

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041751**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.29

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) Номер заявки
202192309

(22) Дата подачи заявки
2021.08.11

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ НАСТУПЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ У ПАЦИЕНТОК С МАТОЧНЫМ БЕСПЛОДИЕМ ПРИ ГИПОПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

(31) a20210142

(32) 2021.05.14

(33) BY

(43) 2022.11.28

(96) 2021/EA/0050 (BY) 2021.08.11

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ЦАРЕВА НАТАЛИЯ
ВЛАДИМИРОВНА; КУРЛОВИЧ
ИВАН ВАСИЛЬЕВИЧ (BY)**

(56) RU-C1-2617515

RU-C1-2731203

WO-A1-2011147976

ЦАРЕВА Н. В. Маточное бесплодие при гипоплазии эндометрия маркеры рецептивности и "окна имплантации" МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ, 2020, Июль-Сентябрь, Вып.3, с.40-45 Найдено [онлайн] 2022-02-25 на сайте [http: // rep.bsmu.by:8080/handle/BSMU/29137](http://rep.bsmu.by:8080/handle/BSMU/29137)

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к акушерству и гинекологии, предназначено для определения вероятности наступления беременности у пациенток с маточным бесплодием при гипоплазии эндометрия. Сущность изобретения заключается в целенаправленном отборе пациенток с гипоплазией эндометрия для проведения гормональной терапии и/или экстракорпорального оплодотворения по протоколам маточного бесплодия на основании определения индивидуального прогноза вероятности наступления беременности, отличающийся тем, что до назначения лечения исследуется анамнез репродуктивной функции женщины на предмет наличия неэффективных попыток экстракорпорального оплодотворения и на 20-22 день менструального цикла проводится иммуногистохимическое исследование экспрессии интегрина $\alpha v \beta 3$ и гена HOXA10 в строме эндометрия, а маркера SUSD2 - в железах эндометрия. Техническим результатом применения данного способа является дифференцированный подход к ведению пациенток с маточным бесплодием при гипоплазии эндометрия, планирующих беременность.

B1

041751

041751

B1

Изобретение относится к медицине, в частности к акушерству и гинекологии, предназначено для увеличения эффективности гормональной терапии в естественных циклах и программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) при маточном бесплодии (МБ) у пациенток с гипоплазией эндометрия (ГпЭ).

Частота бесплодного брака у супружеских пар детородного возраста в мире составляет от 15 до 17% и имеет тенденцию к росту [1]. По мнению многих учёных, в современной структуре непреодолимых причин бесплодия значительную долю занимает маточный фактор [2,3]. Не менее 70% всех случаев МБ обусловлено невосприимчивостью эндометрия к адгезии и имплантации бластоцисты [4]. При ГпЭ стандартная терапия по протоколам МБ не эффективна у каждой третьей из пациенток [5]. При этом подразумевается размер М-эхо толщины эндометрия на 20-22 сутки менструального цикла 7 мм и менее [6]. Имплантация бластоцисты происходит успешно только тогда, когда эндометрий к ней наиболее восприимчив или рецептивен. Этот строго ограниченный по времени период в литературе получил название "окно имплантации" [7]. В любые другие дни эндометрий находится в нерепреципитивном состоянии и, таким образом, не обеспечивает успешную имплантацию [8]. Считается, что эффективность программ ЭКО напрямую зависит от состояния рецептивности эндометрия [9].

