

Клинико-морфологические особенности эндометрия при бесплодии у женщин, направляемых на ЭКО

А.В. Волчек^{1, 2}, К.Ю. Макаров¹, В.М. Кулешов¹, С.В. Айдагулова¹, И.О. Маринкин¹

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

²Областной перинатальный центр ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Бесплодие у женщин остается трудно разрешимой социальной и медицинской проблемой, особенно в случае диагноза «хронический эндометрит» с вариантом тонкого эндометрия.

Ц е л ь . Изучить клинико-морфологические особенности эндометрия при бесплодии у женщин, направляемых на экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО).

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Изучены клинические данные и результаты иммуногистохимического исследования эндометрия у 181 направленной на ЭКО и родоразрешенной женщины в возрасте 30 [22; 38] лет. Причинами нарушения репродуктивной функции были «тонкий эндометрий» (1-я группа – 64 пациентки); непроходимость маточных труб (2-я группа – 55 женщин) и мужской фактор бесплодия (3-я группа – 62 случая). Обследование пациенток включало в себя ультразвуковое исследование. В пайпель-биоптатах эндометрия перед процедурой ЭКО оценивали количество пиноподий в эпителии, изучали экспрессию HLA-DR и эстрогеновых (ER) и прогестероновых (PR) рецепторов с помощью иммуногистохимии. Применяли методы непараметрической статистики.

Р е з у л ь т а т ы . У женщин с бесплодием, направленных на ЭКО, в секреторную фазу цикла выявлен низкий процент пиноподий эпителия в эндометрии. Самые низкие показатели экспрессии HLA-DR, ER и PR рецепторов – в эндометрии пациенток с непроходимостью маточных труб. При этом у пациенток с тонким эндометрием – сравнительно высокие показатели экспрессии ER и PR в эпителии. Экспрессия ER и PR в стромальных клетках эндометрия не имела статистически значимых различий при парных сравнениях.

З а к л ю ч е н и е . У пациенток с тонким эндометрием формирование пиноподий имеет высокую диагностическую значимость для рецептивного статуса, подтвержденного ERA-тестом, и не имеет зависимости от экспрессии PR рецепторов в эпителии и строме.

Ключевые слова: бесплодие у женщин, тонкий эндометрий, пиноподии, экстракорпоральное оплодотворение, прогестероновые рецепторы, иммуногистохимия.

Образец цитирования: Волчек А.В., Макаров К.Ю., Кулешов В.М., Айдагулова С.В., Маринкин И.О. Клинико-морфологические особенности эндометрия при бесплодии у женщин, направляемых на ЭКО // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(4):130-142. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-130-142

Clinical and morphological features of the endometrium in infertility in women referred for IVF

A.V. Volchek^{1, 2}, K.Yu. Makarov¹, V.M. Kuleshov¹, S.V. Aidagulova¹, I.O. Marinkin¹

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

²State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Infertility in women is being a difficult social and medical problem for resolving, especially in the case of a chronic endometritis diagnosis with a variant of so called “thin” endometrium.

Поступила в редакцию 01.11.2024
Прошла рецензирование 27.11.2024
Принята к публикации 05.12.2024

Автор, ответственный за переписку
Айдагулова Светлана Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: asvetvlad@yandex.ru

Received 01.11.2024
Revised 27.11.2024
Accepted 05.12.2024

Corresponding author
Svetlana V. Aidagulova: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasnyy prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: asvetvlad@yandex.ru

A i m . To study the clinical and morphological features of the endometrium in infertility in women referred for *in vitro* fertilization (IVF).

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The clinical data and results of immunohistochemical examination of the endometrium were studied in 181 women aged 30 [22; 38] years who were referred for IVF and gave birth. The causes of reproductive dysfunction were thin endometrium (group 1, 64 patients), fallopian tube obstruction (group 2, 55 women) and male factor infertility (group 3, 62 cases). The examination of patients included ultrasound imaging. In Pipelle biopsies of the endometrium before the IVF procedure, the number of pinopodia in the epithelium was assessed, the expression of HLA-DR and estrogen and progesterone receptors (ERs and PRs, respectively) was measured using immunohistochemistry. Nonparametric statistical tests were used.

R e s u l t s . In women with infertility referred for IVF, a low percentage of endometrial pinopodia in the epithelium was detected in the secretory phase of the cycle. The lowest expression rates of HLA-DR, ERs and PRs were found in the endometrium of patients with tubal obstruction. At the same time, patients with thin endometrium had relatively high expression rates of ERs and PRs in the epithelium. The expression of ERs and PRs in endometrial stromal cells did not have statistically significant differences in pairwise comparisons.

C o n c l u s i o n . In patients with thin endometrium, the formation of pinopodia has a high diagnostic significance for the receptive status confirmed by the ERA test, and does not depend on the PRs expression in the epithelium and stroma.

Keywords: female infertility, thin endometrium, pinopodia, *in vitro* fertilization, progesterone receptors, immunohistochemistry.

Citation example: Volchek A.V., Makarov K.Yu., Kuleshov V.M., Aidagulova S.V., Marinkin I.O. Clinical and morphological features of the endometrium in infertility in women referred for IVF. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(4):130-142. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-130-142

ВВЕДЕНИЕ

Достижение более высоких показателей рождаемости на этапе имплантации эмбриона человека постоянно находится в центре внимания врачей-репродуктологов в центрах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). При использовании ВРТ частота успешной имплантации относительно количества переносов эмбрионов составляет приблизительно 30 %; при этом частота рецидивирующей неэффективности имплантации, т.е. три или более неудачных переноса у женщин, прошедших экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), достигает 10 % [1].

В большинстве случаев первичное бесплодие, идиопатические выкидыши при привычном невынашивании беременности (ПНБ), как и неудачи имплантации при ЭКО, ассоциированы с нарушением секреторной трансформации эндометрия, обусловленной недостаточностью лютеиновой фазы овариально-маточного цикла с неадекватностью реакции на прогестерон. Слабую рецепторную чувствительность эндометрия связывают с воспалительными и/или аутоиммунными нарушениями, в том числе из-за широкой распространенности возбудителей хронических инфекций и бесконтрольного использования антимикробных препаратов [2, 3].

Одной из существенных неблагоприятных причин бесплодия у женщин считается тонкий эндометрий [4], ассоциированный с более низ-

INTRODUCTION

Achieving higher fertility rates during human embryo implantation is a constant focus of reproductive physicians in assisted reproductive technology (ART) centers. When using ART, the rate of successful implantation relative to the number of embryo transfers is approximately 30%; however, the rate of recurrent implantation failure, i.e. three or more unsuccessful transfers in women who have undergone *in vitro* fertilization (IVF), reaches 10% [1].

In most cases, primary infertility, idiopathic miscarriages in recurrent pregnancy loss (RPL), as well as implantation failures in IVF, are associated with impaired secretory transformation of the endometrium caused by luteal phase insufficiency with non-specific response to progesterone. A low sensitivity of the endometrial receptors is associated with inflammatory and/or autoimmune disorders, including due to the widespread prevalence of pathogens of chronic infections and non-rational use of antimicrobial drugs [2, 3].

