

Н. В. Царева

## МАРКЕРЫ ИМПЛАНТАЦИОННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ПРИ ГИПОПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

До настоящего времени маркеры имплантационной восприимчивости эндометрия у пациенток с гипоплазией эндометрия изучены недостаточно. Обследовано 59 пациенток с гипоплазией эндометрия, у которых лечение в соответствии с клиническими протоколами (гормональное и/или экстракорпоральное оплодотворение) не дало результата (основная группа), 16 женщин с гипоплазией эндометрия, у которых после стандартной терапии наступила беременность (группа сравнения), и 23 соматически здоровых фертильных женщины (группа контроля). Различия по возрасту в группах отсутствовали.

Проведен анализ клинико-anamnestических данных, выполнены трехмерное ультразвуковое и иммуногистохимическое исследования эндометрия. Показано, что основными маркерами имплантационной восприимчивости при гипоплазии эндометрия являются наличие безуспешных попыток экстракорпорального оплодотворения в анамнезе, однородность и наличие трехслойной структуры эндометрия, величина объема эндометрия и клеточная плотность стромы эндометрия. Иммуногистохимическими маркерами имплантационной восприимчивости при гипоплазии эндометрия являются величина экспрессии рецепторов для эстрогенов  $\alpha$  в строме эндометрия, интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  – в железистом слое эндометрия, а гена *NOXA10* и поверхностного маркера ЭМСК *SUSD2* – как в железистой ткани, так и в строме эндометрия.

**Ключевые слова:** гипоплазия эндометрия, маточное бесплодие, 3D УЗИ и иммуногистохимическое исследование эндометрия, маркеры имплантационной восприимчивости эндометрия.

N. V. Tsareva

## MARKERS OF IMPLANTATION SUSCEPTIBILITY IN ENDOMETRIAL HYPOPLASIA

To date, markers of endometrial implantation susceptibility in patients with endometrial hypoplasia have not been sufficiently studied. 59 patients with endometrial hypoplasia were examined, in whom treatment in accordance with clinical protocols (hormonal and/or in vitro fertilization) did not yield results (the main group), 16 women with endometrial hypoplasia who became pregnant after standard therapy (comparison group), and 23 somatically healthy fertile women (control group). There were no age differences in the groups.

The analysis of clinical and anamnestic data was carried out, three-dimensional ultrasound and immunohistochemical studies of the endometrium were performed. It is shown that the main markers of implantation susceptibility in endometrial hypoplasia are the presence of unsuccessful attempts of in vitro fertilization in the anamnesis, the uniformity and presence of a three-layer structure of the endometrium, the volume of the endometrium and the cellular density of the endometrial stroma. Immunohistochemical markers of implantation susceptibility in endometrial hypoplasia are the expression of receptors for estrogens  $\alpha$  in the endometrial stroma, integrin  $\alpha\upsilon\beta 3$  – in the glandular layer of the endometrium, and the gene *NOXA10* and the surface marker *EMSC SUSD2* – both in the glandular tissue and in the endometrial stroma.

**Key words:** endometrial hypoplasia, uterine infertility, 3D ultrasound and immunohistochemical examination of the endometrium, markers of endometrial implantation susceptibility.

