

Рецептивность эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации

В.Е. Радзинский¹, Л.М. Михалёва², М.Р. Оразов¹, Е.С. Силантьева³, Д.П. Камилова³, К.Ю. Мидибер^{1, 2}, Р.Е. Орехов¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, г. Москва

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына»; Россия, г. Москва

³ ГК «Мать и дитя»; Россия, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: расширить представления о патогенезе нарушений рецептивности у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) в программах экстракорпорального оплодотворения.

Дизайн: проспективное открытое сравнительное исследование.

Материалы и методы. В исследование включены 57 женщин в возрасте от 27 до 42 лет (средний возраст составил $36 \pm 6,2$ года) с клинически верифицированными ПНИ. Группу морфологического контроля составили 30 фертильных женщин. Материалом исследования являлись биоптаты эндометрия, полученные на 5–7-й день после пика концентрации лютеинизирующего гормона в крови (окно имплантации).

Результаты. В период окна имплантации у пациенток с ПНИ отмечались статистически значимые ($p < 0,05$) изменения: повышение экспрессии рецепторов эстрогена α в железах в 1,5 раза и в строме в 1,4 раза, экспрессии рецепторов прогестерона А и В в железах в 2,3 раза при одновременном снижении ее в строме в 1,6 раза, очаговое уменьшение экспрессии MUC1 в апикальной поверхности эндометрия, увеличение плотности пиноподий в апикальной поверхности эндометрия в 1,3 раза и экспрессии CD56+ NK-клеток в строме в 2,3 раза, снижение экспрессии CD4+ клеток в 2 раза и рост экспрессии CD8+ клеток в 2,2 раза по сравнению с таковыми в группе морфологического контроля. Уровни фактора Виллебранда и CD34+ в строме эндометрия в период окна имплантации при экспрессии в эндотелии кровеносных сосудов статистически значимо не различались у женщин обеих групп.

Заключение. Патогенез нарушений рецептивности в эндометрии у пациенток с ПНИ может быть объяснен нарушением экспрессии рецепторов к половым гормонам в строме и железистом компоненте и снижением экспрессии MUC1, увеличением плотности и уменьшением числа зрелых и созревающих пиноподий на апикальной поверхности эндометрия. Обнаруженное увеличенное число экспрессированных CD56+ NK-клеток в эндометрии в период окна имплантации у пациенток обеих групп (у пациенток с ПНИ экспрессия CD56+ значимо выше) в сочетании с выявленным дисбалансом между Т-лимфоцитами объясняет иммунологический компонент патогенеза нарушений имплантации.

Ключевые слова: повторные неудачи имплантации, пиноподии, MUC1, CD56+, CD4+, CD8+, фактор Виллебранда, CD34+, рецепторы эстрогена α , рецепторы прогестерона А и В.

Вклад авторов: Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Силантьева Е.С., Камилова Д.П. — отбор пациенток, разработка дизайна исследования, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации; Михалёва Л.М. — разработка дизайна исследования, проведение и интерпретация результатов морфологического и иммуногистохимического исследований, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации; Мидибер К.Ю. — проведение морфометрии, съемка, монтаж и описание микрофотографий; Орехов Р.Е. — обзор публикаций по теме статьи, сбор клинического материала, обработка, анализ и интерпретация, статистическая обработка данных, написание текста рукописи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Для цитирования: Радзинский В.Е., Михалёва Л.М., Оразов М.Р., Силантьева Е.С., Камилова Д.П., Мидибер К.Ю., Орехов Р.Е. Рецептивность эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации. Доктор.Ру. 2022; 21(1): 27–33. DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-1-27-33

Endometrium Receptivity in Patients with Repeated Implant Failures

V.E. Radzinsky¹, L.M. Mikhaleva², M.R. Orazov¹, E.S. Silantjeva³, D.P. Kamilova³, K.Yu. Midiber^{1, 2}, R.E. Orekhov¹

¹ Peoples' Friendship University of Russia (a Federal Government Autonomous Educational Institution of Higher Education); 6 Miklouho-Maclay Str., Moscow, Russian Federation 117198

² A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology; 3 Tsyurupa Str., Moscow, Russian Federation 117418

³ Mother and Child; 2 Mozhayskoye Shosse, Moscow, Russian Federation 143081

ABSTRACT

Study Objective: To broaden the understanding of the pathogenesis of impaired receptivity in patients with repeated implant failures (RIF) in *in vitro* fertilisation programs.

Радзинский Виктор Евсеевич — член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 4507-7510. <https://orcid.org/0000-0003-1101-4419>. E-mail: radzinsky@mail.ru

Михалёва Людмила Михайловна (автор для переписки) — д. м. н., профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии ФГБНУ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына. 117418, Россия, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 2086-7513. <https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>. E-mail: mikhalevalm@yandex.ru

(Окончание на с. 28.)



Study Design: Open perspective comparative study.

Materials and Methods. 57 women aged 27 to 42 years old (mean age: 36 ± 6.2 years old) with clinically verified RIF. A morphological control group included 30 fertile women. The subject of the study was endometrium biopsy material obtained on day 5–7 of menstruation, following the peak blood concentration of luteinizing hormone (implantation window).