One of the significant unfavorable causes of infertility in women is considered to be so called “thin” endometrium [4] associated with lower birth rates followed by planned pregnancy which is largely due to implantation failure. The formation of thin endometrium is considered as an outcome of chronic endometritis with or without an autoimmune component [5, 6] or is regarded as a primarily degenerative process, i.e. endometriopathy with insufficient

кими показателями реализации планируемой беременности, что в значительной степени связано с неудачей имплантации. Формирование тонкого эндометрия интерпретируют как исход хронического эндометрита с наличием или отсутствием аутоиммунной компоненты [5, 6] либо расценивают как первично дистрофический процесс, т.е. эндометриопатия с недостаточной секреторной трансформацией эндометрия, не соответствующей нормальным циклическим изменениям, необходимым для имплантации бластоцисты и вынашивания беременности [7, 8]. У пациенток с тонким эндометрием в аркуатной артерии матки обнаружено замедление кровотока, и лечение витамином Е, L-аргинином и цитратом силденафила, которые увеличивают кровоток в аркуатной артерии матки, способствовало утолщению эндометрия [9]. Однако в большинстве случаев реабилитация тонкого эндометрия требует больших усилий в связи с торпидностью фенотипа даже при терапии эстрогенами и воздействии низкими дозами аспирина [10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить клинко-морфологические особенности эндометрия при бесплодии у женщин, направляемых на ЭКО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено ретроспективное когортное исследование в рамках проспективного исследования, изучены клинко-инструментальные показатели и результаты иммуногистохимического исследования эндометрия у 181 направленной на ЭКО и родоразрешенной женщины в возрасте 30 [22; 38] лет в стационарах ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» и ГБУЗ НСО «Новосибирский городской клинический перинатальный центр», являющихся клиническими базами кафедры акушерства и гинекологии Новосибирского государственного медицинского университета. Критерии включения в исследование: успешно родоразрешенные женщины в результате беременности, наступившей с помощью ЭКО собственными ооцитами, и информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: пациентки с глубоким инфильтративным эндометриозом, онкологическими заболеваниями, ВИЧ-инфекцией, системными заболеваниями, являющимися противопоказаниями к ВРТ.

Причинами бесплодия и направления на ЭКО были нарушения рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите с вариантом

secretory transformation of the endometrium that does not correspond to the normal cyclic changes necessary for blastocyst implantation and pregnancy [7, 8]. In patients with thin endometrium, a low blood flow was found in the arcuate artery of the uterus, and treatment with vitamin E, L-arginine and sildenafil citrate, which increase blood flow in the arcuate artery of the uterus, contributed to thickening of the endometrium [9]. However, in most cases, recovery of thin endometrium requires great efforts due to the torpidity of the phenotype even with estrogen therapy and administration of low doses of aspirin [10].

AIM OF THE RESEARCH

To study the clinical and morphological features of the endometrium in infertility in women referred for IVF.

MATERIALS AND METHODS

A retrospective cohort study within the framework of a prospective investigation was performed. Results of clinical investigation and immunohistochemical examination of the endometrium in 181 women aged 30 [22; 38] years referred for IVF and delivered in the Novosibirsk Regional Clinical Hospital and the Novosibirsk City Clinical Perinatal Center, which are clinical bases of the Department of Obstetrics and Gynecology of the Novosibirsk State Medical University, were studied. Inclusion criteria were: women who had successful delivery as a result of pregnancy achieved through IVF with their own oocytes, and informed consent to participate in the study. Exclusion criteria are: deep infiltrating endometriosis, malignant diseases, HIV infection, systemic diseases that are contraindications to ART.

The causes of infertility and reasons for referral to IVF were disorders of endometrial receptivity in chronic endometritis, a variant of thin endometrium (group 1, 64 female patients); tubal obstruction (group 2, 55 female patients) and male infertility factor (group 3, 62 female patients). Endometrial thickness was measured using ultrasound, and the number of pinopodia in the epithelium (expressed as persents) was assessed in Pipelle biopsies taken in the secretory phase of the cycle before an IVF procedure at a 400-fold magnification. The expression of HLA-DR (inflammatory cell activation marker) and estrogen (ERs) and progesterone (PRs) receptors was measured using immunohistochemistry (IHC) and presented in points. In addition, the native endometrial samples from 13 patients from group 1 were examined at the Igenomix laboratory (Spain) which holds a patent for the development of a specific

«тонкого эндометрия» (1-я группа – 64 пациентки); непроходимость маточных труб (2-я группа – 55 женщин) и мужской фактор бесплодия (3-я группа – 62 случая). С помощью УЗИ измеряли толщину эндометрия, а в пайпель-биоптатах, взятых в секреторную фазу цикла перед процедурой ЭКО, при увеличении в 400 раз оценивали количество пиноподий эпителиоцитов (выражали в процентах), а также с помощью иммуногистохимии (ИГХ) изучали экспрессию HLA-DR (маркер активации клеток воспаления) и эстрогеновых (ER) и прогестероновых (PR) рецепторов, которую выражали в баллах. Кроме того, у 13 пациенток 1-й группы нативные образцы эндометрия были исследованы в лаборатории Igenomix (Испания), обладающей патентом на разработку специфического микрочипа на основе профиля экспрессии более 50 генов (Endometrial Receptivity Array, или ERA), который позволяет оценить «восприимчивое состояние эндометрия человека» (т.е. рецептивность эндометрия) для диагностических и терапевтических целей [11].

Обследование и наблюдение пациенток проводили с их письменного информированного согласия в соответствии с законодательством Российской Федерации и этическими принципами проведения медицинских исследований, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 111 от 29.11.2018).

Для статистической обработки сведения о пациентках, включая паспортную часть, клинические характеристики и результаты инструментальных и лабораторных исследований о течении основного заболевания и сопутствующей патологии, были закодированы и введены в базу данных, созданную с помощью программы Microsoft Excel. Для статистического анализа использовали программное обеспечение RStudio (<http://www.rstudio.com/>). Нормальность распределения показателей в группах проверяли с помощью критерия Шапиро – Уилка, и поскольку она отсутствовала, данные представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартилей (Q1; Q3). Применяли методы непараметрической статистики: внутригрупповые сравнения проводили с помощью критерия Вилкоксона; межгрупповые парные сравнения данных – с помощью критерия Манна – Уитни; множественные межгрупповые сравнения – с помощью критерия Краскала – Уоллиса. Использовали критерий χ^2 для

microarray based on the expression profile of more than 50 genes (Endometrial Receptivity Array – ERA), which allows one to assess the “receptive state of human endometrium” (i.e. endometrial receptivity) for diagnostic and therapeutic purposes [11].

The examination and follow up of patients was carried out with their written informed consent in accordance with the legislation of the Russian Federation and the ethical principles of medical research set out in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. The study was approved by the Ethics Committee of the Novosibirsk State Medical University (Protocol No. 111 dated November 29, 2018).

