

Демура Т.А.<sup>1,2</sup>, Коган Е.А.<sup>1</sup>, Коссович Ю.М.<sup>1</sup>, Унанян А.Л.<sup>1</sup>

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КРИТЕРИИ НАРУШЕНИЯ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России, 119991 ГСП-1, г. Москва

Для корреспонденции: Демура Татьяна Александровна, д-р мед. наук, проф. каф. патологической анатомии им. А.И. Струкова лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: demura-t@yandex.ru

*Цель* — изучить морфологические и молекулярные особенности рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите у женщин репродуктивного возраста с бесплодием и неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в анамнезе.

*Материал и методы.* В исследование включили 120 женщин репродуктивного возраста с морфологически верифицированным хроническим эндометритом: в 1-ю группу вошли 64 пациентки с бесплодием и неудачными попытками ЭКО в анамнезе; во 2-ю группу — 56 женщин без нарушения фертильности; в группу контроля — 30 здоровых женщин репродуктивного возраста, у которых брали образцы эндометрия во II фазе менструального цикла. Проведён сравнительный анализ морфологических и молекулярных критериев рецептивности эндометрия во всех группах исследования.

*Результаты.* Установлено достоверное двукратное преобладание средней продолжительности хронического эндометрита с момента его морфологической верификации у пациенток 1-й группы —  $5,50 \pm 0,06$  года, приведшее к критическому снижению рецептивности эндометрия и развитию у них бесплодия ( $p < 0,001$ ). Установлены морфологические особенности хронического эндометрита в 1-й группе пациенток: наличие классических признаков воспаления в слизистой тела матки с аутоиммунным компонентом, выявленным в 90,6% наблюдений: высокая экспрессия CD16, CD20, CD56 и низкая — HLA-DR<sub>II</sub> ( $p < 0,001$ ). Морфологическими критериями нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием на фоне хронического эндометрита явились отставание созревания эндометрия от дня менструального цикла и снижение количества зрелых пиноподий в апикальной части поверхностных эпителиоцитов. К молекулярным критериям нарушенной при бесплодии рецептивности эндометрия относятся достоверное снижение экспрессии стероидных рецепторов ER и PR в железах и стромах, LIF — в железах и на поверхности пиноподий, CLDN4 — в апикальной части поверхностных эпителиоцитов и в основании пиноподий ( $p < 0,001$ ).

*Заключение.* Хронический эндометрит, ассоциированный с бесплодием, в 90,6% случаев имеет аутоиммунный генез и характеризуется длительным (более 5 лет) течением с развитием морфологических и молекулярных критериев нарушения рецептивности эндометрия.

*Ключевые слова:* хронический эндометрит; аутоиммунный патогенез; бесплодие; рецептивность эндометрия; пиноподии; CD16; CD20; CD56; HLA-DR<sub>II</sub>; ER; PR; LIF; CLDN4.

*Для цитирования:* Демура Т.А., Коган Е.А., Коссович Ю.М., Унанян А.Л. Морфологические и молекулярные критерии нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом. Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва. 2018; 5(1): 19—25.  
DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-1-19-25>

Demura T.A.<sup>1,2</sup>, Kogan E.A.<sup>1</sup>, Kossovich Yu.M.<sup>1</sup>, Unanyan A.L.<sup>1</sup>

## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CRITERIA OF THE ENDOMETRIAL RECEPTIVITY VIOLATION IN PATIENTS WITH INFERTILITY ASSOCIATED WITH CHRONIC ENDOMETRITIS

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>2</sup>Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, 119121, Russian Federation

*The goal is to study the morphological and molecular features of endometrial receptivity in reproductive-age women with chronic endometritis and infertility and unsuccessful attempts in vitro fertilization (IVF) in anamnesis.*

*Material and methods.* The study included 120 reproductive-age women with morphologically verified chronic endometritis: the first group included 64 patients with infertility and unsuccessful IVF attempts in history; in the 2<sup>nd</sup> group there were 56 women without violation of the fertility; the control group consisted of 30 healthy reproductive-age women, in whom samples of the endometrium were taken in the II phase of the menstrual cycle. A comparative analysis of the morphological and molecular criteria of endometrial receptivity in all study groups was carried out.

*Results.* In patients of the 1<sup>st</sup> group there was a significant twofold prevalence rate of the average duration of chronic endometritis since the moment of its morphological verification, which led to a critical decrease in the receptivity of the endometrium and the development of infertility has been established in  $5.50 \pm 0.06$  years ( $p < 0.001$ ). In the first group of patients following morphological features of chronic endometritis were established: the presence of classical signs of inflammation in the mucous membrane of the uterus with an autoimmune component revealed in 90.6% of observations: high expression of CD16, CD20, CD56 and low HLA-DR<sub>II</sub> ( $p < 0.001$ ). Morphological criteria of endometrial receptivity disorders in patients with infertility on the background of chronic endometritis were such as the delay in the maturation of the endometrium from the day of the menstrual cycle and a decrease in the number of mature pinopodia in the apical part of the superficial epitheliocytes. Molecular criteria of the infertility in the endometrial receptivity violation include the significant decrease in the expression of steroid ER and PR receptors in glands and stroma, LIF in glands and in the surface of the pinopodia, CLDN4 — in the apical part of the superficial epithelial cells and in the base of the pinopodia ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** *Chronic endometritis, associated with the infertility, in 90.6% of cases has an autoimmune genesis and is characterized by a long (more than 5 years) course with the development of morphological and molecular criteria of endometrial receptivity disorders.*

**Keywords:** *chronic endometritis; autoimmune pathogenesis; infertility; receptivity of the endometrium; pinopodia; CD16; CD20; CD56; HLA-DR11; ER; PR; LIF; CLDN4.*

**For citation:** Demura T.A., Kogan E.A., Kossovich Yu.M., Unanyan A.L. Morphological and molecular criteria of the endometrial receptivity violation in patients with infertility associated with chronic endometritis. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal.* 2018; 1(5): 19—25. (in Russ.).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-1-19-25>

**For correspondence:** Tatyana A. Demura, MD, PhD, DSci., professor of the Department of Pathological Anatomy of A.I. Strukov Medical Faculty of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation; e-mail: demura-t@yandex.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 03.12.2017  
Accepted 18.12.2017

Одно из актуальных направлений современного здравоохранения связано с проблемой бесплодного брака, частота выявления которого колеблется около 15,0—17,5% и не имеет тенденции к снижению [1]. Эффективность применяемых у бесплодных супружеских пар методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) не превышает 25—30% на одну попытку [2]. Успешность имплантации и дальнейшее полноценное развитие эмбриона в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) определяются, с одной стороны, качеством самого эмбриона, а с другой — морфофункциональным состоянием эндометрия [3]. В настоящее время благодаря бурному развитию молекулярных методов исследования рецептивность эндометрия рассматривается как комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия с четкими временными и пространственными константами, определяющий наибольшую восприимчивость слизистой оболочки полости матки к внедрению эмбриона в специфический период «окна имплантации» [4]. Хронический эндометрит (ХЭ) является одной из ведущих причин, приводящих к снижению рецептивности эндометрия [5].

