

DOI 10.22363/2313-0245-2023-27-1-46-56

EDN: SKKUTS

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Иммунологические и иммуногистохимические особенности имплантационного фактора эндометрия у здоровых пациенток позднего репродуктивного возраста

Е.И. Кравцова , Н.В. Колесникова ✉, И.Н. Лукошкина ,
К.В. Урюпина , В.А. Авакимян 

Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация
✉ nvk24071954@mail.ru

Аннотация: *Актуальность.* Число женщин старшего репродуктивного возраста неуклонно растет, и повторяющиеся неудачи программ вспомогательных репродуктивных технологий при переносе эмбрионов высокого качества указывают на возможность нарушения процессов имплантации эмбриона, связанных с нарушением рецептивности и функциональности эндометрия. Морфологические, иммунологические и иммуногистохимические изменения в эндометрии, связанные с возрастным фактором, могут оказаться определяющими для формирования «окна имплантации» и коррекции этих изменений, что может улучшить исходы вспомогательных репродуктивных технологий для когорты пациенток старшего репродуктивного возраста. *Цель исследования* — расширить патогенетические представления о нарушении имплантационной способности эндометрия у здоровых пациенток старшего репродуктивного возраста. *Материалы и методы.* Проведено проспективное выборочное исследование 46 пациенток (1 группа) в возрасте от 38 до 45 лет с официально зарегистрированным диагнозом «бесплодие» длительностью не более 4 лет, с благополучным гинекологическим и акушерским анамнезом, которым предшествовала первая попытка ЭКО. Пациентки обследованы согласно приказу № 803н Минздрава РФ. Дополнительно исследовался уровень мелатонина периферической крови, определение в эндометрии рецепторов к прогестерону, эстрогену, HLA-DR (МНС II), CD56 (NK-клетки), CD138, фактора, ингибирующего лейкемию. В цервикальном секрете определялись концентрации IL-6, IL-10, TGFβ, VEGF, с расчетом провоспалительного индекса, как отношение IL-6/IL-10 и соотношение TGFβ1/VEGF (y.e). Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). *Результаты и обсуждение.* В группе здоровых пациенток старшего репродуктивного возраста наблюдается дисбаланс стероидных рецепторов и секреторной трансформации эндометрия на фоне относительной гиперэстрогении, при снижении рецепции к собственным гормонам в эндометрии. Снижение мелатонина сигнализирует о расстройстве пинеального и гипофизарного контроля яичниковой цикличности. Отмечается уменьшение экспрессии фактора, ингибирующего лейкемию. Отслеживаются признаки неактивного хронического эндометрита с аутоиммунным компонентом, подтверждающиеся провоспалительным цитокиновым балансом. Преобладание процессов фиброза над процессами ангиогенеза подтверждается увеличением соотношения TGFβ1/VEGF и высокорезистентным кровотоком в маточных артериях. *Выводы.* Стандартная прегравидарная подготовка не может обеспечить компенсацию всех факторов,

© Кравцова Е.И., Колесникова Н.В., Лукошкина И.Н., Урюпина К.В., Авакимян В.А., 2023



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

нарушающих имплантационный потенциал эндометрия у данной когорты пациенток, и требует разработки новых комплексных методик, непосредственно влияющих на многообразие всех факторов, обеспечивающих естественное угасание репродуктивного потенциала, с целью повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: бесплодие, старший репродуктивный возраст, имплантационный фактор эндометрия, хронический эндометрит

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

Вклад авторов. Н.В. Колесникова — разработка дизайна исследования; получение и анализ данных; написание текста рукописи; обзор публикаций по теме статьи. Е.И. Кравцова — разработка дизайна исследования; получение и анализ данных; написание текста рукописи; обзор публикаций по теме статьи. И.Н. Лукошкина — разработка дизайна исследования; написание текста рукописи; обзор публикаций по теме статьи. К.В. Урюпина — получение и анализ данных; написание текста рукописи; обзор публикаций по теме статьи. В.А. Авакимян — получение и анализ данных; написание текста рукописи; обзор публикаций по теме статьи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проведено в соответствии со стандартами Хельсинской декларации (Declaration Helsinki, 2013). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета, г. Краснодар, Российская Федерация.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты, включенные в исследование, давали добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Получена 10.12.2022. Принята 16.01.2023

Для цитирования: Кравцова Е.И., Колесникова Н.В., Лукошкина И.Н., Урюпина К.В., Авакимян В.А. Иммунологические и иммуногистохимические особенности имплантационного фактора эндометрия у здоровых пациенток позднего репродуктивного возраста // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 1. С. 46–56. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-1-46-56

Immunological and immunohistochemical features of endometrial implantation factor in healthy patients of late reproductive age

Elena I. Kravtsova , Natalia V. Kolesnikova ✉, Irina N. Lukoshkina 
Kristina V. Uryupina , Veronika A. Avakimyan 

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation
✉ nvk24071954@mail.ru

Abstract. Relevance. The number of women of older reproductive age is steadily increasing, and repeated failures of Assisted Reproductive Technologies programs during the transfer of high-quality embryos indicate the possibility of disruption of embryo implantation processes associated with impaired receptivity and functionality of the endometrium. Morphological, immunological and immunohistochemical changes in the endometrium associated with age factor may be decisive for the formation of the

