

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПИНОПОДИЙ В ЭНДОМЕТРИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ В НЕМ ХРОНИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ГИПЕРПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ У ЖЕНЩИН ХОРОШИХ ОТВЕТЧИКОВ С НЕУДАЧНЫМИ ПОПЫТКАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (ВРТ) В АНАМНЕЗЕ

Носенко Е.Н.¹, Саенко А.И.², Парницкая О.И.³, Головатюк Е.П.⁴

¹ Университетская клиника «Центр восстановительной и реконструктивной медицины» Одесского национального медицинского университета, Одесса, e-mail: nosenko.olena@gmail.com)

²Украинско-французский центр репродуктивных функций «Сем+я», Донецк, e-mail: semya-lab@skif.ua

³ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМНУ», Киев, e-mail: ipag@ukr.net

⁴ООО «Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета», Одесса, e-mail: info@gameta.od.ua

Целью работы стал анализ особенностей формирования пиноподий в эндометрии женщин хороших ответчиков с неудачными попытками ВРТ в анамнезе в зависимости от наличия в нем таких патологических процессов, как хроническое воспаление и гиперплазия, в день предполагаемого окна имплантации. Обследовано 140 пациенток хороших ответчиков, уже перенесших лечение бесплодия в программах ВРТ и имевших неудачные имплантации и 30 условно здоровых женщин контрольной группы. Всем пациенткам, включенным в исследование, на 22-й день менструального цикла проводили гистероскопию с забором ткани эндометрия. Оценивали состояние пиноподий в поверхностном эпителии эндометрия методом сканирующей электронной микроскопии. Выявлено, что формирование пиноподий в день предполагаемого окна имплантации в эндометрии женщин хороших ответчиков с неудачными попытками ВРТ в анамнезе зависит от наличия в нем таких патологических процессов, как хроническое воспаление и гиперпролиферация, но, даже при их отсутствии отличается от такового у здоровых фертильных женщин. Общими отличительными чертами является снижение количества развитых пиноподий, повышение численности развивающихся пиноподий; частое наличие участков отсутствия пиноподий; мозаицизм их размеров, формы и стадии развития; от одной четверти до одной трети пациенток имеют обильные короткие, толстые микроворсинки, более половины - их умеренное число, и лишь каждая пятая - малое количество; характерным является появление цилиарных клеток, наиболее выраженное при гиперпластических процессах эндометрия. Вследствие этого пациентки-хорошие ответчики при хронической имплантационной недостаточности в циклах ВРТ требуют проведения предпрограммной подготовки с целью коррекции рецептивности эндометрия.

Ключевые слова: бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, рецептивность эндометрия, пиноподии, хронический эндометрит, гиперплазия эндометрия

THE PARTICULARITIES OF PINOPODES FORMATION IN ENDOMETRIUM DEPENDING ON AVAILABILITY OF CHRONIC INFLAMMATORY AND HYPERPROLIFERATIVE PROCESSES IN HIM IN WOMEN GOOD RESPONDERS WITH UNSUCCESSFUL ATTEMPTS OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY (ART) IN ANAMNESIS

Nosenko E.N.¹, Saenko A.I.², Parnitskaya O.I.³, Golovatyuk E.P.⁴

¹ University Hospital "Center for Restorative and Reconstructive Medicine" of Odessa National Medical University, Odessa, e-mail: nosenko.olena@gmail.com

²Ukrainian-French Centre of reproductive functions "Semya", Donetsk, e-mail: semya-lab@skif.ua

³SI "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of NAMSU", Kiev, e-mail: ipag@ukr.net

⁴ Limited Liability Company "Medical Center of Reproductive Health "Gamete", Odessa, e-mail: info@gameta.od.ua

