

# Повторные неудачи имплантации. Патогенез иммунологических нарушений в эндометрии

Л.М. Михалёва<sup>1</sup>, М.Р. Оразов<sup>2</sup>, Е.С. Силантьева<sup>3</sup>, Д.П. Камилова<sup>3</sup>, К.Ю. Мидибер<sup>1,2</sup>, Р.Е. Орехов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына»; Россия, г. Москва

<sup>2</sup> ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, г. Москва

<sup>3</sup> ГК «Мать и дитя»; Россия, г. Москва

## РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** расширить представления об иммунологических аспектах патогенеза имплантационной несостоятельности эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) в программах экстракорпорального оплодотворения.

**Дизайн:** проспективное открытое сравнительное исследование.

**Материалы и методы.** В исследование включены 57 женщин в возрасте от 27 до 42 лет (средний возраст составил  $36 \pm 6,2$  года) с клинически верифицированными ПНИ. Группу морфологического контроля составили 30 фертильных женщин, имевших в анамнезе 2 и более родов доношенными здоровыми детьми и не имевших нарушений фертильности, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Материалом исследования являлись биоптаты эндометрия, полученные на 8–10-й день менструального цикла (средняя стадия фазы пролиферации).

**Результаты.** В настоящем исследовании в биоптатах эндометрия пациенток, страдающих ПНИ, в средней стадии фазы пролиферации в строме эндометрия отмечены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) изменения: повышение экспрессии клеток CD56+ в 1,9 раза и CD8+ в 1,5 раза, снижение экспрессии клеток CD4+ в 2,2 раза и нарушение соотношения CD8+/CD4+ в сторону CD8+ по сравнению с таковыми в группе морфологического контроля.

**Заключение.** В основе патогенеза имплантационной несостоятельности у пациенток с ПНИ лежит иммунологический дисбаланс в строме эндометрия, субстратом которого являются недостаточные концентрации проангиогенных NK-клеток, регуляторных супрессивных Т-хелперов, а также повышение плотности цитотоксического класса NK- и Т-клеток, что формирует два ключевых звена патогенеза — снижение иммунологической толерантности к полуаллогенной бластоцисте и нарушение процессов нормального ангиогенеза в строме эндометрия женщин с ПНИ.

**Ключевые слова:** повторные неудачи имплантации, иммунология, местный иммунитет, NK-клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, плазмоциты.

**Вклад авторов:** Михалёва Л.М. — разработка дизайна и проведение исследования, анализ и интерпретация результатов патоморфологического и иммуногистохимического исследований, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации; Оразов М.Р., Силантьева Е.С., Камилова Д.П. — отбор пациенток, разработка дизайна исследования, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации; Мидибер К.Ю. — проведение морфометрии, съемка, монтаж и описание микрофотографий; Орехов Р.Е. — обзор публикаций по теме статьи, сбор клинического материала, обработка, анализ и интерпретация, статистическая обработка данных, написание текста рукописи.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Для цитирования:** Михалёва Л.М., Оразов М.Р., Силантьева Е.С., Камилова Д.П., Мидибер К.Ю., Орехов Р.Е. Повторные неудачи имплантации. Патогенез иммунологических нарушений в эндометрии. Доктор.Ру. 2022; 21(1): 21–26. DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-1-21-26

## Repeated Implant Failures. Pathogenesis of Immunological Disorders in Endometrium

L.M. Mikhaleva<sup>1</sup>, M.R. Orazov<sup>2</sup>, E.S. Silantieva<sup>3</sup>, D.P. Kamilova<sup>3</sup>, K.Yu. Midiber<sup>1,2</sup>, R.E. Orekhov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology; 3 Tsyurupa Str., Moscow, Russian Federation 117418

<sup>2</sup> Peoples' Friendship University of Russia (a Federal Government Autonomous Educational Institution of Higher Education); 6 Miklouho-Maclay Str., Moscow, Russian Federation 117198

<sup>3</sup> Mother and Child; 2 Mozhayskoye Shosse, Moscow, Russian Federation 143081

## ABSTRACT

**Study Objective:** To broaden the understanding of the immunological aspects of implantation incompetence of endometrium in patients with repeated implant failures (RIF) in in vitro fertilisation programs.

