

Пилотное исследование эффективности внутриматочного безабляционного эрбиевого лазера при подготовке эндометрия к переносу размороженного эмбриона у женщин с неудачами имплантации в анамнезе

О.А. Пустотина^{✉1,2}, А.А. Гашенко^{1,3}, Е.И. Устинова⁴, Е.А. Лишова⁴, А.В. Лопатина^{2,5}, Ж.С. Течиева³, З. Визинтин²

¹ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева», Санкт-Петербург, Россия;

²Laser and Health Academy, Любляна, Словения;

³Центр ЭКО «Виталис», Москва, Россия;

⁴ООО «ИНВИТРО», Москва, Россия;

⁵ООО «Медицинская косметология», Москва, Россия

Аннотация

Обоснование. Актуальной проблемой вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) остаются неудачи имплантации эмбриона.

Цель. Определить влияние внутриматочного облучения безабляционным эрбиевым лазером на состояние эндометрия по данным гистологического и иммуногистохимического исследований и оценить его эффективность в протоколах переноса размороженного эмбриона (РЭ).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 25 женщин 26–45 лет, имеющих от 1 до 5 неудачных имплантаций в анамнезе и планирующих беременность в протоколе переноса РЭ. Всем пациенткам на 6–10-й день менструального цикла производилась однократная процедура внутриматочного облучения эндометрия и слизистой цервикального канала эрбиевым лазером в безабляционном режиме на лазерной системе Fotona SP Dynamis (Словения). Оценивались гистологические и иммуногистохимические характеристики эндометрия до и через 1–2 мес после процедуры, а также частота наступления беременности при последующем переносе РЭ.

Результаты. Внутриматочное облучение безабляционным эрбиевым лазером повысило пролиферативную активность эндометрия ($p=0,029$), экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста ($p=0,029$), уменьшило очаги склероза в спиральных артериях и строме эндометрия, улучшило экспрессию рецепторов прогестерона и эстрогенов, что значительно повысило эффективность криопротоколов ВРТ ($p=0,013$).

Ключевые слова: безабляционный эрбиевый лазер, подготовка эндометрия, перенос размороженного эмбриона, неудачи имплантации

Для цитирования: Пустотина О.А., Гашенко А.А., Устинова Е.И., Лишова Е.А., Лопатина А.В., Течиева Ж.С., Визинтин З. Пилотное исследование эффективности внутриматочного безабляционного эрбиевого лазера при подготовке эндометрия к переносу размороженного эмбриона у женщин с неудачами имплантации в анамнезе. Гинекология. 2023;25(1):62–71. DOI: 10.26442/20795696.2023.1.202084

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2023 г.

Введение

Несмотря на достижения современных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в преодолении бесплодия, частота наступления клинической беременности составляет, по данным Российской ассоциации репродукции человека, всего 34,6% [1]. Сегментация цикла овариальной

стимуляции с последующей пункцией фолликулов и отсроченным переносом размороженного эмбриона (РЭ) увеличили данный показатель всего на 7,1%. Одной из основных причин неудач считается нарушение функциональной активности или восприимчивости эндометрия. Показано [2–4], что при неудачах имплантации имеют место повреждение

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Пустотина Ольга Анатольевна – д-р мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом репродуктивной медицины ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева», Laser and Health Academy. E-mail: pustotina@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6117-7270

Гашенко Анфиса Анатольевна – канд. мед. наук, соискатель каф. акушерства и гинекологии с курсом репродуктивной медицины ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева», врач Центра ЭКО «Виталис». E-mail: anfisa.gashenko@mail.ru

Устинова Елена Игоревна – канд. мед. наук, зав. лаб. гистологии и цитологии ООО «ИНВИТРО». E-mail: Eustinova@invitro.ru

Лишова Екатерина Александровна – ООО «ИНВИТРО». E-mail: elishova@invitro.ru

Лопатина Анна Владимировна – глав. врач ООО «Медицинская косметология», Laser and Health Academy. E-mail: smimos@smimos.ru

Течиева Жанна Сергеевна – канд. мед. наук, глав. врач Центра ЭКО «Виталис». E-mail: texhieva23@mail.ru

Визинтин Зденко – Laser and Health Academy. E-mail: zdenko2011@gmail.com; ORCID: 0000-0003-3044-190X

[✉]Olga A. Pustotina – D. Sci. (Med.), Inozemtsev Academy of Medical Education, Laser and Health Academy. E-mail: pustotina@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6117-7270

Anfisa A. Gashenko – Cand. Sci. (Med.), Inozemtsev Academy of Medical Education, Center for In Vitro Fertilization “Vitalis”. E-mail: anfisa.gashenko@mail.ru

Elena I. Ustinova – Cand. Sci. (Med.), INVITRO. E-mail: Eustinova@invitro.ru

Ekaterina A. Lishova – INVITRO. E-mail: elishova@invitro.ru

Anna V. Lopatina – Chief Doctor, Medical Cosmetology, Laser and Health Academy. E-mail: smimos@smimos.ru

Zhanna S. Techiieva – Cand. Sci. (Med.), Center for In Vitro Fertilization “Vitalis”. E-mail: texhieva23@mail.ru

Zdenko Vizintin – Laser and Health Academy. E-mail: zdenko2011@gmail.com; ORCID: 0000-0003-3044-190X

A pilot study of the intrauterine non-ablative erbium laser effectiveness in the endometrium preparation for cryopreserved embryo transfer in women with a history of implantation failures

Olga A. Pustotina^{1,2}, Anfisa A. Gashenko^{1,3}, Elena I. Ustinova⁴, Ekaterina A. Lishova⁴, Anna V. Lopatina^{2,5}, Zhanna S. Techiieva³, Zdenko Vizintin²

¹Inozemtsev Academy of Medical Education, Saint Petersburg, Russia;

²Laser and Health Academy, Ljubljana, Slovenia;

³Center for In Vitro Fertilization "Vitalis", Moscow, Russia;

⁴INVITRO, Moscow, Russia;

⁵Medical Cosmetology, Moscow, Russia

Abstract

Background. Embryo implantation failure remains an urgent issue of assisted reproductive technologies (ART).

Aim. To determine the effect of intrauterine irradiation with a non-ablative erbium laser on the endometrium state using the histological and immunohistochemical examination and to evaluate its effectiveness in ART cryo-protocols.

Materials and methods. The study enrolled 25 women aged 26–45 with 1 to 5 failed implantations who were planning a pregnancy in a cryopreserved embryo transfer protocol. On days 6–10 of the menstrual cycle, all patients underwent a single procedure of intrauterine irradiation of the endometrium and cervical canal mucosa with an erbium laser in a non-ablative mode using Fotona SP Dynamis laser system (Slovenia). The histological and immunohistochemical data of the endometrium before and 1–2 months after the procedure and the pregnancy rate with subsequent transfer of the cryopreserved embryo were assessed.