We have done the analysis of the particularities of pinopodes formation in the endometrium of women good responders with unsuccessful attempts ART anamnesis, depending on the presence of pathological processes in endometrium such as chronic inflammation and hyperplasia, on the day of the implantation window. The study involved 140 patients of good responders who treat infertility in ART programs and have failed implantation, and 30 apparently healthy women of the control group. All patients, included in the study, on the 22th day of the menstrual cycle was carried out hysteroscopy with an endometrial tissue fence. The state of pinopodes in the surface epithelium of the endometrium was investigated by scanning electron microscopy. It was revealed that the pinopodes formation on the day of the implantation window in the endometrium of women with good responders with unsuccessful attempts ART history depends on the presence of such pathological processes such

as chronic inflammation and hyperproliferation, but even in their absence is different from that in healthy fertile women. Common features were: a reduction in the amount of developed pinopodes, increasing numbers of developing pinopodes; the frequent presence of areas without pinopodes; variegation of their size, shape, and stage of development; one-quarter to one-third of patients have abundant short, thick microvilli, more than half - of their moderate number, and only one in five - a small number; characteristic is the appearance of ciliary cells, most pronounced when endometrial hyperplastic processes. Consequently, this patients good responders with chronic implant failure in ART cycles require preparation for correction of endometrial receptivity before ART.

Keywords: infertility, assisted reproductive technologies, receptivity of the endometrium, pinopodes, chronic endometritis, endometrial hyperplasia

Бесплодие остается одной из важнейших медицинских и социальных проблем. Все большее распространение получает метод лечения бесплодия путем ВРТ [10]. Однако не всегда попытки ВРТ являются успешными. Так их эффективность их в Украине составляет в среднем 33,53% на цикл, во Франции - 27,5%, в Бельгии - 26,7%, Великобритании - 30,3% [1, 3]. Низкая частота наступления беременности в циклах ВРТ, является одним из сложных вопросов, которые широко изучается. Считается, что низкий уровень имплантация у хороших ответчиков наблюдается частично вследствие применения препаратов для контролируемой овариальной стимуляции (КОС), частично из-за отсутствия синхронности между созреванием эндометрия и развитием бластоцист, а также снижением рецептивности эндометрия [2, 5].

В эндометрии женщины наблюдаются две фазы, которые идентифицируются морфологически: пролиферация и секреция. Одновременно с этим в фазу секреции эндометрий может находиться в разных состояниях применительно к восприимчивости яйцеклетки, которые включают нейтральную, рецептивную, нерецептивную или рефрактерную фазу.

Рецептивность эндометрия (от англ. receptivity – восприимчивость) – способность эндометрия принять внедряющуюся бластоцисту. На моделях животных было показано, что имплантация происходит только тогда, когда эндометрий достигает рецептивной фазы. Эта фаза достаточно короткая и должна совпадать с развитием эмбриона до стадии бластоцисты, определяя, таким образом, короткий интервал времени, когда возможна имплантация. Период, в течение которого эндометрий остаётся рецептивным для nidации эмбриона, получил название окна имплантации. Наблюдается оно в естественном менструальном цикле на 6-10-й день после овуляции, что соответствует 20-24-му дню менструального цикла, и у каждой женщины хронологически индивидуально [2, 9].

Активизация окна имплантации характеризуется значительными ультраструктурными изменениями эндометриальных эпителиальных клеток. В этот период плазматические мембраны просветного эпителия эндометрия теряют микроворсинки и апикальные поверхности клеток формируют куполоподобные выпячивания – пиноподии. При использовании сканирующей

электронной микроскопии (СЭМ), пиноподии определяются в 78% биопсий эндометрия на 6-й постовуляторный день у женщин с регулярными менструальными циклами [7].

Пиноподии в своём развитии проходят три стадии: развивающиеся, развитые и регрессирующие [2].

Развивающиеся пиноподии появляются с началом окна имплантации и представляют собой эктоплазматические протрузии (выпячивания) поверхностных эндометриальных эпителиальных клеток, сочетающиеся с уменьшением числа коротких, толстых микроворсинок.

Развитые пиноподии – выпячивания достигают своей максимальной величины и образуют складки, напоминая цветы или грибы, количество коротких, толстых микроворсинок резко уменьшается, в большинстве случаев или микроворсинки полностью исчезают. Эта стадия длится менее 48 часов.

Регрессирующие пиноподии – выпячивания поверхностных эндометриальных эпителиальных клеток уменьшаются, появляются разрывы апикальных поверхностей клеток и они начинают принимать бокаловидную форму; на поверхности мембран поверхностных эндометриальных сморщивающихся клеток вновь появляются кончики коротких, толстых микроворсинок.