В настоящее время основными маркерами рецептивности эндометрия считаются: оптимальная толщина внутреннего слоя матки, наличие на его поверхности необходимого количества пиноподий, уровень экспрессии и соотношение рецепторов к эстрогенам и прогестерону, а также - достаточная продукция лейкоингибирующего фактора (ЛИФ), интегрин $\alpha\beta3$ и достаточный уровень экспрессии гена HOXA10 в эндометрии [10,11,12,13]. Наше внимание привлёк представленный в последние годы новый маркер высококлоногенных эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток (эМСК) - SUSD2 (суши домен). Этот маркер экспрессируется на мезенхимальных стволовых клетках (МСК), а также на некоторых раковых и опухолевых клеточных линиях, но не обнаруживается на кроветворных клетках периферической крови и костного мозга [14]. SUSD2 является маркером, который используется для идентификации и выделения МСК из костного мозга и ткани эндометрия. Эти МСК прямо и косвенно поддерживают состояние рецептивности эндометрия и могут быть индуцированы для дифференциации в широкий спектр типов клеток [15].

Принципиально все известные способы увеличения эффективности лечения МБ при ГпЭ можно разделить на 2 группы: 1 - способы, основанные на внутриматочном использовании лекарственных препаратов и физиотерапевтических воздействий и 2 - основанные на усовершенствовании методик отбора пациенток для проведения стандартной терапии по протоколам МБ.

Существует способ лечения бесплодия на фоне хронического эндометрита с гипоплазией эндометрия (патент на изобретение РФ № 2571236, опубл. 20.12.2015 г.). Способ включает комплексную терапию, в составе которой проводят внутриматочное введение лекарственных растворов с воздействием на эндометрий низкочастотного ультразвука (НЧУЗ). Процедуры НЧУЗ обработки проводят в три курса: в первом курсе для НЧУЗ обработки полости матки используют 0,05% водный раствор хлоргексидина. Во втором и третьем курсе используют раствор иммунофана на стерильном физиологическом растворе в соотношении 1/125. При этом в курсе лечения процедуры проводят один раз в день, ежедневно, при количестве процедур от 5 до 10. Между курсами лечения делают перерыв, равный 2-3 менструальным циклам. Начало проведения процедур в курсе: 5-9 день менструального цикла.

Известен способ предимплантационной подготовки к программе ЭКО пациенток при ГпЭ и снижении овариального резерва после оперированного наружного генитального эндометриоза (патент на изобретение РФ № 2591086, опубл. 10.07.2016 г.). При М-эхо 7 мм и меньше, уровне тестостерона в крови менее 1 нмоль/л назначают андриол перорально в дозе 40 мг в сутки на протяжении 2-3 месяцев до проведения программы ЭКО и продолжают в программе ЭКО до пункции фолликулов, дополнительно с 5 по 7 дни лечебного цикла проводят внутриматочную инсталляцию филграстима в дозе 100 мкг и инстиллягеля с использованием катетера Фолея. Способ позволяет повысить эффективность программ ЭКО и лечения бесплодия, осложненного снижением овариального резерва вследствие оперированного наружного генитального эндометриоза и гипоплазией эндометрия.

Предложен способ повышения рецептивности эндометрия у пациенток с МБ при наличии тонкого рефрактерного эндометрия при подготовке к проведению ЭКО (заявка на патент № 2017120906, опубл. 21.09.2018), отличающийся тем, что в период имплантационного окна на 7-й день после овуляции при 28-дневном менструальном цикле, предшествующем проведению ЭКО, проводят процедуру низкочастотного ультразвукового кавитационного орошения полости матки, при которой в качестве озвученной лекарственной среды применяют препарат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста Filgrastim® в дозе 300 мкг/мл в разведении 6 мл препарата на 200 мл 5% раствора декстрозы, длительность процедуры 5 мин, частота ультразвуковых волн 25 кГц.

Общим недостатком перечисленных выше способов является использование внутриматочных катетеров для введения препаратов и орошения слизистой оболочки матки, связанное с дополнительным риском инфицирования матки и болевыми ощущениями, что снижает качество жизни пациенток. Предложенные для местного использования лекарственные препараты даже при однократном применении могут

вызывать различные аллергические реакции и оказывать повреждающее действие. Характерным недостатком указанных способов является необходимость использования лекарственных препаратов не по их прямому назначению, что требует специального разрешения от Министерства Здравоохранения. Отсутствуют статистические данные об эффективности предлагаемых способов лечения МБ, не разработаны показания и противопоказания для их применения, критерии отбора пациенток для лечения.

