

УДК 618.177-089.888.11-06-071.1:618.14-07

© Е. Н. Носенко, А. И. Саенко, И. Г. Постолук, 2012.

## ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С НЕУДАЧНЫМИ ПОПЫТКАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В АНАМНЕЗЕ

**Е. Н. Носенко, А. И. Саенко, И. Г. Постолук**

*Научно-исследовательский институт медицинских проблем семьи (директор – профессор А. В. Чайка), Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк.*

### THE IMMUNE REACTIVITY OF ENDOMETRIUM IN PATIENTS WITH FAILURE TO ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES IN HISTORY

O. M. Nosenko, A. I. Saenko, I. G. Postoluk

#### SUMMARY

The article presents the results of studies of the immune reactivity of endometrium in infertile women with unsuccessful attempts to assisted reproductive technologies in anamnesis. Authors conclude, that due to variations in the content of uterine natural killer in the endometrium should conduct an individual assessment of the immune status of the endometrium in preparation of women with infertility to pregnancy in order to optimize its pharmacological therapy.

### ІМУННА РЕАКТИВНІСТЬ ЕНДОМЕТРІЯ У ПАЦІЄНТОК З НЕВДАЛИМИ СПРОБАМИ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ В АНАМНЕЗІ

О. М. Носенко, А. І. Саенко, І. Г. Постолук

#### РЕЗЮМЕ

У статті представлено результати вивчення імунної реактивності ендометрія у безплідних жінок з невдалими спробами допоміжних репродуктивних технологій в анамнезі. Автори вважають, що у зв'язку з варіаціями вмісту маткових натуральних кілерів в ендометрії доцільно проводити індивідуальну оцінку імунного статусу ендометрія при прегравідарній підготовці жінок з безпліддям з метою оптимізації його медикаментозної корекції.

**Ключевые слова:** бесплодие, эндометрий, маточные натуральные киллеры, вспомогательные репродуктивные технологии.

Одной из возможных причин неудач в программе вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является нарушение процессов nidации и имплантации бластоцисты, что, несомненно, связано с состоянием рецептивности эндометрия. Решающим условием наступления и прогрессирования беременности является синхронизация развития эмбриона и его микроокружения. Состав эндометриального секрета и свойства маточного эпителия во многом определяют: сможет ли свободная бластоциста выжить и имплантироваться или ее рост прекратится, а имплантация не наступит [1-6].

Непосредственно перед имплантацией в секреторную фазу 20,00% эндометриальных стромальных клеток являются лейкоцитами. После овуляторного всплеска ЛГ и под влиянием эстрогенов и прогестерона стромальные клетки эндометрия превращаются в рыхлый слой секреторных клеток, известный как децидуальная оболочка. В период окна имплантации 70,00-80,00% от общего числа

лейкоцитов в эндометрии составляют крупные гранулированные лимфоциты, экспрессирующие CD56+ и CD16-. В течение окна имплантации децидуальная ткань становится все более обогащенной CD56+CD16-CD3+ маточными натуральными киллерами (МНК), количество которых резко уменьшается перед началом менструации. При отсутствии имплантации МНК-клетки удаляются из матки вместе с другими эндометриальными клетками во время менструации [1-3].

У людей большинство натуральных киллерных клеток крови слабо экспрессируют CD56+, слабо или умеренно CD16 (CD56dimCD16+). МНК эндометрия женщины отличаются от них в десятки раз большей экспрессией CD56CD16-, имеющих высокую продукцию цитокинов, и малым количеством CD56CD16+, характеризующихся цитотоксическими способностями, высоким ангиогенным потенциалом и экспрессией киллерных Ig-подобных рецепторов [6].

Целью данного исследования стало исследование количества и спектра эндометриальных МНК-клеток у женщин с бесплодием и с неудачными попытками ВРТ в анамнезе.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 62 женщины репродуктивного возраста с бесплодием и неудачными попытками ВРТ в анамнезе, а также 30 женщин контрольной группы, которые приняли участие в программе вспомогательных репродуктивных технологий в качестве суррогатных матерей.

Всем им на этапе предгравидарной подготовки на LH+7-LH+9 день менструального цикла была проведена гистероскопия с проведением забора эндометрия. Полученные образцы эндометрия помещали в нейтральный забуференный раствор формальдегида (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 3-4 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином.