Study Results. During the implantation window, patients with RIF have statistically significant ($p < 0.05$) changes: 1.5- and 1.4-fold increase in gland and stromal expression of estrogen α receptors, respectively; 2.3-fold increase in expression of progesterone A and B receptors with simultaneous reduction in stromal expression by 1.6 times; focal reduction in MUC1 expression in apical surface of endometrium; 1.3-fold increase in pinopods density in apical surface of endometrium and 2.3-fold increase in stromal expression of CD56+ NK-cells; 2-fold reduction in CD4+ cell expression, and 2.2-fold increase in CD8+ expression vs morphological controls. During the implantation window, von Willebrand factor and CD34+ levels in endometrial stroma did not demonstrate statistically significant differences when expressed in blood-vessel endothelium.

Conclusion. Pathogenesis of impaired receptivity in patients with RIF can be explained with impaired expression of sex hormone receptors in stroma and glandular component and reduced MUC1 expression, increased density and reduced amount of mature and maturing pinopods in apical surface of endometrium. An increased number of expressed CD56+ NK-cells during the implantation window in patients in both groups (in patients with RIF, CD56+ expression is significantly higher) in combination with the found imbalance between T-lymphocytes can be a cause of the immunological component of impaired implantation pathogenesis.

Keywords: repeated implant failures, pinopods, MUC1, CD56+, CD4+, CD8+, von Willebrand factor, CD34+, estrogen α receptors, progesterone A and B receptors.

Contributions: Radzinsky, V.E., Orazov, M.R., Silantieva, E.S., Kamilova, D.P. — patient selection, study design, review of critically important material, approval of the manuscript for publication; Mikhaleva, L.M. — study design, analysis and interpretation of pathomorphology and immunohistochemistry results, review of critically important material, approval of the manuscript for publication; Midiber, K.Yu. — morphometry; photomicrography, assembly and description of photomicrograms; Orekhov, R.E. — thematic publications reviewing, clinical material collection, data processing, analysis and interpretation, statistical data processing, text of the article.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have any conflict of interests.

For citation: Radzinsky V.E., Mikhaleva L.M., Orazov M.R., Silantieva E.S., Kamilova D.P., Midiber K.Yu., Orekhov R.E. Endometrium Receptivity in Patients with Repeated Implant Failures. Doctor.Ru. 2022; 21(1): 27–33. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-1-27-33

ВВЕДЕНИЕ

Повторные неудачи имплантации (ПНИ) в зарубежной литературе определяются как три или более последовательные неудачные попытки имплантации в программах ЭКО с использованием не менее четырех эмбрионов высокого качества в минимум трех «свежих» или замороженных циклах при отсутствии каких-либо факторов, снижающих шансы наступления беременности [1]. В клиническом протоколе «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» Минздрава РФ 2019 года такую клиническую ситуацию называют «Повторные неудачные попытки переноса эмбрионов (имплантации)» и относят к ней случаи трех неудачных попыток селективного (eSET или eDET) переноса «свежих» или размороженных эмбрионов у женщин моложе 35 лет и двух — у женщин 35 лет и старше при отсутствии каких-либо факторов, снижающих шансы наступления беременности¹.

Считается, что 5% женщин страдают от привычного выкидыша, при этом у 75% из них также диагностируются ПНИ. Среди пациенток, проходящих лечение бесплодия, по разным данным, 15% страдают ПНИ [2]. В подобной ситуации кли-

ницисты отчаянно пытаются увеличить шансы достижения клинической беременности, постоянно разрабатывая дополнительные диагностические исследования и/или вспомогательные методы лечения [3].

Имплантация эмбриона — это сложный многоэтапный биологический процесс, требующий синхронизированного молекулярного взаимодействия между эмбрионом на стадии бластоцисты и эндометрием [4]. Качество эмбриона и рецептивность эндометрия считаются ключевыми факторами, детерминирующими успешную имплантацию [5]. Эндометрий представляет собой сложную и динамичную двухслойную ткань, состоящую из функционального и базального слоев, которые в норме претерпевают ряд биохимических и морфологических изменений в течение каждого менструального цикла для достижения оптимальной рецептивности. Для того чтобы эндометрий был восприимчив к эмбриону во время окна имплантации (период, когда эндометрий лучше всего подходит для поддержки трофобластно-эндометриальных взаимодействий), стероидные гормоны яичников подготавливают эндометрий путем потенцирования ряда клеточных, иммунологических и сосудистых изменений [6].

Оразов Мекан Рахимбердыевич — профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского института ФGAOU ВО РUDH, д. м. н., профессор. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 1006-8202. <https://orcid.org/0000-0002-5342-8129>. E-mail: otekan@mail.ru

Силантьева Елена Сергеевна — д. м. н., заместитель главного врача по реабилитации Клинического госпиталя Лапино ГК «Мать и дитя». 143081, Московская обл., г. Лапино, 1-е Успенское шоссе, д. 111. <https://orcid.org/0000-0002-7667-3231>. E-mail: e.silantieva@mcclinics.ru

Камиллова Дилором Пулатовна — к. м. н., главный специалист по ЭКО ГК «Мать и дитя», врач акушер-гинеколог, репродуктолог клиники ГК «Мать и дитя» Кунцево. 121374, Россия, г. Москва, Можайское шоссе, д. 2. <https://orcid.org/0000-0001-6226-5117>. E-mail: d.kamilova@mcclinics.ru

Мидибер Константин Юрьевич — научный сотрудник лаборатории клинической морфологии ФГБНУ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына; ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института ФGAOU ВО РUDH. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 6891-6636. <https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>. E-mail: midiberkonst@gmail.com

Орехов Роман Евгеньевич — ассистент кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского института ФGAOU ВО РUDH. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 4772-9867. <https://orcid.org/0000-0002-2775-9266>. E-mail: romanorekhovv@yandex.ru

(Окончание. Начало см. на с. 27.)