Указанных недостатков в значительной степени лишены способы увеличения эффективности лечения МБ, основанные на индивидуальном целенаправленном отборе пациенток для стандартной терапии по утвержденным протоколам лечения (гормонального и/или ЭКО).

Наиболее близким по техническому решению к заявляемому способу является способ прогнозирования рецептивности эндометрия на основании оценки экспрессии гонадотропин - релизинг гормона (GnRG) и рецептора гонадотропин - релизинг гормона (GnRGR) в "окно имплантации" в эндометрии женщин бесплодием и неудачными попытками программы ЭКО (патент РФ № 2617515C1, опубл. 25.04.2017 г.). Указанный способ за счет целенаправленного отбора пациенток увеличивает вероятность наступления беременности в программах ЭКО и естественных циклах у женщин с МБ.

Способ включает исследование в биоптате эндометрия в "окно имплантации" количества пиноподий в поверхностном эпителии и иммуногистохимическое (ИГХ) определение уровней экспрессии GnRG и GnRGR. Прогностически неблагоприятными показателями для наступления беременности считают отставание секреторной трансформации эндометрия, снижение количества клеток, содержащих зрелые пиноподии в поверхностном эпителии, менее чем 20%, а также низкую экспрессию (<2 баллов) GnRG и GnRGR в эндометрии.

Однако данный метод не использовался для лечения МБ при ГпЭ и не учитывает клинические ситуации, обусловленные нарушением регенераторной способности эндометрия, когда механизмы опосредованные (GnRG) и (GnRGR) могут быть нарушены. Эндометриальная экспрессия GnRG и GnRGR в период "имплантационного окна" не является общепризнанным маркером рецептивности. Предложенные методики полуколичественной оценки результатов исследований (подсчета экспрессии (GnRG) и (GnRGR) и процента зрелых пиноподии в поверхностном эпителии при световой микроскопии) не обладают достаточной точностью и надежностью при сравнении с программными методами определения величины экспрессии и математическими моделями отбора пациенток, основанными на логистическом и регрессионном анализе.

Задачей заявляемого изобретения является повышение эффективности применения протоколов стандартной терапии МБ, обусловленного ГпЭ.

Заявляется способ определения вероятности наступления беременности у пациенток с МБ при ГпЭ отличающийся тем, что до назначения гормональной терапии и/или ЭКО исследуется анамнез репродуктивной функции женщины и на 20-22 день менструального цикла проводится ИГХ исследование экспрессии интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ и гена HOXA10 в строме эндометрия, а поверхностного маркера эмМК SUSD2 - в железах эндометрия.

Способ осуществляется следующим образом. У каждой новой пациентки с МБ при ГпЭ путем пайпель-биопсии в период имплантационного окна (на 20-22 день менструального цикла) забирается материал эндометрия, который обрабатывается по общепринятым ИГХ методикам. С целью морфометрического исследования микропрепараты сканируются, а затем с использованием программного обеспечения для морфометрии Aperio Image Scope v 9.0 рассчитывается экспрессия интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ и гена HOXA10 в строме эндометрия, а поверхностного маркера эмМК SUSD2 - в железах эндометрия.

Для назначения стандартной терапии МБ используется формула:

$$P = 1 / 1 + e^{-z} \quad (1)$$

где P - вероятность наступления беременности у пациенток с ГпЭ после стандартной терапии МБ;

e - основание натуральных логарифмов;

$z = 18,988 \times C1 + 14,492 \times C2 - 94,52 \times C3 - 4,985 \times C4 - 7,357$;

C1 - величина экспрессии маркера SUSD2 в железах эндометрия;

C2 - величина экспрессии гена HOXA10 в строме эндометрия;

C3 - величина экспрессии интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ в строме эндометрия;

C4 - количество неэффективных попыток ЭКО в анамнезе.