Для иммуногистохимического исследования срезы помещали на покрытые адгезивом стекла Super Frost Plus («Menzel», Германия). Для «демаксирования» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution («ДАКО», Дания) с использованием микроволновой печи Samsung CE118KFR. После блокирования неспецифического связывания белков протеиновым блоком («ДАКО», Дания) и эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком («ДАКО», Дания) наносили первичные антитела. Использовали моноклональные антитела к CD16 (клон 2Y7, «Novocastra») и к CD56 (клон 123C3.D5, «Diagnostic BioSystems»). Визуализацию первичных антител проводили с помощью высокочувствительной полимерной системы детекции DAKO Advance. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ («ДАКО», Дания). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую среду Permanent Mounting Medium («ДАКО», Дания).

Микроскопию препаратов и морфометрические исследования проводили на микроскопе Olympus AX70 Provis («Olympus», Япония) с помощью программы анализа изображения Analysis 3.2 Pro («Soft Imaging», Германия) согласно рекомендациям производителя программного обеспечения.

Производили подсчет позитивно окрашенных клеток в трех полях зрения и рассчитывали процент положительных клеток по отношению ко всем клеткам стромы. Клетки железистых структур, попадавших в поле зрения, при подсчете не учитывались. Расчет производился не менее чем на 1000 стромальных клеточных элементов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ «Excel».

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании образцов эндометрия от 62 женщин с неудачными попытками ВРТ установлено, что у 58,06% пациенток эндометрий по критериям О.И. Топчиевой и R. W. Noyes не соответствовал фазе и дню менструального цикла, был на 22-й день менструального цикла у 17,74% женщин в фазе пролиферации, у 14,52% – в ранней фазе секреции, у 9,68% – поздней фазе секреции, у 16,13% – смешанного строения и лишь у 41,94% соответствовал средней фазе секреции. Среди обследованных женщин с неудачными попытками ВРТ в 25,81% случаев при гистологическом исследовании образцов эндометрия был зарегистрирован хронический эндометрит, подтвержденный наличием экспрессии синдекана (CD138+) плазмоцитами, в 30,65% – полип эндометрия, в 14,52% – простая неатипическая гиперплазия, в 6,45% – комплексная неатипическая гиперплазия, 11,29% – гипоплазия эндометрия.

У когорты пациенток с неудачными попытками ВРТ количество иммунопозитивных CD56+МНК варьировало от 9,97 до 213,28‰ и в среднем составило 83,59±7,60‰, CD16+МНК – от 5,64 до 112,93‰, в среднем – 43,72±3,27‰; индекс CD16+/CD56+ – от 0,21 до 0,95, в среднем – 0,59±0,03, что было больше таковых средних показателей контроля соответственно в 11,64±1,06, 49,68±3,72 и 4,23±0,18 раза.

При морфофункциональном несоответствии эндометрия фазе и дню менструального цикла тенденции изменений экспрессии CD56+МНК, CD16+МНК и соотношения CD16+/CD56+ в день предполагаемого окна имплантации отвечали выше выявленным общим: при соответствии эндометрия фазе пролиферации содержание CD16+МНК превышало аналогичные показатели контрольной группы в 41,67±8,70 раза; CD56+МНК – в 7,15±1,35, CD16+/CD56+ – в 4,72±0,26; при соответствии ранней фазе секреции – в 37,03±12,52 раза; в 6,72±1,90, в 4,65±0,44; поздней фазе секреции – в 84,72±2,81 раза; в 27,44±0,75, в 2,71±0,10; в эндометрии смешанного строения – соответственно в 43,56±4,99 раза; в 8,62±0,35, в 4,38±0,45. Даже в эндометрии от пациенток с неудачными попытками ВРТ, в котором наблюдалась соответствие средней фазе секреции, содержание CD16+МНК превышало аналогичные показатели контрольной группы в 51,72±5,58 раза; CD56+МНК – в 12,76±1,61, CD16+/CD56+ – в 4,16±0,32. Из приведенных данных видно, что наибольшее увеличение экспрессии CD56+МНК и высокоцитотоксичных CD16+МНК наблюдалось при соответствии эндометрия поздней и средней фазе секреции, а наибольшая диспропорция между их содержанием – при соответствии фазе пролиферации.