For statistical processing, data on patients, including personal information, clinical characteristics and results of clinical investigation and lab tests characterizing the underlying disease and concomitant pathology, were coded and entered into a database created using Microsoft Excel. RStudio software (<http://www.rstudio.com/>) was used for statistical analysis. A normal distribution of variables in groups was checked using the Shapiro-Wilk test, and since it was absent, the data are presented as the median (Me), the first and third quartiles (Q1; Q3). Nonparametric statistical tests were used: comparisons between groups were performed using the Wilcoxon test; paired comparisons between groups – using the Mann-Whitney test; multiple comparisons between groups – using the Kruskal-Wallis test. The χ^2 test was used to evaluate binary data. Differences were considered statistically significant at a level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In patients of group 1 (with chronic endometritis as the main cause of infertility), the endometrial thickness in the mid-secretory phase of the cycle was less than 7 mm, which had statistically significant differences compared to the values of the other two groups (Fig. 1). It is noteworthy that in group 2 in which the cause of infertility was the inflammation-induced fallopian tube obstruction, the endometrial thickness was reduced in many cases, which can be regarded as the development of endometriopathy, atrophic changes in the uterine mucosa as a result of long-term inflammation [7, 8].

Differing by endometrial thickness, group 1 and group 2 were virtually indistinguishable from each other in the number of pinopodia visually assessed in Pipelle biopsies during the secretory phase of the cycle. Pinopodia are protrusions up to 10 μm on the apical surface of endometrial epithelial cells that appear on the 20th and 21st days of the cycle (can vary within 5 days) and characterize endometrial

оценки бинарных данных. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациенток 1-й группы (с хроническим эндометритом как ведущей причиной бесплодия) толщина эндометрия в средне-секреторную фазу овариально-маточного цикла составила менее 7 мм, статистически значимо отличаясь от показателей двух других групп (рис. 1). Обращает на себя внимание, что во 2-й группе, фактором бесплодия в которой явилась непроходимость маточных труб в результате воспалительного процесса, толщина эндометрия была снижена во многих клинических наблюдениях, что можно расценивать как развитие эндометриопатии – атрофического изменения слизистой оболочки матки в итоге длительного воспаления [7, 8].

Отличаясь по толщине эндометрия, 1-я и 2-я группы практически не отличались друг от друга по количеству пиноподий, визуально оцениваемых в пайпель-биоптатах в секреторную фазу цикла. Пиноподии – это выросты до 10 мкм на апикальной поверхности эпителиальных клеток эндометрия, которые появляются на 20-й и 21-й дни овариально-маточного цикла (могут варьироваться в пределах 5 сут) и характеризуют восприимчивость (рецептивность) эндометрия [12].

receptivity [12]. The percentage of epithelial cells with pinopodia in group 3 showed a statistically significant increase compared to the values of the other two groups (Fig. 2), which once again confirms the highly informative value of this long-described and available for analysis marker [13].

Among the molecular markers detected by IHC and currently used in routine practice for the diagnosis of endometrial receptivity in patients with infertility, the role of cell surface receptors (HLA-DR) of antigen-presenting cells, which bind foreign peptide (including bacterial) antigens and autoantigens, is recognized. In our study, the HLA-DR expression was significantly reduced, below the diagnostic significance, in the endometrium of patients in group 2 relative to groups 1 and 3, which did not differ from each other (Fig. 3). HLA-DR expression is considered as a marker of activation of cells involved in inflammation, however, a decrease in the HLA-DR level, reflecting a deficiency of antigen-presenting cells in the endometrium, according to [14], can serve as a general biomarker for the diagnosis of infertility in women, despite the major role of inflammation in the pathogenesis of chronic endometritis as the main reason of infertility.

The epithelium and stroma of the endometrium, rapidly renewing during reproductive age, are highly sensitive to sex steroids. Insufficient PR expression due to inadequate level and/or reception of estro-

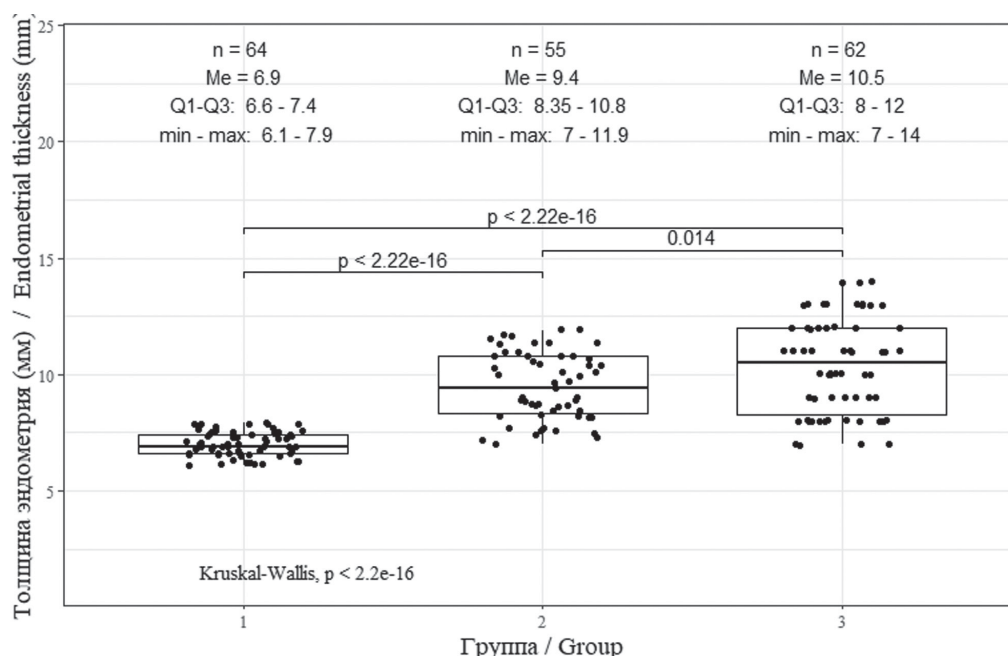


Рис. 1. Показатели толщины эндометрия в секреторную фазу цикла. Очень высокая статистическая значимость отличий (критерий Краскела – Уоллиса) между группами с наименьшими показателями в 1-й группе (вариант «тонкого эндометрия»)

Fig. 1. Endometrial thickness indices in the secretory phase of the cycle. Very high statistical significance of differences (Kruskal-Wallis test) between groups with the lowest indices in group 1 (variant of “thin endometrium”)