К факторам, определяющим успешную имплантацию, относятся рецепторы к эстрогенам ER, к прогестерону — PR [6], ингибирующий фактор лейкемии — LIF [7], клаудины — CLDNs [8], интегрины [9], селектины [10], кадгеринины [9], муцины [9], сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF [11], гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста HB-EGF [10] и ген семейства homeobox HOXA-10 [12]. Только достаточная и согласованная экспрессия всех вышеперечисленных молекул обеспечивает имплантацию бластоцисты в эндометрий. При ХЭ вероятность рассогласования действий этих механизмов крайне велика.

Цель исследования — изучить морфологические и молекулярные особенности рецептивности эндометрия у женщин репродуктивного возраста с бесплодием и неудачными попытками ЭКО в анамнезе на фоне хронического эндометрита.

## Материал и методы

В исследование включили 120 женщин репродуктивного возраста с морфологически верифицирован-

ном диагнозом ХЭ, обратившихся для планирования беременности в медицинские учреждения, являющиеся клиническими базами кафедры акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, в 2012—2013 гг. Пациентки с ХЭ были разделены на 2 группы в зависимости от возможности реализации генеративной функции: 1-я, основная группа ( $n = 64$ ) — женщины с бесплодием и неудачными попытками ЭКО, 2-я группа ( $n = 58$ ) — женщины с сохранённой фертильностью; 2-я группа была сформирована ретроспективно на основании факта наступления беременности в течение 1 года с момента окончания комплексной терапии ХЭ. Группу контроля (3-я группа) составили 30 здоровых фертильных пациенток, которым была проведена пайпель-биопсия эндометрия во II фазе менструального цикла перед постановкой спирали.

Пациенток 1-й и 2-й групп на этапе планирования беременности обследовали общеклиническими, лабораторными и инструментальными методами, учитывали данные гинекологического анамнеза, а также проводили детальное морфологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия. Забор тканей эндометрия осуществляли посредством аспирационной биопсии с использованием канюли Pipelle de Cornier («Laboratoire S.C.D.», Франция) по стандартной методике на 7—10-й и 18—24-й дни менструального цикла. Каждая пациентка перед вступлением в исследование подписывала информированное добровольное согласие.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследования эндометрия проводились на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Полученные образцы эндометрия фиксировали в 10% растворе формалина в течение 24 ч с последующей заливкой материала в парафин и изготовлением срезов толщиной 4—5 мкм по стандартной методике. Срезы эндометрия фиксировали на полилизиновых стеклах («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином и изучали посредством световой микроскопии при 100—400-кратном увеличении. Для выполнения иммуногистохимического исследования изготавливали де-

парафинированные срезы эндометрия с последующей их обработкой стрептавидин-биотин-пероксидазным методом с демаскировкой антигена по стандартной методике. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к CD16, CD20, CD56, HLA-DR<sub>II</sub> («Novocastra», Великобритания), а для оценки рецептивности эндометрия — антитела к ER и PR («DAKO», Дания), LIF («R&D Systems») и CLDN4 («Lab Vision»).

Оценка экспрессии LIF и CLDN4 в эндометрии проводилась полуколичественным методом по 6-балльной системе: 0 баллов — отсутствие иммуноокрашенных клеток, 0,5 балла — при выявлении до 5% иммуноокрашенных клеток, 2 балла — при определении 5—20% иммуноокрашенных клеток, 4 балла — 20—40% иммуноокрашенных клеток, 6 баллов — при регистрации более 40% иммуноокрашенных клеток [13].

Оценку экспрессии ER и PR проводили методом гистологического счёта HistoScore, учитывая количество и интенсивность окрашенных клеток эпителия желёз и стромы эндометрия, и вычисляли по формуле:

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

где *HS* — HistoScore, *a*, *b*, *c* — число слабо, умеренно и сильно окрашенных клеток соответственно (в %); 1, 2, 3 — степень экспрессии ER и PR, выраженная в баллах. Степень выраженности экспрессии ER и PR оценивали: 0—10 баллов — при отсутствии экспрессии ER и PR; 11—100 баллов — слабая экспрессия ER и PR; 101—200 баллов — умеренная экспрессия ER и PR; 201—300 баллов — выраженная экспрессия ER и PR [3].

Обработка полученных в ходе исследования данных выполнена с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 7.0 компании «StatSoft® Inc.» (США, 2006) с применением параметрических и непараметрических методов.

Для выявления прогностически значимых показателей применяли ROC-анализ, при котором по вычисленному значению площади под кривой AUC оценивали качество проверяемой модели: отличное — при AUC = 0,9—1,0; очень хорошее — при AUC = 0,8—0,9; хорошее — при AUC = 0,7—0,8; среднее — при AUC = 0,6—0,7 и неудовлетворительное — при AUC < 0,6. Для проверки полученных моделей рассчитывали их чувствительность, специфичность и точность.

## Результаты и обсуждение

Пациентки обследованных групп были сопоставимы по соматическому статусу и среднему возрасту (1-я группа — 31,90 ± 0,71 года, 2-я группа — 30,20 ± 0,88 года, 3-я группа — 32,20 ± 0,98 года; *p* > 0,05).

Средняя продолжительность ХЭ с момента его морфологической верификации достоверно преобладала у пациенток основной группы и составила 5,50 ± 0,06 года, тогда как в группе сравнения ХЭ протекал в среднем 2,40 ± 0,07 года (*p* < 0,001). Полученные данные подчёркивают важное прогностическое значение дли-

тельности течения ХЭ в отношении объёма повреждения эндометрия, приводящего к критическому снижению его рецептивности и развитию бесплодия.