Интерпретация результатов: при значениях $P > 0,5$ предполагается высокая вероятность успеха стандартной терапии МБ у пациенток, страдающих ГпЭ, а при значениях $P \leq 0,5$ - отсутствие эффекта.

С учетом дихотомического, то есть имеющего лишь два возможных значения ожидаемого события: беременность или ее отсутствие, характера отбора пациенток для лечения нами использована бинарная логистическая регрессия. Этот подход позволяет в полном объеме использовать высокоинформативные клиничко-анамнестические и ИГХ предикторы эффективности для целенаправленного назначения стандартного лечения по протоколам МБ при ГпЭ.

При определении вероятности наступления (или не наступления) беременности у пациенток с МБ при ГпЭ применялся метод последовательного добавления переменных ("Форвард"), когда программа пошаговой логистической регрессии по очереди рассматривает все возможные варианты включения в

формулу новой переменной и/или удаления уже добавленных. Те переменные, добавление или удаление которых не улучшает или незначительно улучшает прогноз, отсеиваются и анализ останавливается. Таким образом, осуществляется удобное для математических расчетов включение в модель минимального количества прогностически наиболее информативных переменных. Изначально в качестве независимых переменных в пошаговый регрессионный анализ были включены показатели значимо влияющие на возможность зачатия: возраст пациенток, их индекс массы тела, наличие или отсутствие гипоменструального синдрома, ранних репродуктивных потерь и неэффективных попыток ЭКО в анамнезе, количество соматических и гинекологических заболеваний, толщина эндометрия по данным УЗИ, данные ИГХ исследования маркеров рецептивности эндометрия: экспрессии эстрагенового рецептора альфа, рецептора для прогестерона, интегрин $\alpha\beta 3$, ЛИФ, гена HOXA10 и поверхностного маркера EMCK SUSD2 .

Включение на третьем и четвертом шаге регрессионного анализа таких переменных как безуспешные попытки ЭКО в анамнезе и экспрессия интегрин $\alpha\beta 3$ в строме эндометрия не увеличивало точность прогнозирования классификации новых случаев по исходам, но существенно повышало достоверность и правдоподобие разработанной модели. В результате способ определения вероятности наступления беременности у пациенток с МБ при ГпЭ с целью назначения стандартной терапии по протоколам МБ при ГпЭ прошел более строгий отбор многомерности связи с эффектами взаимодействия. Поэтому конечная модель имеет высокую объяснительную способность. Полученные для данной модели межгрупповые отличия по критерию Хи-квадрат составили 27,253 при значении $p=0,000$.

Качество и предсказательная точность разработанной модели оценивалась при помощи ROC-анализа. По полученным данным площадь под ROC-кривой составила 0,932 при $p=0,044$.

Таким образом, при предложенной программой регрессии точке отсечения 0,500 полученная математическая модель обладает достаточно высокой чувствительностью (92,6%) и специфичностью (72,6%) для прогнозирования неэффективности стандартной терапии по протоколам МБ при ГпЭ, что предполагает необходимость применения иного вида терапии.

Клинические примеры.

Пример 1. Пациентка Р. 28 лет, страдает первичным бесплодием в течение 2 лет. Месячные с 14 лет, цикл 27 дней, регулярный, продолжительностью 3-4 дня, характер менструаций скудный. В анамнезе - хронический гастрит. Гинекологических заболеваний не выявлено. Ранее в программах ЭКО не участвовала, прошла курс гормональной терапии без результата. При УЗИ обследовании на 20 день менструального цикла М-эхо толщины эндометрия 4,0 мм. Выполнена пайпель-биопсия с забором материала эндометрия для ИГХ исследования. Экспрессия интегрин $\alpha\beta 3$ в строме эндометрия отсутствовала, экспрессия гена HOXA10 в строме эндометрия составила 0,73, а поверхностного маркера EMCK SUSD2 в железах эндометрия - 0,09. При расчете вероятности наступления беременности по формуле (1) получено значение $P=0,99$. С учетом высокой вероятности успеха пациентка была включена в программу ЭКО после чего наступила одноплодная беременность, которая закончилась срочными родами.