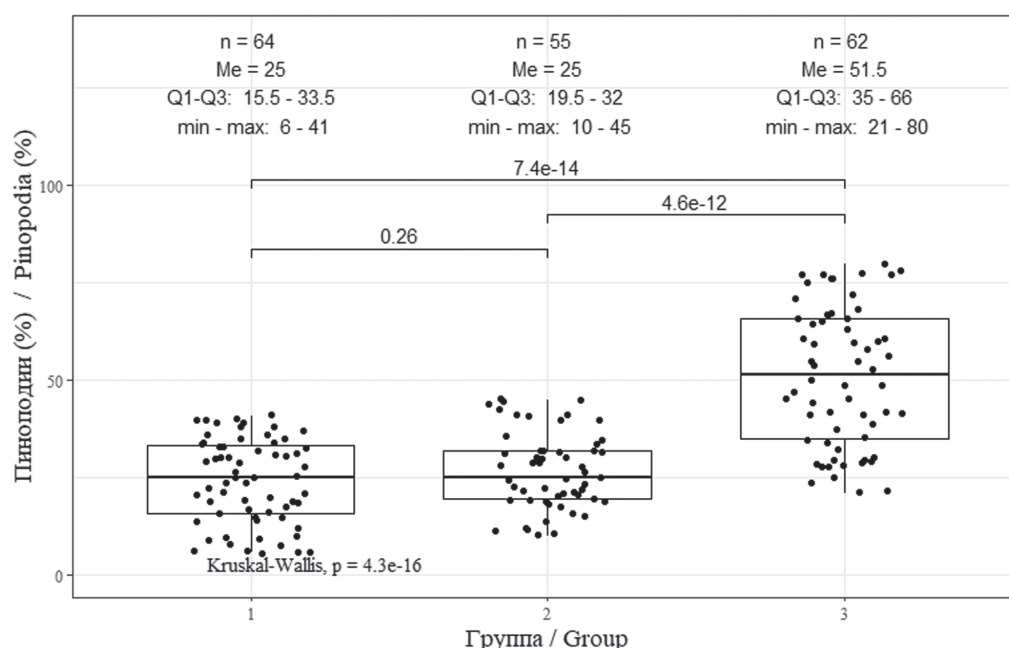


Рис. 2. Низкие и практически одинаковые показатели пиноподий эпителия в эндометрии пациенток 1-й и 2-й групп в секреторную фазу цикла. Критерий Краскела – Уоллиса

Fig. 2. Small and almost identical indicators of epithelial pinopodia in the endometrium of patients of groups 1 and 2 in the secretory phase of the cycle. Kruskal-Wallis test

Процент эпителиоцитов с пиноподиями в 3-й группе статистически значимо превысил показатели других двух групп (рис. 2), что еще раз подтверждает высокую информативность этого давно описанного и доступного для анализа маркера [13].

Среди выявляемых с помощью ИГХ молекулярных маркеров, в настоящее время используемых в рутинной практике для диагностики рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием, признана роль рецепторов клеточной поверхности (HLA-DR) антиген-презентирующих клеток, которые связывают пептидные чужеродные (в том числе бактериальные) антигены и аутоантигены. В нашем исследовании экспрессия HLA-DR оказалась статистически значимо сниженной, ниже диагностической значимости, в эндометрии пациенток 2-й группы относительно 1-й и 3-й групп, не отличающихся между собой (рис. 3). Экспрессию HLA-DR расценивают как маркер активации клеток, участвующих в воспалении, однако снижение уровня HLA-DR, отражающее дефицит антиген-презентирующих клеток в эндометрии, согласно [14], может служить общим биомаркером для диагностики бесплодия у женщин, несмотря на большую роль воспаления в патогенезе хронического эндометрита как главного фактора бесплодия.

Быстро обновляющиеся в репродуктивном возрасте эпителий и строма эндометрия высоко

gens often underlies luteal phase deficiency [15]. Since morphological immaturity of the endometrium can be observed even with sufficient progesterone production, not only the level of steroids in the body is important, but also the preservation of all pathways to exert the hormonal effect. In the panel of IHC markers of endometrial receptivity in infertility, the analysis of ER and PR expression in the epithelium and stroma is mandatory. In the endometrial epithelium, the ER expression was the highest in patients of group 1 and lowest in patients of group 2, with the differences between all groups being statistically significant (Kruskal-Wallis test) (Fig. 4). Moreover, the ER expression in stromal cells did not have statistically significant differences in paired comparisons (in groups 1, 2 and 3, respectively, 174 (142–211), 157 (144–180) and 176 (161–199) points, $p = 0.21$). Similar results were obtained for the expression of PRs in endometrial stromal cells (in groups 1, 2 and 3, respectively, 178 (147–221), 172 (147–222) and 175 (145–208) points, $p = 0.73$).

In contrast to the pattern of the ER expression in the endometrial epithelium, the PR expression in thin endometrium of group 1 did not differ from that of group 3 which was virtually unaltered receptive endometrium. However, the PR expression was reduced in the epithelium of group 2 relative to groups 1 and 3 (Fig. 5).

Controversies about the diagnostic role of pinopodia, steroid receptors and many other molecules

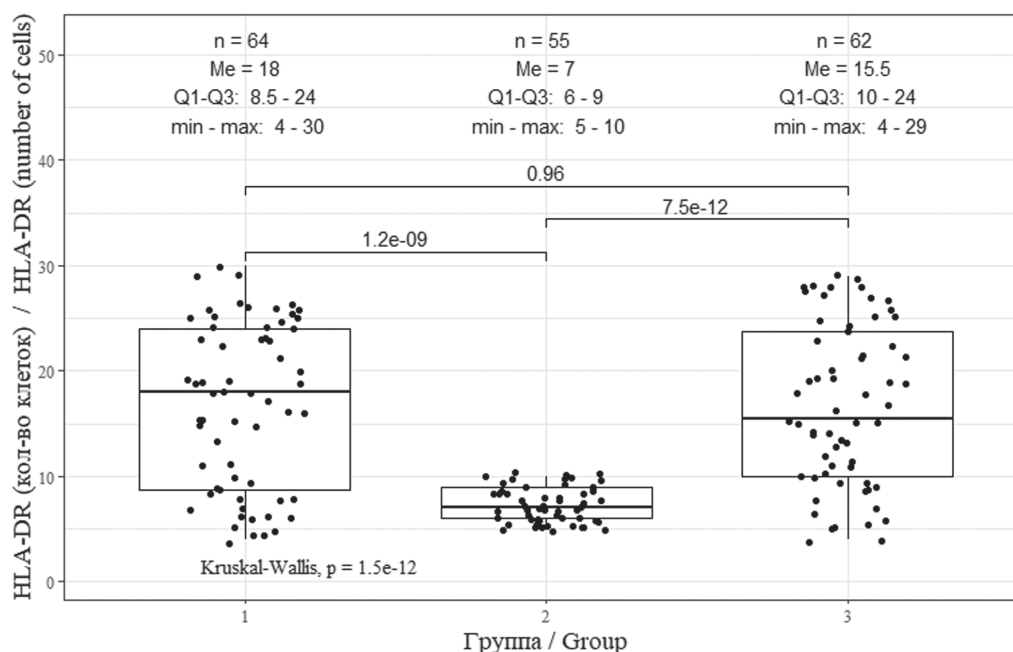


Рис. 3. Экспрессия HLA-DR статистически значимо снижена (ниже пороговых значений) в эндометрии пациенток 2-й группы относительно 1-й и 3-й групп, не отличающихся между собой. Критерий Краскела – Уоллиса
Fig. 3. The HLA-DR expression is statistically significantly reduced (below the threshold values) in the endometrium of patients in group 2 compared to groups 1 and 3, which do not differ from each other. Kruskal-Wallis test

чувствительны к половым стероидам. Недостаточная экспрессия PR в связи с неадекватными содержанием и/или рецепцией эстрогенов часто лежит в основе недостаточности лютеиновой фазы цикла [15]. Поскольку даже при достаточной продукции прогестерона может наблюдаться «морфологическая незрелость» эндометрия, то важен не только уровень стероидов в организме, но и сохранение всех путей реализации гормонального эффекта. В панели ИГХ маркеров рецептивности эндометрия при бесплодии обязателен анализ экспрессии ER и PR в эпителии и строме. В эпителии эндометрия экспрессия ER оказалась наибольшей у пациенток 1-й группы и наименьшей – у пациенток 2-й группы, причем различия между всеми группами статистически значимы (критерий Краскела – Уоллиса) (рис. 4). При этом экспрессия ER в стромальных клетках не имела статистически значимых различий при парных сравнениях (соответственно в 1, 2 и 3-й группах 174 (142–211); 157 (144–180) и 176 (161–199) баллов, $p = 0.21$). Аналогичные результаты получены и для экспрессии PR в стромальных клетках эндометрия (соответственно в 1, 2 и 3-й группах 178 (147–221); 172 (147–222) и 175 (145–208) баллов, $p = 0.73$).