Под имплантационной восприимчивостью или рецептивностью эндометрия в настоящее время понимают сложный взаимосвязанный процесс обмена информацией между эндометрием и бластоцистой с целью обеспечения всех необходимых этапов имплантации (ориентации в полости матки, адгезии на поверхности и инвазии в эндометрий). Имплантация бластоцисты происходит успешно только тогда, когда эндометрий к ней наиболее восприимчив [1]. Этот строго ограниченный по времени период в литературе получил название «окно имплантации» [2]. Основными признаками имплантационной восприимчивости эндометрия считаются: оптимальная толщина и объем внутреннего слоя матки, наличие трехслойной структуры эндометрия и необходимого количества пиноподий на его поверхности, достаточный уровень экспрессии и соотношения рецепторов к эстрогенам (ЭР) и прогестерону (ПР), оптимальная экспрессия лейкоингибирующего фактора (ЛИФ), интегрин  $\alpha\beta 3$  и гена *HOXA10* [3, 4]. По данным Ю. А. Руденко и соавторов (2019), кроме толщины, другими критериями имплантационной восприимчивости при ультразвуковом исследовании (УЗИ) эндометрия могут быть его структурное соответствие секреторной фазе цикла и М-эхо однородность с отсутствием включений (гипо- и гиперэхогенных) [5]. Результаты исследований, выполненных во многих лабораториях и центрах репродуктологии, подтверждают необходимость одновременного определения нескольких факторов, влияющих на состояние рецептивности эндометрия с целью диагностики его имплантационной восприимчивости [6]. Однако и до настоящего времени, перечисленные маркеры имплантационной восприимчивости у пациенток с гипоплазией эндометрия (ГЭ), страдающих бесплодием маточного происхождения (МБ), изучены все еще недостаточно.

**Цель исследования** – разработать новые подходы к диагностике имплантационной восприимчивости эндометрия у женщин с ГЭ.

### Материал и методы

У 98 женщин фертильного возраста проведен сравнительный анализ основных клинико-анамнестических данных, а также – структурных и иммуногистохимических (ИГХ) маркеров рецептивности эндометрия. Из них: 59 пациенток с ГЭ, у которых лечение в соответствии с клиническими протоколами (гормональное и/или ЭКО) не дало результата, вошли в основную группу, 16 женщин

с ГЭ, у которых после стандартной терапии наступила беременность – в группу сравнения, а 23 соматически здоровых фертильных женщины – в группу контроля. Средний возраст женщин основной группы, группы сравнения и контрольной группы составлял 36,9 (34,0;41,0), 36,6 (32,0;42,0) и 36,2 (32,0;39,0) лет соответственно. Достоверных различий по возрасту в этих группах не выявлено.

УЗИ органов малого таза проводилось на аппарате 3D/4D УЗИ Voluson E8 (США). Исследование выполнялось в серошкальном и доплерографическом режимах по стандартной схеме анализа нормы и патологии с использованием трансабдоминального и трансвагинального доступа.

Образцы эндометрия, взятые для гистологического исследования путем пайпель-биопсии, фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине, а затем осуществляли гистологическую проводку материала в автоматическом режиме по стандартной (спирты-ксил-парафиновая среда) методике. С парафиновых блоков делали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивалась макро- и микроскопическая морфометрическая картина эндометрия (состояние стромы, железистого аппарата, соответствие эндометрия фазе менструального цикла, развитие сосудов стромы эндометрия). Определение величины клеточной плотности (КП) стромы эндометрия проводилось с помощью программы Digimizer (Version 5.6.0).

ИГХ окрашивание биопсийного материала эндометрия с целью последующего анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров выполнены с использованием первичных антител к эстрогеновому рецептору  $\alpha$  (ЭР $\alpha$ ) (BioGenex, США), рецепторам к прогестерону (ПР) (Leica BioSystems Inc., США), интегрину  $\alpha\beta 3$  (Gene Tex, США), ЛИФ (Novus Biologicals, США), гену *HOXA10* (Abnova Ltd., Англия) и поверхностному маркеру эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток (ЭМСК) *SUSD2* (Abcam, Англия). В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител Uno Vue (DBS, США). Экспрессия ИГХ-маркеров измерялась программой Aperio Image Scope автоматически.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакетов статистических программ Statistica 10.0 и SPSS Statistics (версия 17.0, SPSS Incorporation, США). Для сравнения двух выборок применяли двусторонний тест Манна-Уитни. Качественные признаки представляли в виде абсо-

лютного значения и относительной величины в процентах, оценку статистической значимости осуществляли с использованием критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Нулевую гипотезу о равенстве выборок отвергли при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