Results. Intrauterine irradiation with a non-ablative erbium laser increased the proliferative activity of the endometrium ($p=0.029$), the expression of vascular endothelial growth factor ($p=0.029$), reduced the sclerosis lesions in the spiral arteries and endometrial stroma, increased the expression of progesterone and estrogen receptors, thus significantly increasing the effectiveness of the ART cryo-protocols ($p=0.013$).

Keywords: non-ablative erbium laser, endometrial preparation, assisted reproductive technology cryo-protocol, implantation failures

For citation: Pustotina OA, Gashenko AA, Ustinova EI, Lishova EA, Lopatina AV, Techiieva ZhS, Vizintin Z. A pilot study of the intrauterine non-ablative erbium laser effectiveness in the endometrium preparation for cryopreserved embryo transfer in women with a history of implantation failures. *Gynecology*. 2023;25(1):62–71. DOI: 10.26442/20795696.2023.1.202084

рецепторного аппарата эндометрия, низкий уровень экспрессии рецепторных белков, молекул адгезии, недостаточная пролиферативная активность эндометриальных желез и фибропластические изменения стромального и сосудистого компонента. Применение различных физиотерапевтических методов для восстановления функциональной активности эндометрия демонстрирует свою эффективность в повышении частоты имплантации эмбриона и клинических беременностей в циклах ВРТ [5], среди которых все более широко используется лазерная энергия [6].

В последние годы в гинекологии для лечения симптомов вульвовагинальной атрофии применяются лазерные системы, индуцирующие световые волны с хорошим поглощением, такие как CO₂ и эрбиевые лазеры, что актуально для высоко гидратированных слизистых оболочек. Создание нового лазерного излучения с длиной волны 2940 нм в тепловом режиме SMOOTH сверхдлинными пакетными импульсами, генерируемого эрбием на иттрий-алюминиевом гранате (Er:YAG) на лазерной системе Fotona SP Dynamis (FOTONA, Словения), дало возможность создавать фототермические изменения в тканях без абляционного повреждения [7, 8].

Во время процедуры лечения вульвовагинальной атрофии с помощью безабляционного эрбиевого лазера системы Fotona SP Dynamis специальное вагинальное устройство (адаптер) равномерно распределяет лазерную энергию по всей длине и окружности влагалищного канала, вызывая строго контролируемую термомодификацию через все слои слизистой оболочки. Образующиеся в результате белки теплового шока запускают реакции клеточного иммунитета с развитием асептического воспаления. Ключевым элементом воспалительного ответа является экспрессия различ-

ных факторов роста, таких как трансформирующий фактор роста β, тромбоцитарный фактор роста и основной фактор роста фибробластов, активирующих фибробласты к неокколагенезу и образованию компонентов внеклеточного матрикса, кроме того, повышается экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), стимулирующего неогенез, и эпидермального фактора роста, запускающего процесс регенерации эпителия. Таким образом, лазерная тепловая энергия стимулирует восстановление и обновление тканей [9, 10].

Клинические исследования применения безабляционного эрбиевого лазера у женщин показали значительное уменьшение сухости, жжения, раздражения и диспареунии, повышение плотности и эластичности стенок влагалища, а также улучшение контроля мочеиспускания [11]. Наиболее значимое ($p<0,01$) уменьшение симптомов вульвовагинальной атрофии и повышение индекса вагинального здоровья наступало через месяц после первой процедуры и последовательно улучшалось после двух следующих, проводимых с интервалом 4 нед [12, 13]. Дополнительная обработка внутренней стенки уретры с помощью тонкой интрауретральной канюли значительно улучшила эффективность лазерного лечения у женщин со стрессовым недержанием мочи [14]. Все гинекологические процедуры на лазерной системе Fotona SP Dynamis являются автоматическими, с экспериментально рассчитанными и сопоставленными лазерными и тканевыми параметрами, с глубиной и степенью теплового воздействия. Это не только исключает риск поражения глубоких структур стенки влагалища, повреждения (абляции) ткани, возможных некротических осложнений и кровотечений, но и ассоциировано с очень низкой частотой побочных эффектов во время и после лечения [15].

Экстраполируя данные об эффективности безабляционного эрбиевого лазера в ремоделировании слизистой оболочки влагалища и мочеиспускательного канала на проблему морфофункциональных нарушений эндометрия, мы решили исследовать влияние внутриматочного использования эрбиевого лазера при подготовке эндометрия к переносу РЭ в полость матки у женщин с неудачами имплантации в циклах ВРТ.

Цель исследования – определить влияние внутриматочного облучения безабляционным эрбиевым лазером на состояние эндометрия по данным гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследований и оценить его эффективность в криопротокколах ВРТ.

Материалы и методы

Открытое проспективное рандомизированное клиническое исследование одобрено этическим комитетом ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева» в соответствии с законодательством Российской Федерации и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и проводилось с февраля по ноябрь 2022 г. в Центре ЭКО «Виталис» (г. Москва). В исследовании приняли участие 25 женщин 26–45 лет, имеющих от 1 до 5 неудачных имплантаций в анамнезе и планирующих беременность в протоколе переноса криоконсервированного эмбриона.

Всем пациенткам после подписания добровольного информированного согласия на участие в исследовании проводились гистологическое и ИГХ исследования эндометрия, полученного при офисной гистероскопии в середине фолликулярной фазы менструального цикла (рис. 1). Через 1–2 мес на 6–10-й день менструального цикла выполнялась однократная процедура внутриматочного облучения эндометрия и слизистой цервикального канала эрбиевым лазером в безабляционном режиме на лазерной системе Fotona SP Dynamis, Словения. Через 1–2 мес после процедуры в те же дни цикла у 12 из пролеченных женщин повторно проводились гистологическое и ИГХ исследования эндометрия, полученного путем пайпель-биопсии. Всем пациенткам до и после процедуры проводилось цитологическое исследование соскоба слизистой цервикального канала. Через 1–4 мес после лазерной процедуры 17 пациенткам осуществлен перенос РЭ в полость матки.

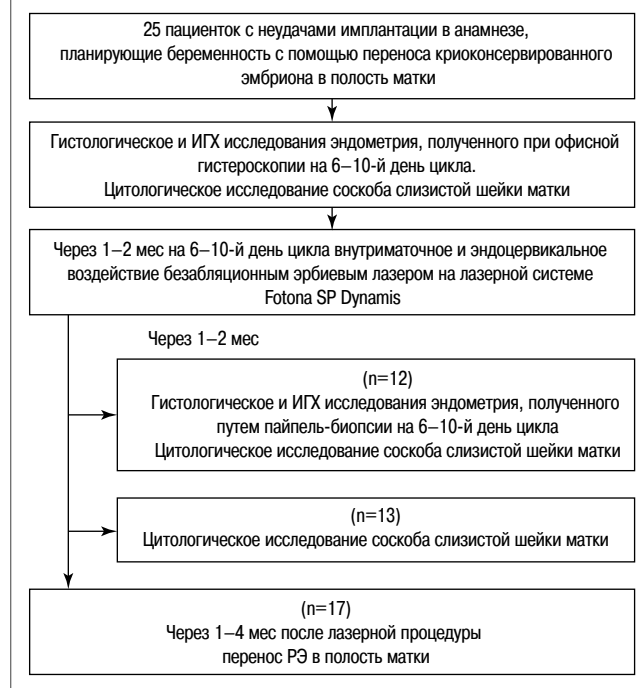
Критериями невключения в исследование являлись злокачественные и острые инфекционно-воспалительные заболевания наружных и внутренних половых органов, тяжелые сопутствующие соматические заболевания. Критерии исключения – нарушение протокола исследования, побочные эффекты проводимой терапии, желание пациентки завершить участие в исследовании.