«implantation window» and correction of these changes and may improve the outcomes of Assisted Reproductive Technologies for a cohort of patients of older reproductive age. *The aim of the study*—to expand the pathogenetic understanding of the violation of the implantation ability of the endometrium in healthy patients of older reproductive age. *Materials and Methods*. A prospective sample study of 46 patients (group 1), aged 38 to 45 years with an officially registered diagnosis of infertility lasting no more than 4 years, with a successful gynecological and obstetric history, who were about to have their first IVF attempt, was conducted. The patients were examined according to Order № 803n of the Ministry of Health of the Russian Federation. Additionally, the level of peripheral blood melatonin, the determination of progesterone, estrogen, HLA-DR (MHC II), CD56 (NK cells), CD138, leukemia inhibiting factor receptors in the endometrium were studied. Concentrations of IL-6, IL-10, TGF β , and VEGF were determined in the cervical secretion, with the calculation of the pro-inflammatory index, as the ratio of IL-6/IL-10 cu and the ratio of TGF β 1/VEGF. Statistical data processing was performed using the Statistica 10.0 application software package (StatSoft, Inc., USA). *Results and Discussion*. In the group of healthy patients of older reproductive age, there is an imbalance of steroid receptors and secretory transformation of the endometrium against the background of relative hyperestrogenism, with a decrease in the reception of own hormones in the endometrium. A decrease in melatonin signals a disorder of pineal and pituitary control over ovarian cycling. There is a decrease in the expression of leukemia inhibiting factor. Signs of inactive chronic endometritis with an autoimmune component are monitored, confirmed by a pro-inflammatory cytokine balance. The predominance of fibrosis processes over angiogenesis processes is confirmed by an increase in the ratio of TGF β 1/VEGF and highly resistant blood flow in the uterine arteries. *Conclusion*. Standard pre-gravidar preparation cannot compensate for all factors that violate the implantation potential of the endometrium in this cohort of patients and requires the development of new complex techniques that directly affect the diversity of all factors that ensure the natural extinction of reproductive potential in order to increase the effectiveness of Assisted Reproductive Technologies programs.

Keywords: infertility, older reproductive age, endometrial implantation factor, chronic endometritis

Funding. The authors state that there is no external funding.

Author contributions. N.V. Kolesnikova — development of the research design; data acquisition and analysis; writing the text of the manuscript; review of publications on the topic of the article. E.I. Kravtsova — research design development; data acquisition and analysis; writing the text of the manuscript; review of publications on the topic of the article. I.N. Lukoshkina — development of research design; writing the text of the manuscript; review of publications on the topic of the article. K.V. Uryupina — data acquisition and analysis; writing the text of the manuscript; review of publications on the topic of the article. V.A. Avakimyan — data acquisition and analysis; writing the text of the manuscript; review of publications on the topic of the article. All the authors made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The conducted research complies with the recognized standards of the Helsinki Declaration (Declaration Helsinki, 2013). The protocol of the study was approved by the Ethical Committee of Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

Acknowledgements — not applicable.

Informed consent to publication: patients included in the study gave written informed consent to participate in the research, including the publication of descriptions of clinical cases and photographs.

Received 10.12.2022. Accepted 16.01.2023.

For citation: Kravtsova EI, Kolesnikova NV, Lukoshkina IN, Uryupina KV, Avakimyan VA. Immunological and immunohistochemical features of endometrial implantation factor in healthy patients of late reproductive age. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(1):46–56. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-1-46-56

Введение

Несмотря на то, что вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются эффективным методом преодоления бесплодия, лечение пациенток старшего репродуктивного возраста остается низко результативным. Так, по данным отчета регистра ВРТ за 2020 год в группе 35–39 лет частота наступления беременности в цикле экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с расчетом на пункцию составила 22,3 %, частота родов — 16,6 %, тогда как у женщин 34 года и моложе (26,8 % и 20,8 % соответственно). Частота наступления беременности в группе женщин 40 лет и старше была более чем в 2 раза ниже (ЭКО — 11,5 %), а частота завершения беременностей родами у данной возрастной группы ниже в 3 раза (6,5 %). Эти параметры более чем вдвое повышаются при проведении предимпланционной генетической диагностики (ПГД) или при переносе размороженного эмбриона, что безусловно подтверждает ведущую роль эмбрионального фактора в исходах ВРТ. Однако число женщин старшего репродуктивного возраста, со снижением естественной фертильности, обратившихся в клиники ВРТ, неуклонно растет, а повторяющиеся неудачи программ ВРТ у пациенток с бесплодием при переносе эмбрионов высокого качества указывают на то, что причиной могут быть нарушения процессов имплантации эмбриона, связанные с нарушением рецептивности и функциональности эндометрия [1–3]. Морфологические, иммунологические и иммуногистохимические изменения в эндометрии, связанные с возрастным фактором, могут оказаться определяющими для формирования «окна имплантации», и коррекция этих изменений, возможно, улучшит исходы ВРТ для когорты пациенток старшего репродуктивного возраста.

Цель исследования — расширить патогенетические представления о нарушении имплантационной способности эндометрия у здоровых пациенток старшего репродуктивного возраста.