У 26 (44,1 %) женщин основной группы имело место первичное и у 33 (55,9 %) – вторичное МБ. В группе сравнения – 6 (37,5 %) и 10 (62,5 %) случаев соответственно ( $P > 0,05$ ). Длительность бесплодия у женщин с ГЭ колебалась от 2 до 11 лет и в среднем составляла 3,5 (3,0; 5,0) года в основной группе против 3,75 (3,0; 4,0) лет в группе сравнения ( $P > 0,05$ ). Среди обследованных женщин с ГЭ в основной группе чаще встречались случаи безрезультативных попыток ЭКО: 21 (35,6 %) против 1 (6,3 %) у женщин группы сравнения ( $\chi^2 = 3,908$ ;  $P = 0,049$ ). Две и более попытки ЭКО наблюдались у 17 (28,8 %) женщин основной группы и не встречались в группе сравнения ( $\chi^2 = 4,431$ ;  $P = 0,036$ ). У 19 (32,2 %) женщин основной группы и у 1 (6,3 %) группы сравнения бесплодие, преодоленное с помощью ЭКО, заканчивалось ранними репродуктивными потерями:  $\chi^2 = 3,110$ ;  $P = 0,078$ .

Возраст начала месячных у женщин с ГЭ в среднем составил 14,1 (13,5; 14,7) года и был статистически незначимо больше в основной группе – 14,6 (13,6; 14,8). Поздние менархе имели 28 (47,5 %) женщин основной группы и 6 (37,5 %) – группы сравнения ( $\chi^2 = 0,182$ ;  $P = 0,670$ ). Продолжительность менструального цикла у женщин с ГЭ обеих групп также статистически значимо не различалась и в среднем составляла 26,8 (22,0; 31,1) дня. Менструальная функция у женщин основной группы характеризовалась такими нарушениями менструального цикла, как скудные месячные – у 52,5 % женщин против 43,8 % в группе сравнения ( $p > 0,05$ ); укорочение длительности менструального кровотечения менее 3-х дней (у 23 (39,0 %) женщин основной группы и 5 (31,1 %) – группы сравнения ( $P > 0,05$ )). Гипоменструальный синдром имел место у 21 (35,6 %) женщины основной группы против 4 (25,0 %) – в группе сравнения ( $\chi^2 = 0,248$ ;  $P = 0,619$ ). Болезненные месячные отмечались у 14 (23,7 %) женщин основной группы и 2 (12,5 %) – группы сравнения ( $\chi^2 = 0,395$ ;  $P = 0,530$ ).

В структуре гинекологических заболеваний у пациенток основной группы преобладали хронические воспалительные заболевания органов

малого таза (аднексит, цервицит и эндометрит): 34 (57,6 %) случая против 4 (25,0 %) – у пациенток группы сравнения ( $\chi^2 = 4,135$ ;  $P = 0,043$ ). На ранее перенесенные инфекции, передающиеся половым путем (уреаплазмоз, хламидиоз, вирус папилломы и генитальный герпес), указывали 21 (37,3 %) женщина основной группы против 6 (37,5 %) в группе сравнения ( $P > 0,05$ ). Самыми частыми оперативными вмешательствами у пациенток основной группы со вторичным МБ были: выскабливание полости матки по поводу медицинского аборта, самопроизвольного выкидыша раннего срока и неразвивающейся беременности – 23 (40,0 %) случая против 6 (37,5 %) в группе сравнения ( $P > 0,05$ ). В целом нами не выявлено статистически значимых различий в частоте встречаемости соматических заболеваний у женщин сравниваемых групп с ГЭ ( $P = 0,84$ ).