Описание лазерной процедуры

Без расширения цервикального канала в полость матки вводился диагностический маточный зонд и определялась длина полости матки. Затем посредством манипулы R09-2Gu лазерной системы Fotona SP Dynamis через цервикальный канал вводилась канюля диаметром 4 мм (рис. 2). После контакта с дном матки канюля выдвигалась до внутреннего зева по продольной оси в точках, отстоящих друг от друга на расстоянии 2,5 мм, и выполнялось облучение эрбиевым лазером в безабляционном режиме на длине волны 2940 нм, пакетами по 4 лазерных импульса с плотностью потока энергии 1,5 Дж/см², частотой повторения пакета импульсов 1,4 Гц и диаметром пятна 4 мм. Осуществляли три прохода по продольной оси тела матки

Рис. 1. Дизайн исследования.

Fig. 1. Study design.



по направлению от дна до внутреннего зева шейки матки, затем по три прохода по линиям под углом 30° вправо и влево относительно указанной оси. Соответственно, всего выполнялось 9 проходов в полости матки по линиям длиной 2–3 см. Затем осуществляли три прохода по всей длине цервикального канала (около 3 см).

Методы исследования

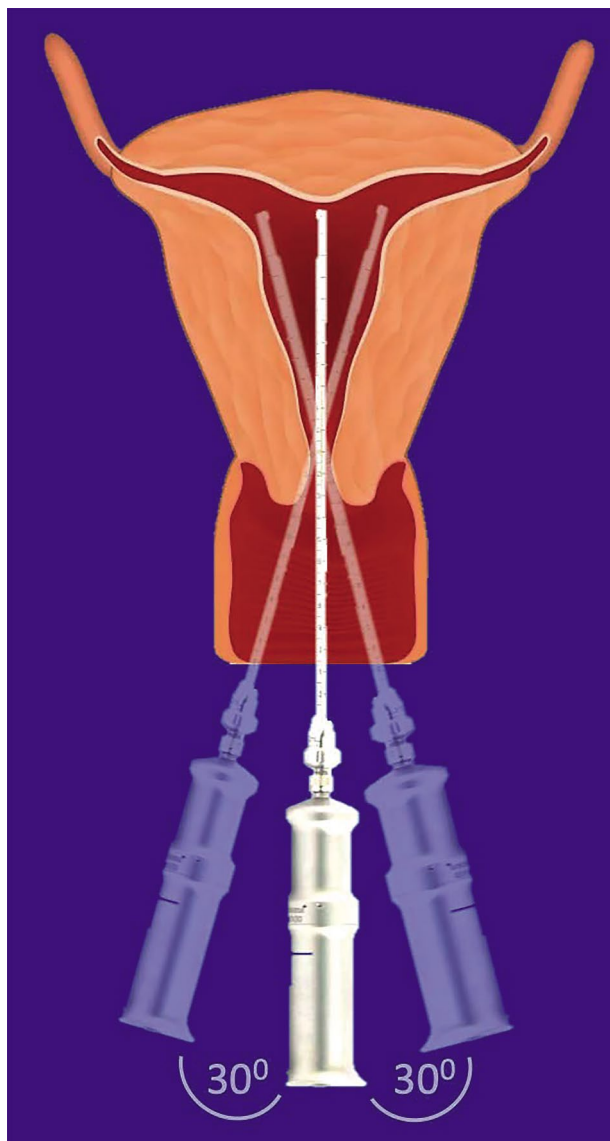
Гистологические, ИГХ и цитологические исследования проводились в лаборатории гистологии и цитологии КДЛ ИНВИТРО-Москва.

Гистологическое и ИГХ исследования эндометрия

Из образцов ткани эндометрия, зафиксированных в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24–48 ч, изготавливались срезы толщиной 3,5 мкм и монтировались на высокоадгезивные стекла с последующим проведением рутинного гистологического исследования с окраской образца гематоксилином и эозином и обязательным ИГХ исследованием.

Алгоритм проведения оценки функционального состояния эндометрия включал оценку пригодности образца к исследованию, характер и степень выраженности пролиферативной активности, очагов склероза, лимфоидной инфильтрации, оценку наличия изменений типа полиповидной трансформации и/или гиперпластических изменений.

ИГХ исследование проводилось в ручном и автоматическом режиме по стандартному протоколу с использованием первичных моноклональных кроличьих и мышинных антител Dako FLEX в готовом разведении к эстрогеновым рецепторам (ЭР) α (клон ER1) и прогестероновым рецепторам – ПР (клон PgR 636), маркеру плазматических клеток CD138 (клон MI15), Agilent, USA, VEGF (клон VG1) в рабочем разведении 1:40, BioSystems Diagnostics, USA, систем визуализации EnVision™ FLEX+, High pH, Dako/Agilent, USA, OptiView DAB IHC Detection Kit, Roche, Ventana на иммуноштейне Ventana BenchMark Ultra, Roche Diagnostics, USA.

Рис. 2. Параметры процедуры.**Fig. 2. Procedure parameters.**

Примечание. Эрбий/YAG smooth, манипула R09-2Gi, канюля 26 мм диаметром 4 мм (Fotona SP Dypamis, Словения), 2940 нм, 1,5 Дж/см², 1,4 Гц, 4 мм пятно.
Описание процедуры: без расширения цервикального канала и анестезии в полость матки вводилась тонкая канюля диаметром 4 мм, после чего вдоль центральной линии матки делалось по 4 лазерных импульса через каждые 2,5 мм – всего 3 прохода, затем по 3 прохода по линиям под углом 30° вправо и влево (всего 9 проходов в полости матки). Затем 3 прохода по всей длине цервикального канала.

В каждой серии препаратов присутствовал соответствующий положительный и отрицательный контроль.

Результаты ИГХ реакций оценивались качественным и полуколичественным методами при световой микроскопии с увеличением объектива 4–40х.

Оценка экспрессии ЭР и ПР

Проводился подсчет количества окрашенных ядер клеток желез эндометрия, учитывалось процентное соотношение окрашенных/неокрашенных ядер клеток на 100 учтенных клеток в 10 репрезентативных полях зрения при 40-кратном увеличении и давался описательный ответ с указанием процента клеток, в которых определяется экспрессия антител к ЭР и ПР. Выраженность экспрессии ЭР и ПР оценивалась методом гистологического счета HISTO SCORE с учетом

количества и интенсивности окрашенных клеток эпителия желез и стромы эндометрия и вычислялась по формуле:

$$HS=1a+2b+3c,$$

где a, b, c – % слабо, умеренно и интенсивно окрашенных клеток соответственно 1, 2, 3-й степени экспрессии, выраженной в баллах. При этом: 0–10 баллов – отсутствие экспрессии, 11–100 баллов – слабая экспрессия, 101–200 баллов – умеренная экспрессия, 201–300 баллов – выраженная экспрессия ЭР и ПР.