Материалы и методы

На базе отделений репродуктологии Краснодарского края в период 2018–2022 гг. проведено проспективное выборочное исследование 46 пациенток (1 группа) в возрасте от 38 до 45 лет с официально зарегистрированным диагнозом «бесплодие» длительностью не более 4 лет, с благополучным гинекологическим и акушерским анамнезом, которым предстояла первая попытка ЭКО. Поздняя попытка реализации репродуктивной функции у всех обследуемых пациенток была вызвана социальными факторами (получение образования, карьера, достижение определенного общественного и финансового статуса, отсутствие полового партнера, позднее вступление в половую жизнь, повторный брак). Контрольную группу (2 группа) (инструментальный и лабораторный контроль) составили 50 здоровых женщин 25–34 лет, наблюдающихся в связи с мужским фактором бесплодия.

Критерии включения в основную группу: возраст пациенток в диапазоне 35–45 лет; наличие показаний к ЭКО; сохраненная функция яичников и менструальный цикл; фертильная сперма партнера; нормальный кариотип у супругов; получение добровольного информированного согласия пациенток в соответствии с Хельсинской декларацией на проведение лабораторно-инструментального, гистологического и иммуногистохимического исследования, проведения процедур ВРТ и обработку персональных данных.

Критерии исключения: возраст менее 38 лет и более 45 лет; противопоказания к ЭКО, миома матки; эндометриоз; наличие в анамнезе воспалительных заболеваний половых путей, хламидиоза и внематочной беременности, мужской фактор бесплодия, нарушения в кариотипе супругов.

Все пациентки были обследованы согласно приказу № 803н Минздрава РФ. Для оценки фолликулярного резерва проводилось исследование уровня фолликулостимулирующего гормона и антимюллерова гормона в сыворотке крови на 2–5 день менструального цикла и оценка количества антральных фолликулов с помощью ультразвукового исследования трансвагинальной методикой при помощи аппарата «Toshiba Aplio 500» (Toshiba, Япония). Исследовался

уровень эстрадиола и прогестерона методом иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием реагентов 100–02 Стероид ИФА-прогестерон № 100–03 (Алкор Био, Санкт-Петербург, Россия) и Estradiol ELISA KIT- 2693 (DRG International, NJ, USA).

Для оценки имплантационного фактора эндометрия проводилась ультразвуковая оценка толщины эндометрия на 19–21 дни менструального цикла, иммуногистохимическое исследование материала полученного пайпель-биопсией с определением в тканях эндометрия рецепторов к прогестерону, эстрогену, HLA-DR (МНС II), CD56 (NK-клетки), CD138, фактора, ингибирующего лейкемию (LIF). Забор цервикальной слизи (ЦС) производился в средней секреторной фазе (19–22 день менструального цикла) с использованием флоковых тампонов (Medschenker, Южная Корея). Концентрации IL-6, IL-10, TGF β , VEGF в цервикальном секрете определялись твердофазным иммуноферментным методом (ТИФА) с использованием наборов (Caltag Laboratories, USA). Проводился расчет провоспалительного индекса, как отношение IL-6/IL-10 у.е. и соотношение TGF β 1/VEGF, у.е.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Описание качественных признаков представлено в виде абсолютных (количество) и относительных (удельный вес, %) данных, количественных признаков в зависимости от варианта распределения признака: по одновыборочному критерию Колмогорова — Смирнова представлено в виде средних значений \pm стандартное отклонение, сравнение количественных данных в зависимости от вида распределения проводили с помощью параметрических или непараметрических методов: t-теста Стьюдента или U-критерия Манна — Уитни. Во всех случаях критический уровень значимости принимался за $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Средний возраст всех обследованных женщин равнялся $39,9 \pm 2,1$ года. Средний возраст пациенток группы контроля составил $30,0 \pm 2,6$ лет.

Общая средняя продолжительность официально документированного бесплодия у пациенток 1 группы составила $3,02 \pm 0,8$ лет. Среди пациенток 1 группы преобладало первичное бесплодие — 37 (80,4 %) пациенток, вторичное бесплодие отмечалось у 9 (19,6 %). У 8 (17,6 %) пациенток в анамнезе были срочные роды, а у 9 (19,6 %) — медикаментозные искусственные аборты.

При сборе гинекологического анамнеза у пациенток основной группы отмечены дисбиозы и инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) (70,9 % пациенток), эктопия цилиндрического эпителия на шейке матки (23,9 % пациенток), тогда как других гинекологических заболеваний не отмечалось. Соматический анамнез у пациенток также не был отягощен заболеваниями, влияющими на возможность реализации репродуктивной функции.

Все женщины прошли обследование в соответствии с приказом № 803н Минздрава РФ. В основное обследование включали общий анализ крови, мочи, биохимическое исследование, определение уровня половых гормонов, ультразвуковое исследование женских половых органов в динамике менструального цикла.

Концентрация гонадотропных и стероидных гормонов практически у всех пациенток находилась в пределах референсной нормы, включая тиреотропный гормон, пролактин, индекс свободных андрогенов. Однако при сравнении показателей основной (1 группа) и контрольной группы (2 группа) были обнаружены достоверные различия, полученные при использовании T-критерия для независимых выборок, поскольку нормальность распределения по критерию Колмогорова—Смирнова не отвергалась ($p > 0,05$).