В отличие от характера экспрессии ER в эпителии эндометрия, экспрессия PR в эпителии тонкого эндометрия 1-й группы не отличалась от

(hormones, cytokines, integrins, enzymes, etc.) that are involved in the blastocyst-maternal endometrium interaction to achieve implantation, have induced the search for a reliable panel of molecular markers of receptivity [16]. This research group has developed and patented the ERA test – a molecular diagnostic tool based on the specific transcriptomic signature that identifies receptive endometrium in natural and artificial (e.g., during hormone replacement therapy) cycles. Based on the results of ERA testing, the Igenomix laboratory makes an assessment of the endometrial window of implantation (WOI): for example, delayed WOI, i.e. prereceptive, advanced WOI, or postreceptive, and unusually short windows of receptivity, the best time (window) for implantation (Fig. 6). This allows personalization of the time of embryo transfer in IVF procedures [17].

Based on the results of ERA testing, 13 patients from group 1 were divided into 3 subgroups with pre-receptive (5 cases), receptive (4 cases) and postreceptive (4 cases) status. Despite the small number of samples, the PR expression in the epithelium and endometrial stroma was analyzed, and statistically significant differences were not revealed, however, a comparison of the percentage of pinopodia of epithelial cells showed their diagnostic significance (Fig. 7).

Thus, based on a small number of clinical observations, we have shown that the epithelial pinopodia in the endometrium in the secretory phase of the

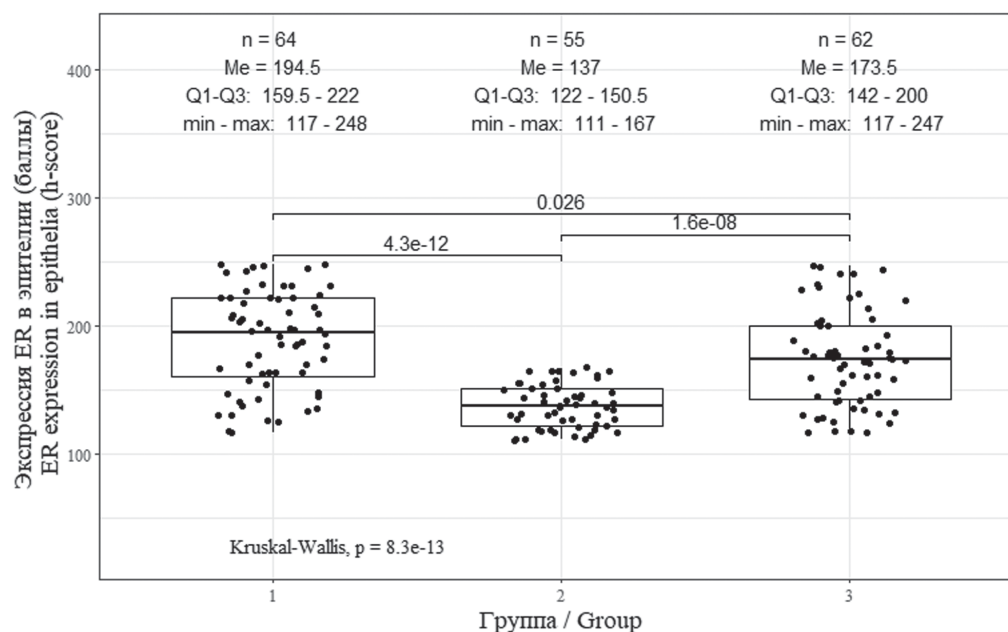


Рис. 4. В эпителии эндометрия экспрессия эстрогеновых рецепторов (ER) наибольшая – у пациенток 1-й группы, наименьшая – у пациенток 2-й группы. Различия между всеми группами статистически значимы (критерий Краскела – Уоллиса)

Fig. 4. The expression of estrogen receptors (ER) in the endometrial epithelium was highest in patients of group 1 and lowest in patients of group 2. The differences between all groups are statistically significant (Kruskal-Wallis test)

3-й группы – фактически неизмененного, рецептивного эндометрия. Однако экспрессия PR была снижена в эпителии 2-й группы относительно 1-й и 3-й групп (рис. 5).

cycle are a noteworthy diagnostic marker of the implantation window, which has been re-evaluated by other researchers. The implantation window is a 4–5-day period of the cycle during which successful

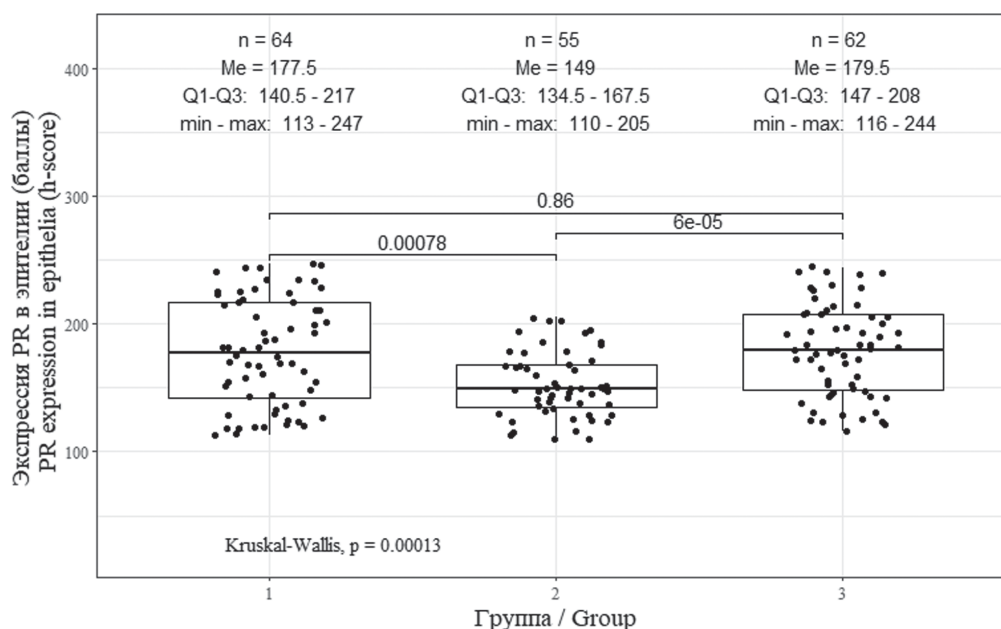


Рис. 5. Экспрессия PR в эпителии тонкого эндометрия 1-й группы не отличалась от 3-й группы – женщин с мужским фактором бесплодия, и во 2-й группе статистически значимо меньше (критерий Краскела – Уоллиса)