Экспрессия CD138 и VEGF оценивалась качественным методом на основании наличия/отсутствия экспрессии антител в клетках/строме и их локации (ядерное/мембранное/цитоплазматическое) в эндометрии.

- Цитологическое исследование смешанного соскоба экто- и эндоцервикса проводилось методом жидкостной цитологии с окрашиванием по Папаниколау по технологии ThinPrep®.
- Ультразвуковое исследование (УЗИ) толщины эндометрия осуществлялось в середине менструального цикла до и через 1–2 мес после лазерной процедуры на аппарате HITACHI ALOKA Prosaund alfa7.

Статистические методы

Статистическая обработка результатов проведена с помощью Microsoft Excel 2000 и программы Statistica 6.0. Нормальность распределения показателей определена с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Количественные данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения M (SD), качественные – в абсолютных числах (n) и относительных величинах (%). Статистическую значимость различий средних величин оценивали с использованием t-критерия (Стьюдента). За уровень значимости принято $p < 0,05$.

Критерии эффективности лечения

Первичные результаты: динамика показателей гистологического и ИГХ исследований эндометрия, цитологического исследования соскоба слизистой шейки матки (отсутствие признаков заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека), частота биохимической и клинической беременности. Биохимическая беременность определялась при получении положительного результата анализа на хорионический гонадотропин человека через 2 нед после переноса эмбриона. Клиническая беременность устанавливалась при наличии плодного яйца в матке по данным УЗИ через 3–4 нед после переноса РЭ в полость матки.

Вторичные результаты: переносимость и безопасность лазерной процедуры, нежелательные явления в период наблюдения.

Результаты

Гистологическое и ИГХ исследования эндометрия, полученного при офисной гистероскопии в середине I фазы менструального цикла у 25 пациенток с неудачами имплантации в анамнезе, показало у 56% из них признаки слабой пролиферации желез эндометрия, у 86% низкую экспрессию антител к VEGF (показателю пролиферативной активности эпителия сосудов), у 68% – склероз спиральных артерий и/или стромы и у каждой 4-й – маркеры хронического эндометрита (выраженный склероз сосудов и стромы эндометрия в сочетании с позитивной экспрессией CD138+); табл. 1. Экспрессия ядерных ЭР и/или ПР также оказалась недостаточной у 56% пациенток, что проявлялось наличием большого количества клеток с низкой экспрессией рецепторов или ее полным отсутствием (табл. 2).

Таблица 1. Гистологическая и ИГХ характеристика эндометрия у пациенток с неудачами имплантации в анамнезе (n=25)
Table 1. Histological and immunohistochemistry (IHC) features of the endometrium in patients with a history of implantation failures (n=25)

Гистологическая и ИГХ характеристики эндометрия на 6–10-й день цикла	Абс.	%
Активная пролиферация	11	44,0
Склероз спиральных артерий и/или стромы	17	68,0
Хронический эндометрит (CD138+, склероз сосудов и стромы)	6	24,0
Лимфоидная инфильтрация (фокальная/диссеминированная)	16	64,0
Позитивная экспрессия VEGF		
• Спиральные артерии	14	56,0
- Выраженная экспрессия	13	52,0
• Строма	19	76,0
- Выраженная экспрессия	4	16,0

Таблица 2. Экспрессия ядерных ПР и ЭР в эндометрии у пациенток с неудачами имплантации в анамнезе (n=25)

Экспрессия ядерных ПР и ЭР в эндометрии на 6–10-й день цикла	Абс.	%
Экспрессия ядерных ПР		
• в >90% железистых клеток	19	76,0
• в >90% клеток стромы	17	68,0
Выраженная экспрессия (H-score >200 N-баллов)		
• в железистых клетках	18	72,0
• в клетках стромы	17	68,0
Отсутствие экспрессии в клетках стромы	1	4,0
Экспрессия ядерных ЭР		
• в >90% железистых клеток	17	68,0
• в >90% клеток стромы	13	52,0
Выраженная экспрессия (H-score >200 N-баллов)		
• в железистых клетках	17	68,0
• в клетках стромы	17	68,0
Отсутствие экспрессии в клетках стромы	2	8,0

Сравнительные гистологическое и ИГХ исследования эндометрия, проведенные через 1–2 мес у 12 из пролеченных пациенток, показало значительные изменения его морфофункционального состояния (рис. 3). Активная пролиферация в середине I фазы цикла, отмечавшаяся первоначально только у 41,7% пациенток, после лазерной процедуры имела место у 83,3% ($p=0,029$), при этом наличие склеротических изменений спиральных артерий и/или стромы, наоборот, значительно снизилось с 58,3 до 16,7% ($p=0,029$). Признаки хронического эндометрита (позитивная экспрессия CD138 в сочетании с выраженным склерозом сосудов и стромы) выявлены у 2 женщин, у 1 из которых через 2 мес после лазерной процедуры они отсутствовали, а у другой очаги склероза значительно уменьшились. Диссеминированная или фокальная лимфоидная инфильтрация встречалась у 1/2 женщин как до, так и после лечения. Лазерное воздействие вызвало значительное улучшение экспрессии VEGF (рис. 4): все клетки эндометрия (в спиральных артериях и

Рис. 3. Гистологическая характеристика эндометрия на 6–10-й день менструального цикла до и через 1–2 мес после лазерного лечения (n=12), %.

Fig. 3. Histological features of the endometrium on days 6–10 of the menstrual cycle before and 1–2 months after laser treatment (n=12), %.

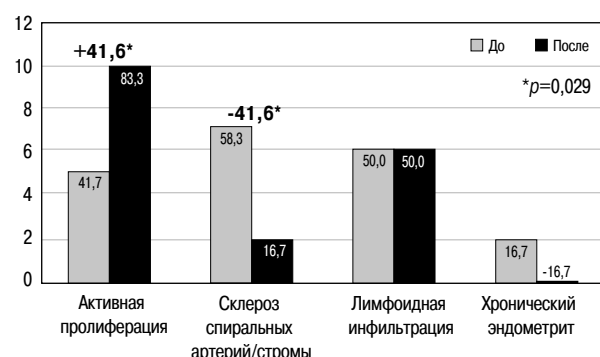


Рис. 4. Экспрессия VEGF в эндометрии на 6–10-й день менструального цикла до и через 1–2 мес после лазерного лечения (n=12), %.

Fig. 4. VEGF expression in the endometrium on days 6–10 of the menstrual cycle before and 1–2 months after laser treatment (n=12), %.