¹ Абубакиров А.Н., Адамян Л.В., Аншина М.Б. и др. Клинические рекомендации (протокол лечения) «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» от 21 февраля 2019 года № 15-4/466-07.

Стромальные клетки эндометрия превращаются в увеличенные округлые децидуальные клетки, секреторные железы начинают расти, а пиноподии и микроворсинки на люминальном эпителии эндометрия развиваются и пролиферируют. Указанные клеточные трансформации сопровождаются изменением экспрессии факторов роста, молекул адгезии и цитокинов с параллельным изменением ингибирующих факторов [6]. Это приводит к инфильтрации иммунных клеток и вторжению кровеносных сосудов в эндометрий [7]. В течение четко определенного окна имплантации эмбрион высокого качества идеально подходит для трех фаз имплантации: аппозиции (apposition), прикрепления или прилипания (attachment, adhesion) и инвазии (invasion) в рецептивный эндометрий [7].

Именно поэтому эндометриальные факторы, а именно нарушения архитектоники и аберрантную экспрессию различных факторов рецептивности, исследователи считают ведущей причиной ПНИ, поскольку в данной клинической ситуации всегда переносятся эмбрионы высокого качества [8–10]. Кроме того, исследования показали, что около двух третей неудач имплантации связаны с субоптимальной рецептивностью эндометрия и нарушением перекрестного взаимодействия между эмбрионом и эндометрием [11].

В связи с изложенным изучение механизмов патогенеза имплантационной несостоятельности в аспекте нарушения рецептивности эндометрия при ПНИ в рамках повышения эффективности программ ЭКО представляет значительный интерес для практического здравоохранения и для женщин, планирующих использование ВРТ. Все вышеизложенное определило выбор цели и задач настоящего исследования.

Цель исследования: расширить представления о патогенезе нарушений рецептивности эндометрия у пациенток с ПНИ в программах ЭКО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 57 женщин (основная группа) в возрасте от 27 до 42 лет (средний возраст составил $36 \pm 6,2$ года) с клинически верифицированными ПНИ, согласно клиническому протоколу «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация». Группу морфологического контроля составили 30 фертильных женщин, имевших в анамнезе 2 и более родов доношенными здоровыми детьми и не имевших нарушений фертильности, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом исследования являлись биоптаты эндометрия, полученные путем пайпель-биопсии на 5–7-й день после пика концентрации ЛГ в крови (окно имплантации). Полученные биоптаты после фиксации в 10%-ном забуференном формалине и гистологической обработки в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 30 (Германия) заливали в парафин на станции Leica EG 1150 (Германия). Производилась окраска срезов толщиной 4 микрометра гематоксилином и эозином при помощи станции Leica ST5010 (Германия).

Обзорное микроскопическое исследование материала осуществлялось с помощью микроскопа Leica DMLB и цифровой камеры Leica DFC420 (Германия). В полученных микропрепаратах производилась патоморфологическая оценка состояния эндометрия.

Имуногистохимическое исследование эндометрия с антителами с целью изучения морфофункционального состояния эндометрия в период окна имплантации (морфологически ранняя стадия фазы секреции) проводили с антителами к MUC1 — клон MRQ-17 Cell marque, фактору

Виллебранда (VWF) — клон 36B11 Leica Bond, CD34+ — клон QBEnd/10 Leica Bond, CD4+ (Т-лимфоциты) — клон SP35 Ventana, CD8+ (Т-лимфоциты) — клон SP57 Ventana, рецепторам эстрогена (ER) α — клон GF11 Leica Bond, рецепторам прогестерона (PR) AB — клон 1E2 Ventana, CD56+ NK — клон CD564 Leica Bond. Имуногистохимическое окрашивание производилось в иммунопейнере Ventana BenchMark Ultra IHD SH (США), Bond-Max (Германия). Для иммуноокрашивания использовали систему визуализации Ultra Vision TL-015-HD Lab Vision.

Экспрессию иммуногистохимических маркеров изучали в трех неперекрывающихся полях зрения при 400-кратном увеличении с помощью микроскопа Leica DMLB и цифровой камеры Leica DFC420 (Германия).

Для определения нормальности распределения параметров применен критерий Колмогорова — Смирнова. Результаты иммуногистохимического исследования представлены в виде суммы DAB-позитивных клеток в полях зрения при 400-кратном увеличении. Все данные отображены в виде медианного значения — Me (25%; 75%).