При трехмерном ультразвуковом исследовании (3D УЗИ) органов малого таза выявлено, что у 51 (86,4 %) женщины основной группы и 10 (62,5 %) женщин группы сравнения эндометрий характеризовался неоднородной эхографической структурой ( $\chi^2 = 4,752$  при  $P = 0,030$ ). Трехслойный паттерн структуры эндометрия выявлялся у большинства (83,3 %) обследованных женщин группы сравнения и реже (16,7 %) у пациенток основной группы ( $\chi^2 = 7,84$  при  $P = 0,006$ ). Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы [7–9]. В нашем исследовании средняя толщина эндометрия у женщин основной группы и группы сравнения составила 5,3 (4,3; 6,7) мм и 5,6 (4,9; 6,1) мм соответственно против 11,7 (9,6; 13,1) мм в контроле ( $P < 0,05$ ). Статистически значимые различия толщины эндометрия у женщин основной группы и группы сравнения отсутствовали ( $P = 0,841$ ). Средний объем эндометрия в основной группе был 2,3 (2,1; 2,6) см<sup>3</sup>, в группе сравнения – 3,4 (3,3; 4,0) см<sup>3</sup> против 9,8 (5,1; 11,9) см<sup>3</sup> в контрольной группе соответственно ( $P < 0,001$ ). Различия в объеме эндометрия женщин с ГЭ обеих групп (сравнения и основной) были также статистически высоко значимыми ( $P < 0,001$ ). С учетом полученных данных можно утверждать, что и у пациенток с ГЭ объем эндометрия является более информативным УЗИ параметром рецептивности, чем его толщина.

Средние значения величины КП стромы эндометрия у женщин основной группы, группы сравнения и контрольной группы составили 5,37 (4,03; 6,77), 4,17 (3,6; 4,57) и 3,9 (3,17; 4,3)

соответственно. Сравнительное исследование у фертильных и инфертильных женщин с ГЭ показало, что в период имплантационного окна регистрируются статистически значимые различия величины КП в основной группе и контрольной группе обследованных, а также – в основной группе и группе сравнения (уровень значимости  $P = 0,002 - 0,023$ ), что позволяет использовать данный маркер, как один из признаков имплантационной восприимчивости у пациенток с ГЭ.

Результаты ИГХ исследования экспрессии рецепторов половых гормонов, интегрин  $\alpha\beta 3$ , ЛИФ,  $HOXA10$  и  $SUSD2$  в железистой ткани и строме эндометрия фертильных и инфертильных женщин с ГЭ двух групп (основной и группы сравнения) в период «окна имплантации» представлены в таблице.

Статистически значимые различия выявлены только для экспрессии ЭР $\alpha$  в строме эндометрия фертильных и инфертильных женщин с ГЭ ( $P = 0,00006$ ). В обеих группах пациенток с ГЭ экспрессия ЭР $\alpha$  как в строме, так и железистой ткани была статистически значимо более выражена, чем в эндометрии женщин контрольной группы. Считается, что снижение количества ЭР $\alpha$  в эндометрии является сигналом к активизации многих генов, ответственных за обеспечение имплантационной восприимчивости. Причинами отсутствия физиологического снижения концентрации ЭР $\alpha$  может быть неадекватный уровень прогестерона в крови, чрезмерная экспрессия ароматаз, наличие провоспалительных цитокинов (интерлей-

кина-6, эпидермального фактора роста), нарушение экспрессии эстрогеновых рецепторов  $\beta$  [10]. В норме при рецептивном эндометрии соотношение экспрессии ПР к рецепторам ЭР $\alpha$  должно быть в пределах 2–4 [3]. Нами отмечены статистически незначимые различия в соотношении рецепторов к половым гормонам у пациенток с ГЭ обеих групп по сравнению с группой контроля, более выраженные в строме эндометрия ( $p > 0,05$ ).

Выявленные статистически значимые различия в экспрессии интегрин  $\alpha\beta 3$  в железистой ткани эндометрия женщин основной группы и родивших женщин группы сравнения ( $p = 0,047$ ), а также здоровых фертильных женщин контрольной группы ( $p = 0,00005$ ) также позволяют использовать данный маркер, как один из критериев рецептивности эндометрия при МБ и ГЭ. Величина же ИГХ экспрессии ЛИФ в строме и в железистом слое эндометрия в группах обследованных женщин с ГЭ не отличалась, но была статистически значимо менее выражена, по сравнению с аналогичными данными у женщин контрольной группы. Представляется важным для оценки имплантационной восприимчивости при ГЭ, что экспрессия гена  $HOXA10$  как в железистом слое, так и в строме эндометрия женщин группы сравнения была статистически значимо более выражена, чем в железистой ткани и строме женщин основной группы.