Уровни лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) были статистически значимо ниже у пациенток 1 группы ($p < 0,001$) (табл. 1). Повышенные базальные значения ЛГ и ФСГ могут быть критичными для нормальной овуляции и для правильной синхронизации состояния оплодотворенного ооцита и статуса эндометрия. При этом концентрация эстрадиола, который имеет чрезвычайно высокое значение для

реализации функции фертильности не имела статистически значимых различий между группами ($p=0,85$).

Таблица 1
Концентрация гонадотропных и стероидных гормонов в периферической крови у пациенток основной и контрольной групп ($M \pm m$)

Показатель	1 группа, n=46	2 группа (контроль), n=50	p
ЛГ, МЕ/л	7,45±3,2	8,55±3,4	0,003
ФСГ, МЕ/л	8,82±1,6	5,13±1,3	0,008
Эстрадиол, пмоль/л	297,1±14,4	283,6±67,3	0,85
Прогестерон, нмоль/л	28,56±15,8	34,86±18,3	0,003
АМГ, нг/мл	1,62±0,8	5,6±1,8	<0,001
Мелатонин, пг/мл	4,1±1,81	5,7±1,2	0,005

Примечание: ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; АМГ – антимюллеров гормон

Table 1
Concentration of gonadotropin and steroid hormones in peripheral blood in patients of the main and control groups ($M \pm m$)

Indicator	1 group, n=46	2 group (control), n=50	p
LG, ME/L	7.45±3.2	8.55±3.4	0.003
FSG, ME/l	8.82±1.6	5.13±1.3	0.008
Estradiol, pmol/l	297.1±14.4	283.6±67.3	0.85
Progesterone, pmol/l	28.56±15.8	34.86±18.3	0.003
AMG, ng/ml	1.62±0.8	5.6±1.8	<0.001
Melatonin, pg/ml	4.1±1.81	5.7±1.2	0.005

Note: LH – luteinizing hormone; FSH – follicle-stimulating hormone; AMH is anti-Mullerian hormone

Прогестерон важен для формирования адекватной секреторной фазы эндометрия и полноценного окна имплантации, под его воздействием активированными лимфоцитами продуцируется прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (PIBF),

который выполняет иммуномодулирующие функции, важные для установления процессов иммунной толерантности между организмами матери и плода [4–6]. При этом сниженная концентрация прогестерона приводит к многообразным дефектам секреторной фазы эндометрия, что уменьшает частоту успешных имплантаций. Исследованиями показано, что средние значения уровня прогестерона крови, определяемого на 19–24 день менструального цикла, в первой группе пациенток были значимо снижены относительно второй группы ($p < 0,001$).

Исследование антимюллерова гормона (АМГ), который наряду с уровнем ФСГ и количеством антральных фолликулов в яичнике является параметром овариального резерва, показало, что по сравнению с группой контроля в первой группе обследуемых наблюдалось статистически значимое снижение его средних значений ($1,62 \pm 0,81$ пг/мл против $5,6 \pm 1,8$ пг/мл, $p < 0,001$). При этом уровень АМГ коррелировал с возрастом пациенток ($p = 0,93$), поскольку наиболее низкие уровни наблюдались у пациенток старше 40 лет. Между тем известно, что АМГ имеет тесную корреляционную связь с количеством ооцитов, полученных в результате стимуляции суперооуляции. Пациентки с низким уровнем АМГ стандартно слабо реагируют на стимуляцию и, следовательно, имеют низкую вероятность наступления беременности с собственными яйцеклетками [7–9].

Изучение роли мелатонина и его взаимосвязь с нарушением фертильной функции в возрастном аспекте представляется чрезвычайно важным, так как мелатонин оказывает подавляющее действие непосредственно на гипофиз, а возрастное снижение мелатонина сигнализирует о расстройстве пинеального и гипофизарного контроля над яичниковой цикличностью и прогрессивном угасании фертильной функции женщины [10–12]. По данным нашего исследования уровень мелатонина периферической крови у пациенток старшего репродуктивного возраста был статистически значимо снижен по сравнению с группой контроля ($4,1 \pm 1,81$ пг/мл против $5,7 \pm 1,2$ пг/мл в контрольной группе, $p = 0,005$).

Одним из методов исследования состояния эндометрия является доплерометрическое ис-

следование характера кровотока в сосудах матки. Измерение таких доплерометрических показателей кровотока, как PI и RI маточных сосудов, может быть использовано для прогноза возможности наступления беременности в циклах ЭКО. Значения PI, меньшие или равные 3,0, являются прогностически благоприятными факторами в циклах ЭКО [13–15].

Ультразвуковое исследование с применением доплеровского картирования выявило статисти-

чески значимую межгрупповую разницу по следующим параметрам: в 1 группе наблюдалось уменьшение толщины эндометрия как в первой, так и во второй фазе цикла, было уменьшено количество антральных фолликулов и у всех пациенток наблюдался высокорезистентный кровоток в маточной артерии (табл. 2) при PI маточных артерий $3,42 \pm 0,1$, что является прогностически неблагоприятным фоном для имплантации эмбриона.

Таблица 2

Данные ультразвукового и доплерометрического исследования женских половых органов обследуемых пациенток

Параметры	1 группа, n=46		2 группа (контроль), n=50		p	p
	5–7	19–21	7–8	19–21		
Дни менструального цикла	5–7	19–21	7–8	19–21	5–7	19–21
Длина тела матки, мм	$53 \pm 1,3$	$54 \pm 2,1$	$52 \pm 1,2$	$53 \pm 1,4$	0,453	0,564
Переднезадний размер, мм	$38 \pm 1,4$	$44 \pm 2,1$	$38 \pm 1,2$	$40 \pm 1,3$	0,458	0,598
Ширина, мм	$51 \pm 1,1$	$56 \pm 1,5$	$51 \pm 1,2$	$52 \pm 1,2$	0,376	0,789
Толщина эндометрия	$6,2 \pm 0,9$	$7,48 \pm 2,24$	$9,4 \pm 1,3$	$13,3 \pm 1,67$	<0,001	<0,001
Количество антральных фолликулов	$3,7 \pm 1,3$	-	$7,6 \pm 0,01$	-	<0,001	-
R med маточных артерии	-	$9,5 \pm 0,01$	-	$7,9 \pm 0,01$	-	<0,001
IR med маточных артерии	-	$0,95 \pm 0,04$	-	$0,85 \pm 0,04$	-	<0,001
PI маточных артерий	-	$3,42 \pm 0,1$	-	$2,22 \pm 0,01$	-	<0,001

Table 2

Data of ultrasound and Doppler examination of female genital organs of the examined patients

Indicator	1 group, n=46		2 group (control), n=50		p	p
	5–7	19–21	7–8	19–21		
Day of the menstrual cycle	5–7	19–21	7–8	19–21	5–7	19–21
Length of the uterus body, mm	53 ± 1.3	54 ± 2.1	52 ± 1.2	53 ± 1.4	0.453	0.564
Front-rear size, mm	38 ± 1.4	44 ± 2.1	38 ± 1.2	40 ± 1.3	0.458	0.598
Width, mm	51 ± 1.1	56 ± 1.5	51 ± 1.2	52 ± 1.2	0.376	0.789
Endometrial thickness	6.2 ± 0.9	7.48 ± 2.24	9.4 ± 1.3	13.3 ± 1.67	<0.001	<0.001
Number of antral follicles	3.7 ± 1.3	-	7.6 ± 0.01	-	<0.001	-
R med of uterine arteries	-	9.5 ± 0.01	-	7.9 ± 0.01	-	<0.001
IRmed Uterine arteries	-	0.95 ± 0.04	-	0.85 ± 0.04	-	<0.001
PI of the uterine arteries	-	3.42 ± 0.1	-	2.22 ± 0.01	-	<0.001

Анализ приведенных данных показывает, что у пациенток старшего репродуктивного возраста, в отсутствии гинекологических заболеваний по совокупности с дисгормонозом имеются гемодинамические нарушения в сосудистой сети матки,

что вероятно вызывает обеднение васкуляризации эндометрия и субэндометриальной зоны, что целом отражается на толщине эндометрия, которая является маркером имплантационных возможностей. Иммуногистохимическое исследование эндометрия

в период «окна нидации» с оценкой рецептивности эндометрия, воспалительных маркеров и эндометриальных факторов позволяет дать комплексное заключение о составляющих эндометриальной дисфункции у обследуемых пациенток.

В результате анализа практически всех параметров обследования у пациенток старшего репродуктивного возраста выявлены статистически значимые отклонения от группы контроля. Экспрессия рецепторов половых гормонов, как к эстрогену так и к прогестерону, была понижена по сравнению с аналогичными показателями во 2 группе ($p < 0,001$) (табл. 3), а так же статистически значимо была снижена экспрессия рецепторов к цитокину LIF, непосредственно обеспечивающему имплантацию.

Таблица 3
Иммуногистохимические параметры эндометрия

Показатель	1 группа, n=46 (исходно)	2 группа (контроль), n=50	p 1–2 группы
ER КЖЭ M±SD	111,71±41,24	134,05±40,47	<0,001
ER KC M±SD	115,84±27,32	141,56±30,02	<0,001
PR КЖЭ M±SD	156,55±36,48	174,50±28,06	<0,001
PR KC M±SD	155,92±33,39	172,86±29,52	<0,001
LIF КЖЭ M±SD	16,8±6,34	26,04±6,89	<0,001
LIF KC M±SD	17,36±4,45	28,00±4,35	<0,001
HLA-DR (MHC II) M±SD	8,36±4,65	8,91±4,52	0,126
CD56 (NK-клетки) M±SD	11,06±3,15	6,41±3,10	<0,001
CD138 (плазмоциты) M±SD	2,03±0,82	1,01±0,85	<0,001

Примечание: КЖЭ — клетки железистого эпителия; KC — клетки стромы; LIF — фактор, ингибирующий лейкемию

Table 3
Immunohistochemical parameters of the endometrium

Indicator	1 group, n=46 (initially)	2 group (control), n=50 p	p 1–2 groups
ER GEC M±SD	111.71±41.24	134.05±40.47	<0.001
ER SC M±SD	115.84±27.32	141.56±30.02	<0.001
PR GEC M±SD	156.55±36.48	174.50±28.06	<0.001
PR SC M±SD	155.92±33.39	172.86±29.52	<0.001
LIF GEC M±SD	16.8±6.34	26.04±6.89	<0.001
LIF SC M±SD	17.36±4.45	28.00±4.35	<0.001
HLA-DR (MHC II) M±SD	8.36±4.65	8.91±4.52	0.126
CD56 (NK-cells) M±SD	11.06±3.15	6.41±3.10	<0.001
CD138 (plasmocytes) M±SD	2.03±0.82	1.01±0.85	<0.001

Note: GEC — glandular epithelial cells; SC — stroma cells; LIF — leukemia inhibiting factor

Параллельно у 37 (80,4 %) пациенток старшего репродуктивного возраста (1 группа), в отсутствии позитивных анализов на инфекционные агенты, были выявлены признаки хронического эндометрита с аутоиммунным компонентом, без активации процесса, что подтверждалось наличием соответствующего количества клеток, экспрессирующих CD56+ — 11,06±3,15 и количеством клеток, экспрессирующих HLA-DR(II)+8,36±4,65. У пациенток группы контроля наблюдался нормальный рецепторный гормональный статус, маркеры хронического эндометрита выявлены не были.

Наличие хронического аутоиммунного воспалительного процесса у пациенток 1 группы подтверждалось активацией провоспалительных реакций цитокинового каскада, определяемого в цервикальном секрете. Так, провоспалительный индекс (ПВИ) цервикальной слизи у пациенток старшего репродуктивного возраста превышал показатель в группе контроля более чем в 1,5 раза за счет увеличения

уровня IL6 (табл. 4). Недостаточная васкуляризация эндометрия у пациенток 1 группы, определяемая показателями доплерометрии, коррелировала со статистически значимо ($p < 0,001$) уменьшенной экспрессией ($p < 0,001$) сосудисто-эндотелиального фактора (VEGF) ($r = 0,98$) и статистически значимо увеличенной экспрессией β -трансформирующего фактора роста (TGF- β), белкового фактора, стимулирующего процесс фиброза ($r = 0,97$). Преобладание процессов фиброза над процессами ангиогенеза у пациенток 1 группы подтверждалось статистически значимым увеличением соотношения TGF β 1/VEGF до $2,4 \pm 0,9$ у.е, по сравнению с группой контроля (2 группа) — $0,95 \pm 0,1$ у.е, $p < 0,001$ (табл. 4).

Таблица 4
Цитокины и факторы роста в цервикальном секрете (ЛГ+7, (пг/мл) (M \pm SD))

Показатель	1 группа, n=46 (исходно)	2 группа (контроль), n=50	p 1–2 группы
ПВИ (IL6/IL10)	1,2 \pm 0,1	0,73 \pm 0,1	0,982
LIF	17,12 \pm 6,8	33,4 \pm 8,5	<0,001
VEGF	28,1 \pm 4,4	56,3 \pm 4,2	0,913
TGF β 1	76,3 \pm 5,3	54,3 \pm 5,4	0,87
TGF β 1/VEGF-A	2,4 \pm 0,9	0,95 \pm 0,1	<0,001

Примечание: ПВИ – провоспалительный индекс

Table 4
Immunohistochemical parameters of the endometrium (LH+7, (pg/ml) (M \pm SD))

Indicator	1 group, n=46 (initially)	2 group (control), n=50 p	p 1–2 groups
PII (IL6/IL10)	1.2 \pm 0.1	0.73 \pm 0.1	0.982
LIF	17.12 \pm 6.8	33.4 \pm 8.5	<0.001
VEGF	28.1 \pm 4.4	56.3 \pm 4.2	0.913
TGF β 1	76.3 \pm 5.3	54.3 \pm 5.4	0.87
TGF β 1/VEGF-A	2.4 \pm 0.9	0.95 \pm 0.1	<0.001

Note: PII- pro-inflammatory index

Выводы

Таким образом, по данным нашего исследования в группе здоровых пациенток старшего репродуктивного возраста наблюдается дисбаланс экспрессии стероидных рецепторов эндометрия и секреторной трансформации эндометрия на фоне нормальных уровней стероидных гормонов с наличием относительной гиперэстрогении при снижении рецепции к собственным гормонам в строме и железистой ткани эндометрия. Снижение мелатонина сигнализирует о расстройстве пинеального и гипофизарного контроля над яичниковой цикличностью. Отмечается уменьшение экспрессии фактора, ингибирующего лейкемию (LIF), обеспечивающего имплантационные свойства эндометрия. Отслеживаются признаки неактивного хронического эндометрита с аутоиммунным компонентом, подтверждающиеся провоспалительным цитокиновым балансом. Преобладание процессов фиброза над процессами ангиогенеза подтверждается увеличением соотношения TGF β 1/VEGF. Так как сосудистое русло и эндометрий является мишенью для стероидных гормонов яичников и факторов роста, возможно, вследствие данных процессов у пациенток старшего репродуктивного возраста в отсутствие отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза и каких-либо гинекологических заболеваний наблюдается высокорезистентный кровоток в маточных артериях и соответствие эхоструктуры эндометрия фазе менструального цикла. Стандартная прегравидарная подготовка, заключающаяся в циклической гормональной терапии или поддержке секреторной фазы менструального цикла, при всей патогенетической обусловленности не может обеспечить компенсацию всех факторов, нарушающих имплантационный потенциал эндометрия у данной когорты пациенток, и требует разработки новых комплексных методик, непосредственно влияющих на многообразие всех факторов, обеспечивающих естественное угасание репродуктивного потенциала, с целью повышения эффективности программ ВРТ.