Адекватное морфофункциональное состояние эндометрия является одним из основных факторов, обеспечивающих успешную имплантацию оплодотворённой яйцеклетки и развитие эмбриона. Различные патоморфологические изменения эндометрия (в частности, гиперплазия, эндометрит, десинхронизация процессов дифференцировки эндометрия, неполноценная секреторная трансформация и прочие) могут привести к нарушениям рецептивности, дефектам имплантации, бесплодию или ранней потере беременности [6, 8].

Поэтому целью работы стал анализ особенностей формирования пиноподий в эндометрии женщин хороших ответчиков с неудачными попытками в анамнезе ВРТ в зависимости от наличия в нем таких патологических процессов, как хроническое воспаление и гиперплазия, в день предполагаемого окна имплантации.

Материал и методы

Проведено комплексное обследование 946 семейных пар, нуждающихся в проведении лечения методами ВРТ. Для исследования отобрано 140 пациенток хороших ответчиков, уже перенесших лечение бесплодия в программах ВРТ и имевших неудачные имплантации.

Критериями включения в исследование были следующие: бесплодие; возраст до 40 лет; нормальный овариальный резерв; неудачные имплантации при хорошей ответе в цикле КОС в программе ВРТ; нормальный овариальный резерв (количество антральных фолликулов более 5-7, АМГ более 1,1 нг/мл, базальный уровень ФСГ в раннюю

фолликулиновую фазу не более 10 мМЕ/мл).

Из исследования были исключены плохие ответчики по Болонским критериям (возраст женщины ≥ 40 лет или любой другой фактор плохого ответа; плохой ответ на КОС в анамнезе (≤ 3 ооцитов при применении стандартного протокола КОС); снижение показателей овариального резерва (количество антральных фолликулов не более 5-7, АМГ до 1,1 нг/мл, базальный уровень ФСГ в раннюю фолликулиновую фазу более 10 мМЕ/мл)) [4]; женщины с известной иммунологической недостаточностью (наличием антифосфолипидных антител, волчаночного антикоагулянта, антикардиолипидных антител); наличие маточных аномалий (миома, полипы, маточная перегородка); эндометриоз, сахарный диабет и другая эндокринная патология; наличие менее двух эмбрионов, доступных для переноса; толщина эндометрия < 8 мм до переноса эмбрионов; выбытие из-под наблюдения.

Группу I составили 64 пациентки с хроническим эндометритом; группу II – 44 женщины с гиперплазией эндометрия; группу III - 32 пациентки без гиперпластических и воспалительных процессов в эндометрии.

Контрольную группу К составили 30 женщин репродуктивного возраста, имевших роды в анамнезе готовившихся к циклу суррогатного материнства.

Всем пациенткам, включенным в исследование, на 22-й день менструального цикла проводили гистероскопию с забором ткани эндометрия.

Полученные образцы эндометрия помещали в нейтральный забуференный 10% раствор формалина (рН 7,4) и фиксировали в течение 24 часов. После дегидратации кусочки заливали в парафин по стандартной методике. На ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS («Carl Zeiss», Германия) изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике, оценивали морффункциональное состояние эндометрия с помощью световой микроскопии, а также изучали состояние пиноподий в поверхностном эпителии методом СЭМ. Образцы эндометрия погружали в 2,5% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере и выдерживали так 24 часа, затем они фиксировались в 4% растворе осмия на фосфатном буфере, дегидратированном раствором ацетона на дистиллированной воде в возрастающих концентрациях (от 20% до 100%), высушивали в углекислом газе, покрывали золотом (150-200 А). СЭМ проводилась на микроскопе «JEOL Super probe 733» с увеличением $\times 2000$.

Полученные результаты статистически обрабатывали при помощи программы EXCEL.

Результаты и их обсуждение

Возраст обследованных женщин с бесплодием варьировал от 25 до 39 лет и в среднем составил $33,91 \pm 0,39$ года, в контрольной группе – $34,13 \pm 0,87$, между группами достоверно не отличался. Группы были однородными по антрометрическим характеристикам, данным гинекологического, соматического, репродуктивного и инфекционного анамнеза.