В доступной литературе мы не нашли данных об использовании величины экспрессии поверх-

Таблица. Результаты исследования ИГХ маркеров рецептивности в строме и железистой ткани эндометрия женщин основной группы и группы сравнения, Ме (25, 75 % $_{\text{о}}$ )

ИГХ маркеры	Основная группа	Группа сравнения	Контрольная группа	$P$
ЭР $\alpha$ в строме	0,01 (0,00;0,05)	0,13 (0,03;0,29)*	0,01 (0,00;0,02)	<0,05
ЭР $\alpha$ в железистой ткани	0,05 (0,01;0,38)*	0,14 (0,08;0,23)*	0,02 (0,00;0,04)	>0,05
ПР в строме	0,14 (0,05;0,25)	0,21 (0,14;0,38)	0,12 (0,02;0,22)	>0,05
ПР в железистой ткани	0,14 (0,01;0,25)	0,19 (0,08;0,31)	0,08 (0,01;0,13)	>0,05
ПР/ ЭР $\alpha$ в строме	13,32 (8,77;19,13)	13,59 (2,18;18,0)	3,88 (1,98;4,22)	>0,05
ПР/ ЭР $\alpha$ в железистой ткани	3,30 (1,46;5,13)	2,04 (1,61;2,80)	3,08 (1,78;3,31)	>0,05
Интегрин $\alpha\beta 3$ в строме	0,01 (0,01; 0,03)*	0,02 (0,01; 0,03)	0,02 (0,01; 0,05)	<0,05
Интегрин $\alpha\beta 3$ в железистой ткани	0,02 (0,01; 0,07)*	0,05 (0,01; 0,15)	0,07 (0,02; 0,16)	<0,05
ЛИФ в строме	0,16 (0,07; 0,32)*	0,18 (0,12; 0,29)*	0,215 (0,11; 0,34)	<0,05
ЛИФ в железистой ткани	0,17 (0,04; 0,30)*	0,195 (0,06; 0,27)*	0,27 (0,17; 0,41)	<0,05
Ген $HOXA10$ в строме	0,44 (0,25; 0,56)*	0,58 (0,38; 0,70)*	0,30 (0,21; 0,35)	<0,05
Ген $HOXA10$ в железистой ткани	0,75 (0,56; 0,91)*	0,86 (0,65; 0,94)*	0,58 (0,38; 0,70)	<0,05
$SUSD2$ в строме	0,03 (0,01; 0,09)*	0,07 (0,01; 0,12)*	0,18 (0,09; 0,26)	<0,05
$SUSD2$ в железистой ткани	0,04 (0,01; 0,11)*	0,09 (0,02; 0,22)*	0,44 (0,26; 0,55)	<0,05

Примечания:

$P$  – статистическая значимость различий данных в основной группе и группе сравнения.

\* – статистически значимые различия в сравнении с группой контроля.

ностного маркера ЭМСК SUSD2 в железистом слое и строме в качестве критерия рецептивности при ГЭ. Выявленное в нашем исследовании статистически значимое увеличение экспрессии SUSD2, как в железистом слое ( $P = 0,001$ ), так и в строме ( $P = 0,007$ ) эндометрия женщин группы сравнения в отличие от женщин основной группы, позволяет использовать данный маркер, как один из важных критериев имплантационной восприимчивости эндометрия при МБ у пациенток с ГЭ.

#### Выводы

1. Основными клиническими признаками имплантационной невосприимчивости эндометрия при его гипоплазии являются: увеличение частоты хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (аднексита, цервицита и эндометрита) и наличие безуспешных попыток ЭКО в анамнезе.

2. По данным 3D УЗИ органов малого таза основными маркерами имплантационной восприимчивости у пациенток с МБ при ГЭ являются: однородность и наличие трехслойной структуры эндометрия. Величина объема эндометрия представляется более информативным критерием рецептивности, чем его толщина. Величину КП стромы эндометрия можно использовать как маркер имплантационной восприимчивости у пациенток с МБ при ГЭ.