Библиографический список

- Orazov M.P., Silant'eva E.S., Orekhov P.E., Kamillova D.P., Mikhaleva L.M. Повторные неудачи имплантации: этиология и возможности физиотерапии // *Трудный пациент*. 2020. № 8–9. С. 20–24. doi: 10.24411/2074-1995-2020-10055
- Lapides L., Klein M., Belušáková V., Csöbönyeiová M., Varga I., Babál P. Uterine Natural Killer Cells in the Context of Implantation: Immunohistochemical Analysis of Endometrial Samples from Women with Habitual Abortion and Recurrent Implantation Failure // *Physiol Res*. 2022. V. 71(Suppl 1). P. S99-S105. doi: 10.33549/physiolres.935012
- Ota K., Takahashi T., Mitsui J., Kuroda K., Hiraoka K., Kawai K. A case of discrepancy between three ERA tests in a woman with repeated implantation failure complicated by chronic endometritis // *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022. V. 1. № 22(1). P. 891. doi: 10.1186/s12884-022-05241-6
- Прохорова О.В., Олина А.А., Тolibова Г.Х., Траль Т.Г. Прогестерон-индуцированный блокирующий фактор: от молекулярной биологии к клинической медицине (обзор литературы) // *Акушерство и гинекология*. 2021. № 5. С. 64–71. doi: 10.18565/aig.2021.5.64-71
- Adamczak R., Ukleja-Sokołowska N., Lis K., Bartuzi Z., Dubiel M. Progesterone-induced blocking factor 1 and cytokine profile of follicular fluid of infertile women qualified to in vitro fertilization: The influence on fetus development and pregnancy outcome // *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2022. V. 36. P. 394632022111134. doi: 10.1177/0394632022111134
- Raghupathy R., Szekeres-Bartho J. Progesterone: A Unique Hormone with Immunomodulatory Roles in Pregnancy // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. № 3. P. 1333. doi: 10.3390/ijms23031333
- Согоян Н.С., Козаченко И.Ф., Адамян Л.В. Роль АМГ в репродуктивной системе женщин (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*. 2017. Т. 23. № 1. С. 37–42. doi: 10.17116/repro201723137-42
- Meczekalski B., Czyzyk A., Kunicki M., Podfigurna-Stopa A., Plociennik L., Jakiel G., Maciejewska-Jeske M., Lukaszuk K. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment // *J Endocrinol Invest*. 2016. V. 39. № 11. P. 1259–1265. doi: 10.1007/s40618-016-0497-6
- di Clemente N., Racine C., Rey R.A. Anti-Müllerian Hormone and Polycystic Ovary Syndrome in Women and Its Male Equivalent. *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 10. P. 2506. doi: 10.3390/biomedicines10102506
- Хабаров С.В., Стерликова Н.А. Мелатонин и его роль в циркадной регуляции репродуктивной функции (обзор литературы) // *Вестник новых медицинских технологий*. 2022. Т. 29. № 3. С. 17–31. doi: 24412/1609-2163-2022-3-17-31
- Cosme P., Rodríguez A.B., Garrido M., Espino J. Coping with Oxidative Stress in Reproductive Pathophysiology and Assisted Reproduction: Melatonin as an Emerging Therapeutical Tool // *Antioxidants (Basel)*. 2022. V. 12. № 1. P. 86. doi: 10.3390/antiox12010086
- Yong W., Ma H., Na M., Gao T., Zhang Y., Hao L., Yu H., Yang H., Deng X. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine // *Biomed Pharmacother*. 2021. V. 144. P. 112001. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112001
- Руденко Ю.А., Кулагина Е.В., Кравцова О.А., Целкович Л.С., Балтер Р.Б., Ибрагимова А.Р., Иванова Т.В., Ильченко О.А., Тюмина О.В., Рябов Е.Ю. Готовность эндометрия к экстракорпоральному оплодотворению: прогноз по данным ультразвукового и морфологического исследований // *Гены и клетки*. 2019. Т. 14. № 3. С. 142–146. doi: 10.23868/201906025
- Krylova Y., Polyakova V., Kvetnoy I., Kogan I., Dzhemlikhanova L., Niauri D., Gzgzayan A., Ailamazyan E. Immunohist ochemical criteria for endometrial receptivity in I/II stage endometriosis IVF-treated patients // *Gynecological Endocrinology*. 2016. V. 32(Sup 2). P. 33–36. doi: 10.1080/09513590.2016.1232576
- Enciso M., Aizpurua J., Rodríguez-Estrada B., Jurado I., Ferrández-Rives M., Rodríguez E., Pérez-Larrea E., Climent A.B., Marron K., Sarasa J. The precise determination of the window of implantation significantly improves ART outcomes // *Sci Rep*. 2021. V. 11. P. 13420. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-021-92955-w