Примечание. Здесь и далее на рис. 5, 6: выраженная экспрессия >200 баллов

строме) начали экспрессировать VEGF, при этом у большинства пациенток экспрессия стала выраженной и только в 3 случаях оставалась неравномерной.

Подобная динамика прослеживалась и с экспрессией ЭР и ПР. Первоначально выраженная экспрессия ядерных ПР (>200 H-баллов) в >90% железистых клеток отмечалась у 75% женщин и у 66,7% – в строме (рис. 5). У остальных ПР обнаруживались в 72–90% клеток и имели сниженную экспрессию (172–199 H-баллов), у 1 женщины в строме эндометрия экспрессия отсутствовала. Через 1–2 мес после лазерной процедуры у 11 из 12 (91,7%) женщин >90% железистых клеток эндометрия активно экспрессировали ПР. Количество стромальных клеток с выраженной экспрессией не изменилось, но общее количество экспрессирующих клеток превысило 90% у 83,3% женщин.

До лечения ядерные ЭР с выраженной экспрессией (>200 H-баллов) в >90% клеток имели 66,7% пациенток в железах эндометрия и только 33,3% – в строме, при этом у 2 пациенток экспрессия в стромальных клетках отсутство-

Рис. 5. Экспрессия ядерных ПР в эндометрии на 6–10-й день менструального цикла до и через 1–2 мес после лазерной процедуры (n=12), %.

Fig. 5. Nuclear PR expression in the endometrium on days 6–10 of the menstrual cycle before and 1–2 months after the laser procedure (n=12), %.

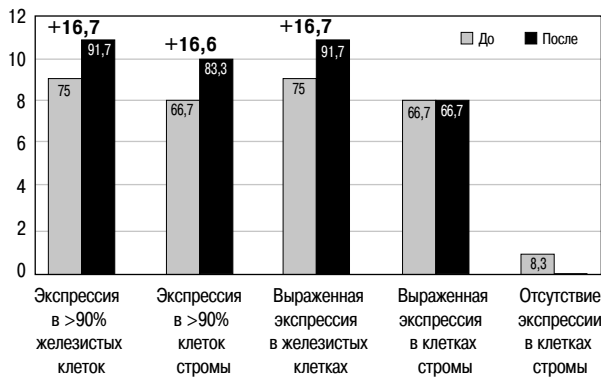
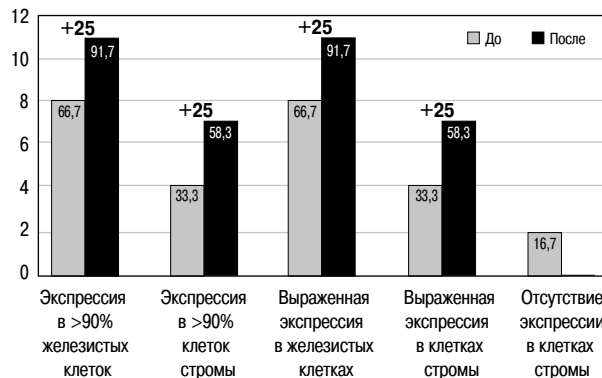


Рис. 6. Экспрессия ядерных ЭР в эндометрии на 6–10-й день менструального цикла до и через 1–2 мес после лазерной процедуры (n=12), %.

Fig. 6. Nuclear ER expression in the endometrium on days 6–10 of the menstrual cycle before and 1–2 months after the laser procedure (n=12), %.



вала (рис. 6). После лазерной процедуры все клетки эндометрия стали экспрессировать ЭР, при этом высокую активность имели 91,7% железистых клеток и 58,3% стромальных.

Гистологическое исследование эндометрия и цитологическое исследование соскоба цервикального канала не выявило какого-либо негативного влияния безабляционного эрбиевого лазера как на состояние эндометрия, так и слизи стью цервикального канала.

Общая длительность лазерной процедуры составила в среднем 14,1±4,7 мин. Во время лазерного облучения полости матки и цервикального канала отсутствовали жалобы на какой-либо дискомфорт со стороны пациенток. Некоторые из них отмечали болезненность при первичном прохождении диагностическим маточным зондом через внутренний зев цервикального канала, которое осуществлялось перед введением канюли, доставляющей лазерную энергию в полость матки, что не требовало назначения анальгетических средств. Инфекционных осложнений после внутриматочной процедуры не зарегистрировано. Длительность скудных мажущих кровяных выделений после нее составила от 1 до 3 дней.

Анализ данных УЗИ эндометрия в середине менструального цикла у 25 пациенток, прошедших внутриматочное воздействие безабляционным эрбиевым лазером, показал среднюю толщину М-эхо до лечения 5,6±0,96 мм и достоверное увеличение до 8,3±2,48 мм после ($p < 0,001$).

Через 1–4 мес после лазерной процедуры 17 пациенткам осуществлен перенос РЭ в полость матки. У 14 из них (82,4%) произошла успешная имплантация и диагностирована биохимическая беременность, у 12 (70,6%) женщин достигнута клиническая беременность.

Клинический пример

Пациентка Л., 38 лет. Обратилась к репродуктологу в феврале 2022 г. для подготовки к протоколу переноса РЭ. В 2021 г. проведены 2 попытки экстракорпорального оплодотворения и 2 переноса эмбриона (один перенос закончился неразвивающейся беременностью 6–7 нед, второй – неудачей имплантации). Соматически здорова. Менструации регулярные, умеренные, резко болезненные. В анамнезе хи-

рургический аборт и вторичное бесплодие в течение 10 лет. В апреле 2022 г. на 10-й день менструального цикла проведена офисная гистероскопия, удаление интрацервикальных и внутриматочных синехий. Гистологическое и ИГХ исследования эндометрия показали слабую пролиферацию желез эндометрия, распространенный склероз межклеточного матрикса и слабую фокальную экспрессию VEGF в строме. Выраженная экспрессия ПР отмечалась в 93% ядер клеток желез эндометрия и в 88% ядер клеток стромы. Экспрессия ЭР являлась умеренной и обнаруживалась только в 72% клеток желез и в 86% клеток стромы эндометрия (рис. 7).

В мае 2022 г. проведена однократная процедура внутриматочного воздействия безабляционным эрбиевым лазером. Через месяц после процедуры на 9-й день цикла проведена пайпель-биопсия эндометрия, исследование которого выявило активную пролиферацию желез эндометрия, отсутствие склероза, диффузную экспрессию VEGF в сосудах и межклеточном матриксе, а также выраженную экспрессию ЭР и ПР в >90% железистых клеток и стромы. Толщина эндометрия в середине менструального цикла по данным УЗИ до процедуры составила 4,2 мм, после – 6,3 мм (рис. 8). В августе 2022 г. произвели перенос РЭ в полость матки. В настоящее время (02.2023) беременность прогрессирует.