Проведённый нами анализ репродуктивной функции у пациенток с ХЭ выявил не только достоверное преобладание среднего числа беременностей на одну женщину 2-й группы по сравнению с 1-й группой — 5,90 ± 0,26 и 4,50 ± 0,15 соответственно (*p* < 0,001), но и показал достоверные различия в структуре исходов наступивших в анамнезе беременностей у пациенток обследованных групп. Так, в 1-й группе родами завершились 87 (29,9%) беременностей, самопроизвольно прервались 84 (28,9%), а искусственным абортom закончились 111 (38,1%) из них, тогда как во 2-й группе данные показатели составили 263 (79,5%), 23 (6,9%) и 39 (11,8%) беременностей соответственно (*p* < 0,001). Развитие острого эндометрита после искусственного аборта, самопроизвольного выкидыша и в послеродовом периоде достоверно чаще отмечали в 1-й группе — в 103 (92,8%), 52 (61,9%) и 29 (33,3%) случаях, тогда как во 2-й группе воспалительные осложнения выявлялись в среднем в 2,5 раза реже — в 15 (38,5%), 10 (37%) и 27 (10,3%) случаях соответственно (*p* < 0,01). Полученные нами данные свидетельствуют о преимущественно вторичном характере бесплодия, ассоциированного с ХЭ, и указывают на значимую роль постабортных и послеродовых инфекционно-воспалительных осложнений в генезе этого заболевания.

Неудачные попытки ЭКО были зарегистрированы у всех пациенток 1-й группы, причём среднее количество неудач на одну женщину составило 1,60 ± 0,09 цикла.

По результатам морфологического исследования эндометрия, проведённого на 7—10-й день менструального цикла, ХЭ верифицирован у женщин 1-й и 2-й групп. Гистологическая картина в обеих группах соответствовала классическому симптомокомплексу ХЭ, критерием которого было выявление в базальном и функциональном слоях эндометрия воспалительных клеточных инфильтратов, располагавшихся преимущественно вокруг желёз и спиральных артерий. Клеточный состав этих инфильтратов был представлен клетками мононуклеарного ряда — лимфоцитами, макрофагами и плазмочитами, тогда как по периферии инфильтратов располагались фибробласты. У пациенток 1-й группы обнаруживалась преимущественно диффузная лимфоплазмочитарная инфильтрация эндометрия с перигландулярным и периваскулярным скоплением лимфоидных фолликулов, окружённых фибробластами (рис. 1, *a*, см. 2-ю полосу обложки), а также очаговый склероз стромы и утолщение стенок спиральных артерий с развитием периваскулярного фиброза (рис. 1, *б*, см. 2-ю полосу обложки), тогда как во 2-й группе — только очаговая инфильтрация эндометрия.

Гистологическое строение эндометрия у женщин 1-й группы существенно отставало от дня цикла и соответствовало в 32 (50,0%) случаях ранней секреторной

**Распределение пациенток исследованных групп по фазам менструального цикла**

Фаза менструального цикла	1-я группа (n = 64)		2-я группа (n = 56)		3-я группа, контроль (n = 30)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Поздняя стадия фазы пролиферации	19	29,7*	0	0*	0	0
Ранняя стадия фазы секреции	32	50	25	44,6	0	0
Средняя стадия фазы секреции	9	14,1*	31	55,4*	30	100
Поздняя стадия фазы секреции	4	6,25	0	0	0	0

Примечание. \* — разница между показателями основной группы и группы сравнения статистически достоверна ( $p < 0,05$ ).

и в 19 (29,7%) случаях — поздней пролиферативной фазе цикла, тогда как в 31 (55,4%) случае в группе сравнения и во всех образцах группы контроля выявляли среднесекреторный эндометрий (табл. 1).

Проведённый нами анализ количества зрелых пиноподий в апикальной части поверхностных эпителиоцитов эндометрия у обследованных пациенток выявил достоверно резкое его снижение в 1-й группе, умеренное снижение во 2-й группе и соответствие физиологической норме в группе контроля, о чем свидетельствовало обнаружение зрелых пиноподий в 8 (12,5%), 16 (28,6%) и 13 (43,3%) случаях соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, см. 2-ю полосу обложки). Полученные результаты, свидетельствующие о нарушении созревания пиноподий, могут быть отчасти связаны с глобальным запаздыванием созревания эндометрия.

Таким образом, секреторные изменения эндометрия у пациенток основной группы, включая количество зрелых пиноподий в апикальной части поверхностных эпителиоцитов, отставали от дня менструального цикла, тогда как в группах сравнения и контроля строение эндометрия четко соответствовало фазе цикла.

На основании корреляционного анализа Пирсона установлена умеренная корреляционная зависимость между длительностью течения ХЭ и морфологическими критериями нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием, ассоциированным с ХЭ: прямая зависимость — с неполноценной секреторной трансформацией эндометрия ( $r = 0,470$  при  $p < 0,001$ ), степенью выраженности лимфоплазмочитарной инфильтрации ( $r = 0,522$  при  $p < 0,001$ ) и фиброзом стромы

Таблица 1

эндометрия ( $r = 0,369$  при  $p < 0,05$ ), обратная зависимость — с количеством зрелых пиноподий в апикальной части поверхностных эпителиоцитов эндометрия ( $r = -0,5682$  при  $p < 0,0001$ ).

С целью диагностики ХЭ в фазу секреции и уточнения возможности наличия аутоиммунного компонента заболевания произведена иммуногистохимическая оценка экспрессии в эндометрии маркеров воспаления CD16, CD20, CD56 и HLA-DR<sub>II</sub> на 18—24-й день цикла. Описанные маркеры являются поверхностными антигенами, экспрессирующимися на поверхности большинства лимфоцитов, в частности натуральных клеток-киллеров (CD16 и CD56) и В-лимфоцитов (CD20), а также антигенпредставляющих клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты (HLA-DR<sub>II</sub>). Снижение экспрессии CD16 и CD56 на поверхности НК-клеток наблюдается при аутоиммунных заболеваниях, тогда как повышение экспрессии маркеров характерно для длительно текущих хронических воспалительных, в том числе вирусных, заболеваний. HLA-DR<sub>II</sub> (антиген главного комплекса гистосовместимости II класса) является функциональным маркером и находится в пределах нормы при благоприятном течении заболевания, тогда как при активации хронического воспалительного процесса и на фоне аутоиммунной патологии его экспрессия резко повышается. Результаты проведённых иммуногистохимических реакций эндометрия во II фазу цикла у обследуемых групп пациенток представлены в табл. 2.