**Study Design:** Open perspective comparative study.

Михалёва Людмила Михайловна (**автор для переписки**) — д. м. н., профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии ФГБНУ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына. 117418, Россия, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 2086-7513. <https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>. E-mail: mikhalevalm@yandex.ru

Оразов Мекан Рахимбердыевич — профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского института ФГАУ ВО РУДН, д. м. н., профессор. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 1006-8202. <https://orcid.org/0000-0002-5342-8129>. E-mail: omekan@mail.ru

(Окончание на с. 22.)



**Materials and Methods.** 57 women aged 27 to 42 years old (mean age:  $36 \pm 6.2$  years old) with clinically verified RIF. A morphological control group included 30 fertile women with a history of at least 2 deliveries of full-term healthy children and without fertility disorders, who signed a voluntary informed consent to take part in the study. The subject of the study was endometrium biopsy material obtained on day 8–10 of menstruation (middle stage of the proliferation phase).

**Study Results.** In this study, endometrium biopsy material of patients with RIF demonstrated statistically significant ( $p < 0.05$ ) changes in the middle stage of the proliferation phase: 1.9- and 1.5-fold increase in CD56+ and CD8+ expression, respectively; 2.2-fold reduction in CD4+ expression, and impaired CD8+/CD4+ ratio (increase in CD8+) vs morphological controls.

**Conclusion.** Pathogenesis of implantation incompetence in patients with RIF is caused by immunological imbalance in endometrial stroma, the substrate of which is insufficient concentrations of proangiogenic NK-cells, regulatory suppressive T-helpers, and increased density of the cytotoxic NK- and T-cells; it forms two primary parts of pathogenesis: reduced immunological tolerance to semiallogenic blastocyte and impaired normal angiogenesis in endometrial stroma of women with RIF.

**Keywords:** repeated implant failures, immunology, local immunity, NK-cells, T-lymphocytes, B-lymphocytes, plasmocytes.

**Contributions:** Mikhaleva, L.M. — study design, study conduct, analysis and interpretation of pathomorphology and immunohistochemistry results, review of critically important material, approval of the manuscript for publication; Orazov, M.R., Silantieva, E.S., Kamilova, D.P. — patient selection, study design, review of critically important material, approval of the manuscript for publication; Midiber, K.Yu. — morphometry; photomicrography, assembly and description of photomicrograms; Orekhov, R.E. — thematic publications reviewing, clinical material collection, data processing, analysis and interpretation, statistical data processing, text of the article.

**Conflict of interest:** The authors declare that they do not have any conflict of interests.

**For citation:** Mikhaleva L.M., Orazov M.R., Silantieva E.S., Kamilova D.P., Midiber K.Yu., Orekhov R.E. Repeated Implant Failures. Pathogenesis of Immunological Disorders in Endometrium. Doctor.Ru. 2022; 21(1): 21–26. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-1-21-26

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на бурное развитие и достижения в области репродуктивной медицины, такие как усовершенствование методов культивирования эмбрионов и предимплантационное генетическое тестирование, частота имплантации в циклах ЭКО остается неудовлетворительной [1, 2]. Справедливости ради следует констатировать тот факт, что многие бесплодные пары, обращающиеся в клиники репродуктивной медицины, к сожалению, сталкиваются с клинической ситуацией, ассоциированной с повторными неудачами имплантации (ПНИ) [2, 3].

ПНИ многими авторами определяется как ненаступление клинической беременности после переноса эмбрионов высокого качества по крайней мере в трех последовательных циклах ЭКО при отсутствии каких-либо органических факторов, снижающих ее шансы [4]. В клиническом протоколе «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» Минздрава РФ 2019 года такую клиническую ситуацию называют «Повторные неудачные попытки переноса эмбрионов (имплантации)» и относят к ней случаи трех неудачных попыток селективного (eSET или eDET) переноса «свежих» или размороженных эмбрионов у женщин моложе 35 лет и двух — у женщин 35 лет и старше при отсутствии каких-либо факторов, снижающих шансы наступления беременности.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза ПНИ, остаются предметом дискуссий [4, 5]. Предложено несколько этиологических причин, но до недавнего времени основное внимание уделялось эмбриону и особенно эмбриональной анеуплоидии [6, 7]. Однако даже перенос эуплоидных эмбрионов не всегда приводит к успешной имплан-

тации [8]. Это может говорить о том, что недостаточная рецептивность эндометрия является основным ограничивающим фактором для достижения беременности [5, 9, 10].

