

Особливості експресії ядерних стероїдних рецепторів в ендометрії у жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі

Н.В. Коцабин, О.М. Макачук

Івано-Франківський національний медичний університет

Структурна та функціональна зрілість ендометрія формується в умовах динамічних коливань рівня стероїдних гормонів яєчників – естрогенів та прогестерону під час менструального циклу.

Мета дослідження: визначення реактивності ядерних рецепторів естрогенів- α (ЯРЕ) і прогестерону (ЯРП) у стромі та залозах ендометрія у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу у жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі.

Матеріали та методи. Для вивчення реактивності ЯРЕ та ЯРП в ендометрії зразки були отримані під час гістероскопії у 42 пацієнток з безплідністю основної групи у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу. У контрольну групу (КГ) увійшли 18 здорових жінок, які мали принаймні одну фізіологічну вагітність, що закінчилась народженням здорової дитини. Реактивність ендометрія до статевих гормонів вивчали за імунопероксидазним методом з використанням мишачих МКА до рецепторів естрогенів- α (РЕ- α) (клон ID5, «ДАКО», Данія) і до рецепторів прогестерону (РП) (клон А6, «ДАКО», Данія). Інтенсивність забарвлення оцінювали за трибальною системою. Рівень експресії РЕ- α і РП встановлювали за допомогою розрахунку напівкількісного індексу: $IRS = SI \times PP$, де IRS – індекс імунореактивності; SI – оптична інтенсивність забарвлення; PP – відсоток позитивно забарвлених ядер.

Результати. У жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі нормальна імунореактивність РЕ- α та РП відзначена у 8 (19,05%) випадках, тотальне зниження імунореактивності (середнього і важкого ступенів) РЕ- α та РП у залозах і стромі спостерігалось у 6 (14,29%) пацієнток. У всіх жінок КГ було встановлено нормальний рівень імунореактивності РЕ- α та РП. Заслугує на увагу наявність поєднаної патології. Так, у 4 з 6 випадків поліп ендометрія виник на тлі хронічного ендометригиту. У 4 жінок з простою неатиповою гіперплазією ендометрія (ПНГЕ) діагностовано вогнищеве неповноцінне відторгнення ендометрія у попередньому циклі та невідпо-відність структури ендометрія фазі циклу. У групі жінок з безплідністю висока реактивність рецепторів була тільки у 8 (19,05%) біоптатах. Відхилення морфологічної будови ендометрія у цій підгрупі спостерігалось вірогідно частіше, ніж у КГ: невідповідність фазі циклу виявляли у 12,50% випадків, ПНГЕ – у 55,00%, поліп ендометрія – у 12,50%, хронічний ендометрит – у 25,00%.

Заключення. Зміна імунореактивності рецепторів естрогенів- α і прогестерону відіграє важливу роль у формуванні невдач імплантації у жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі. Отримані дані підтверджують гіпотезу множинних факторів регуляції розвитку ендометрія у природних циклах та циклах ДРТ. Висока частота структурно-функціональної неповноцінності ендометрія є показанням для поглибленого дослідження та корекції стану ендометрія перед плануванням вагітності.

Ключові слова: безплідність, невдалі спроби, запліднення *in vitro*, імунореактивність, рецептори естрогенів- α , рецептори прогестерону.

Структурна та функціональна зрілість ендометрія формується в умовах динамічних коливань рівня стероїдних гормонів яєчників – естрогенів та прогестерону під час менструального циклу.

Доведено, що вирішальну роль в імплантації ембріона відіграє абсолютний вміст стероїдних гормонів та кількість функціонально повноцінних рецепторів стромі та залоз ендометрія до відповідних гормонів.

Мета дослідження: визначення реактивності ядерних рецепторів естрогенів- α (ЯРЕ) і прогестерону (ЯРП) у стромі та залозах ендометрія у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу у жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для вивчення реактивності ЯРЕ та ЯРП в ендометрії зразки були отримані під час гістероскопії у 42 пацієнток з безплідністю (основна група – ОГ) у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу. У контрольну групу (КГ) увійшли 18 здорових жінок, які мали принаймні одну фізіологічну вагітність, що закінчилась народженням здорової дитини. У КГ для отримання матеріалу була проведена Pipelle-біопсія ендометрія (Prodimed, Франція) також у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу. Для визначення дня піку ЛГ було використане щоденне вимірювання ЛГ у сечі з середини фолікулярної фази. В обох групах біоптати ендометрія відразу ж уміщували стерильну ємність з формаліном і передавали в лабораторію. Зразки розподіляли на 2 частини: для ПГД та ІГХ.

Реактивність ендометрія до статевих гормонів вивчали імунопероксидазним методом з використанням мишачих МКА до рецепторів естрогенів- α (РЕ- α) (клон ID5, «ДАКО», Данія) і до рецепторів прогестерону (РП) (клон А6, «ДАКО», Данія). Морфометричні дослідження здійснювали на мікроскопі «AX Provis» (Olympus AX70, Японія) за допомогою програми аналізу зображення AnalysisPro 3,2 (SoftImaging, Німеччина). Інтенсивність забарвлення оцінювали за трибальною системою.

Рівень експресії РЕ- α і РП встановлювали за допомогою розрахунку напівкількісного індексу:

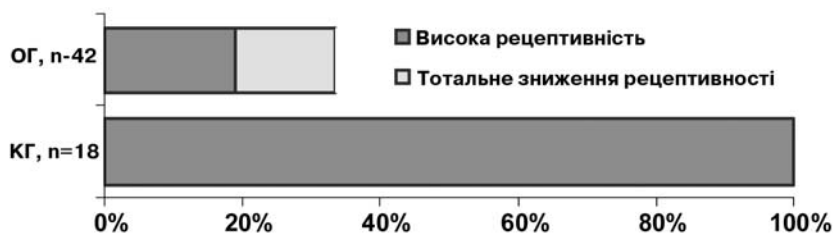
$$IRS = SI \times PP,$$

де IRS – індекс імунореактивності; SI – оптична інтенсивність забарвлення; PP – відсоток позитивно забарвлених ядер.

Оптичну щільність забарвлення оцінювали за трибальною системою (за 0 балів приймали цілковиту відсутність забарвлення; 1 бал – помірне забарвлення; 2 бали – інтенсивне забарвлення). Кількість позитивно забарвлених ядер виражали у відсотках.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі нормальна імунореактивність РЕ- α та РП відзначена у 8 (19,05%) жінок, тотальне зниження імунореактивності



Результати дослідження імунореактивності стероїдних рецепторів в ендометрії у жінок груп зіставлення

(середнього і важкого ступенів) РЕ-α та РП у залозах і стромі спостерігалось у 6 (14,29%) пацієнток. У всіх жінок КГ було встановлено нормальний рівень імунореактивності РЕ-α та РП (малюнок).

Під час вивчення морфологічної структури ендометрія проста неатипова гіперплазія ендометрія (ПНГЕ) виявлена у 15 (35,72%) жінок з безплідністю і у 1 (5,56%) жінок КГ; поліп ендометрія – у 6 (14,29%) і 0% відповідно; невідповідність морфологічної картини ендометрія дню менструального циклу – у 10 (23,81%) і 1 (5,56%) відповідно; хронічний ендометрит – у 6 (14,29%) і 0% відповідно (табл. 1). Ендометрій мав нормальну морфологічну будову та відповідав стадії середньої секреції у 13 (30,96%) і 16 (88,89%) жінок КГ відповідно.

Заслужує на увагу наявність поєднаної патології. Так у 4 з 6 випадків поліп ендометрія виник на тлі хронічного ендометриту. У 4 жінок з ПНГЕ діагностовано вогнищеве неповноцінне відторгнення ендометрія у попередньому циклі та невідповідність структури ендометрія фази циклу.

За даними табл. 1 можна зробити висновок, що незважаючи на те що у КГ у всіх випадках була висока реактивність стероїдних рецепторів, в 1 (5,56%) випадку було виявлено ендометрій, що не відповідає фазі менструального циклу та 1 випадок ПНГЕ (5,56%).

У групі жінок з безплідністю висока реактивність рецепторів була тільки у 8 (19,05%) біоптатах. Відхилення морфологічної будови ендометрія у цій підгрупі спостерігалось вірогідно частіше, ніж у КГ: невідповідність фази циклу виявляли у 12,50% випадків, ПНГЕ – у 55,00%, поліп ендометрія – у 12,50%, хронічний ендометрит – у 25,00%.

Тотальне зниження експресії стероїдних рецепторів було у 6 (14,29%) жінок зі звичною неефективною імплантацією. Відхилення морфологічної будови ендометрія у цій підгрупі також спостерігалось вірогідно частіше, ніж у КГ. Так, ендометрій, що не відповідає фазі циклу, виявляли у 33,33% пацієнток з тотальним зниженням експресії стероїдних ре-

цепторів; ПНГЕ – у 16,67%, поліп ендометрія – у 33,33%, хронічний ендометрит – у 50,00%.

Заслужує на увагу те, що у пацієнток з тотальним зниженням експресії стероїдних рецепторів частота хронічного ендометриту була вдвічі вищою, ніж у безплідних пацієнток з високою реактивністю рецепторів, а біоптатів з ендометрієм нормальної структури, що відповідає середній стадії секреції, не було жодного.

У табл. 2 наведено дані про особливості експресії РЕ-α та РП у стромі та залозах ендометрія жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі.

Під час аналізу експресії РЕ-α у 4 (9,52%) пацієнток виявлено підвищену експресію у залозах; в 1 (2,38%) – у залозах і стромі. Підвищення імунореактивності РП у залозах виявили у 4 (9,52%) пацієнток; у стромі – у 3 (7,14%), що вірогідно частіше, ніж РЕ-α (p<0,05); в 1 (2,38%) пацієнтки спостерігалось підвищення імунореактивності РП у залозах і стромі. Підвищення імунореактивності РП та РЕ-α характерно для низької концентрації рівня прогестерону сироватки крові, недостатності лютеїнової фази та є фоном для розвитку гіперпластичних процесів ендометрія.

У 6 (14,29%) пацієнток було тотальне зниження імунореактивності важкого ступеня РЕ-α та РП у залозах та стромі. За даними наукових публікацій, така картина характерна для пацієнток з тривалим хронічним ендометритом чи травмами ендометрія в анамнезі.

Був проведений аналіз особливостей імунореактивності рецепторів статевих гормонів у жінок з різною морфологічною картиною ендометрія).

Під час аналізу даних, наведених у табл. 2, імунореактивність РЕ-α і РП у групі жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі та наявністю ендометрія, що не відповідає фазі циклу, IRS РЕ-α у залозах становила 83,95±7,68 ум.од., РП – 129,75±7,87 ум.од., у стромі – 97,85±3,25 ум.од. та 101,65±4,74 ум.од. відповідно.

Таблиця 1

Особливості морфологічної будови ендометрія залежно від імунореактивності стероїдних рецепторів в ендометрії жінок у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу

Показники морфологічної будови	КГ, n=18		ОГ, n=42			
	Висока рецептивність (n=18, 100%)		Висока рецептивність (n=8, 19,05%)		Тотальне зниження рецептивності (n=6, 14,29%)	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Ендометрій, що не відповідає фазі циклу	1	5,56	1	12,50*	2	33,33*
ПНГЕ	1	5,56	2	25,00*	1	16,67*
Поліп ендометрія	0	0,00	1	12,50*	0	0
Хронічний ендометрит	0	0,00	2	25,00*	1	50,00*
Ендометрій нормальної структури у середній стадії секреції	16	88,89%	2	25,00*	0	0,00*
Поєднання патології (поліп ендометрія + хронічний ендометрит)	0	0,00	0	0,00	2	

Примітка. * – Різниця вірогідна з аналогічним показником КГ (p<0,05).