3. ИГХ критериями для оценки имплантационной восприимчивости эндометрия у пациенток с ГЭ и МБ являются: величина экспрессии ЭР $\alpha$  в строме эндометрия, интегрин  $\alpha v \beta 3$  в железистом слое эндометрия, а гена HOXA10 и поверхностного маркера ЭМСК SUSD2 – как в железистой ткани, так и в строме эндометрия.

#### Литература

1. *Teissier, D. R.* Uterine spiral arteries in pathogenesis of natural killer cells and extra villous trophoblasts in normal and high-risk pregnancies / D. R. Teissier, J. Yockell-Lellievre, A. Gruslin // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2015. – Vol. 74, № 1. – P. 177–191.

2. *Бурменская, О. В.* Поиск маркеров персонального «окна имплантации» у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения с помощью определения транс-

крипционного профиля генов / О. В. Бурменская, В. К. Боженко, В. Ю. Смольникова // *Акушерство и гинекология.* – 2017. – № 5. – С. 72–80.

3. *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.

4. *Оразов, М. Р.* «Тонкий» эндометрий – современный взгляд на проблему / М. Р. Оразов, В. Е. Радзинский, М. Б. Хамошина [и др.] // *Фарматека.* – 2018. – № 6. – С. 15–22.

5. *Готовность эндометрия к экстракорпоральному оплодотворению: прогноз по данным ультразвукового и морфологического исследований* / Ю. А. Руденко, Е. В. Кулагина, О. А. Кравцова [и др.] // *Гены & Клетки.* – 2019. – Т. XIV, № 3. – С. 142–146.

6. *Кибанов, М. В.* Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов / М. В. Кибанов, Г. М. Махмудова, Я. А. Гохберг // *Альманах клинической медицины.* – 2019. – Т. 47, № 1. – С. 12–25.

#### References

1. *Teissier, D. R.* Uterine spiral arteries in pathogenesis of natural killer cells and extra villous trophoblasts in normal and high-risk pregnancies / D. R. Teissier, J. Yockell-Lellievre, A. Gruslin // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2015. – Vol. 74, № 1. – P. 177–191.

2. *Burmenskaya, O. V.* Poisk markerov personal'nogo "okna implantatsii" u zhenshchin v programme ekstrakorporal'nogo oplodotvoreniya s pomoshch'yu opredeleniya transkriptsionnogo profilya genov / O. V. Burmenskaya, V. K. Bozhenko, V. Yu. Smol'nikova // *Akusherstvo i ginekologiya.* – 2017. – № 5. – С. 72–80.

3. *Ponomarenko, K. Yu.* Retseptivnost' endometriya u zhenshchin s narusheniyami v reproduktivnoi sisteme / K. Yu. Ponomarenko // *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei.* – 2017. – Т. 66, № 4. – С. 90–97.

4. *Orazov, M. R.* «Tonkii» endometrii – sovremenniy vzglyad na problemu / M. R. Orazov, V. E. Radzinskii, M. B. Khamoshina [et al.] // *Farmateka.* – 2018. – № 6. – С. 15–22.

5. *Gotovnost' endometriya k ekstrakorporal'nomu oplodotvoreniyu: prognoz po dannym ul'trazvukovogo i morfolo-gicheskogo issledovaniy* / Yu. A. Rudenko, E. V. Kulagina, O. A. Kravtsova, L. S. [et al.] // *Geny & Kletki.* – 2019. – Т. XIV, № 3. – С. 142–146.

6. *Kibanov, M. V.* Poisk ideal'nogo markera dlya otsenki retseptivnosti endometriya: ot gistologii do sovremennykh molekulyarno-geneticheskikh podkhodov / M. V. Kibanov, G. M. Makhmudova, Ya. A. Gokhberg // *Al'manakh klinicheskoi meditsiny.* – 2019. – Т. 47, № 1. – С. 12–25.

Поступила 29.04.2022 г.