Под рецептивностью понимается состояние эндометрия во время окна имплантации — короткого периода менструального цикла в середине лютеиновой фазы, когда эндометрий приобретает адгезивные свойства, способствующие синхронной имплантации эмбриона [1, 11]. В некоторых исследованиях сообщалось, что нарушение рецептивности эндометрия становится причиной примерно двух третей неудач имплантации [1, 5, 9].

Перекрестные связи между эмбрионом и эндометрием опосредуются многими биологически активными веществами, включая цитокины, молекулы адгезии, факторы роста и гормоны [1, 5, 11]. Большинство этих молекул вовлечены в иммунологический процесс, который играет ключевую роль в принятии полуаллогенного эмбриона материнским эндометрием и создании подходящей среды во время имплантации [1, 12].

Среди всех элементов, влияющих на неудачу имплантации эмбрионов высокого качества, иммунная система описывалась исследованиями и как ключевая, и как наиболее контраверсионная [1, 7]. В большинстве существующих исследований изучался только один или несколько маркеров, что имеет ограниченное значение, особенно при таком сложном процессе, как имплантация [13, 14]. В последние годы выдвинуто предположение, что основной причиной ПНИ является иммунный дисбаланс, а репродуктивная иммунология играет ведущую роль в ПНИ, однако до сих пор механизмы этих изменений остаются плохо изученными [7, 8]. Таким образом, исследование местного иммунитета эндометрия может помочь женщинам с необъяснимыми ПНИ в циклах ЭКО [3].

Силантьева Елена Сергеевна — д. м. н., заместитель главного врача по реабилитации Клинического госпиталя Лапино ГК «Мать и дитя». 143081, Московская обл., г. Лапино, 1-е Успенское шоссе, д. 111. <https://orcid.org/0000-0002-7667-3231>. E-mail: [e.silantieva@mcclinics.ru](mailto:e.silantieva@mcclinics.ru)

Камилова Дилором Пулатовна — к. м. н., главный специалист по ЭКО ГК «Мать и дитя», врач акушер-гинеколог, репродуктолог клиники ГК «Мать и дитя» Кунцево. 121374, Россия, г. Москва, Можайское шоссе, д. 2. <https://orcid.org/0000-0001-6226-5117>. E-mail: [d.kamilova@mcclinics.ru](mailto:d.kamilova@mcclinics.ru)

Мидибер Константин Юрьевич — научный сотрудник лаборатории клинической морфологии ФГБНУ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына; ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института ФGAOY BO PУДH. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 6891-6636. <https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>. E-mail: [midiberkonst@gmail.com](mailto:midiberkonst@gmail.com)

Орехов Роман Евгеньевич — ассистент кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Медицинского института ФGAOY BO PУДH. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. eLIBRARY.RU SPIN: 4772-9867. <https://orcid.org/0000-0002-2775-9266>. E-mail: [rotanorekhov@yandex.ru](mailto:rotanorekhov@yandex.ru)

(Окончание. Начало см. на с. 21.)

В связи с изложенным вопросы, касающиеся изучения ультратонких механизмов патогенеза имплантационной несостоятельности при ПНИ в рамках повышения эффективности программ ЭКО, представляют значительный интерес для практического здравоохранения и для женщин, планирующих использование ВРТ. Это и определило выбор цели и задач настоящего исследования.

**Цель исследования:** расширить представления об иммунологических аспектах патогенеза имплантационной несостоятельности эндометрия у пациенток с ПНИ в программах ЭКО.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В проспективное открытое сравнительное исследование включены 57 женщин (основная группа) в возрасте от 27 до 42 лет (средний возраст составил  $36 \pm 6,2$  года) с клинически верифицированными ПНИ, согласно клиническому протоколу «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация». Группу морфологического контроля составили 30 фертильных женщин, имевших в анамнезе 2 и более родов доношенными здоровыми детьми и не имевших нарушений фертильности, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом исследования являлись биоптаты эндометрия, полученные путем пайпель-биопсии на 8–10-й день менструального цикла (в среднюю стадию фазы пролиферации) для объективной патоморфологической верификации состояния эндометрия. Полученные биоптаты после фиксации в 10%-ном забуференном формалине и гистологической обработки в автоматическом гистопротессоре Leica ASP 30 (Германия) заливали в парафин на станции Leica EG 1150 (Германия). Производилась окраска срезов толщиной 4 микрометра гематоксилином и эозином при помощи станции Leica ST5010 (Германия).

Обзорное микроскопическое исследование материала проводилось посредством микроскопа Leica DMLB с использованием цифровой камеры Leica DFC420 (Германия). В полученных микропрепаратах осуществлялась патоморфологическая оценка состояния эндометрия.

Имуногистохимическое исследование эндометрия с антителами с целью изучения местного иммунитета проводили с антителами к CD4+ (Т-лимфоциты) — клон SP35 Ventana, CD8+ (Т-лимфоциты) — клон SP57 Ventana, CD20+ (зрелые В-лимфоциты) — клон L26 фирмы DAKO, CD56+ NK — клон CD56+ 4 Leica Bond, CD138+ на плазматические клетки — клон MI15 DAKO. Имуногистохимическое окрашивание производилось в иммуностейнере Ventana BenchMark Ultra IHDSh (США), Bond-maX (Германия). Для иммуноокрашивания использовали систему визуализации Ultra Vision TL-015-HD Lab Vision.

Экспрессию иммуногистохимических маркеров изучали в трех неперекрывающихся полях зрения при 400-кратном увеличении с помощью микроскопа Leica DMLB и цифровой камеры Leica DFC420 (Германия).

Для определения нормальности распределения параметров был применен критерий Колмогорова — Смирнова. Результаты иммуногистохимического исследования представлены в виде суммы DAB-позитивных клеток в полях зрения при 400-кратном увеличении. Все данные отображены в виде медианного значения — Me (25%; 75%).

Статистическое сравнение групп осуществлялось при помощи непараметрических методов. Для выявления статистической значимости результатов использовался критерий Манна — Уитни. В случае оценки качественных признаков

применен двусторонний критерий Фишера. Результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Обработку данных проводили с использованием пакета программ электронных таблиц Microsoft Excel и программы IBM SPSS Statistics 26.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Эндометрий в средней стадии фазы пролиферации у пациенток с ПНИ продемонстрировал изменения экспрессии исследуемых иммунологических маркеров в сравнении с показателями группы морфологического контроля (табл.).

При патоморфологическом исследовании гистологических препаратов эндометрия, окрашенных гематоксилином и эозином, у пациенток основной группы маточные железы морфологически соответствовали средней стадии фазы пролиферации, в части образцов определялись невыраженные фокусы уплотнения стромы эндометрия за счет неких «завихрений», преимущественно вокруг маточных желез, и мелкие очаги воспалительной инфильтрации, а также умеренное утолщение стенки кровеносных сосудов, что может соответствовать слабо выраженному хроническому эндометриту (рис. 1).

Для уточнения клеточного состава воспаления и состояния местного иммунитета у пациенток основной группы нами проведено иммуногистохимическое исследование.

В настоящем исследовании при иммуногистохимическом анализе биоптатов эндометрия в средней стадии фазы пролиферации у пациенток, страдающих ПНИ, отмечено статистически значимое увеличение числа экспрессированных CD56+ клеток (в почти в 2 раза) по сравнению с таковым у здоровых женщин (рис. 2 А, В).

В дополнение к этому наблюдались статистически значимые уменьшение экспрессии клеток CD4+ (в 2,2 раза) (рис. 2 С, D) и повышение экспрессии CD8+ (в 1,5 раза) по сравнению с таковыми в группе морфологического контроля (рис. 2 Е, F), что сопровождалось дисбалансом между CD4+ и CD8+ в сторону превалирования последних (см. табл.).

Таблица / Table

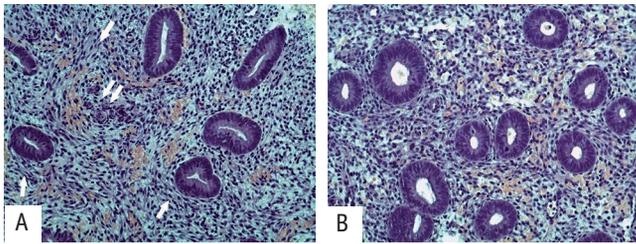
**Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации и фертильных женщин, Me (25%; 75%)**  
**Immunohistochemistry results for endometrium biopsy samples of patients with repeated implant failures and of fertile women, Me (25%; 75%)**