Пример 2. Пациентка С. 38 лет, страдает вторичным бесплодием в течение 2 лет. До обращения не лечилась. В анамнезе - самостоятельные роды 6 лет назад, 2 медицинских аборта, 1 выкидыш 3 года назад. Месячные с 13 лет, продолжительностью 28 дней, длительностью 4-5 дней, регулярные, в умеренном количестве. При обследовании сопутствующих соматических и гинекологических заболеваний не выявлено. При УЗИ исследовании на 21 день менструального цикла размер М-эхо толщины эндометрия составил 5,0 мм. При ИГХ исследовании маркеров рецептивности в эндометрии экспрессия интегрин $\alpha\beta 3$ в строме составила 0,01, экспрессия гена HOXA10 в строме - 0,77, а маркера SUSD2 в железах эндометрия - 0,04. Расчетная величина вероятности наступления беременности (Р) для стандартного лечения по протоколам МБ составила 0,97. Был назначен курс гормональной терапии по длинному протоколу, после которого пациентка забеременела самостоятельно. Беременность протекала без осложнений и закончилась срочными родами.

Пример 3. Пациентка К. 28 лет, страдает первичным бесплодием 4 года. Получила 2 курса гормональной терапии (короткий и длинный), 2 года назад прошла процедуру инсеминации. Беременностей не было. Месячные с 13 лет, цикл 28 дней, по 4-5 дней, умеренные, безболезненные. Детальное гинекологическое обследование (УЗИ органов малого таза, продукция половых гормонов, обследование на инфекции, передающиеся половым путем, гистероскопия, мазки из уретры и цервикального канала) не выявило отклонений от нормы. Соматически здорова. По данным УЗИ толщина эндометрия на 21 день менструального цикла составила 5,0 мм. Выполнена пайпель-биопсия эндометрия с последующим ИГХ исследованием полученного материала. Экспрессия интегрин $\alpha\beta 3$ в строме составила 0,02, гена HOXA10 в строме и маркера SUSD2 в железах эндометрия - 0,43 и 0,04 соответственно. Расчетная величина $P=0,095$. Несмотря на низкую вероятность наступления беременности у данной пациентки была принята попытка ЭКО, без результата.

Пример 4. Пациентка Л. 37 лет, страдает вторичным бесплодием в течение 4 лет. Ранее имела 2 беременности (самостоятельно и после ЭКО) которые закончились ранними репродуктивными потерями (выкидыши), прошла 2 курса гормональной терапии, подготовлена к повторному ЭКО. Соматически отягощена субклиническим гипотиреозом. Гинекологических заболеваний не было. Месячные с 14 лет, про-

должительность цикла 27 дней, регулярные, безболезненные, умеренные, по 4-5 дней. По данным УЗИ исследования на 20 день менструального размер М-эхо толщины эндометрия до 6,0 мм. Специальное ИГХ исследование пайпель-биопсийного материала эндометрия выявило высокое значение экспрессии гена HOXA10 в строме (0,82) при относительно низкой экспрессии маркера SUSP2 в железах эндометрия (0,02). Экспрессия интегрина $\alpha v \beta 3$ в строме составила 0,01. С учетом безуспешной попытки ЭКО в анамнезе рассчитанное по формуле (1) значение Р показало величину 0,26. Однако была предпринята повторная попытка ЭКО, без эффекта.

Литература.

