на ожидаемый прогноз лечения методом ЭКО.

Обсуждение результатов. Отсутствие имплантации в циклах ЭКО – одна из основных проблем современной репродуктологии. Имплантация является многофакторным процессом, трудно представить себе наличие единого критерия, с помощью которого возможно определить рецептивность эндометрия. Однако, возможность достоверной диагностики состояния рецептивности эндометрия трудно переоценить с точки зрения клинической значимости. Биопсия эндометрия на сегодняшний день остается наиболее распространенным методом, позволяющим диагностировать патологические состояния, приводящие к существенному снижению или утрате имплантационной способности эндометрия.

Важной представляется возможность прогнозировать наступление имплантации, так как при выявлении нарушений можно избежать лишней эмоциональной нагрузки, не проводить поддержку лютеиновой фазы и воздержатся от бесперспективного переноса эмбрионов и сохранить их для отсроченного переноса.

Ткань эндометрия полученная в период «окна имплантации» в естественном цикле, способна отражать рецептивность эндометрия и во время цикла, несмотря на негативное влияние стимуляции овуляции. Рецептивность эндометрия находится почти на одном и том же уровне, от цикла к циклу, что обеспечивается постоянством геномного профиля [7]. Поэтому использование иммуногистохимического метода исследования эндометрия в период подготовки к лечению методами ВРТ является обоснованным.

В результате проведенных исследований нами верифицированы наиболее специфичные и значимые маркеры рецептивности эндометрия, TGF β 1 и LIF которые были использованы для разработки алгоритма прогноза исхода лечения методом ЭКО при наружном генитальном эндометриозе I-II степени.

С помощью разработанной модели возможно прогнозирование группы с неблагоприятным исходом лечения, что позволяет принимать научно-обоснованные решения, направленные на улучшение эффективности проводимых лечебных мероприятий.

На основании разработанной модели предложен следующий алгоритм прогноза возникновения неблагоприятного исхода:

1. При планировании лечения методами ЭКО необходимо проведение биопсии эндометрия и гистологического исследования.

2. На втором этапе в случае не выявления явных причин препятствующих формированию рецептивности эндометрия (гиперпластические процессы, воспалительные изменения) проводят комплексную оценку функционального состояния эндометрия с применением иммуногистохимического метода.

3. На третьем этапе соотносят каждого обследованного к группам «положительный исход» и «отрицательный исход» используя алгоритм прогнозирования.

Заключение. Становится все более очевидным, что одного идеального биомаркера для оценки рецептивности эндометрия не существует, так как сложность патогенеза любого заболевания, ведущего к бесплодию и физиологические особенности каждой пациентки не могут быть идентифицированы по одному биомаркеру.

Расширение фундаментальных исследований по изучению молекулярно-клеточных механизмов имплантации позволит расширить понимание механизмов лежащих в основе формирования имплантации и может явиться основой для разработки лекарственных средств для селективного воздействия на эндометрий с нарушенной рецептивностью. Необходимо проведение крупных исследований на больших когортах женщин с нормальной и нарушенной фертильностью, что позволит определить диапазон нормы экспрессии различных молекул, стандартизировать методы и даст возможность в перспективе использовать их для предиктивной диагностики и коррекции рецептивности.

REFERENCES

- [1] Kupka M.S., Ferraretti A.P., de Mouzon J., et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2014; 29: 2099-113.
- [2] Edwards R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 887-904.
- [3] Devroey C., Bourgain N.S., Macklon, et al. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 84-90.
- [4] Simon A., Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril* 2012; 97: 1039-43.
- [5] Mazur M., Kurman R.J. *Diagnosis of endometrial biopsies and curettings: a practical approach*. New York: Springer, 2005.
- [6] Boomsma C.M., Kavelaars A., Eijkemans M.J., et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod* 2009; 24: 1427-35.
- [7] Ruiz-Alonso M., Blesa D., Dí'az-Gimeno P., et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013; 100: 818-24.

Ю. С. Крылова¹, В. О. Полякова¹, А. М. Гзгзян¹, В. Н. Локшин², И. М. Кветной¹

¹ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия,

²Международный центр клинической репродуктологии «PERSONA», Алматы, Казахстан

НАРУЖНЫЙ ГЕНИТАЛЬНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИМПЛАНТАЦИОННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ

Аннотация. Отсутствие имплантации в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) – одна из основных проблем современной репродуктологии. Имплантация является многофакторным процессом, трудно представить себе наличие единого критерия, с помощью которого возможно определить рецептивность эндометрия. Однако, возможность достоверной диагностики состояния рецептивности эндометрия трудно переоценить с точки зрения клинической значимости. Биопсия эндометрия на сегодняшний день остается наиболее распространенным методом, позволяющим диагностировать патологические состояния, приводящие к существенному снижению или утрате имплантационной способности эндометрия.

Важной представляется возможность прогнозировать наступление имплантации, так как при выявлении нарушений можно избежать лишней эмоциональной нагрузки, не проводить поддержку лютеиновой фазы и воздержаться от бесперспективного переноса эмбрионов, сохранив их для отсроченного переноса. Нами проведена оценка возможности использования иммуногистохимического исследования с оценкой ключевых биологических молекул участвующих в формировании имплантационного окна (LIF, ER, PR, Integrin, TGF- β 1, VEGF), для прогноза и диагностики нарушения имплантационной восприимчивости эндометрия, у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. В результате исследований были верифицированы информативные иммуногистохимические маркеры, которые были использованы для создания алгоритма прогноза исхода лечения методом ЭКО. С помощью разработанной модели возможно прогнозирование группы с неблагоприятным исходом лечения, что позволяет обоснованно планировать тактику ведения лечебных мероприятий и способствует повышению эффективности лечения методами ЭКО.

Ключевые слова: ЭКО, имплантационная восприимчивость эндометрия, рецептивность, «окно имплантации», LIF, VEGF, Integrin α V β 3, TGF β 1, ER, PR.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т. М. Апендиев*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 20.03.2017.

Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
14,0 п.л. Тираж 300. Заказ 1.