Имунологические маркеры / Immunological markers	Основная группа / Study group	Группа морфологического контроля / Morphological controls
CD4+	2,4 (0,8; 8,1)*	5,3 (4,8; 9,2)
CD8+	14,1 (7,5; 14,2)*	9,3 (8,3; 11,4)
CD56+	1,2 (8,3; 12,5)*	5,4 (2,1; 8,4)
CD8+/CD4+	6,2 (3,4; 8,2)*	2,6 (1,2; 4,3)
CD20+	8,3 (7,1; 10,2)	7,5 (6,3; 12,6)
CD138+	2,3 (1,6; 4,4)	1,3 (0,4; 3,2)

\* Отличия от группы морфологического контроля статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

\* Differences vs morphological controls are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Рис. 1. А — основная группа, бесплодие 1, повторные неудачи имплантации: эндометрий соответствует средней стадии фазы пролиферации, в строме и вокруг маточных желез определяются мелкие фокусы фиброза в виде «завихрений» (стрелки), утолщение стенок мелких артериальных сосудов (двойная стрелка). В — группа морфологического контроля: эндометрий соответствует средней стадии фазы пролиферации. Окраска гематоксилином и эозином, 200-кратное увеличение. *Здесь и далее иллюстрации Мидибера К.Ю.*  
 Fig. 1. A: study group, primary sterility, repeated implant failures: endometrium corresponds to middle stage of proliferation phase; there are small “vortex” fibrous foci (arrows) and thickened arterial vessel walls (double arrows) in the stroma and around uterine glands. B: morphological controls: endometrium corresponds to middle stage of proliferation phase. H&E staining, x200 magnification.  
*All photos in the paper courtesy of Midiber, K.Yu.*



Выявлено также незначительное (в 1,1 раза) увеличение числа экспрессированных CD20+ клеток у пациенток с ПНИ (рис. 3 А, В).

При иммуногистохимической реакции с антителом к CD138+ в 11% клинических наблюдений с ПНИ выявлены 1–2 плазматические клетки в строме (рис. 3 С, D), подтверждавшие наличие у этих пациенток слабо выраженного хронического эндометрита. У здоровых женщин они отсутствовали.

Полученные результаты комплексного патоморфологического исследования продемонстрировали дисбаланс в местном иммунитете эндометрия у пациенток с ПНИ между клетками CD4+ и CD8+ в пользу последних Т-лимфоцитов, у здоровых женщин, напротив, было больше CD4+.

Наряду с дисбалансом между Т-лимфоцитами нами выявлено увеличение числа маркеров зрелых В-лимфоцитов CD20+ в эндометрии пациенток с ПНИ по сравнению с показателем группы морфологического контроля.

Одновременно обнаружено статистически значимое повышение числа CD56+ клеток, относящихся к натуральным киллерам.

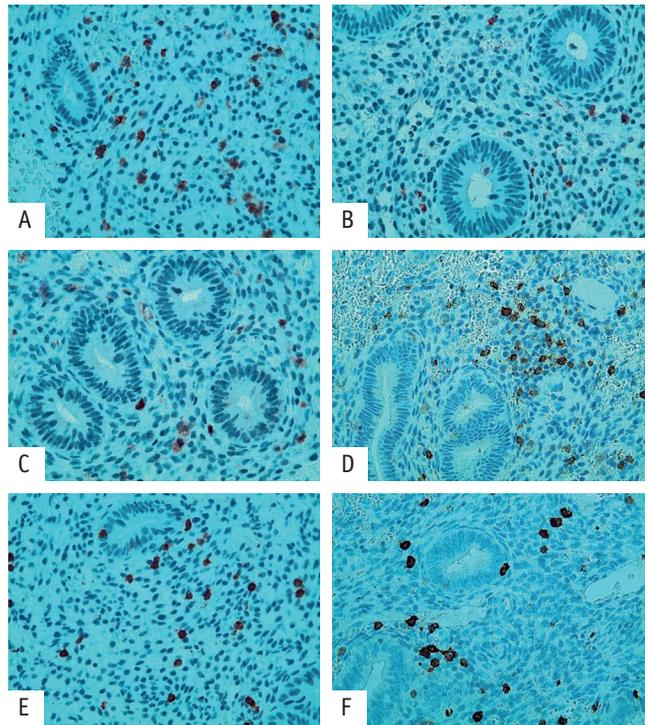
Результаты иммуногистохимического исследования сочетаются с патоморфологическими находками, свидетельствующими о наличии слабо выраженного хронического эндометрита у 11% пациенток с ПНИ. Полученные морфологические данные тесно связаны с иммунобиологией имплантации.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Эндометриальные гранулоциты (большие гранулярные лимфоциты) относятся к особой популяции NK-клеток. По сравнению с типичными естественными киллерами эндометриальные гранулоциты отличаются высокой экспрессией

Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) и участниц группы морфологического контроля (400-кратное увеличение). А — основная группа, бесплодие 1, ПНИ: положительная экспрессия CD56+, 34 клетки в поле зрения. В — группа морфологического контроля: положительная экспрессия CD56+; 7 клеток в поле зрения. С — основная группа, бесплодие 1, ПНИ: положительная экспрессия CD4+; 9 клеток в поле зрения. D — группа морфологического контроля: положительная экспрессия CD4+; 38 клеток в поле зрения. E — основная группа, бесплодие 1, ПНИ: положительная экспрессия CD8+; 23 клетки в поле зрения. F — группа морфологического контроля: положительная экспрессия CD8+; 27 клеток в поле зрения

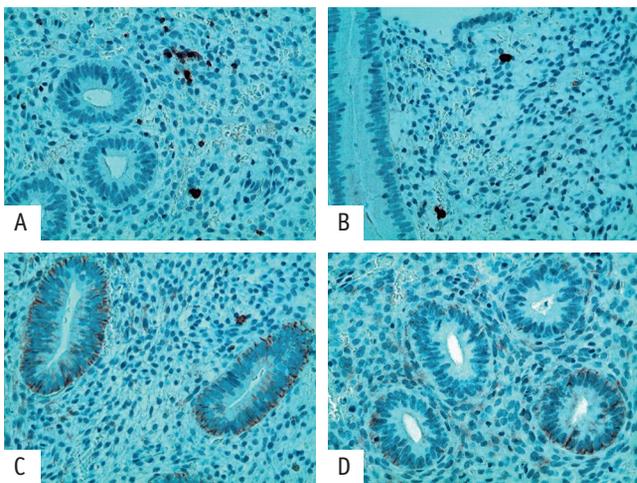
Fig. 2. Immunohistochemistry of patients with repeated implant failures (RIF) and of morphological controls (x400 magnification). A: study group, primary sterility, RIF: positive CD56+ expression, 34 cells per HPF. B: morphological controls: positive CD56+ expression, 7 cells per HPF. C: study group, primary sterility, RIF: positive CD4+ expression, 9 cells per HPF. D: morphological controls: positive CD4+ expression, 38 cells per HPF. E: study group, primary sterility, RIF: positive CD8+ expression, 23 cells per HPF. F: morphological controls: positive CD8+ expression, 27 cells per HPF



CD56 (адгезивной молекулы, участвующей в реакции цитотоксичности) при отсутствии других маркеров NK-клеток, а именно CD16 и CD57.

Популяция лейкоцитов эндометрия состоит в основном из маточных естественных клеток-киллеров (uNK), макрофагов

Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) и участниц группы морфологического контроля (400-кратное увеличение). А — основная группа, бесплодие 1, ПНИ: положительная экспрессия CD20+; 6 клеток в поле зрения. В — группа морфологического контроля: положительная экспрессия CD20+; 2 клетки в поле зрения. С — основная группа, бесплодие 1, ПНИ: положительная экспрессия CD138+; 2 клетки в поле зрения. Д — группа морфологического контроля: негативная экспрессия CD138+; 0 клеток в поле зрения



и Т-клеток и заметно отличается от таковой в периферической крови [15]. Количество клеток CD56+ изменяется в течение менструального цикла с резким увеличением в середине секреторной фазы, начинающейся через 6–7 дней после сильного повышения уровня ЛГ, что является началом предполагаемого времени имплантации [16].

Приблизительно 10% NK-клеток стромы эндометрия являются CD56+ и CD16+, которые похожи, но не идентичны периферическим NK-клеткам, в то время как 90% популяции имеют различные фенотипы CD56 и CD16 [16, 17]. Субпопуляции маточных NK-клеток можно подразделить на два класса, которые отличаются маркерами, а также функциональными свойствами: цитотоксический класс CD56–CD16+ и проангиогенный класс CD56+CD16– [15, 18–20].