У 58 (90,6%) пациенток основной группы и 2 (3,6%) женщин группы сравнения выявлено сочетание высокого уровня экспрессии CD16, CD20 и CD56 с незначительным количеством HLA-DR<sub>II</sub>-позитивных клеток, что свидетельствовало о наличии у них активного ХЭ с аутоиммунным компонентом ( $p < 0,001$ ; ОР 25,38; 95% ДИ 6,49—99,19) (см. табл. 2; рис. 3, см. 2-ю полосу обложки). С другой стороны, у 54 (96,4%) женщин группы сравнения и 6 (9,4%) пациенток основной группы зарегистрирована высокая экспрессия в эндометрии CD16 и CD20 на фоне малого количества CD56- и HLA-DR<sub>II</sub>-

Таблица 2

**Экспрессия CD16, CD20, CD56 и HLA-DR<sub>II</sub> в эндометрии у пациенток групп исследования**

Распределение CD16, CD20, CD56 и HLA-DR <sub>II</sub> в эндометрии (количество клеток в поле зрения)	1-я группа (n = 64)		2-я группа (n = 56)		3-я группа, контроль (n = 30)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
CD16, CD20, CD56 и HLA-DR <sub>II</sub> > 10	58	90,6*	2	3,6	0	0
CD16, CD20 > 10,						
CD56, HLA-DR <sub>II</sub> < 10	6	9,4	54	96,4*	0	0
CD16, CD20, CD56 и HLA-DR <sub>II</sub> < 10	0	0	0	0	30	100*

Примечание. \* — разница между показателями основной группы и группы сравнения статистически достоверна ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3

**Экспрессия ER и PR в эндометрии у пациенток групп исследования, баллы**

Распределение ER и PR в эндометрии	1-я группа (n = 64)	2-я группа (n = 56)	3-я группа, контроль (n = 30)	r
ER в железах эндометрия	95,0 ± 8,6 <sup>□</sup>	123,5 ± 11,7 <sup>□</sup>	121,1 ± 10,6	-0,8092
ER в строме эндометрия	41,3 ± 9,3* <sup>□</sup>	68,5 ± 10,6	85,6 ± 11,3**	-0,9574
PR в железах эндометрия	159,0 ± 17,6*	167,8 ± 14,8	180,0 ± 19,2*	-0,8228
PR в строме эндометрия	160,0 ± 15,8*	168,0 ± 16,3#	182,2 ± 21,0**	-0,8332
PR/ERα в строме, ед.	3,87 ± 0,93* <sup>□</sup>	2,45 ± 0,87 <sup>□</sup>	2,13 ± 0,65*	0,8780

Примечание. \* — разница между показателями основной и контрольной групп статистически значима ( $p < 0,001$ ); # — разница между показателями группы сравнения и группы контроля статистически значима ( $p < 0,001$ ); <sup>□</sup> — разница между показателями основной группы и группы сравнения статистически значима ( $p < 0,001$ ).

позитивных клеток, что подтверждало верифицированный ранее ХЭ без аутоиммунного компонента в стадии ремиссии ( $p < 0,001$ ; ОР 0,10; 95% ДИ 0,05—0,21). В группе контроля в подавляющем большинстве образцов эндометрия маркеры воспаления не определялись, а в остальных случаях отмечалась крайне низкая их экспрессия, что подтверждало отсутствие в них признаков ХЭ (рис. 4, см. 3-ю полосу обложки).

С целью оценки полноценности секреторной трансформации эндометрия изучали экспрессию в нём стероидных рецепторов ER и PR, определяющуюся при иммуногистохимическом исследовании в виде коричневого окрашивания ядер клеток желёз и стромы эндометрия (табл. 3).

Проведённый анализ установил статистически достоверно значимую низкую экспрессию ER как в железах ( $95,0 \pm 8,6$  балла), так и в строме эндометрия ( $41,3 \pm 9,3$  балла) у пациенток основной группы, тогда как в группах сравнения и контроля выявлена их умеренная экспрессия в железах ( $123,5 \pm 11,7$  и  $121,1 \pm 10,6$  балла) и в строме ( $68,5 \pm 10,6$  и  $85,6 \pm 11,3$  балла) эндометрия ( $p < 0,01$ ) (рис. 5, а, см. 3-ю полосу обложки). Экспрессия PR во всех изученных структурах у всех обследованных нами пациенток была умеренной и высокой ( $159,0 \pm 17,6$ — $182,2 \pm 21,0$  балла) с достоверным её снижением у пациенток 1-й ( $p < 0,001$ ) и 2-й ( $p < 0,05$ ) групп относительно группы контроля (рис. 5, б, см. 3-ю полосу обложки).

Для оценки вероятности наступления беременности как в естественных циклах, так и в циклах ЭКО у пациенток всех исследуемых групп вычислили стромальный индекс экспрессии PR/ERα, нормальные значения

которого колеблются в пределах 2—4 ед. [14]. Получено достоверное 1,5-кратное увеличение значения соотношения PR/ERα у пациенток основной группы ( $3,87 \pm 0,93$  ед.) относительно его нормальных значений в группах сравнения и контроля, составивших  $2,45 \pm 0,87$  и  $2,13 \pm 0,65$  ед. соответственно ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о прогностически низкой эффективности предстоящих циклов ЭКО у пациенток основной группы. В доступной для анализа современной литературе информации относительно величины стромального индекса при ХЭ нам не встречалось.

Таким образом, полученные нами данные о низкой экспрессии ER и PR в железах и строме эндометрия у пациенток основной группы объясняют нарушение процесса имплантации и снижение результативности проводимых у них циклов ЭКО, тогда как уровень экспрессии стероидных рецепторов в эндометрии у пациенток групп сравнения и контроля не оказывает значимого влияния на вероятность наступления беременности у данной категории женщин.

Для оценки рецептивности эндометрия производили определение основного её маркера — LIF (leukemia inhibitory factor), экспрессия которого выявлялась в виде коричневого окрашивания цитоплазмы клеток железистого эпителия и стромы, а также на поверхности пиноподий эпителиоцитов эндометрия (табл. 4).

Проведённый нами анализ экспрессии LIF в эндометрии продемонстрировал достоверное её снижение у пациенток основной группы вплоть до низкой ( $1,30 \pm 0,15$  балла) — в железистом эпителии и крайне низкой ( $0,95 \pm 0,10$  балла) — на поверхности пиноподий ( $p < 0,001$ ) (рис. 6, см. 3-ю полосу обложки). Экспрессия LIF

в группе сравнения была умеренной в железах ( $4,0 \pm 0,3$  балла) и строме эндометрия ( $3,8 \pm 0,2$  балла) и высокой — на поверхности пиноподий ( $4,8 \pm 0,3$  балла), тогда как в группе контроля отмечалось высокое накопление маркера в железистом ( $4,7 \pm 0,2$  балла) и поверхностном эпителии ( $5,6 \pm 0,1$  балла).

С целью оценки имплантационной способности эндометрия в нашем исследовании была изучена экспрес-

Таблица 4

**Экспрессия LIF в эндометрии у пациенток групп исследования, баллы**

Распределение LIF в эндометрии	1-я группа (n = 64)	2-я группа (n = 56)	3-я группа, контроль (n = 30)	r
LIF в железах эндометрия	1,30 ± 0,15* <sup>□</sup>	4,0 ± 0,3# <sup>□</sup>	4,7 ± 0,2**	-0,9231
LIF в строме эндометрия	2,9 ± 0,3	3,8 ± 0,2	2,9 ± 0,4	0,0135
LIF в пиноподиях	0,95 ± 0,10* <sup>□</sup>	4,8 ± 0,3# <sup>□</sup>	5,6 ± 0,1**	-0,8306

Примечание. \* — разница между показателями основной и контрольной групп статистически значима ( $p < 0,001$ ); # — разница между показателями групп сравнения и контроля статистически значима ( $p < 0,001$ ); <sup>□</sup> — разница между показателями основной группы и группы сравнения статистически значима ( $p < 0,001$ ).

**Экспрессия CLDN4 в эндометрии у пациенток групп исследования, баллы**

Распределение CLDN4 в эндометрии	1-я группа (n = 64)	2-я группа (n = 56)	3-я группа, контроль (n = 30)	r
CLDN4 в апикальной части поверхностных эпителиоцитов	1,5 ± 0,2* <sup>o</sup>	4, ± 0,3# <sup>o</sup>	5,1 ± 0,3**	-0,8857
CLDN4 в основании пиноподий	1,0 ± 0,1* <sup>o</sup>	4,5 ± 0,2# <sup>o</sup>	6,0 ± 0,01**	-0,9103

Примечание. \* — разница между показателями основной и контрольной групп статистически значима ( $p < 0,001$ ); # — разница между показателями группы сравнения и группы контроля статистически значима ( $p < 0,001$ ); <sup>o</sup> — разница между показателями основной группы и группы сравнения статистически значима ( $p < 0,001$ ).

сия клаудина-4 — CLDN4, определявшаяся в виде коричневого окрашивания апикальной части мембран поверхностных эпителиоцитов эндометрия и в основании пиноподий (табл. 5).

Анализ экспрессии CLDN4 в эндометрии установил статистически значимое её снижение в апикальной части поверхностных эпителиоцитов и в основании пиноподий в ряду группа контроля — группа сравнения — основная группа, где определялась высокая (5,1 ± 0,3 и 6,0 ± 0,01 балла), умеренная (4,1 ± 0,3 и 4,5 ± 0,2 балла) и низкая (1,5 ± 0,2 и 1,0 ± 0,1 балла) экспрессия маркера соответственно ( $p < 0,001$ ) (рис. 7, см. 3-ю полосу обложки).

Полученные нами результаты свидетельствуют об иницирующей роли высокой экспрессии LIF и CLDN4 в поверхностных структурах эндометрия в процессе имплантации эмбриона и объясняют критическое нарушение рецептивности эндометрия на фоне длительно текущего ХЭ. Отмеченные нами особенности экспрессии LIF в эндометрии полностью согласуются с данными литературы [5, 7], тогда как сведения о роли CLDN4 в процессе имплантации немногочисленны и отражают взаимосвязь высокой эндометриальной экспрессии самого белка с идиопатическим бесплодием [8, 15]. Научных работ, изучающих участие мРНК CLDN4 в процессе nidации эмбриона, нам не встречалось.

Проведённый корреляционный анализ Пирсона выявил умеренную зависимость между длительностью течения ХЭ и молекулярными критериями нарушения

Таблица 5

рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием, ассоциированным с ХЭ: обратную зависимость — с экспрессией ER в железах ( $r = -0,507$  при  $p < 0,0001$ ) и строге эндометрия ( $r = -0,622$  при  $p < 0,0001$ ), экспрессией PR в железах ( $r = -0,560$  при  $p < 0,0001$ ) и строге эндометрия ( $r = -0,572$  при  $p < 0,0001$ ), экспрессией LIF в железистых эпителиоцитах эндометрия ( $r = -0,536$  при  $p < 0,0001$ ) и на поверхности пиноподий ( $r = -0,673$  при  $p < 0,001$ ), экспрессией CLDN4 в клетках поверхностного эпителия эндометрия ( $r = -0,611$  при  $p < 0,0001$ ) и в основании пиноподий ( $r = -0,605$  при  $p < 0,0001$ ); прямую зависимость — со стромальным индексом PR/ERα эндометрия ( $r = 0,557$  при  $p < 0,0001$ ).

По результатам ROC-анализа, проведённого относительно экспрессии CLDN4 в поверхностных эпителиоцитах эндометрия и в основании пиноподий, получены математические модели «отличного» качества — AUC = 0,947 ± 0,023 и 0,977 ± 0,016 соответственно. Точками «cut-off» определены уровни экспрессии CLDN4, равные 1,7 балла в апикальной части поверхностных эпителиоцитов и 1,1 балла — в основании пиноподий. Таким образом, снижение экспрессии CLDN4 менее 1,7 балла в поверхностных эпителиоцитах и менее 1,1 балла в основании пиноподий у пациенток с ХЭ ассоциировано с развитием бесплодия с вероятностью 91,7 и 94,2% соответственно (табл. 6, рис. 8).

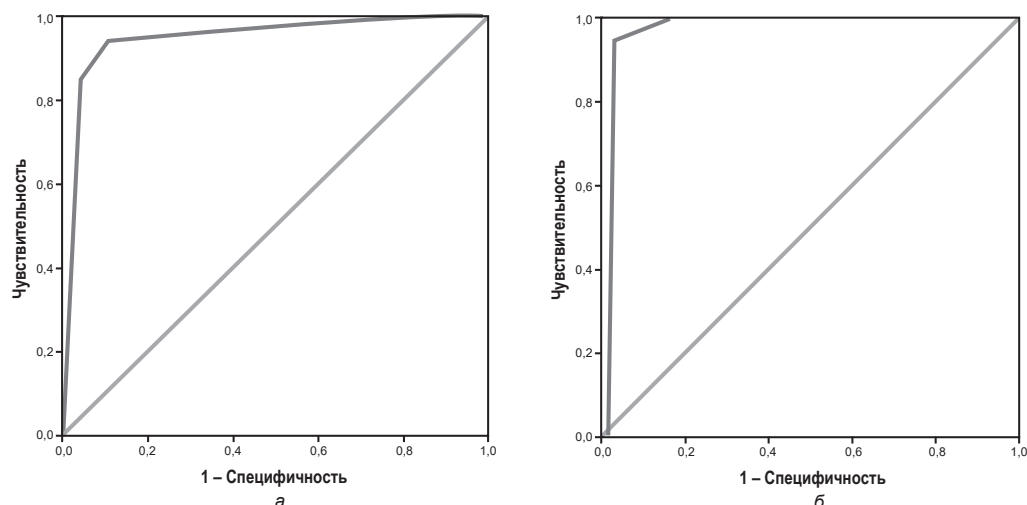
**Заключение**

Таким образом, при хроническом эндометрите, ассоциированном с развитием бесплодия и неудачными попытками ЭКО, в 90,6% случаев выявляется иммунный патогенез заболевания, характеризующийся длительным (более 5 лет) течением (высокой экспрессией в эндометрии CD16, CD20, CD56 на фоне незначительного количества HLA-DR<sub>II</sub>-позитивных клеток), нарушением секреторной трансформации эндометрия с выраженным снижением количества зрелых пиноподий на апикальной поверхности покровных эпителиоцитов

Таблица 6

**Значения чувствительности и специфичности для математической модели «уровень экспрессии CLDN4 — развитие бесплодия на фоне ХЭ»**

Параметры	Характеристики математической модели				точность модели, %
	чувствительность Se, %	специфичность Sp, %	прогностическое значение		
			«+»	«-»	
Экспрессия CLDN4 в апикальной части поверхностных эпителиоцитов					
Рассчитанные значения	92,19	91,07	92,19	91,07	91,67
95% ДИ	82,98—96,62	80,74—96,13	82,98—96,62	80,74—96,13	84,99—95,53
Экспрессия CLDN4 в основании пиноподий					
Рассчитанные значения	95,31	92,86	93,85	94,55	94,17
95% ДИ	87,10—98,39	83,02—97,19	85,22—97,58	85,15—98,13	88,22—97,21



**Рис. 8. ROC-кривые для математических моделей «уровень экспрессии CLDN4 в эндометрии — развитие бесплодия на фоне ХЭ».**

а — в поверхностных эпителиоцитах ( $AUC = 0,947 \pm 0,023$ ); б — в основании пиноподий ( $AUC = 0,977 \pm 0,016$ ).

эндометрия, а также резкое снижение экспрессии стероидных рецепторов ER и PR и маркеров рецептивности LIF и CLDN4. Описанные при хроническом эндометрите процессы лежат в основе стойкого нарушения имплантационной способности эндометрия, приводящего к дисфункции репродуктивной системы с развитием бесплодия и многократных неудач в циклах ВРТ у страдающих им женщин.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 7—12, 15 см. REFERENCES)

- Кулаков В.И., Лопатина Т.В. Репродуктивное здоровье населения России. В кн.: *Бесплодный брак: Руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006: 10-8.
- Сухих Г.Т., Шуршаллина А.В. *Хронический эндометрит: Руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
- Коган Е.А., Колотовкина А.В., Файзуллина Н.М., Калинина Е.А. Морфологические и молекулярно-биологические особенности эндометрия в период «окна имплантации» у пациенток с бесплодием, сочетающимся с наружным генитальным эндометриозом 1-2-й стадии. *Акушерство и гинекология*. 2013; 9: 35-40.
- Шуршаллина А.В., Демура Т.А. Морфофункциональные перестройки эндометрия в «окно имплантации». *Акушерство и гинекология*. 2011; 7/2: 9-13.
- Бессмертная В.С., Самойлов М.В., Серебренникова К.Г., Бабиченко И.И. Морфологические и иммуногистохимические особенности эндометрия женщин с первичным и вторичным бесплодием. *Архив патологии*. 2008; 70 4: 31-4.
- Самойлов М.В., Бессмертная В.С., Серебренникова К.Г., Мишнев О.Д. Эндометриальное «окно имплантации» при бесплодии. *Архив патологии*. 2011; 3: 13-8.
- Левиашвили М.М., Демура Т.А., Мишиева Н.Г., Файзуллина Н.М., Назаренко Т.А., Коган Е.А. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе. *Акушерство и гинекология*. 2012; 4/1: 65-9.
- Дюжева Е.В., Калинина Е.А., Кузьмичев Л.Н., Коган Е.А. Иммуногистохимическое исследование эндометрия в программах ВРТ. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2009; 6: 98-104.

#### REFERENCES

- Kulakov V.I., Lopatina T.V. Reproductive health of the population of Russia. In: *Infertile marriage: A guide for doctors. [Besployny*

- brak: Rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2006: 10-8. (in Russian)
- Sukhikh G.T., Shurshalina A.V. *Chronic endometritis: a guide. [Khronicheskiy endometrit: rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
- Kogan E.A., Kolotovkina A.V., Fayzullina N.M., Kalinina E.A. Morphological and molecular-biological features of the endometrium during the “window of implantation” in patients with infertility, combined with external genital endometriosis of the 1-2 stage. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; (9): 35-40. (in Russian)
- Spurshalina A.V., Demura T.A. Morphofunctional rearrangements of the endometrium in the “implantation window”. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; (7/2): 9-13. (in Russian)
- Bessmertnaya B.C., Samoylov M.V., Serebrennikova K.G., Babichenko I.I. Morphological and immunohistochemical features of the endometrium of women with primary and secondary infertility. *Arkhiv patologii*. 2008; 70 (4): 31-4. (in Russian)
- Samoylov M.V., Bessmertnaya V.S., Serebrennikova K.G., Mishnev O.D. Endometrial “implantation window” with infertility. *Arkhiv patologii*. 2011; (3): 13-8. (in Russian)
- Dimitriadis E., Sharkey A.M., Lee Tan Y. et al. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reproduct. Biol. Endocrinol.* 2007; 5: 44-51.
- Serafini P.C., Silva I.D.C.G., Smith G.D., Motta E.L.A., Rocha A.M., Baracat E.C. Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reproduct. Biol. Endocrinol.* 2009; 7: 30.
- Achache H., Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum. Reprod. Update*. 2006; 12 (6): 731-46.
- Fukuda M.N., Sugihara K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2008; 34 (2): 129-36.
- Jee Byung Chul, Chang Suk Suh, Ki Chul Kim et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptor-1 in a luteal endometrium in patients with repeated in vitro fertilization failure. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (2): 528-34.
- Ruiz-Alonso M., Blesa D., Simon C. The genomics of the human endometrium. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1822: 1931-42.
- Leviashvili M.M., Demura T.A., Mishieva N.G., Fayzullina N.M., Nazarenko T.A., Kogan E.A. Evaluation of endometrial receptivity in patients with ineffective extracorporeal fertilization programs in history. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012; (4/1): 65-9. (in Russian)
- Dyuzheva E.V., Kalinina E.A., Kuz'michev L.N., Kogan E.A. Immunohistochemical study of endometrium in ART programs. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina*. 2009; 6: 98-104. (in Russian)
- Hou J., Gomes A.S., Paul D.L., Goodenough D.A. Study of claudin function by RNA interference. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 3617-23.



К статье А.В. Мурашко и соавт.

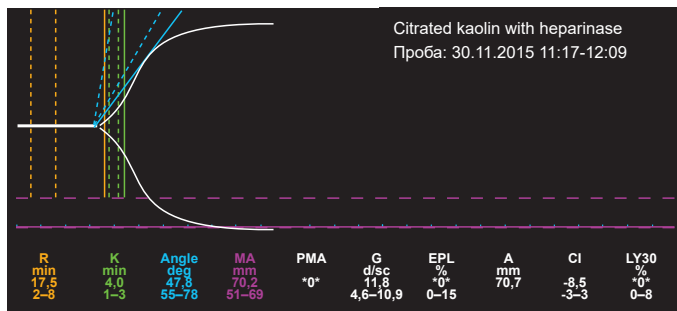


Рис. 2. Модель тромбозластограммы у пациентки Б.

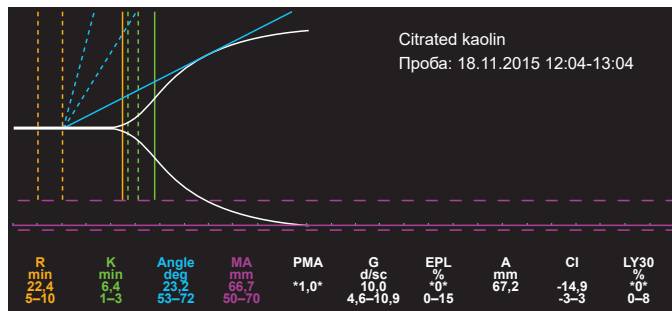


Рис. 4. Модель тромбозластограммы у пациентки С.

К статье Т.А. Демуры и соавт.

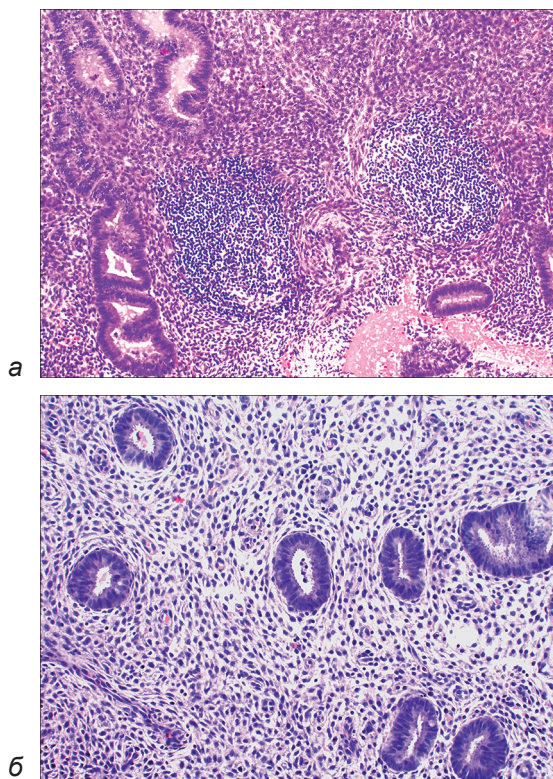


Рис. 1. Морфологические особенности ХЭ у пациенток основной группы.

а — диффузная лимфогиистоплазмацитарная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов вокруг желёз и сосудов эндометрия;

б — очаговый фиброз стромы эндометрия с уплотнением стенок спиральных артерий и развитием периваскулярного фиброза (окраска гематоксилином и эозином, ув. 100 и 200).

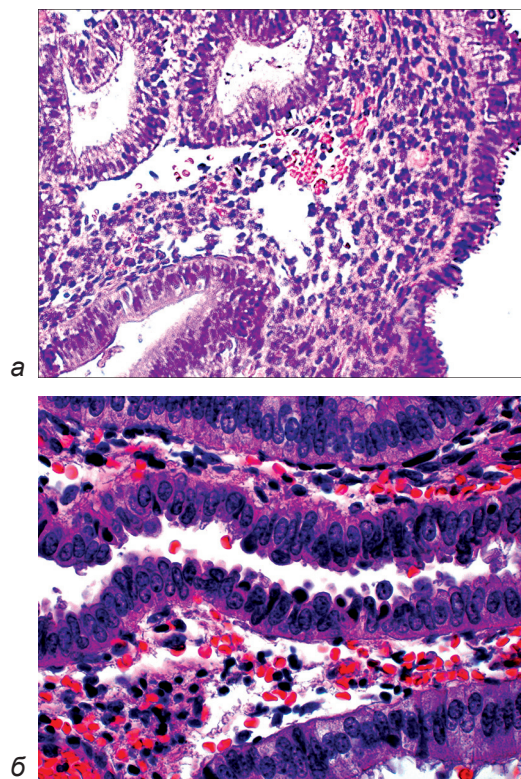


Рис. 2. Развитие пиноподий в апикальной части поверхностных эпителиоцитов.

а — незрелые пиноподии в раннюю секреторную фазу цикла при ХЭ в основной группе;

б — зрелые пиноподии в среднюю секреторную фазу цикла в группе контроля (окраска гематоксилином и эозином, ув. 400).

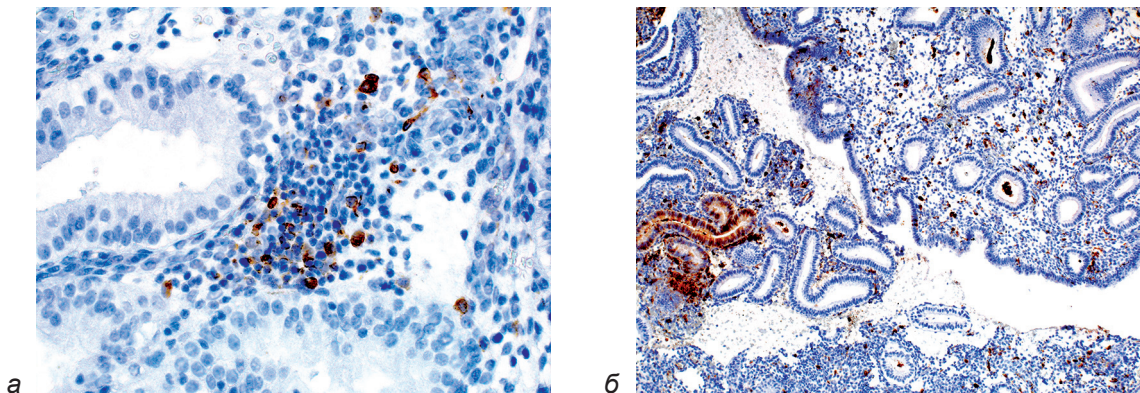


Рис. 3. Высокая экспрессия CD16 (а) и HLA-DR<sub>II</sub> (б) в эндометрии у пациенток с ХЭ в основной группе.