References

- Orazov MR, Silant'eva ES, Orekhov RE, Kamillova DP, Mikhaleva LM. Repeated implantation failures: etiology and possibilities of physiotherapy. *A difficult patient*. 2020;8–9:20–24. doi: 10.24411/2074-1995-2020-10055. (In Russian).
- Lapides L, Klein M, Belušáková V, Csöbönyeiová M, Varga I, Babál P. Uterine Natural Killer Cells in the Context of Implantation: Immunohistochemical Analysis of Endometrial Samples from Women with Habitual Abortion and Recurrent Implantation Failure. *Physiol Res*. 2022;27(71 Suppl 1): S99-S105. doi: 10.33549/physiolres.935012
- Ota K, Takahashi T, Mitsui J, Kuroda K, Hiraoka K, Kawai K. A case of discrepancy between three ERA tests in a woman with repeated implantation failure complicated by chronic endometritis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022;22(1):891. doi: 10.1186/s12884-022-05241-6
- Prokhorova OV, Olina AA, Tolibova GH, Tral TG. Progesterone-induced blocking factor: from molecular biology to clinical medicine (literature review). *Obstetrics and Gynecology*. 2021;5:64–71. doi: 10.18565/aig.2021.5.64-71. (In Russian).
- Adamczak R, Ukleja-Sokołowska N, Lis K, Bartuzi Z, Dubiel M. Progesterone-induced blocking factor 1 and cytokine profile of follicular fluid of infertile women qualified to in vitro fertilization: The influence on fetus development and pregnancy outcome. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2022;36:394632022111134. doi: 10.1177/0394632022111134
- Raghupathy R, Szekeres-Bartho J. Progesterone: A Unique Hormone with Immunomodulatory Roles in Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1333. doi: 10.3390/ijms23031333
- Sogoyan NS, Kozachenko IF, Adamyan LV. The role of AMH in the reproductive system of women (literature review). *Reproduction problems*. 2017;23(1):37–42. doi: 10.17116/repro201723137-42. (In Russian).
- Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, Podfigurna-Stopa A, Plociennik L, Jakiel G, Maciejewska-Jeske M, Lukaszuk K. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(11):1259–1265. doi: 10.1007/s40618-016-0497-6

9. di Clemente N, Racine C, Rey RA. Anti-Müllerian Hormone and Polycystic Ovary Syndrome in Women and Its Male Equivalent. *Biomedicines*. 2022;10(10):2506. doi: 10.3390/biomedicines10102506.
10. Khabarov SV, Sterlikova NA. Melatonin and its role in circadian regulation of reproductive function (literature review). *Bulletin of New Medical Technologies*. 2022;29(3):17–31. doi: 24412/1609-2163-2022-3-17-31. (In Russian).
11. Cosme P, Rodríguez AB, Garrido M, Espino J. Coping with Oxidative Stress in Reproductive Pathophysiology and Assisted Reproduction: Melatonin as an Emerging Therapeutical Tool. *Antioxidants (Basel)*. 2022;12(1):86. doi: 10.3390/antiox12010086
12. Yong W, Ma H, Na M, Gao T, Zhang Y, Hao L, Yu H, Yang H, Deng X. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. *Biomed Pharmacother*. 2021;144:112001. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112001
13. Rudenko YuA, Kulagina EV, Kravtsova OA, Tselkovich LS, Balter RB, Ibragimova AR, Ivanova TV, Ilchenko OA, Tyumina OV, Ryabov EY. Endometrial readiness for in vitro fertilization: prognosis according to ultrasound and morphological studies. *Genes and cells*. 2019;14(3):142–146. doi: 10.23868/201906025. (In Russian).
14. Krylova Y, Polyakova V, Kvetnoy I, Kogan I, Dzhemlikhanova L, Niauri D, Gzgzryan A, Ailamazyan E. Immunohistochemical criteria for endometrial receptivity in I/II stage endometriosis IVF-treated patients, *Gynecological Endocrinology*. 2016;32(Sup2):33–36, doi: 10.1080/09513590.2016.1232576
15. Enciso M, Aizpurua J, Rodríguez-Estrada B, Jurado I, Ferrández-Rives M, Rodríguez E, Pérez-Larrea E, Climent AB, Marron K, Sarasa J. The precise determination of the window of implantation significantly improves ART outcomes. *Sci Rep*. 2021;11:13420. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92955-w>

Ответственный за переписку: Колесникова Наталья Владиславовна — доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики, Российская Федерация, 350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4. E-mail: nvk24071954@mail.ru
Колесникова Н.В. SPIN-код 9685–7584; ORCID 0000–0002–9773–3408
Кравцова Е.И. SPIN-код 5579–9910; ORCID 0000–0001–8987–7375
Лукошкина И.Н. ORCID 0000–0001–6214–8404
Урюпина К.В. ORCID 0000–0001–8113–2790
Авакимян В.А. ORCID 0000–0002–4946–6640

Corresponding author: Kolesnikova Natalia Vladislavovna — PhD, MD, Professor, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of the Kuban State Medical University, 350012, st. Mitrofan Sedin 4, Krasnodar, Russian Federation. E-mail: nvk24071954@mail.ru
Kolesnikova N.V. ORCID 0000–0002–9773–3408
Kravtsova E.I. ORCID 0000–0001–8987–7375
Lukoshkina I.N. ORCID 0000–0001–6214–8404
Uryupina K.V. ORCID 0000–0001–8113–2790
Avakimyan V.A. ORCID 0000–0002–4946–6640