Статистическое сравнение групп осуществлялось при помощи непараметрических методов. Для выявления статистической значимости результатов использовался критерий Манна — Уитни. В случае оценки качественных признаков применен двусторонний критерий Фишера. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Обработку данных производили с использованием пакета программ электронных таблиц Microsoft Excel и программы IBM SPSS Statistics 26.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В эндометрии пациенток с ПНИ в период окна имплантации наблюдались изменения экспрессии исследуемых маркеров рецептивности в сравнении с показателями группы морфологического контроля (табл.).

В период окна имплантации у пациенток с ПНИ установлены изменения имплантационной состоятельности эндометрия, характеризующиеся прежде всего уменьшением числа зрелых и созревающих пиноподий вплоть до их отсутствия на апикальной поверхности эндометрия (морфологически ранняя стадия фазы секреции) на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 1 А, В).

При проведении иммуногистохимической реакции с маркером MUC1 определялась неравномерная окраска, а в фокусах отсутствия пиноподий у пациенток с ПНИ выявлена негативная реакция (рис. 1С) в отличие от группы морфологического контроля, в которой реакция на всем протяжении на апикальной поверхности эндометрия была равномерной положительной (рис. 1D).

Для сравнения процессов ангиогенеза в эндометрии у пациенток с ПНИ и здоровых женщин нами проведено иммуногистохимическое исследование с маркерами VWF и CD34+, продемонстрировавшее статистически незначимое увеличение числа кровеносных сосудов, экспрессии их в эндотелии (рис. 2).

Следующим этапом стало изучение иммуногистохимических реакций с антителами к половым гормонам: ER α и PR-AB (рис. 3). Обращают на себя внимание статистически значимые увеличение числа экспрессированных клеток с антителом к ER α в железах и строме эндометрия (в 1,5 и 1,4 раза) у пациенток основной группы (см. рис. 3А) и снижение экспрессии к рецепторам PR-AB в строме эндометрия (в 1,6 раза) при одновременном повышении уровня этого маркера

Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации и фертильных женщин, Me (25%; 75%)

Immunohistochemistry results for endometrium biopsy samples of patients with repeated implant failures and of fertile women, Me (25%; 75%)

Маркеры рецептивности / Receptivity markers		Основная группа / Study group	Группа морфологического контроля / Morphological controls
MUC1 (железы) / MUC1 (glands), %		23,4 (15,3; 41,9)*	48,9 (42,1; 56,3)
Рецепторы эстрогена α / Estrogen α receptors, %	железы / glands	39,2 (15,9; 54,4)*	26,4 (11,3; 50,6)
	строма / stroma	10,6 (8,1; 14,8)*	7,5 (5,6; 13,4)
Рецепторы прогестерона АВ / Progesterone A and B receptors, %	железы / glands	40,9 (11,5; 52,1)*	17,8 (12,3; 28,5)
	строма / stroma	51,2 (39,2; 96,9)*	81,1 (53,4; 100,0)
Плотность пиноподий, μм ⁻² / Pinopods density, μм ⁻²		0,031 (0,024; 0,037)*	0,024 (0,016; 0,030)
CD4+		2,4 (0,7; 6,1)*	4,9 (3,6; 10,2)
CD8+		16,3 (9,4; 18,2)*	7,3 (6,3; 10,1)
CD56+		11,2 (8,1; 13,9)*	4,9 (3,3; 7,7)
CD8+/CD4+		8,2 (4,8; 10,4)*	1,9 (0,2; 4,7)

* Отличия от группы морфологического контроля статистически значимы (p < 0,05).

* Differences vs morphological controls are statistically significant (p < 0.05).

Рис. 1. Эндометрий соответствует ранней-средней стадии фазы секреции. А — фокус отсутствия пиноподий на апикальной поверхности эндометрия (стрелка) у пациентки с бесплодием 2, повторными неудачами имплантации (ПНИ); В — равномерное расположение пиноподий на всем протяжении апикальной поверхности эндометрия у пациентки группы морфологического контроля; С — иммуногистохимия с антителом к MUC1, фокусы отсутствия или уменьшения экспрессии на апикальной поверхности эндометрия (стрелки) у пациентки с бесплодием 2, ПНИ; D — равномерное распределение пиноподий у пациентки группы морфологического контроля. Здесь и далее иллюстрации Мидибера К.Ю., 400-кратное увеличение. А, В — окраска гематоксилином и эозином, С, D — иммуногистохимическое окрашивание

Fig. 1. Endometrium corresponds to early-to-middle stage of secretion phase. A: lack of pinopods in apical surface of endometrium (arrow) in a patient with secondary infertility, with repeated implant failures (RIF); B: even distribution of pinopods over the apical surface of endometrium in a patient from the morphological control group; C: immunohistochemistry with MUC1 antibody; lack or reduced expression in apical surface of endometrium (arrows) in a patient with secondary infertility, RIF; D: even distribution of pinopods in a patient from the morphological control group. All photos in the paper courtesy of the authors Midiber, K.Yu. x400 magnification A, B: H&E staining, C, D: immunohistochemical staining