1. Пономаренко, К.Ю. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями в репродуктивной системе /К.Ю. Пономаренко //Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. - № 4. – С. 90 – 97.
2. Акушерство и гинекология. Клинические рекомендации / под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 1024 с.
3. The European health report 2015. Targets and beyond – reaching new frontiers in evidence. - Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2015. – 234 p.
4. Кобаидзе, Е.Г. Нарушение функции эндометрия при хронических воспалениях матки /Е.Г. Кобаидзе, М.М. Падруль //Пермский медицинский журнал. - 2014. - Т. 33, №5. - С. 92-101.
5. Прегравидарная подготовка: клинический протокол / под ред. В.Е. Радзинского. - М.: Status Praesens, 2016. - 80 с.
6. Zhang, J. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy / J.Zhang, C.Dunk, A.B.Croy // Cell. Tissue. Res.- 2016.- Vol.363.- P.249-265.

7. Бурменская, О.В. Поиск маркеров персонального «окна имплантации» у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения с помощью определения транскрипционного профиля генов /О.В. Бурменская, В.К. Боженко, В.Ю. Смольникова //Акушерство и гинекология. - 2017. - № 5. – С. 72-80.
8. Карева, Е.Н. Эстрогены и головной мозг /Е.Н. Карева, О.М. Олейникова, В.О. Панов //Вестник РАМН. - 2012.- № 2.- С.48-59.
9. Edwards, R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? /R.G. Edwards //Reprod. Biomed. Online. - 2006.- Vol. 13.- P. 887-904.
10. Левиашвили, М.М. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе /М.М. Левиашвили, Т.А. Демура, Н.Г. Мишиева, Н.М. Фазуллина //Акушерство и гинекология. - 2012. - № 4-1. - С. 65 - 69.
11. Ниаури, Д.А. Иммуногистохимическая характеристика рецептивности эндометрия в циклах ЭКО /Д.А. Ниаури, А.М. Гзгзян, И.М. Кветной, И.Ю. Коган //Акушерство и гинекология. - 2014. - № 9. – С. 44-50.
12. Connelly, O.M. Reproductive functions of progesterone receptors Recent /O.M. Connelly //Prog. Horm. Res.- 2012. – Vol.57.- P.339 - 355.
13. Garrido-Gómez, T. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results /T. Garrido-Gómez, M. Ruiz-Alonso, D. Blesa //Fertil. Steril. - 2013-Vol.99.- P.1078-1085.
14. Masuda H., Anwar S.S., Bühring H.J., Rao J.R., Gargett C.E. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells //Cell Transplant. – 2012. - Vol. 21. - 2201–2214.
15. Усольцева Е.О., Гзгзян А.М., Джемлиханова Л.Х., Ниаури Д.А. Перспективы клинического использования стволовых клеток эндометриального происхождения //Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. 64, № 6. – С. 68 - 77.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения вероятности наступления беременности у пациенток с маточным бесплодием при гипоплазии эндометрия с учетом количества неэффективных попыток ЭКО в анамнезе, при котором на 20-22 день менструального цикла (период "окна имплантации") проводят иммуногистохимическое исследование экспрессии интегрина $\alpha v \beta 3$ и гена $HOXA10$ в строме эндометрия, и также поверхностного маркера эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток $SUSD2$ - в железах эндометрия, а расчет вероятности наступления беременности определяют по формуле

$$P = 1 / 1 + e^{-z} \quad (1)$$

где P - вероятность наступления беременности;

e - основание натуральных логарифмов;

$z = 18,988 \times C1 + 14,492 \times C2 - 94,52 \times C3 - 4,985 \times C4 - 7,357$;

$C1$ - величина экспрессии маркера $SUSD2$ в железах эндометрия;

$C2$ - величина экспрессии гена $HOXA10$ в строме эндометрия;

$C3$ - величина экспрессии интегрина $\alpha v \beta 3$ в строме эндометрия;

$C4$ - количество неэффективных попыток ЭКО в анамнезе,

в итоге при значениях $P > 0,5$ устанавливают высокую вероятность наступления беременности у пациенток, страдающих маточным бесплодием при гипоплазии эндометрия, а при значениях $P \leq 0,5$ - отсутствие эффекта.