а — ув. 400; б — ув. 100; иммунопероксидазная реакция.





К статье Т.А. Демурь и соавт.

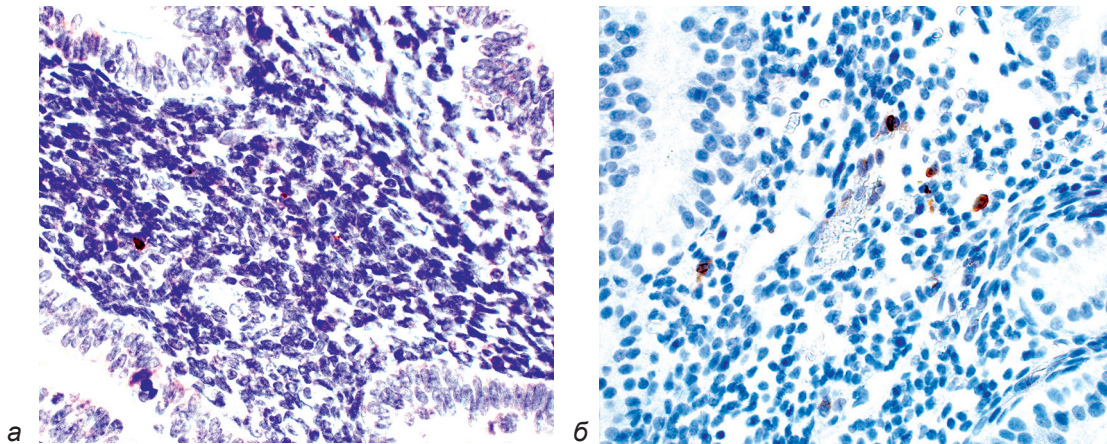


Рис. 4. Крайне низкая экспрессия CD16 (а) и CD20 (б) в эндометрии у женщин в группе контроля (иммунопероксидазная реакция, ув. 400).

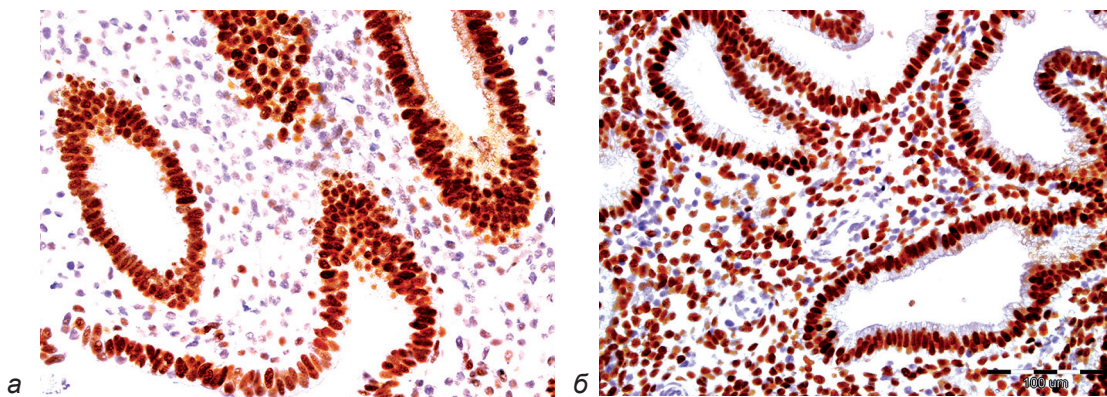


Рис. 5. Экспрессия стероидных рецепторов в эндометрии. а — умеренная экспрессия ER в железах и низкая в строме эндометрия в группах сравнения и контроля; б — умеренная экспрессия PR в железах и строме эндометрия в группе контроля (иммунопероксидазная реакция, ув. 400).

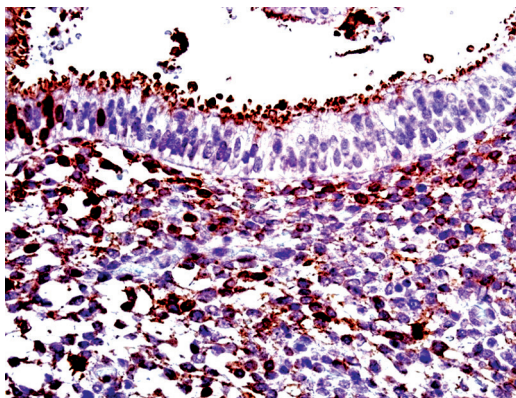


Рис. 6. Высокая экспрессия LIF в эндометрии у пациенток в группе контроля (иммунопероксидазная реакция, ув. 400).

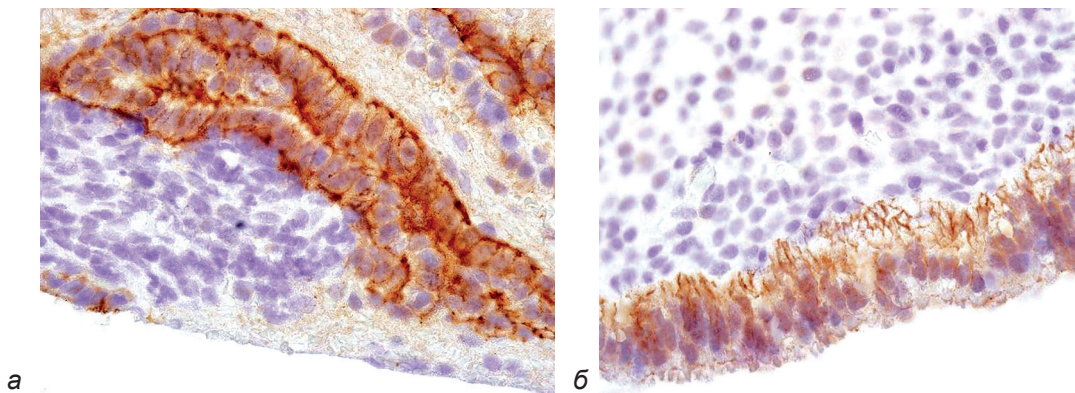


Рис. 7. Экспрессия CLDN4 в эндометрии (иммунопероксидазная реакция, ув. 400). а — высокая экспрессия CLDN4 в группе контроля; б — низкая экспрессия CLDN4 у пациенток с ХЭ в основной группе.