Средняя продолжительность бесплодия в группе ДРТ составила $5,07 \pm 0,31$ лет и не имела достоверных различий между группами. По поводу бесплодия пациентки группы ДРТ имели в анамнезе от 1 до 3 попыток, в среднем $-1,89 \pm 0,04$.

Таблица 1

Распределение пиноподий в эндометрии исследуемых женщин в день предполагаемого окна имплантации в зависимости от наличия патологических процессов в эндометрии, n ($P \pm p, \%$)

Группа	Развивающиеся пиноподии	Развитые пиноподии	Регрессирующие пиноподии	Наличие участков отсутствия пиноподий	Наличие пиноподий различной формы	Наличие пиноподий разных размеров
I (n=64)	14($21,88 \pm 0,59$) ^{к,2}	35($54,69 \pm 0,92$) ^{к,2}	15($23,44 \pm 0,61$)	34($53,13 \pm 0,92$) ^к	58($90,63 \pm 1,19$) ^{к,3}	58($90,63 \pm 1,19$) ^{к,3}
II (n=44)	26($59,09 \pm 1,17$) ^{к,1,3}	11($25,00 \pm 0,76$) ^{к,1,3}	7($15,91 \pm 0,65$) ^к	24($54,55 \pm 1,12$) ^к	36($81,82 \pm 1,37$) ^{к,3}	40($90,91 \pm 1,45$) ^{к,3}
III (n=32)	10($31,25 \pm 1,00$) ^{к,2}	15($46,88 \pm 1,23$) ^{к,2}	7($21,88 \pm 0,84$)	17($53,13 \pm 1,31$) ^к	17($53,13 \pm 1,31$) ^{к,1,2}	21($65,63 \pm 1,45$) ^{к,1,2}
K (n=30)	0($0,00 \pm 0,00$)	27($90,00 \pm 1,75$)	3($10,00 \pm 0,59$)	0($0,00 \pm 0,00$)	0($0,00 \pm 0,00$)	0($0,00 \pm 0,00$)

Примечание. ^{к, 1, 2, 3} – вероятно статистическая разница с показателями группы K, I, II, III, $p < 0,05$.

Как видно из табл. 1, у 54,69% женщин с хроническим эндометритом пиноподии в день предполагаемого окна имплантации были развитыми; у 21,88% - развивающимися и у 23,44% - регрессирующими. У 53,13% пациенток наблюдались участки отсутствия пиноподий. Пиноподии были различными по форме (90,63%) и размерам (90,63%) у подавляющего числа пациенток (рис. 1). Более половины женщин (56,25%) имели умеренное количество микроворсинок на поверхностном просветном маточном эпителии, 26,56% - их обилие, 18,75% – малое количество (табл. 2).

Таблица 2

Количественное распределение микроворсинок в эндометрии женщин в день предполагаемого окна имплантации в зависимости от наличия в нем патологических процессов, n($P \pm p, \%$)

Группа	Обилие	Умеренное количество	Малое количество
I (n=64)	17($26,56 \pm 0,65$) ^к	36($56,25 \pm 0,94$) ^к	12($18,75 \pm 0,55$) ^к

II (n=44)	13(29,55±0,83) ^к	22(50,00±1,08) ^к	13(29,55±0,83) ^к
III (n=32)	12(37,50±1,10) ^к	15(46,88±1,23) ^к	7(21,88±0,84) ^к
К (n=30)	0(0,00±0,00)	3(10,00±0,59)	27(90,00±1,75)

Примечания: 1. ^к – достоверное отличие с группой К (p<0,05);

2. У одной пациентки могли встречаться участки с разным количеством микроворсинок.

У пациенток с хроническим эндометритом число случаев наличия в эндометрии развитых пиноподий было в 2,19 раза больше (p<0,01), чем у женщин с гиперпластическими процессами эндометрия, однако развивающиеся пиноподии встречались в 2,70 раза реже (p<0,01). У женщин с хроническим эндометритом по сравнению с пациентками без воспалительных и гиперпролиферативных процессов в эндометрии отмечалось большее число случаев наличия пиноподий различной формы и размеров - соответственно в 1,71 (p<0,01) и в 1,38 (p<0,01) раза.