Обсуждение

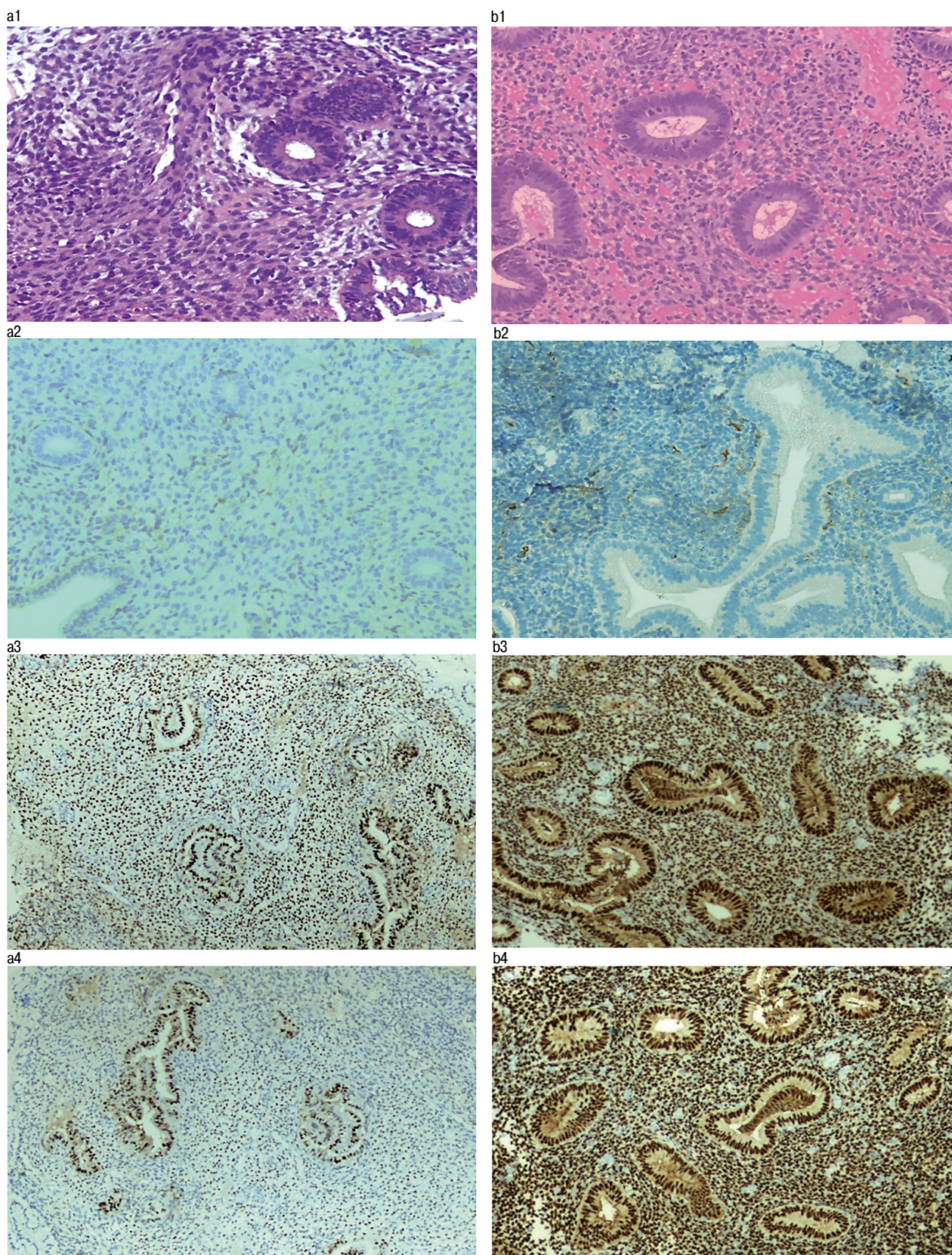
Физиотерапевтические методы воздействия на эндометрий широко используются в последние годы в преодолении бесплодия у женщин как при естественном зачатии, так и с помощью ВРТ. Наиболее перспективными считаются способы внутриматочного лечения эндометриальной дисфункции с использованием фотодинамической и лазеротерапии, введением аутологичной плазмы крови, обогащенной тромбоцитами, скретчинг и др. Так, например, введение фотосенсибилизатора в полость матки с последующей внутриматочной экспозицией низкоинтенсивного лазерного излучения мощностью 0,05 Вт/см² и плотностью энергии 40 Дж/см² у женщин с хроническим эндометритом улучшало гистологическую структуру эндометрия и его толщину по данным УЗИ¹ [16]. Описан метод лазер-индуцированного лечения атрофии эндометрия², при котором пер-

¹Никонов С.Д. Способ лечения хронического эндометрита. RU 2692999 С1, ООО «Клиника профессора Пасман», 28.06.2019.

²Способ неинвазивного лазерно-индуцированного лечения атрофии эндометрия RU 2713797 С1, ООО «ФОТОН-БИО», 07.02.2020.

Рис. 7. Гистологическая и ИГХ характеристики эндометрия до (a1, a2, a3, a4) и после (b1, b2, b3, b4) лазерной процедуры (окраска гематоксилином и эозином, увеличение – $\times 4-40$).

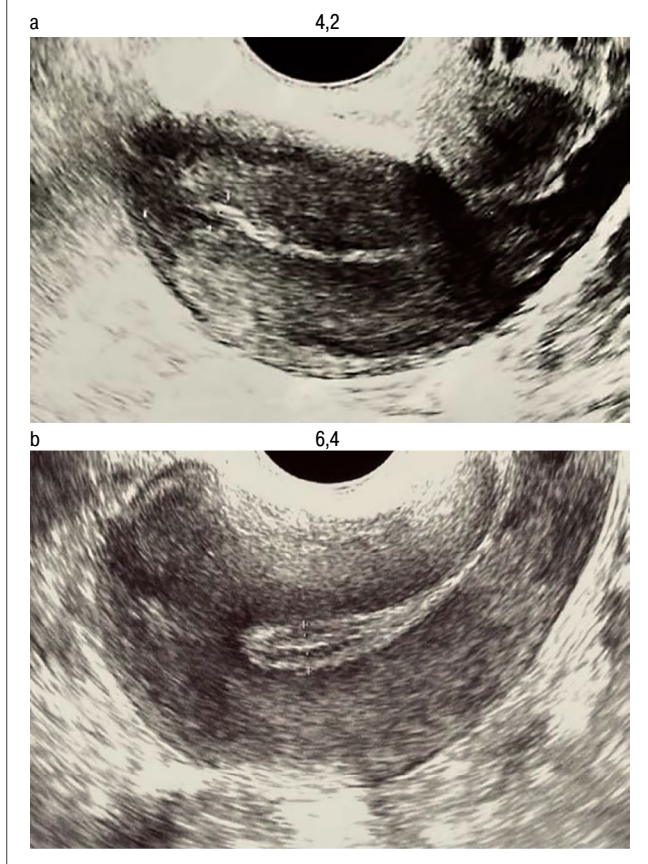
Fig. 7. Histological and IHC features of the endometrium before (a1, a2, a3, a4) and after (b1, b2, b3, b4) the laser procedure (hematoxylin-eosin staining, $\times 4-40$).



Примечание. a1 – слабая пролиферация желез, склероз стромы, лимфоидная инфильтрация; a2 – слабая экспрессия VEGF в строме; a3 – слабая экспрессия ПР; a4 – слабая экспрессия ЭР; b1 – активная пролиферация, отсутствие склероза; b2 – выраженная экспрессия VEGF в строме и сосудах; b3 – выраженная экспрессия ПР; b4 – выраженная экспрессия ЭР.

Рис. 8. Толщина эндометрия (мм) в середине менструального цикла по данным УЗИ до (а) и после (б) лазерной процедуры.

Fig. 8. Endometrial thickness (mm) in the middle of the cycle according to ultrasound before (a) and after (b) the laser procedure.



воначально назначали хлорофилл-содержащий препарат в течение 4–6 нед, контролировали степень его накопления в матке с помощью фотолюминесцентной спектроскопии и затем проводили 3–6 сеансов лазерной внутриматочной терапии. Однако общими недостатками методов фотодинамической терапии являются необходимость длительной экспозиции фотосенсибилизатора в полости матки, отсутствие четких данных по глубине и параметрам лазерного воздействия на ткани, риск развития отека стромы эндометрия, болевой синдром во время и после процедуры и необходимость проведения повторных процедур.

Для лечения «тонкого» эндометрия с успехом используется внутриматочное введение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, которая активирует функцию первичных факторов роста, ускоряет естественные механизмы регенерации, повышает активность фибробластов, ангиогенез и образование соединительной ткани [17, 18]. При сочетанном применении инфракрасного спектра лазера с плацентарной терапией также улучшалась трофика тканей, повышалась скорость кровотока, улучшались обменные процессы и регенерация тканей, стимулируя процессы пролиферации эндометрия [19]. В некоторых клиниках ВРТ для преодоления бесплодия маточного генеза используется скретчинг эндометрия. Легкое повреждение эндометрия вызывает увеличение количества местных цитокинов, участвующих в заживлении ран, что способствует его децидуализации и подготовке к имплантации [20].

Проведенное нами исследование впервые продемонстрировало влияние на эндометрий эрбиевого лазера в без-

абляционном режиме, индуцируемого лазерной системой Fotona SP Dynamis. Полученные результаты подтвердили нашу гипотезу об эффективности терапевтического лазерного воздействия в восстановлении функциональной активности эндометрия с последующей успешной имплантацией эмбриона в циклах ВРТ.

Иммуноморфологическое исследование, проведенное после лазерной процедуры через 4–8 нед, необходимых для реализации стимулирующего воздействия лазерной термодиффузии в тканях, продемонстрировало выраженную положительную динамику состояния эндометрия. Выявлено улучшение пролиферативной активности эпителия желез эндометрия, степень выраженности которой пришла в соответствие с фазой менструального цикла в сравнении с данными предварительного гистологического исследования, усилилась экспрессия VEGF, являющегося маркером пролиферации эпителия сосудов. Уменьшилась распространенность склеротических изменений в базальном слое эндометрия, что также свидетельствует об улучшении не только гистологической структуры, но и функциональной активности эндометрия и является особенно значимым для пациенток с хроническим эндометритом, имеющих выраженные очаги склероза в спиральных артериях и строме. Обнаружилась четкая тенденция к восстановлению рецепторной активности эндометрия. После лазерной процедуры увеличились как количество клеток, экспрессирующих ЭР и ПР, так и степень выраженности их экспрессии. Произшедшие морфофункциональные изменения отразились на толщине эндометрия, средний показатель которой во II фазу цикла по данным УЗИ достоверно увеличился ($p < 0,05$). Основным подтверждением восстановительного влияния безабляционной лазерной энергии на эндометрий явился высокий показатель клинических беременностей (70,6%), достигнутый у пациенток, имевших до этого от 1 до 5 неудачных имплантаций, который на 28,9% превысил ($p = 0,013$) существующий показатель эффективности криопротоколов ВРТ в нашей стране [1].

Дополнительными преимуществами используемого нами способа восстановления эндометрия являются безопасность безабляционного эрбиевого лазера, основанная на строго контролируемых и экспериментально рассчитанных параметрах теплового воздействия на ткань, разработанных для данных видов лазерных систем, безболезненность и небольшая длительность процедуры.

Заключение

Таким образом, проведенное нами пилотное исследование внутриматочного применения безабляционного эрбиевого лазера продемонстрировало его положительное влияние на морфофункциональное состояние эндометрия, которое проявилось в улучшении пролиферативной активности эндометрия, уменьшении склеротических изменений и восстановлении экспрессии ЭР и ПР. При этом не выявлено негативного влияния лазерной термодиффузии на эндометрий и слизистую цервикального канала. Процедура не требовала предварительной подготовки и являлась безболезненной для пациенток. В результате подготовки эндометрия с помощью безабляционного эрбиевого лазера перед переносом РЭ в полость матки у 70,6% женщин с неудачами имплантации в анамнезе наступила клиническая беременность.

В то же время для подтверждения полученных нами первых результатов требуются дальнейшие исследования на большем числе пациенток, необходимо изучить корреляцию количества лазерных процедур с гистологическими и клиническими эффектами, определить оптимальное

время для осуществления переноса РЭ, оценить течение и исход беременностей, наступивших после подготовки эндометрия с помощью безабляционного эрбиевого лазера, а также проанализировать долгосрочные результаты. Тем не менее полученные нами данные демонстрируют способность безабляционной лазерной энергии стимулировать восстановление функциональной активности и морфологической структуры эндометрия и тем самым положительно влиять на репродукцию женщин, что открывает нам новые пути и возможности использования современных лазерных технологий в гинекологии.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. О.А. Пустотина – разработка концепции и дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, сбор клинических данных и формирование электронной базы полученных результатов, получение данных для анализа, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, написание текста статьи; А.А. Гашенко – разработка концепции и дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, сбор клинических данных и формирование электронной базы полученных результатов, корректировка и одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации; Е.И. Устинова – разработка концепции и дизайна исследования, получение данных для анализа, формирование электронной базы полученных результатов, обзор публикаций по теме статьи, корректировка и одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации; Е.А. Лишова – разработка концепции и дизайна исследования, одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации; А.В. Лопатина – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации; Ж.С. Течиева – разработка концепции и дизайна исследования, одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации; З. Визинтин – разработка концепции и дизайна исследования, одобрение окончательной версии статьи перед ее подачей для публикации.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. OA Pustotina – development of the study concept and design, literature review, collection of clinical data and the development of an electronic database of the results obtained, obtaining data for analysis, statistical data processing, analysis of the data obtained, writing the article; AA Gashenko – development of the study concept and design, obtaining data for analysis, literature review, collection of clinical data and the development of an electronic database of the results obtained, correcting and approving the final version of the article before submitting it for publication; EI Ustinova – development of the study concept and design, obtaining data for analysis, development of an electronic database of the results obtained, literature review, correcting and approving the final version of the article before submitting it for publication; EA Lishova – development of the study concept and design, approving the final version of the article before submitting it for publication; AV Lopatina – development of the study concept and design, analysis of the data obtained, approving the final version of the article before submitting it for

publication; ZhS Tchieva – development of the study concept and design, approving the final version of the article before submitting it for publication; Z Vizintin – development of the study concept and design, approving the final version of the article before submitting it for publication.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева» (протокол №1 от 21.01.2022). Одобрение и процедуру проведения протокола получали по принципам Хельсинкской конвенции.