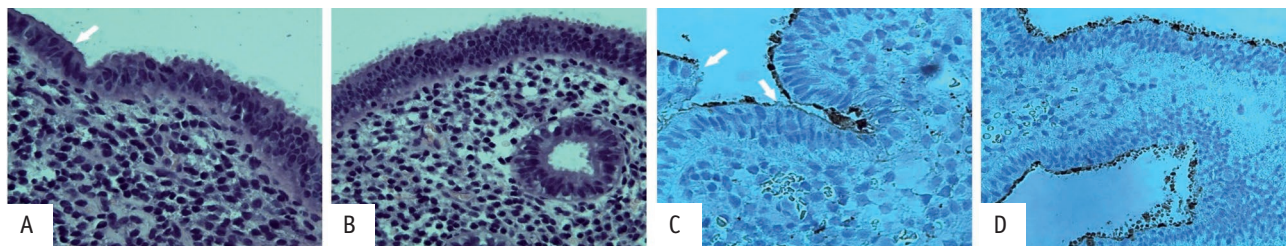


Рис. 2. Положительная экспрессия в эндотелии кровеносных сосудов: иммуногистохимия с антителом к фактору Виллебранда у пациентки с бесплодием 2, повторными неудачами имплантации (ПНИ) (А) и участницы группы морфологического контроля (В); иммуногистохимия с антителом к CD34+ у пациентки с бесплодием 2, ПНИ (С) и участницы группы морфологического контроля (D). Здесь и в рисунке 3 — иммуногистохимическое окрашивание

Fig. 2. Positive expression in blood vessel endothelium: immunohistochemistry with von Willebrand factor antibody in a patient with secondary infertility, with repeated implant failures (RIF) (A) and in a patient from the morphological control group (B); immunohistochemistry with CD34+ antibody in a patient with secondary infertility, RIF (C) and in a patient from the morphological control group (D). Here and Fig. 3: immunohistochemical staining

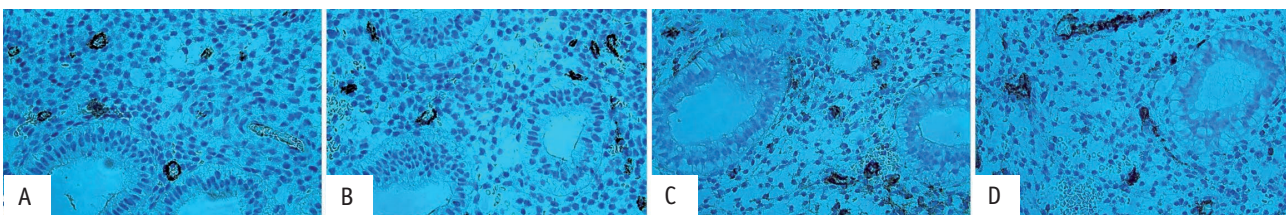
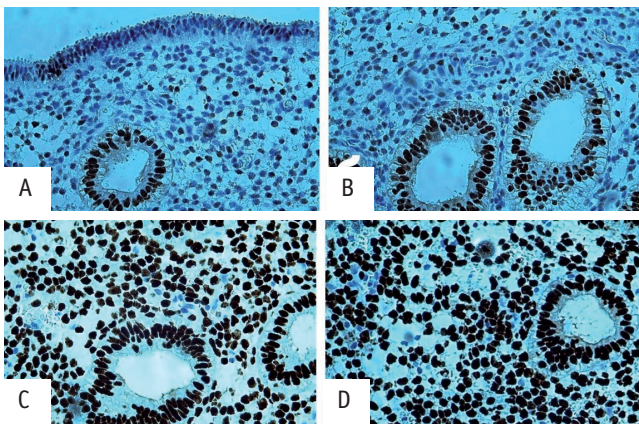


Рис. 3. Иммуногистохимия: А, В — положительная экспрессия к рецепторам эстрогена в железах и строме эндометрия в обеих группах; С — положительная экспрессия к рецепторам прогестерона в железах при уменьшении числа положительных клеток в строме эндометрия у пациентки с бесплодием 2, повторными неудачами имплантации; D — положительная равномерная экспрессия к рецепторам прогестерона в железах и строме эндометрия у пациентки группы морфологического контроля

Fig. 3. Immunohistochemistry: A, B: positive expression to estrogen receptors in glands and stoma of endometrium in both groups; C: positive expression to progesterone receptors in glands with increased number of positive cells in endometrial stroma in a patient with secondary infertility, RIF; D: positive expression to progesterone receptors in glands and stoma of endometrium in a patient from the morphological control group



в эпителии маточных желез (в 2,3 раза) (см. рис. 3С) по сравнению с таковыми у здоровых женщин (см. рис. 3 В, D).

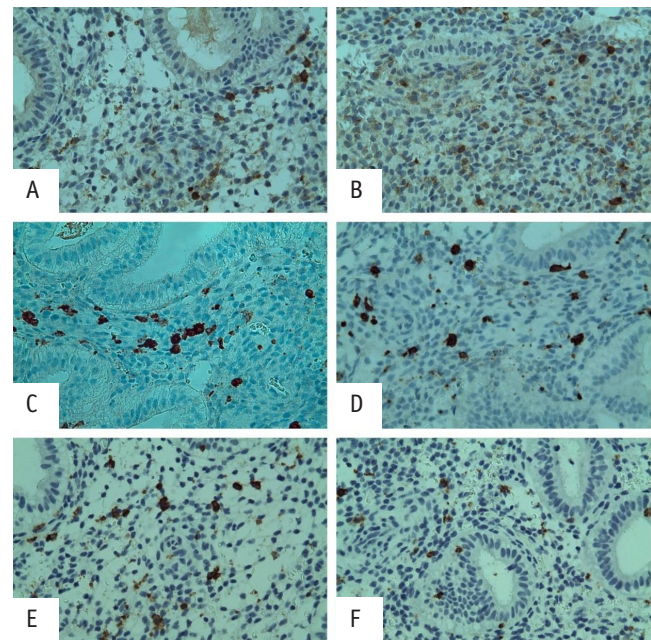
В предыдущем исследовании нами была проведена иммуногистохимическая оценка местного иммунитета в эндометрии пациенток с ПНИ, морфологически соответствующего средней стадии фазы пролиферации, продемонстрировавшая дисбаланс между Т-лимфоцитами (CD4+, CD8+) в пользу CD8+, а также увеличение почти в 2 раза уровня CD56+ NK-клеток. Выполненное иммуногистохимическое исследование с вышеуказанными маркерами в период окна имплантации (ранняя стадия фазы секреции) подтвердило сохранение дисбаланса между Т-лимфоцитами и увеличение количества CD56+ клеток по сравнению с таковым в группе морфологического контроля (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Успешная имплантация требует адгезии эмбриона к эндометрию и его последующей инвазии в нижележащий стромальный слой. На события во время имплантации и ранней беременности серьезное влияние оказывают стероидные гормоны яичников, 17β-эстрадиол и прогестерон [12]. Молекулярные механизмы, посредством которых стероид-регулируемые пути контролируют эти процессы, интенсивно исследуются во многих лабораториях по всему миру, однако установлено, что регуляторное воздействие стероидных гормонов в первую очередь детерминировано экспрессией

Рис. 4. Иммуногистохимия с антителом к CD4+ — уменьшение количества положительных клеток у пациентки с бесплодием 2, повторными неудачами имплантации (ПНИ) (А) по сравнению с таковым у участницы группы морфологического контроля (В). Иммуногистохимия с антителом к CD8+ — увеличение количества положительных клеток у пациентки с бесплодием 2, ПНИ (С) по сравнению с показателем группы морфологического контроля (D). E — положительная экспрессия CD56+; 28 клеток в поле зрения у пациентки с бесплодием 2, ПНИ. F — положительная экспрессия CD56+; 10 клеток в поле зрения у пациентки группы морфологического контроля

Fig. 4. Immunohistochemistry with CD4+ antibody: reduction in the number of positive cells in a patient with secondary infertility, with repeated implant failures (RIF) (A) vs a patient from the morphological control group (B). Immunohistochemistry with CD8+ antibody: increase in the number of positive cells in a patient with secondary infertility, RIF (c) vs a patient from the morphological control group (D). E: positive CD56+ expression; 28 cells per HPF in a patient with secondary infertility, RIF. F: positive CD56+ expression; 10 cells per HPF in a patient from the morphological control group



рецепторов к ним — к эстрогену α и β и прогестерону А и В соответственно [12].

Большое количество данных литературы свидетельствует о том, что эстроген и прогестерон, действуя через свои рецепторы, регулируют пролиферацию, дифференцировку и выработку секреторных белков в матке, необходимых для имплантации [13]. Соответственно, динамическая картина экспрессии рецепторов к ним наблюдается как в эпителиальном, так и в стромальном компартменте матки во время всего репродуктивного цикла и беременности.

После овуляции, оплодотворения и прогрессивного развития полученной зиготы до стадии активированной

бластоцисты повышение уровня системного прогестерона вызывает пролиферацию стромальных клеток эндометрия, которая еще больше усиливается небольшим нидативным скачком уровня эстрогена [14]. Параллельно прогестерон подавляет эстроген-индуцированную пролиферацию эпителия эндометрия, что приводит к переходу эпителия из пролиферативного в дифференцированное состояние и временно-му переходу в состояние, благоприятное для прикрепления и инвазии эмбриона [14, 15].

Ранние исследования J.P. Lydon и коллег с использованием модели мыши с выключением локуса, отвечающего за экспрессию PR (PRKO), в которой обе изоформы PR были одновременно удалены [15], подчеркнули незаменимость опосредованной ядерными рецепторами прогестероновой сигнализации в развитии рецептивности и децидуализации эндометрия.

Окружая инвазирующую эндометрий бластоцисту, децидуальные клетки обеспечивают гистотрофное питание, иммуно-толерантную среду, процесс отбора нежизнеспособных эмбрионов и защиту от физиологических стрессовых факторов, а также от чрезмерной инвазии эмбриона в матку [16].

В свою очередь, эстроген играет важную, но ограниченную роль в имплантации эмбриона. Мессенджер PDK ER1 обнаруживается как в эпителиальных, так и в стромальных клетках эндометрия в пролиферативной фазе, но уровень его экспрессии снижается в ранней секреторной фазе под влиянием лютеинового прогестерона [17]. Экспрессия транскриптов ER1 и ER2 падает до необнаруживаемого уровня к середине секреторной фазы в окне имплантации в функциональном слое, что позволяет предположить, что снижение пролиферативного воздействия эстрогенов в секреторной фазе необходимо для успешной имплантации. Действие эстрогена может не требоваться для нормального секреторного развития эндометрия после овуляции и даже способно препятствовать имплантации [18].