Данные, полученные в нашем исследовании, продемонстрировали статистически значимый рост числа CD56+ клеток, что свидетельствует о повышении плотности цитотоксической субпопуляции NK-клеток, а также позволяет косвенно

предположить снижение плотности проангиогенной субпопуляции в строме эндометрия пациенток с ПНИ.

На сегодняшний день выделено множество Т-лимфоцитарных субпопуляций лейкоцитов, имеющих различную экспрессию антигенов и функциональную активность. Особенный интерес с позиции имплантационного потенциала представляют Foxp3+ Т-регуляторные клетки, которые являются уникальными представителями супрессивных CD4+ Т-хелперов, участвующих в реализации иммунной толерантности к собственным и чужеродным антигенам у людей и мышей [21–24]. Показано, что во время имплантации и беременности возрастает количество Treg-клеток в периферической крови как у людей [25, 26], так и у мышей [27], а дальнейшие исследования выявили, что стимуляция плода аллоантигенами является основной движущей силой в увеличении числа Treg-клеток [28, 29].

Повышение уровней Т-регуляторных клеток в день переноса эмбрионов было связано с более высокой частотой имплантации [30]. Данные, полученные в нашем исследовании, продемонстрировали относительное статистически значимое уменьшение экспрессии клеток CD4+ в строме пациенток с ПНИ, что позволяет предположить снижение иммуносупрессивной активности Т-регуляторных клеток в эндометрии. Повышенная экспрессия CD8+ предполагает увеличение концентраций цитотоксических Т-лимфоцитов, что является следствием недостаточной супрессивной активности регуляторных Т-хелперов в строме эндометрия пациенток с ПНИ.

В-лимфоциты (CD20+) в неизменном эндометрии единичны (обычно 1–3 клетки), в случаях развития хронического воспаления в эндометрии в зависимости от степени выраженности воспалительного процесса число CD20+ клеток может возрастать. В нашем исследовании у пациенток с ПНИ и наличием слабо выраженного хронического эндометрита число CD20+ клеток увеличивалось до 6. Одновременно в эндометрии у этих пациенток (около 11%) диагностированы единичные CD138+ (1–2 плазматические клетки), что позволяет предположить, что хроническая инфекция в эндометрии не является ведущей причиной наблюдаемых изменений в экспрессии иммунных клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В основе патогенеза имплантационной несостоятельности у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) лежит иммунологический дисбаланс в строме эндометрия, субстратом которого являются недостаточные концентрации проангиогенных NK-клеток, регуляторных супрессивных Т-хелперов, а также повышение плотности цитотоксического класса NK- и Т-клеток, что формирует два ключевых звена патогенеза — снижение иммунологической толерантности в полуаллогенной бластоцисте и нарушения процессов нормального ангиогенеза в строме эндометрия женщин с ПНИ.

С целью проверки этой гипотезы и определения клинической значимости иммуногистохимической оценки маркеров CD4, CD8, CD20 и CD56 для улучшения показателей имплантационной состоятельности и наступления беременности необходимо провести дальнейший анализ с большим размером выборки; однако мы можем предположить, что они могут служить высокоинформативными прогностическими маркерами ПНИ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pathare A.D.S., Zaveri K., Hinduja I. Downregulation of genes related to immune and inflammatory response in IVF implantation failure cases under controlled ovarian stimulation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017; 78(1): e12679. DOI: 10.1111/aji.12679
- Цыпурдеева Н.Д., Коган И.Ю., Савичева А.М. и др. Особенности микробиоты эндометрия у пациенток с неэффективными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе и хроническим эндометритом. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2016; 65(специал.): 27–8. [Tsyurdeeva N.D., Kogan I.Yu., Savicheva A.M. et al. Characteristics of endometrium microsite in patients with a history of inefficient in vitro fertilisation attempts and chronic endometritis. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2016; 65S: 27–8. (in Russian)]
- Lédée N., Petitbarat M., Chevrier L. et al. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016; 75(3): 388–401. Doi: 10.1111/aji.12483
- Comins-Boo A., García-Segovia A., del Prado N.N. et al. Evidence-based update: immunological evaluation of recurrent implantation failure. *Reprod. Immunol. Open Acc.* 2016; 1(4): 24. DOI: 10.4172/2476-1974.100024
- Оразов М.Р., Орехов Р.Е., Камилова Д.П. и др. Тайны патогенеза повторных неудач имплантации. *Трудный пациент.* 2020; 18(4): 43–8. [Orazov M.R., Orekhov R.E., Kamilova D.P. et al. Secrets of pathogenesis in repeated implantation failure. *Difficult Patient.* 2020; 18(4): 43–8. (in Russian)]. DOI: 10.24411/2074-1995-2020-10030
- Hashimoto T., Koizumi M., Doshida M. et al. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: a retrospective, two-centers study. *Reprod. Med. Biol.* 2017; 16(3): 290–6. DOI: 10.1002/rmb2.12041
- Franasiak J.M., Scott R.T. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. *Fertil. Steril.* 2017; 107(6): 1279–83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.019
- García-Velasco J.A. Introduction: immunology and assisted reproductive technology in the 21st century. *Fertil. Steril.* 2017; 107(6): 1267–8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.017
- Shi C., Shen H., Fan L.J. et al. Endometrial microRNA signature during the window of implantation changed in patients with repeated implantation failure. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2017; 130(5): 566–73. DOI: 10.4103/0366-6999.200550
- Айламазян Э.К., Толибова Г.Х., Траль Т.Г. и др. Новые подходы к оценке эндометриальной дисфункции. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2017; 66(3): 8–15. [Aylamazyan E.K., Tolibova G.Kh., Tral T.G. et al. New approaches to the estimation of endometrial dysfunction. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2017; 66(3): 8–15. (in Russian)]. DOI: 10.17816/JOWD6638-15
- Dekel N., Gnainsky Y., Granot I. et al. The role of inflammation for a successful implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72(2): 141–7. DOI: 10.1111/aji.12266
- Piccinni M.P., Lombardelli L., Logiodice F. et al. T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. *Clin. Mol. Allergy.* 2015; 13(1): 9. DOI: 10.1186/s12948-015-0015-y
- Huang J., Qin H., Yang Y. et al. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproduction.* 2017; 153(6): 749–58. DOI: 10.1530/REP-16-0574
- Gong Q., Zhu Y., Pang N. et al. Increased levels of CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5+ CD4+ T cells, and associated factors Bcl-6, CXCR5, IL-21 and IL-6 contribute to repeated implantation failure. *Exp. Ther. Med.* 2017; 14(6): 5931–41. DOI: 10.3892/etm.2017.5334
- Tuckerman E., Mariee N., Prakash A. et al. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 87(1–2): 60–6. DOI: 10.1016/j.jri.2010.07.001
- Laird S.M., Tuckerman E.M., Cork B.A. et al. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Update.* 2003; 9(2): 163–74. DOI: 10.1093/humupd/dmg013
- Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59(5): 388–400. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2008.00596.x
- Junovich G., Azpiroz A., Incera E. et al. Endometrial CD16(+) and CD16(–) NK cell count in fertility and unexplained infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013; 70(3): 182–9. DOI: 10.1111/aji.12132
- Carlino C., Stabile H., Morrone S. et al. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood.* 2008; 111(6): 3108–15. DOI: 10.1182/blood-2007-08-105965
- Vacca P., Vitale C., Montaldo E. et al. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(6): 2402–7. DOI: 10.1073/pnas.1016257108
- Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(3): 199–210. DOI: 10.1038/nri1027
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133(5): 775–87. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009
- Bilate A.M., Lafaille J.J. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 733–58. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075043
- Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2010; 11(1): 7–13. DOI: 10.1038/ni.1818
- Somerset D.A., Zheng Y., Kilby M.D. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004; 112(1): 38–43. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x
- Santner-Nanan B., Peek M.J., Khanam R. et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J. Immunol.* 2009; 183(11): 7023–30. DOI: 10.4049/jimmunol.0901154
- Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 2004; 5(3): 266–71. DOI: 10.1038/ni1037
- Kahn D.A., Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(20): 9299–304. DOI: 10.1073/pnas.1003909107
- Rowe J.H., Ertelt J.M., Xin L. et al. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains antigen to fetal antigen. *Nature.* 2012; 490(7418): 102–6. DOI: 10.1038/nature11462
- Wang W.J., Liu F.J., Zhang X. et al. Periodic elevation of regulatory T cells on the day of embryo transfer is associated with better in vitro fertilization outcome. *J. Reprod. Immunol.* 2017; 119: 49–53. DOI: 10.1016/j.jri.2017.01.002 

Поступила / Received: 12.10.2021

Принята к публикации / Accepted: 30.11.2021