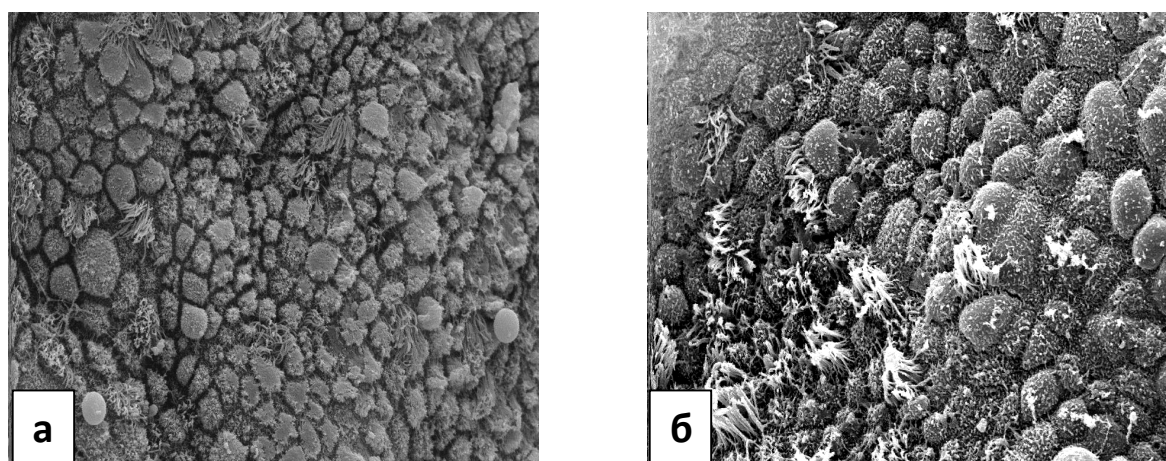


Рис. 1. Пиноподии на 22-й день МЦ у пациенток с хроническим эндометритом: мозаицизм формы, размеров, стадии развития пиноподий; множество коротких толстых микроворсинок; а - подавляющее количество развивающихся пиноподий, единичные развитые пиноподии; б - подавляющее количество развитых пиноподий, но разных размеров, многочисленные цилиарные клетки. СЭМ. x2000. Шкала баров = 5 мкм.

Как видно из табл. 2, только у 25,00% женщин с гиперпролиферативными процессами в эндометрии пиноподии в день предполагаемого окна имплантации были развитыми; у 59,09% - развивающимися и у 15,91% - регрессирующими. У 54,55% женщин регистрировались участки отсутствия пиноподий. Мозаицизм формы (81,82%) и размеров (90,91%) наблюдался у подавляющего числа пациенток (рис. 2). Практически у всех женщин наблюдались цилиарные клетки, при этом более чем в половине случаев они были

многочисленными. 50,00% женщин имели умеренное количество микроворсинок на поверхностном просветном маточном эпителии, 29,55% - их обилие, 29,55% - малое количество (см. табл. 2).

У пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия число случаев наличия в эндометрии развитых пиноподий было меньше, чем у женщин без воспалительных и гиперпролиферативных процессов в эндометрии в 1,88 раза ($p < 0,01$), а развивающихся пиноподий - в 1,89 раза больше ($p < 0,01$). У женщин с гиперпластическими процессами эндометрия по сравнению с пациентками без воспалительных и гиперпролиферативных процессов в эндометрии, чаще встречались пиноподии различной формы и размеров - соответственно в 1,54 ($p < 0,01$) и в 1,39 ($p < 0,01$) раза.