Імунореактивність рецепторів естрогенів- α і прогестерону в ендометрії жінок у ЛГ+6 – ЛГ+11 дні менструального циклу та морфологічна структура ендометрія

Морфологічна характеристика ендометрія	IRS PE- α		IRS PP	
	Залози	Строма	Залози	Строма
<i>Контрольна група, n=18</i>				
Ендометрій у середній стадії секреції (n=16)	47,35 \pm 0,91	62,91 \pm 1,90	81,95 \pm 2,25	151,85 \pm 2,53
ПНГЕ (n=1)	53,92 \pm 1,91	51,45 \pm 2,90	91,56 \pm 5,41	121,65 \pm 9,63
Ендометрій, що не відповідає фазі циклу (n=1)	51,90 \pm 1,43	71,24 \pm 0,91	94,73 \pm 4,86	109,30 \pm 6,51
<i>Група жінок з безплідністю, n=42</i>				
Ендометрій, що не відповідає фазі циклу (n=6)	83,95 \pm 7,68*	97,85 \pm 3,25*	129,75 \pm 7,87*	101,65 \pm 4,74*
ПНГЕ (n=11)	64,75 \pm 9,85*	45,76 \pm 8,45*	70,01 \pm 6,84*	85,96 \pm 9,24*
Поліп ендометрія (n=2)	83,75 \pm 10,91*	75,69 \pm 10,39*	88,34 \pm 11,56*	90,25 \pm 7,95*
Хронічний ендометрит (n=2)	69,75 \pm 6,15*	52,95 \pm 5,93*	67,93 \pm 7,02*	67,97 \pm 6,93*
Ендометрій у середній стадії секреції (n=13)	45,91 \pm 4,89	64,45 \pm 5,17	80,17 \pm 1,53*	109,85 \pm 7,18*
Хронічний ендометрит + поліп ендометрія (n=4)	76,34 \pm 9,23*	71,23 \pm 9,45*	80,12 \pm 3,24*	84,23 \pm 6,76*
ПНГЕ + ендометрій, що не відповідає фазі циклу (n=4)	72,33 \pm 7,24*	54,23 \pm 4,23*	103,23 \pm 10,64*	101,23 \pm 9,34*

Примітка. * – Різниця вірогідна з аналогічним показником КГ ($p < 0,05$).

При ПНГЕ у залозах IRS PE- α становив 64,75 \pm 9,85 ум.од., PP – 70,01 \pm 6,84 ум.од., у стромі – 45,76 \pm 8,45 ум.од. та 85,96 \pm 9,24 ум.од. відповідно. При поліпі ендометрія у залозах IRS PE- α становив 83,75 \pm 10,91 ум.од., PP – 88,34 \pm 11,56 ум.од., у стромі – 75,69 \pm 10,39 ум.од. та 90,25 \pm 7,95 ум.од. відповідно. При хронічному ендометриті у залозах IRS PE- α становив 69,75 \pm 6,15 ум.од., PP – 67,93 \pm 7,02 ум.од., у стромі – 52,95 \pm 5,93 ум.од. та 67,97 \pm 6,93 ум.од. відповідно. При ендометрії секреторного типу у залозах IRS PE- α становив 45,91 \pm 4,89 ум.од., PP – 80,17 \pm 1,53 ум.од., у стромі – 64,45 \pm 5,17 ум.од. та 109,85 \pm 7,18 ум.од. відповідно.

Отримані результати імунореактивності PE- α і PP у залозах і стромі ендометрія у жінок з безплідністю достовірно відрізняються від аналогічних показників групи контролю.

У 8 жінок ОГ виявлено високу експресію стероїдних ре-

цепторів (див. табл. 1). Ендометрій нормальної структури, що відповідає дню менструального циклу, виявлено лише у 2 поміж них.

ВИСНОВКИ

Очевидно, що зміна імунореактивності рецепторів естрогенів- α і прогестерону відіграє важливу роль у формуванні невдач імплантації у жінок з невдалими спробами запліднення *in vitro* в анамнезі.

Перспективи подальшого дослідження. Отримані дані підтверджують гіпотезу множинних факторів регуляції розвитку ендометрія у природних циклах та циклах ДРТ. Висока частота структурно-функціональної неповноцінності ендометрія є показанням для поглибленого дослідження та корекції стану ендометрія перед плануванням вагітності.

Особенности экспрессии ядерных стероидных рецепторов в эндометрии у женщин с неудачными попытками оплодотворения *in vitro* в анамнезе Н.В. Коцабин, ОА.М. Макарчук

Структурная и функциональная зрелость эндометрия формируется в условиях динамических колебаний уровня стероидных гормонов яичников – эстрогенов и прогестерона во время менструального цикла.

Цель исследования: определение реактивности ядерных рецепторов эстрогенов- α (ЯРЭ) и прогестерона (ЯРП) в строме и железах эндометрия в ЛГ+6 – ЛГ+11 дни менструального цикла у женщин с неудачными попытками оплодотворения *in vitro* в анамнезе.

Материалы и методы. Для изучения реактивности ЯРЭ и ЯРП в эндометрии образцы были получены во время гистероскопии у 42 пациенток с бесплодием (основная группа) в ЛГ+6 – ЛГ+11 дни менструального цикла. В контрольную группу (КГ) вошли 18 здоровых женщин, которые имели, по крайней мере, одну физиологическую беременность, закончившуюся рождением здорового ребенка. Реактивность эндометрия к половым гормонам изучали иммунопероксидазным методом с использованием мышиных МКА к рецепторам эстрогенов- α (РЭ- α) (клон ID5, «ДАКО», Дания) и рецепторов к прогестерону (РП) (клон А6, «ДАКО», Дания). Интенсивность окраски оценивали по трехбальной системе. Уровень экспрессии РЭ- α и РП устанавливали с помощью расчета полуколичественного индекса: $IRS = SI \times PP$, где IRS – индекс иммунореактивности; SI – оптическая интенсивность окрашиваемости; PP – процент позитивно окрашенных ядер.

Результаты. У женщин с неудачными попытками оплодотворе-

ния *in vitro* в анамнезе нормальная иммунореактивность РЭ- α и РП отмечена в 8 (19,05%) случаях, тотальное снижение иммунореактивности (средней и тяжелой степени) РЭ- α и РП в железах и строме наблюдалось у 6 (14,29%) пациенток. У всех женщин КГ был установлен нормальный уровень иммунореактивности РЭ- α и РП. Заслуживает внимания наличие сочетанной патологии. Так, в 4 из 6 случаев полип эндометрия возник на фоне хронического эндометрита. У 4 женщин с простой гиперплазией эндометрия без атипичии было диагностировано очаговое неполноценное отторжение эндометрия в предыдущем цикле и несоответствие структуры эндометрия фазе цикла. В группе женщин с бесплодием высокая реактивность рецепторов была в только в 8 (19,05%) биоптатах. Отклонения морфологического строения эндометрия в этой подгруппе наблюдалось достоверно чаще, чем в КГ: несоответствие фазе цикла обнаруживали в 12,50% случаев, ПНГЭ – в 55,00%, полип эндометрия – в 12,50%, хронический эндометрит – в 25,00%.

Заключение. Изменение иммунореактивности рецепторов эстрогенов- α и прогестерона играет важную роль в формировании неудач имплантации у женщин с неудачными попытками оплодотворения *in vitro* в анамнезе. Полученные данные подтверждают гипотезу множественных факторов регуляции развития эндометрия в естественных циклах и циклах ВРТ. Высокая частота структурно-функциональной неполноценности эндометрия является показанием для углубленного исследования и коррекции состояния эндометрия перед планированием беременности.

Ключевые слов: бесплодие, неудачные попытки, оплодотворение *in vitro*, иммунореактивность, рецепторы эстрогенов- α , рецепторы прогестерона.

Features of the nuclear steroid receptors expression in endometrium of women with failed in vitro attempts in history
N.V. Kotsabyn, O.M. Makarchuk

Structural and functional maturity of the endometrium is formed in a condition of dynamic fluctuations of ovarian steroid hormones – estrogens and progesterone during the menstrual cycle.

The objective: of the research was to determine the reactivity of estrogen core receptors- α and progesterone core receptors in endometrial stroma and glands.

Patients and methods. Endometrial samples were obtained during hysteroscopy in 42 patients with infertility on day LH + 6 – LH + 11 of the menstrual cycle. The control group (CG) consisted of 18 healthy women who had at least one physiological pregnancy that resulted in the birth of a healthy child. Receptivity of the endometrium to the hormones was studied by immunoperoxidase method using mouse MABs for estrogen receptors- α (ER- α) (clone ID5, «DAKO», Denmark) and progesterone receptor (RP) (clone A6, «DAKO», Denmark). The color intensity was assessed by tree-point system. The expression level of ER- α and RP were set by calculating semiquantitative index: $IRS = SI \times PP$, where IRS – immunoreactivity index; SI – optical intensity staining; PP – the percentage of positively stained nuclei.

Results. Normal ER- α and RP immunoreactivity was observed in 8 (19,05%) women with failed in vitro fertilization attempts in history, total reduction of ER- α and RP immunoreactivity (medium and

severe) in glands and stroma was observed in 6 (14,29%) of infertile patients. Normal levels of ER- α and RP immunoreactivity were observed among KG women. Noteworthy is the presence of comorbidity. So in 4 of the six cases of endometrial polyp appeared on the background of chronic endometritis. In 4 women diagnosed with simple hyperplasia without atypia the defective rejection of the endometrium from the previous cycle and the incompatibility of endometrium structure to the day of cycle were found. In the group of infertile women high reactivity of receptors was observed only in 8 (19,05%) biopsies. Deviation of the morphological structure of the endometrium in this subgroup was observed significantly more often than in KG: incompatibility of morphological endometrial structure to the day of menstrual cycle was found in 12,50% of cases, simple hyperplasia without atypia – of 55,00%, endometrial polyp – 12,50%, chronic endometritis – 25,00%.

Conclusions. The change of immunoreactivity of estrogen receptor- α and progesterone plays an important role in the formation of implantation failure in women with unsuccessful in vitro fertilization attempts. The obtained data confirm the hypothesis of multiple factors of development regulation of the endometrium in natural cycles and in IVF cycles. High frequency of structural and functional inferiority of the endometrium is the indication for in-depth study. Correction of the endometrial condition need to be done before pregnancy.

Key words: infertility, failed in vitro fertilization attempt, immunoreactivity, receptors estrogen- α , progesterone receptors.

Сведения об авторах

Макарчук Оксана Михайловна – Кафедра акушерства и гинекологии НИИ ПО Ивано-Франковского национального медицинского университета, 76000, г. Ивано-Франковск, ул. Галицкая, 2; тел.: (0342) 55-31-65

Козабин Наталия Владимировна – Кафедра акушерства и гинекологии НИИ ПО Ивано-Франковского национального медицинского университета, 76000, г. Ивано-Франковск, ул. Галицкая, 2; тел.: (0342) 55-31-65

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гюльмамедова І.Д. Сучасні погляди на діагностику та корекцію імплантаційної рецептивності ендометрія (огляд літератури) / І.Д. Гюльмамедова, О.С. Доценко, І.В. Савченко, О.А. Гюльмамедова // Тавричеський медико-біологічний вестник. – 2013. – Т. 16, № 2 (2). – С. 169–175.
2. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе / Левишвили М.М., Демура Т.А., Мишиева Н.Г., Файзуллина Н.М., Назаренко Т.А., Коган Е.А. // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 4/1. – С. 65–69.
3. Choby B.A. Endometrial biopsy. Gynecology and Female Reproductive System Procedures, 2015.
4. Li T.C. Evidence-based management of the couple with recurrent implantation failure / T.C. Li // ESHRE. – 2012. – O-088.
5. Macklon N. Laboratory: The embryo-endometrial interface – role in implantation/developmental success / N. Macklon // The contribution of the endometrium University of Southampton, Academic Unit of Human Health and Development Mailpoint. European Society of Human Reproduction and Embryology: 29th Annual Meeting. Paramedical invited session. – London, United Kingdom, 7–10 July 2013.

Статья поступила в редакцию 23.11.16