При анализе количества и спектра МНК в эндометрии у бесплодных пациенток с неудачными попытками ВРТ в зависимости от гистологического диагноза установлено, что у пациенток с хроническим эндометритом содержание CD16+МНК превышало аналогичные показатели контрольной группы в  $61,52 \pm 7,15$  раза; CD56+МНК – в  $12,96 \pm 1,83$ , CD16+/CD56+ – в  $4,54 \pm 0,31$ ; с гиперпластическими процессами – соответственно в  $45,46 \pm 5,34$ , в  $10,66 \pm 1,35$  и в  $4,12 \pm 0,28$  раза, в том числе, с полипами – в  $37,98 \pm 8,78$  раза, в  $12,39 \pm 2,50$ , в  $3,15 \pm 0,39$ ; с простой неатипической гиперплазией – в  $52,51 \pm 8,33$  раза; в  $8,83 \pm 1,34$ , в  $5,05 \pm 0,19$ ; с комплексной неатипической гиперплазией – в  $53,94 \pm 2,24$  раза; в  $9,14 \pm 0,01$ , в  $5,17 \pm 0,21$ ; с гипоплазией – в  $28,57 \pm 5,91$  раза; в  $7,13 \pm 1,23$ , в  $3,49 \pm 0,33$ . Даже в эндометрии от пациенток с неудачными попытками ВРТ, в котором отсутствовали явления эндометрита и гиперплазии, содержание CD16+МНК превышало аналогичные показатели контрольной группы в  $45,69 \pm 6,99$  раза; CD56+МНК – в  $11,87 \pm 2,41$ , CD16+/CD56+ – в  $4,12 \pm 0,35$ . Из приведенных данных видно, что наибольшее увеличение экспрессии CD56+МНК наблюдалось при хроническом эндометрите и полипах, высокоцитотоксичных CD16+МНК – при хроническом эндометрите и комплексной неатипической гиперплазии, а наибольшая диспропорция между их содержанием – при комплексной и простой неатипической гиперплазии.

Несмотря на общую тенденцию к повышению МНК в эндометрии пациенток с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона в анамнезе наблюдали случаи снижения их содержания вплоть до следов. Характерной чертой было неравномерное содержание МНК клеток в одном поле зрения и различных участках препарата эндометрия. Так, у женщин с хроническим эндометритом содержание иммунопозитивных CD16+МНК в эндометрии варьировало от 33,90 до 111,70%, CD56+МНК – от 42,13 до 203,00%, CD16+МНК/CD56+МНК – от 0,33 до 0,82; с полипами – от 8,27 до 112,93%, от 9,97 до 179,78%, от 0,21

до 0,83; с простой неатипической гиперплазией – от 7,92 до 59,90%, от 13,25 до 82,30%, от 0,60 до 0,83; с комплексной неатипической гиперплазией – от 45,05 до 49,88%, от 65,53 до 65,72%, от 0,69 до 0,76; с гипоплазией – от 5,64 до 43,14%, от 14,39 до 71,93%, от 0,36 до 0,64%; без явлений хронических воспалительных и гиперпластических процессов – от 5,64 до 81,43%, от 12,94 до 213,28%, от 0,35 до 0,95.

#### ВЫВОДЫ

В связи с вариациями содержания МНК в эндометрии целесообразно проводить индивидуальную оценку иммунного статуса эндометрия при преградиварной подготовке женщин с бесплодием с целью оптимизации его медикаментозной коррекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy / I. Manaster, S. Mizrahi, D. Goldman-Wohl [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181. – P. 1869–1876.
2. How does variability of immune system genes affect placentation? / F. Colucci, S. Boulouar, J. Kieckbusch [et al.] // *Placenta*. – 2011. – Vol. 32, № 8. – P. 539–545.
3. Increased natural killer cells and decreased regulatory T cells are seen in complex atypical endometrial hyperplasia and well-differentiated carcinoma treated with progestins / A. K. Witkiewicz, T. McConnell, M. Potoczek [et al.] // *J. Hum. Pathol.* – 2009. – Sep 3. [Epub ahead of print].
4. Kwak-Kim J. Clinical implication of natural killer cells and reproduction / J. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – Vol. 59, № 5. – P. 388–400.
5. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage / E. Tuckerman, S. M. Laird, A. Prakash [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, № 8. – P. 2208–2213.
6. Sentman C. L. NK cell function in the human female reproductive tract / C. L. Sentman, C. R. Wira, M. Eriksson // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2007. – Vol. 57, № 2. – P. 108–115.