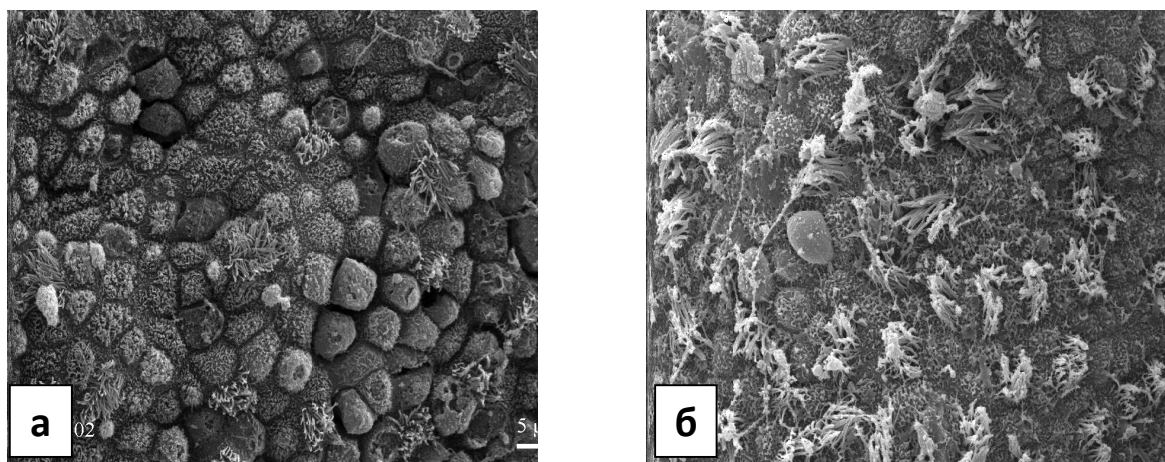


Рис. 2. Пиноподии на 22-й день МЦ у пациентки с неудачными попытками ВРТ в анамнезе и явлениями гиперплазии эндометрия: а - мозаицизм наличия, стадии развития, формы и размеров пиноподий, множество коротких, толстых микроворсинок, появление цилиарных клеток; б - большое количество мелких пиноподий, поверхность которых покрыта короткими, толстыми, густыми микроворсинками, неравномерно расположенные многочисленные цилиарные клетки. СЭМ. $\times 2000$. Шкала баров = 5 мкм.

Бесплодные пациентки хорошие ответчики с неудачными попытками ВРТ в анамнезе без хронических и воспалительных процессов в эндометрии, хотя и не имели перечисленной патологии, но достоверно отличались от женщин группы К по характеру формирования пиноподий (рис. 3): развитых пиноподий было в 1,92 раза меньше ($p < 0,01$), чем у женщин контроля; развивающиеся наблюдались у 31,25% пациенток, тогда как в контроле таких не встречалось ($p < 0,01$). У 53,13% женщин наблюдались участки отсутствия пиноподий. Пиноподии были разными по форме у 53,13 женщин и по размерам - у 65,63%. В контрольной группе участки отсутствия пиноподий, варибельность формы и размеров пиноподий практически отсутствовали. Около половины женщин без хронических и

воспалительных процессов в эндометрии (46,88%) имели умеренное количество микроворсинок на поверхностном просветном маточном эпителии, 37,50% - их обилие, 21,88% – малое количество (см. табл. 2).