Вышесказанное позволяет сделать вывод, что выявленная в нашем исследовании aberrantная экспрессия рецепторов к эстрогену и прогестерону обуславливает нарушения рецептивной способности эндометрия в окне имплантации у пациенток с ПНИ. Дезрегуляция активности стероидных гормонов в результате нарушенной экспрессии рецепторов приводит к изменениям архитектоники эндометрия и имплантационной несостоятельности.

Эти данные также подтверждаются изменением экспрессии маркера адгезии MUC1 на апикальной поверхности эндометрия и снижением числа пиноподий, местами вплоть до полного их отсутствия, у пациенток с ПНИ в отличие от здоровых женщин.

Хотя точная роль MUC1 в имплантации до сих пор не изучена, многие исследования показали, что экстремально низкий уровень MUC1 связан с нарушением рецептивности эндометрия [19]. Недавнее исследование продемонстрировало, что содержание данного маркера значительно снижено у пациенток с нарушениями имплантации [20].

Это позволяет предположить, что уменьшение экспрессии MUC1 в эндометрии является маркером рецептивности при ПНИ во время окна имплантации. Регуляция экспрессии MUC1 также опосредована экспрессией и активацией рецепторов к прогестерону и эстрогену [21]. В нашем исследовании продемонстрировано снижение экспрессии MUC1 у пациенток с ПНИ по сравнению с таковой в группе морфологического контроля.

Эндометриальные пиноподии — это микроскопические образования апикальной клеточной мембраны функцио-

нального слоя, которые проходят различные морфофункциональные стадии развития по мере течения лютеиновой фазы менструального цикла. На сегодняшний день исследователями описаны развивающиеся, полностью развитые и пиноподии в стадии регресса, каждая из стадий длится примерно 24 ч [22].

Функция пиноподий не вполне известна. Согласно исследованиям *in vitro*, они в стадии расцвета могут способствовать прикреплению бластоцисты [23]. Пиноподии неоднократно предлагались в качестве надежного маркера окна имплантации [23].

В настоящем исследовании отмечено статистически значимое уменьшение числа зрелых и созревающих пиноподий вплоть до их полного отсутствия у женщин с ПНИ. Это можно объяснить тем, что в эндометрии пациенток с ПНИ пиноподии не достигают состояния полного созревания. По этой же причине плотность пиноподий у пациенток с ПНИ была в 1,3 раза больше, чем у здоровых женщин.

Маточные натуральные киллеры (uNK) являются доминирующими лимфоцитами в поздней лютеиновой фазе, составляя > 30% клеток в строме эндометрия, их количество увеличивается на всех стадиях лютеиновой фазы [24]. CD56+ uNK-клетки являются частью врожденной иммунной системы и отличаются от своих периферических аналогов NK-клеток, проявляя пониженную цитотоксичность и демонстрируя высокую экспрессию поверхностного маркера CD56+ и низкую экспрессию CD16+, однако при активации они способны вызывать клеточный апоптоз в клетках-мишенях [25].

В условиях высоких концентраций прогестерона количество CD56+CD16- uNK-клеток увеличивается, и их роль в секреторной фазе заключается в ремоделировании сосудов эндометрия, ангиогенезе и модуляции фето-материнского взаимодействия [26, 27].

Отмеченное в нашем исследовании повышение экспрессии CD56+ клеток свидетельствует о вероятном смещении экспрессии uNK-клеток в сторону их цитотоксических форм CD16+.

Крайне важный результат нашего исследования — подтверждение выявленного нарушения в местном иммунитете у пациенток с ПНИ: увеличение числа CD8+ клеток Т-супрессоров и снижение числа CD4+ клеток Т-хелперов, ответственных за реализацию иммунной толерантности к собственным и чужеродным антигенам [27]. Дисбаланс между Т-лимфоцитами в пользу CD8+ клеток и увеличение числа CD56+ NK, зафиксированные как в период окна имплантации (настоящее исследование), так и в средней стадии фазы пролиферации (ранее), могут быть расценены как ведущие иммунологические звенья в патогенезе ПНИ.

Проведенное исследование с маркерами к эндотелию кровеносных сосудов VWF и CD34+ не выявило значимых различий по числу кровеносных сосудов в эндометрии у участниц обеих групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенез нарушений рецептивности в эндометрии пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) может быть объяснен нарушением экспрессии рецепторов к прогестерону А и В и эстрогену α в строме и железистом компоненте. Эти изменения приводят к дезрегуляции нормальных морфофункциональных изменений эндометрия в период окна имплантации, что подтверждается повышением плотности пиноподий и снижением экспрессии MUC1 на апикальной поверхности эндометрия пациенток с ПНИ.