Fig. 5. The progesterone receptors (PR) expression in the epithelium of the thin endometrium of group 1 did not differ from group 3 (women with male infertility factor), and in group 2 it was statistically significantly lower (Kruskal-Wallis test)



ТЕСТ ERA (АНАЛИЗ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ) TEST ERA (ANALYSIS OF ENDOMETRIAL RECEPTIVITY)

Данные пациента Patient's data		Информация об образце Sample information		Данные клиники Clinic's data	
№ медицинской карты: Medical card No.:		Дата поступления материала в лабораторию: Delivery date to a laboratory:	27/04/2022	Клиника: Clinic:	
Тип материала: Sample type:	Образец ткани эндометрия Sample endometrial tissue	Дата выдачи заключения: Date of conclusion:	07/05/2022	Лечащий врач: Physician:	
Ф.И.О. / Full name:	Elena	Прогестерон: Progesterone:	Меньше 1 нг/мл Less than 1 ng/ml	№ пункции: Puncture No.:	
Дата рождения: Date of birth:	17/06/1974	Дата измерения: Date of measurement:	18/04/2022		
		Дата начала приема прогестерона: Date of progesterone intake:	18/04/2022		
		Дата биопсии: Biopsy date:	23/04/2022		
		Тип цикла: Cycle type:	HRT (115 часов) (115 hours)		

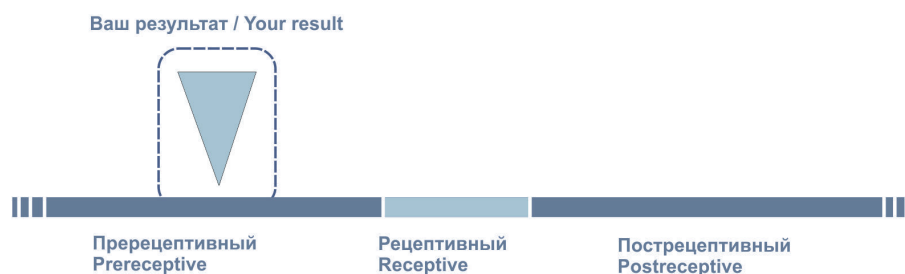
РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ / RESEARCH RESULT:

ПРЕРЕЦЕПТИВНЫЙ / PRERECCEPTIVE

Заключение: перенос эмбриона(-ов) на стадии бластоцисты рекомендовано проводить через 130 ± 3 часа после начала приема препарата прогестерона (на 1 день позже биопсии ткани эндометрия в рамках данного исследования).

Повторная биопсия эндометрия не требуется.

Conclusion: transfer of embryo(s) at the blastocyst stage is recommended 130 ± 3 h after intake of progesterone (one day after endometrial biopsy). Repeat endometrial biopsy is not required.



Интерпретация результата исследования / Result interpretation:

Согласно данным лаборатории Igenomix, у 89% женщин с подобным профилем экспрессии генов в рамках цикла с заместительной гормональной терапией уровень максимальной рецептивности эндометрия наступает на 1 день позже (ДИ 95% [86–91%]). Повторной биопсии эндометрия в данном случае не требуется. Учитывая полученный результат, перенос эмбриона(-ов) на стадии бластоцисты следует проводить через 139 ± 3 часа после первого приема препарата прогестерона.

В случае эмбриона(-ов) третьего дня развития перенос должен быть проведен на 2 дня раньше.

According to the Igenomix laboratory data, 89% of women with a similar gene expression profile in a cycle with hormone replacement therapy the level of maximum endometrial receptivity comes 1 day later (CI 95% [86–91%]). In this case, repeat endometrial biopsy is not required. Given this result, transfer of embryo(s) at the blastocyst stage should be performed 139 ± 3 h after the first intake of progesterone.

In case of day 3 of embryo culture, transfer should be carried out 2 days earlier.

Рис. 6. Пример заключения ERA-тестирования эндометрия у пациентки 1-й группы с бесплодием
Fig. 6. An example of the conclusion of ERA testing for the endometrium in a patient in group 1 with infertility

Контраверсии о диагностической роли пиноподий, стероидных рецепторов и многих других молекул (гормоны, цитокины, интегрины, ферменты и т.д.), которые принимают участие во

implantation of the blastocyst can occur, usually dating from the 19th–20th day of the idealized 28-day cycle. The first steps in dating this window by establishing a set of morphological criteria for assessing

взаимодействии бластоцисты и материнского эндометрия для достижения имплантации, индуцировали поиск надежной панели молекулярных маркеров рецептивности [16]. Данной исследовательской группой был разработан и запатентован ERA-тест – молекулярный диагностический инструмент, основанный на специфической транскриптомной панели, которая идентифицирует восприимчивый эндометрий в естественных и искусственных (например, при заместительной гормонотерапии) циклах. По итогу ERA-тестирования лаборатория Igenomix выдает заключение об интерпретации состояния образца – например, статус рецептивности «отсроченный», т.е. «пререцептивный», у других – «пострецептивный», и могут быть необычно короткие «окна восприимчивости» – наилучший период времени (или «окно») для имплантации (рис. 6). Это позволяет персонализировать время переноса эмбриона в случаях ЭКО [17].

По итогам ERA-тестирования 13 пациенток 1-й группы разделились на 3 подгруппы с пререцептивным (5 наблюдений), рецептивным (4) и пострецептивным (4) статусом. Несмотря на малое количество образцов, была проанализирована экспрессия PR в эпителии и строме эндометрия и статистически значимые различия не выявлены, однако сравнение процента пиноподий эпителиоцитов показало их диагностическую значимость (рис. 7).

the development and receptivity of the endometrium were made [13, 18], but then came a period of declining interest in pinopodia with the search for molecular markers of endometrial receptivity.

In recent clinical studies pinopodia are associated with the favorable fertility outcomes in women, and since they are directly associated with the increased progesterone levels, the potential usefulness of these hormonally regulated cellular biological structures in predicting or improving implantation in clinical settings is promising. There has been renewed interest in pinopodia [19].

Answers to complicated questions of women with infertility management which have a critical importance for clinical practice and reproductive health, are needed, and further experimental and clinical studies to elucidate the cellular and molecular mechanisms are necessary as well [20].

CONCLUSION

In women with infertility of various origins, referred for IVF, the low and virtually identical formation of epithelial pinopodia in the endometrium was revealed in the secretory phase of the cycle. Formation of pinopodia has high diagnostic significance for the receptive status of the endometrium, confirmed by the ERA test, in patients of group 1 with infertility (chronic endometritis with thin endometrium) and does not depend on the expression of progesterone receptors in the epithelium and stroma.

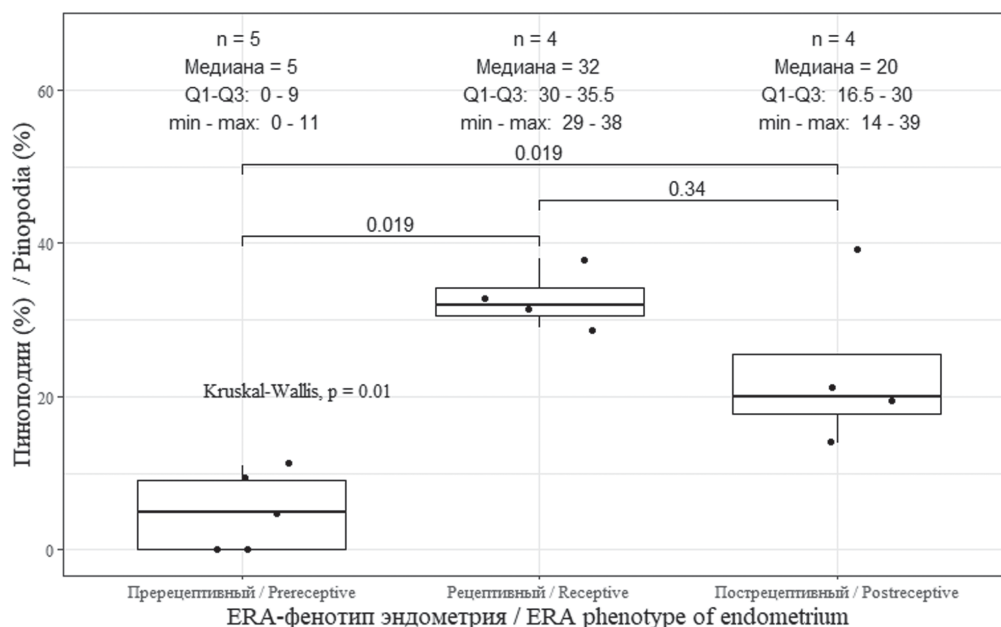


Рис. 7. Формирование пиноподий имеет высокую диагностическую значимость для рецептивного статуса эндометрия, подтвержденного ERA-тестом, у пациенток 1-й группы с бесплодием (хронический эндометрит с тонким эндометрием)

Fig. 7. The pinopodia formation has a high diagnostic significance for the receptive status of the endometrium, confirmed by the ERA test, in patients of group 1 with infertility (chronic endometritis with thin endometrium)

Таким образом, на небольшом количестве клинических наблюдений нами показано, что пиноподии эпителия в эндометрии в секреторную фазу цикла являются заслуживающим внимания диагностическим маркером «окна имплантации», к переоценке которого обратились и другие исследователи. Окно имплантации – это 4–5-дневный период овариально-маточного цикла, в течение которого может произойти нормальная имплантация бластоцисты, обычно датируемый с 19–20-го дня идеализированного 28-дневного цикла. Первые шаги в датировании этого окна – установление набора морфологических критериев для оценки развития и рецептивности эндометрия – были сделаны [13, 18], но затем наступил период отказа от внимания к пиноподиям с поиском молекулярных маркеров рецептивности эндометрия.

Недавние клинические исследования связывают высокий уровень экспрессии пиноподий с благоприятным прогнозом в отношении фертильности у женщин, и поскольку их наличие напрямую связано с повышением уровня прогестерона, потенциальная полезность этих гормонально регулируемых клеточных биологических структур в прогнозировании или улучшении имплантации в клинических условиях является многообещающей. Появился новый интерес к пиноподиям [19].

Необходимы ответы на сложные вопросы ведения пациенток, имеющие решающее значение для клинической практики и репродуктивного здоровья, и подчеркивается необходимость дальнейших экспериментальных и клинических исследований для изучения клеточных и молекулярных механизмов [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У женщин с бесплодием различного генеза, направленных на ЭКО, в секреторную фазу цикла выявлено низкое и практически одинаковое формирование пиноподий эпителия в эндометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cimadomo D., Craciunas L., Vermeulen N. et al. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists// *Hum. Reprod.* 2021;36(2):305-317. DOI: 10.1093/humrep/deaa317
2. Трунова Л.А., Трунов А.Н., Маринкин И.О. и др. Дисбаланс цитокинов и активность иммунновоспалительного процесса у женщин с бесплодием// *Аллергология и иммунология.* 2014;15(1):22-26.

The HLA-DR expression showed a statistically significant increase (below threshold values) in the endometrium of patients with tubal obstruction. The ER expression in the endometrial epithelium is highest in patients with thin endometrium, and lowest in patients with tubal factor infertility. The PR expression in the epithelium of thin endometrium in patients from group 1 did not differ from group 3 (women with male infertility factor) and shows a statistically significant increase in patients with tubal infertility. At the same time, the ER and PR expression in endometrial stromal cells had no statistically significant differences in paired comparisons.

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

Формирование пиноподий имеет высокую диагностическую значимость для рецептивного статуса эндометрия, подтвержденного ERA-тестом, у пациенток 1-й группы с бесплодием (хронический эндометрит с тонким эндометрием) и не имеет зависимости от экспрессии прогестероновых рецепторов в эпителии и строме.

Экспрессия HLA-DR статистически значимо снижена (ниже пороговых значений) в эндометрии пациенток с непроходимостью маточных труб. Экспрессия ER в эпителии эндометрия наибольшая – у пациенток с тонким эндометрием, наименьшая – у пациенток с трубным бесплодием. Экспрессия PR в эпителии тонкого эндометрия 1-й группы не отличалась от 3-й группы – женщин с мужским фактором бесплодия и была статистически значимо меньшей при трубном бесплодии. При этом экспрессия ER и PR в стромальных клетках эндометрия не имела статистически значимых различий при парных сравнениях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Cimadomo D., Craciunas L., Vermeulen N. et al. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists. *Hum. Reprod.* 2021;36(2):305-317. DOI: 10.1093/humrep/deaa317
2. Trunova L.A., Trunov A.N., Marinkin I.O. et al. Features of immuno-inflammatory process in the pathogenesis of infertility in women with chronic reproductive infectious and inflammatory diseases. *Allergology and Immunology.* 2014;15(1):22-26. (In Russ.)