Ethics approval. The study was approved by the local ethics committee of Inozemtsev Academy of Medical Education (Protocol №1, 21.01.2023). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

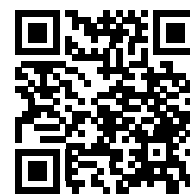
Литература/References

1. Регистр ВРТ РАПЧ. Отчет за 2020 год. Режим доступа: https://www.rahr.ru/registr_otchet.php. Ссылка активна на 25.01.2023 [Register of VRT RACH. Report for 2020. Available at: https://www.rahr.ru/registr_otchet.php. Accessed: 25.01.2023 (in Russian)].
2. Соколова Е.А., Краснополянская К.В., Белокурова М.В., Исакова К.М. Состояние эндометрия у пациенток с синдромом поликистозных яичников. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2021;21(2):86-90 [Sokolova EA, Krasnopol'skaja KV, Belokurova MV, Isakova KM. Endometrial condition in patients with polycystic ovary syndrome. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2021;21(2):86-90 (in Russian)].
3. Saxtorph MH, Hallager T, Persson G, et al. Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2020;41(6):998-1006.
4. Чистякова Г.Н., Гришкина А.А., Ремизова И.И., и др. Иммуногистохимическая и морфометрическая оценка тонкого эндометрия. *Проблемы репродукции*. 2021;27(5):38-43 [Chistyakova GN, Grishkina AA, Remizova II, et al. Immunogistokhimičeskaja i morfometričeskaja otsenka tonkogo endometrii. *Problemy reproduksii*. 2021;27(5):38-43 (in Russian)].
5. Оразов М.Р., Краснополянская К.В., Силантьева Е.С., и др. Эффективность альтернативных методов лечения бесплодия маточного генеза. *Гинекология*. 2021;23(1):92-6 [Orazov MR, Krasnopol'skaia KV, Silant'eva ES, et al. The efficacy of alternative treatment tactics for uterine infertility. *Gynecology*. 2021;23(1):92-6 (in Russian)]. DOI:10.26442/20795696.2021.1.200672
6. Пустотина О.А. Современные лазерные технологии в лечении урогенитальных расстройств у женщин. *ФАРМАТЕКА*. 2020;6:105-12 [Pustotina OA. Sovremennye lazernye tekhnologii v lechenii urogenital'nykh rasstroistv u zhenshchin. *FARMATEKA*. 2020;6:105-12 (in Russian)].
7. Vizintin Z, Lukac M, Kazic M, et al. Erbium laser in gynecology. *Climacteric*. 2015;18 Suppl. 1:4-8. DOI:10.3109/13697137.2015.1078668
8. Lukac M, Zorman A, Lukac N, et al. Characteristics of Non-Ablative Resurfacing of Soft Tissues by Repetitive Er:YAG Laser Pulse Irradiation. *Lasers Surg Med*. 2021;53(9):1266-78. DOI:10.1002/lsm.23402

9. Tadir Y, Gaspar A, Lev-Sagie A, et al. Light and energy-based therapeutics for genitourinary syndrome of menopause: consensus and controversies. *Lasers Surg Med.* 2017;49(2):137-59.
10. Dams SD, de Liefde-van Beest M, Nuijs AM, et al. Pulsed Heat shocks enhance procollagen type I and procollagen type III expression in human dermal fibroblasts. *Skin Res Technol.* 2010;16(3):354-64.
11. Gambacciani M. Laser Treatment for Vulvovaginal Atrophy. In: *Postmenopausal Diseases and Disorders*. Ed. FR Pérez-López. Springer Nature Switzerland AG, 2019, p. 205-2010.
12. Gambacciani M, Levancini M, Cervigni M. Vaginal erbium laser: the second-generation thermotherapy for the genitourinary syndrome of menopause. *Climacteric.* 2015;18:757-63.
13. Gambacciani M, Levancini M, Russo E, et al. Long-term effects of vaginal erbium laser in the treatment of genitourinary syndrome of menopause. *Climacteric.* 2018;21(2):148-52.
14. Gaspar A, Maestri S, Silva J, et al. Intraurethral erbium:YAG laser for the management of urinary symptoms of genitourinary syndrome of menopause: a pilot study. *Lasers Surg Med.* 2018;50:802-7.
15. Gambacciani M, Cervigni M, Gaspar A, et al. Safety of vaginal erbium laser: A review of 113000 patients treated in the past 8 years. *Climacteric.* 2020;23(1):s28-32.
16. Серебренникова К.Г., Арутюнян Н.А., Кацалап С.Н., Алехин А.И. Фотодинамическая терапия у пациенток с бесплодием при хроническом эндометрите. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2020;20(3):56-61 [Serebrennikova KG, Arutyunyan NA, Katsalap SN, Alekhin AI. Photodynamic therapy in patients with infertility in chronic endometritis. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist.* 2020;20(3):56-61 (in Russian)]. DOI:10.17116/rosakush20202003156
17. Аполихина И.А., Эфендиева З.Н., Федорова Т.А., и др. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в комплексной терапии женщин с рефрактерным «тонким» эндометрием. *Акушерство и гинекология.* 2021;4:112-9 [Apolikhina IA, Efendiieva ZN, Fedorova TA, et al. Obogashchennaia trombositami autologichnaia plazma v kompleksnoi terapii zhenshchin s refrakternym "tonkim" endometriem. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2021;4:112-9 (in Russian)].
18. Dogra Y, Singh N, Vanamail P. Autologous platelet-rich plasma optimizes endometrial thickness and pregnancy outcomes in women with refractory thin endometrium of varied aetiology during fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *JBRA Assist Reprod.* 2022;26(1):13-21. DOI:10.5935/1518-0557.20210037
19. Зиновьева О.С., Мотовилова Т.М., Качалина Т.С., и др. Влияние сочетанной плацентарной терапии и инфракрасного спектра лазера на гемодинамические нарушения в гипопластичном эндометрии. *Медицинский альманах.* 2018;6(57):4-97 [Zinov'eva OS, Motovilova TM, Kachalina TS, et al. Vliianiie sochetannoi platsentarnoi terapii i infrakrasnogo spektra lazera na gemodinamicheskie narusheniia v gipoplastichnom endometrii. *Meditsinskii al'manakh.* 2018;6(57):4-97 (in Russian)].
20. Lensen SF, Armstrong S, Gibreel A, et al. Endometrial injury in women undergoing in vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;6(6):CD009517. DOI:10.1002/14651858.CD009517.pub4

Статья поступила в редакцию / The article received: 20.01.2023

Статья принята к печати / The article approved for publication: 22.02.2023



OMNIDOCTOR.RU