Обнаруженное увеличенное число экспрессированных CD56+ NK-клеток в эндометрии в период окна имплантации

у пациенток обеих групп (у пациенток с ПНИ экспрессия CD56+ значимо выше) в сочетании с дисбалансом между Т-лимфоцитами, снижением числа зрелых и созревающих

пиноподий на апикальной поверхности эндометрия и экспрессии MUC1 объясняют нарушение имплантации, клинически проявляющееся ПНИ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sun Y., Zhang Y., Ma X. et al. Determining diagnostic criteria of unexplained recurrent implantation failure: a retrospective study of two vs. three or more implantation failure. *Front. Endocrinol.* 2021; 12: 619437. DOI: 10.3389/fendo.2021.619437
- Busnelli A., Reschini M., Cardellicchio L. et al. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence. *Reprod. Biomed. Online.* 2020; 40(1): 91–7. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.10.014
- Bos-Mikich A., Ferreira M.O., de Oliveira R. et al. Platelet-rich plasma or blood-derived products to improve endometrial receptivity? *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36(4): 613–20. DOI: 10.1007/s10815-018-1386-z
- Liu W., Tal R., Chao H. et al. Effect of local endometrial injury in proliferative vs. luteal phase on IVF outcomes in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2017; 15(1): 75. DOI: 10.1186/s12958-017-0296-8
- Simón C., Martín J.C., Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2000; 14(5): 815–26. DOI: 10.1053/beog.2000.0121
- Оразов М.Р., Орехов П.Е., Камилова Д.П. и др. Тайны патогенеза повторных неудач имплантации. *Трудный пациент.* 2020; 18(4): 43–8. [Orazov M.R., Orekhov P.E., Kamilova D.P. et al. Secrets of pathogenesis in repeated implantation failure. *Difficult Patient.* 2020; 18(4): 43–8. (in Russian)]. DOI: 10.24411/2074-1995-2020-10030
- Dain L., Ojha K., Bider D. et al. Effect of local endometrial injury on pregnancy outcomes in ovum donation cycles. *Fertil. Steril.* 2014; 102(4): 1048–54. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.044
- Bastu E., Demiral I., Gunel T. et al. Potential marker pathways in the endometrium that may cause recurrent implantation failure. *Reprod. Sci.* 2019; 26(7): 879–90. DOI: 10.1177/1933719118792104
- Dhaenens L., Lierman S., De Clerck L. et al. Endometrial stromal cell proteome mapping in repeated implantation failure and recurrent pregnancy loss cases and fertile women. *Reprod. Biomed. Online.* 2019; 38(3): 442–54. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.11.022
- Айламазян Э.К., Толибова Г.Х., Траль Т.Г. и др. Новые подходы к оценке эндометриальной дисфункции. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2017; 66(3): 8–15. [Aylamazyan E.K., Tolibova G.Kh., Tral T.G. et al. New approaches to the estimation of endometrial dysfunction. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2017; 66(3): 8–15. (in Russian)]. DOI: 10.17816/JOWD6638-15
- Craciunas L., Gallos I., Chu J. et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2019; 25(2): 202–23. DOI: 10.1093/humupd/dmy044
- Ramathal C.Y., Bagchi I.C., Taylor R.N. et al. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin. Reprod. Med.* 2010; 28(1): 17–26. DOI: 10.1055/s-0029-1242989
- Critchley H.O., Saunders P.T. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium. *Reprod. Sci.* 2009; 16(2): 191–9. DOI: 10.1177/1933719108331121
- Namiki T., Ito J., Kashiwazaki N. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod. Med. Biol.* 2018; 17(4): 331–42. DOI: 10.1002/rmb2.12103
- Lydon J.P., DeMayo F.J., Funk C.R. et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes. Dev.* 1995; 9(18): 2266–78. DOI: 10.1101/gad.9.18.2266
- Gellersen B., Brosens J.J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr. Rev.* 2014; 35(6): 851–905. DOI: 10.1210/er.2014-1045
- Garcia E., Bouchard P., De Brux J. et al. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988; 67(1): 80–7. DOI: 10.1210/jcem-67-1-80
- Lee D.K., Kurihara I., Jeong J.W. et al. Suppression of ERalpha activity by COUP-TFII is essential for successful implantation and decidualization. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24(5): 930–40. DOI: 10.1210/me.2009-0531
- Bastu E., Mutlu M.F., Yasa C. et al. Role of mucin 1 and glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil. Steril.* 2015; 103(4): 1059–64.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.025
- Wu F., Chen X., Liu Y. et al. Decreased MUC1 in endometrium is an independent receptivity marker in recurrent implantation failure during implantation window. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018; 16(1): 60. DOI: 10.1186/s12958-018-0379-1
- Hey N.A., Li T.C., Devine P.L. et al. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum. Reprod.* 1995; 10(10): 2655–62. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135762
- Jin X.Y., Zhao L.J., Luo D.H. et al. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles. *Hum. Reprod.* 2017; 32(12): 2394–403. DOI: 10.1093/humrep/dex312
- Qiong Z., Jie H., Yonggang W. et al. Clinical validation of pinopode as a marker of endometrial receptivity: a randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* 2017; 108(3): 513–17.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.07.006
- Moffett A., Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 2015; 30(7): 1519–25. DOI: 10.1093/humrep/dev098
- Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59(5): 388–400. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2008.00596.x
- Di Renzo G.C., Giardina I., Clerici G. et al. Progesterone in normal and pathological pregnancy. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2016; 27(1): 35–48. DOI: 10.1515/hmbci-2016-0038
- Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in fetomaternal immunological cross talk. *Med. Princ. Pract.* 2018; 27(4): 301–7. DOI: 10.1159/000491576

Поступила / Received: 12.10.2021

Принята к публикации / Accepted: 19.11.2021