3. D'Ippolito S., Di Nicuolo F., Pontecorvi A. et al. Endometrial microbes and microbiome: Recent insights on the inflammatory and immune "players" of the human endometrium// *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018;80(6):e13065. DOI:10.1111/aji.13065.
4. He T., Li M., Li W. et al. Endometrial thickness is associated with low birthweight in frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 8,235 singleton newborns// *Front. Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:929617. DOI: 10.3389/fendo.2022.929617.
5. Hillier S.L., Bernstein K.T., Aral S. A review of the challenges and complexities in the diagnosis, etiology, epidemiology, and pathogenesis of pelvic inflammatory disease// *J. Infect. Dis.* 2021;224(12 Suppl 2):S23-S28. DOI: 10.1093/infdis/jiab116.
6. Klimaszuk K., Svarre Nielsen H., Wender-Ozegowska E., Kedzia M. Chronic endometritis – is it time to clarify diagnostic criteria? // *Ginek. Pol.* 2023;94(2):152-157. DOI: 10.5603/GP.a2022.0147.
7. Маринкин И.О., Непомнящих Г.И., Кулешов В.М. и др. Атрофия эндометрия как проявление синдрома регенераторно-пластической недостаточности при привычном невынашивании беременности//Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2012;5:223-230.
8. Маринкин И.О., Кулешов В.М., Илизарова Н.А., Айдагулова С.В. Закрытое окно. Новая интерпретация снижения рецептивности эндометрия при привычном невынашивании беременности // *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак.* 2014;6(23):74-81.
9. Miwa I., Tamura H., Takasaki A. et al. Pathophysiologic features of "thin" endometrium//*Fertil. Steril.* 2009;91(4):998-1004. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.029.
10. Gharibeh N., Aghebati-Maleki L., Madani J. et al. Cell-based therapy in thin endometrium and Asherman syndrome// *Stem Cell Res. Ther.* 2022;13(1):33. DOI: 10.1186/s13287-021-02698-8.
11. Place T.L., Agarwal R., Najafzadeh P. et al. Consistency of endometrial receptivity array and histologic dating of spatially distinct endometrial samplings: a prospective, blinded study // *F S Rep.* 2023;4(4):375-379. DOI: 10.1016/j.xfre.2023.08.008.
12. Mrozikiewicz A.E., Ożarowski M., Jędrzejczak P. Biomolecular markers of recurrent implantation failure – A review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(18):10082. DOI: 10.3390/ijms221810082.
13. Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. Reprint of: Dating the endometrial biopsy // *Fertil. Steril.* 2019;112(4 Suppl.1):e93-e115. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.08.079.
14. Jiang L., Wang X., Zhang T. et al. Down-regulation of HLA-DRs and HLA-DPs reflects the deficiency of antigen-presenting cells in endometrium from infertile women with and without ovarian endometriosis // *Hum. Fertil. (Camb.)*. 2022;25(4):716-727. DOI: 10.1080/14647273.2021.1902576.
15. Аничков Н.М. Патоморфология эндометрия при гормональных воздействиях // Архив патологии. 2001;6:3-8.
16. Valles C.S., Domínguez F. Embryo-endometrial interaction // *Chang Gung Med. J.* 2006;29(1):9-14.
3. D'Ippolito S., Di Nicuolo F., Pontecorvi A. et al. Endometrial microbes and microbiome: Recent insights on the inflammatory and immune "players" of the human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018;80(6):e13065. DOI:10.1111/aji.13065.
4. He T., Li M., Li W. et al. Endometrial thickness is associated with low birthweight in frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 8,235 singleton newborns. *Front. Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:929617. DOI: 10.3389/fendo.2022.929617.
5. Hillier S.L., Bernstein K.T., Aral S. A review of the challenges and complexities in the diagnosis, etiology, epidemiology, and pathogenesis of pelvic inflammatory disease. *J. Infect. Dis.* 2021;224(12 Suppl 2):S23-S28. DOI: 10.1093/infdis/jiab116.
6. Klimaszuk K., Svarre Nielsen H., Wender-Ozegowska E., Kedzia M. Chronic endometritis – is it time to clarify diagnostic criteria? *Ginek. Pol.* 2023;94(2):152-157. DOI: 10.5603/GP.a2022.0147.
7. Marinkin I.O., Nepomnyashchikh G.I., Kuleshov V.M. et al. Atrophy of endometrium as manifestation of regenerative-plastic insufficiency syndrome at recurrent pregnancy loss. *RUDN Journal of Medicine.* 2012;5:223-230. (In Russ.)
8. Marinkin I.O., Kuleshov V.M., Ilizarova N.A., Aidagulova S.V. Closed window. New interpretation of decreased endometrial receptivity in recurrent pregnancy loss. *StatusPraesens. Gynecology, Obstetrics, Infertility.* 2014;6(23):74-81. (In Russ.)
9. Miwa I., Tamura H., Takasaki A. et al. Pathophysiologic features of "thin" endometrium. *Fertil. Steril.* 2009;91(4):998-1004. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.029.
10. Gharibeh N., Aghebati-Maleki L., Madani J. et al. Cell-based therapy in thin endometrium and Asherman syndrome. *Stem Cell Res. Ther.* 2022;13(1):33. DOI: 10.1186/s13287-021-02698-8.
11. Place T.L., Agarwal R., Najafzadeh P. et al. Consistency of endometrial receptivity array and histologic dating of spatially distinct endometrial samplings: a prospective, blinded study. *F S Rep.* 2023;4(4):375-379. DOI: 10.1016/j.xfre.2023.08.008.
12. Mrozikiewicz A.E., Ożarowski M., Jędrzejczak P. Biomolecular markers of recurrent implantation failure – A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(18):10082. DOI: 10.3390/ijms221810082.
13. Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. Reprint of: Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.* 2019;112(4 Suppl.1):e93-e115. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.08.079.
14. Jiang L., Wang X., Zhang T. et al. Down-regulation of HLA-DRs and HLA-DPs reflects the deficiency of antigen-presenting cells in endometrium from infertile women with and without ovarian endometriosis. *Hum. Fertil. (Camb.)*. 2022;25(4):716-727. DOI: 10.1080/14647273.2021.1902576.
15. Anichkov N.M. Pathomorphology of the endometrium under hormonal influences. *Archive of Pathology.* 2001;6:3-8. (In Russ.)
16. Valles C.S., Domínguez F. Embryo-endometrial interaction. *Chang Gung Med. J.* 2006;29(1):9-14.
17. Blesa D., Ruiz-Alonso M., Simón C. Clinical management of endometrial receptivity. *Semin. Reprod. Med.* 2014;32(5):410-413. DOI : 10.1055/s-0034-1376360.

17. Blesa D., Ruiz-Alonso M., Simón C. Clinical management of endometrial receptivity // *Semin. Reprod. Med.* 2014;32(5):410-413. DOI: 10.1055/s-0034-1376360.
18. Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. Dating the endometrial biopsy // *Fertil. Steril.* 1950;1:3-25.
19. Quinn K.E., Matson B.C., Wetendorf M., Caron K.M. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions // *Mol. Cell Endocrinol.* 2020;501:110644. DOI: 10.1016/j.mce.2019.110644.
20. Илизарова Н.А., Маринкин И.О., Агеева Т.А. и др. Ультразвуковые и гистохимические маркеры индукции секреторной активности эндометрия при привычном невынашивании беременности // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009;148(10):468-472.
18. Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.* 1950;1:3-25.
19. Quinn K.E., Matson B.C., Wetendorf M., Caron K.M. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions. *Mol. Cell Endocrinol.* 2020;501:110644. DOI: 10.1016/j.mce.2019.110644.
20. Ilizarova N.A., Marinkin I.O., Ageeva T.A. et al. Ultrastructural and histochemical markers of endometrial secretion induction in habitual miscarriage. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009;148(4):663-667. DOI: 10.1007/s10517-010-0790-x.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Волчек Александр Викторович – младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; врач – акушер-гинеколог Областного перинатального центра ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4458-1158.

Макаров Константин Юрьевич – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-3574-6382.

Кулешов Виталий Михайлович – д-р мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Айдагулова Светлана Владимировна – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7124-1969.

Маринкин Игорь Олегович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии, ректор ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9409-482X.

ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr V. Volchek – Junior Researcher, Laboratory of Cell Biology and Fundamental Foundations of Reproduction, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Obstetrician-Gynecologist, Regional Perinatal Center, Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4458-1158.

Konstantin Yu. Makarov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-3574-6382.

Vitaliy M. Kuleshov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Svetlana V. Aidagulova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Cell Biology and Fundamental Foundations of Reproduction, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7124-1969.

Igor O. Marinkin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Rector, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9409-482X.