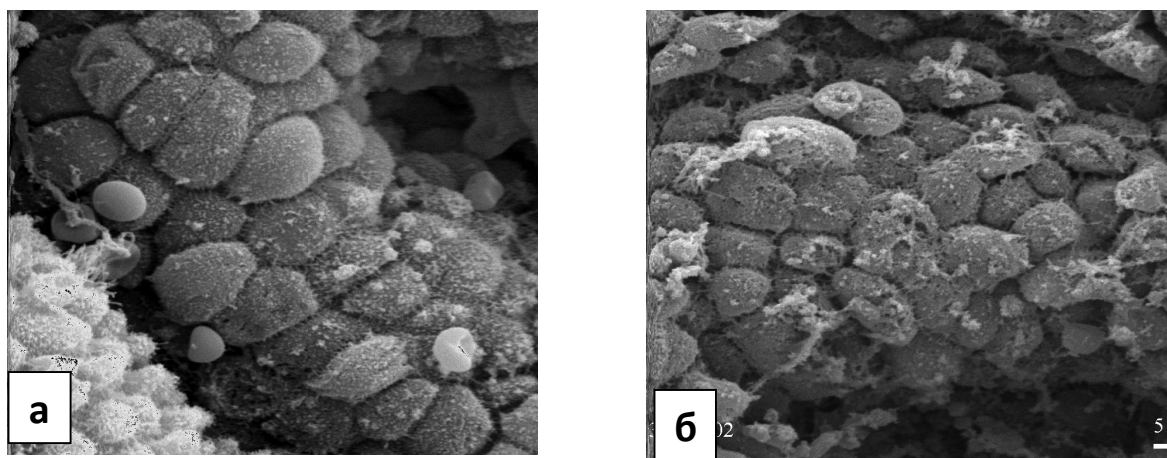


Рис. 3. Пиноподии на 22-й день МЦ у пациентки с неудачными попытками ВРТ в анамнезе без гиперпластических и воспалительных процессов в эндометрии: а - поля с большим количеством развитых пиноподий различной формы, с умеренным количеством микроворсинок; б - поля развивающихся пиноподий вокруг устьев желез различных размеров и формы, с умеренным количеством микроворсинок. СЭМ. x2000. Шкала баров = 5 мкм.

Выводы

Формирование пиноподий в день предполагаемого окна имплантации в эндометрии женщин хороших ответчиков с неудачными попытками ВРТ в анамнезе зависит от наличия в нем таких патологических процессов, как хроническое воспаление и гиперпролиферация, но, даже при их отсутствии отличается от такового у здоровых фертильных женщин. Общими отличительными чертами является снижение количества развитых пиноподий, повышение численности развивающихся пиноподий; частое наличие участков отсутствия пиноподий; мозаицизм их размеров, формы и стадии развития; от одной четверти до одной трети пациенток имеют обильные короткие, толстые микроворсинки, более половины - их умеренное число, и лишь каждая пятая - малое количество; характерным является появление цилиарных клеток, наиболее выраженное при гиперпластических процессах эндометрия. Вследствие этого пациентки-хорошие ответчики при хронической имплантационной недостаточности в циклах ВРТ требуют проведения предпрограммной підготовки с целью коррекции рецептивности эндометрия.

Список литературы

1. Гюльмамедова И.Д. Дифференцированный подход к диагностике и лечению бесплодного брака с применением вспомогательных репродуктивных технологий: Автореф. дис. д-ра. мед. наук. – Донецк, 2009. – 41 с.
2. Рецептивность эндометрия у пациенток с бесплодием: монография / [Под общей ред. В.К. Чайки, А.В. Чайки, Е.Н. Носенко]. Донецк: Изд-во «Ноулидж», 2011. – 243 с.
3. Tarín J.J., García-Pérez M.A., Cano A. Assisted reproductive technology results: why are live-birth percentages so low? // *Mol. Reprod. Dev.* – 2014. – Vol. 81, № 7. – P. 568-583. doi: 10.1002/mrd.22340.
4. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / [Ferraretti A.P., La Marca A., Fauser B.C. et al.] / ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, № 7. – P.1616-1624. doi: 10.1093/humrep/der092.
5. Expression of hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium / Narkar M., Kholkute S., Chitlange S., Nandedkar T. // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 246. – P.107–113.
6. Molecular and morphological aspects of endometrial receptivity disorders at chronic endometritis / Kogan E.A., Demura T.A., Vodianoï Via., Shurshalina A.V. // *Arkh. Patol.* – 2012. – Vol. 74, № 3. – P.15-17.
7. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice // *Human Reproduction.* – 1999. – Vol. 14, Suppl. 2. – P.99-106.
8. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- β 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss / [Xu B., Sun X., Li L. et al.] // *Fertil. Steril.* – 2012. – Vol. 98, № 2. – P. 389-395. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.032.
9. Sudoma I. Optimization of cryocycles by using pinopode detection in patients with multiple implantation failure: preliminary report / Sudoma I., Goncharova Y., Zukin V. // *Reproductive BioMedicine Online.* – 2011. – Vol. 22. – P.590- 596.
10. Ultrastructural and morphometrical study of preimplantation endometrium in superovulated mice treated with progesterone or Sildenafil / [Roshangar L., Soleimani-Rad J., Rashedee B. et al.] // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11, № 10. – P.807-814.

Рецензенты:

Ермоленко Т.А, д.м.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 2, Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса;

Рожковская Н.Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1,
Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса.