

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ВЛИЯНИЯ ТРАВМЫ ЭНДОМЕТРИЯ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ЭКО У ЖЕНЩИН С «МАЛЫМИ» ФОРМАМИ ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

Красильникова А.К.¹, Малышкина А.И.^{1,2}, Сотникова Н.Ю.^{1,2}, Бойко Е.Л.¹, Воронин Д.Н.¹, Семененко С.С.¹

¹ФГБУ «Ив НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, e-mail: ivniimid@inbox.ru;

²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: adm@isma.ivanovo.ru

Цель исследования – провести сравнительный анализ эффективности разных методов травматизации эндометрия и их влияния на продукцию цитокинов макрофагами эндометрия при подготовке к ЭКО у женщин с бесплодием, обусловленным генитальным эндометриозом I–II стадии. Обследованы 57 женщин с бесплодием и генитальным эндометриозом I–II стадии при подготовке к ЭКО. Пациентки были разделены на 2 группы в зависимости от способа нанесения травмы эндометрия: 1-я (n=17) – методом скретчинга, 2-я (n=40) – отдельным диагностическим выскабливанием полости матки при гистероскопии. Внутриклеточную продукцию цитокинов эндометриальными макрофагами определяли методом проточной цитофлуориметрии. Травма эндометрия путем скретчинга приводила к снижению внутриклеточной продукции IL-6, IFN γ макрофагами эндометрия по сравнению с исходными данными. В случае нанесения травмы эндометрия отдельным диагностическим выскабливанием полости матки существенных сдвигов в продукции цитокинов на локальном уровне не наблюдалось. Тем не менее сама травматизация эндометрия независимо от метода нанесенной травмы может повышать результативность ЭКО у женщин с бесплодием и «малыми» формами генитального эндометриоза. Эффективность ЭКО не зависит от техники нанесения локальной травмы эндометрия. У пациенток с наступившей беременностью в протоколах ЭКО происходили повышение изначально сниженных показателей и снижение изначально повышенных показателей внутриклеточной продукции цитокинов эндометриальными макрофагами независимо от метода травматизации.

Ключевые слова: локальная травма эндометрия, бесплодие, «малые» формы эндометриоза, эндометрий, макрофаги, цитокины.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS AND EFFECT OF ENDOMETRIAL INJURY ON INTRACELLULAR CYTOKINE PRODUCTION IN PREPARATION FOR IVF IN WOMEN WITH "SMALL" FORMS OF GENITAL ENDOMETRIOSIS

Krasilnikova A.K.¹, Malysheva A.I.^{1,2}, Sotnikova N.Yu.^{1,2}, Boyko E.L.¹, Voronin D.N.¹, Semenenko S.S.¹

¹FGBI «Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named after V.N. Gorodkov» Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: ivniimid@inbox.ru;

²FSBEI HE «Ivanovo State Medical Academy» Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: adm@isma.ivanovo.ru

The aim of the study. To carry out a comparative analysis of the effectiveness of different methods of endometrial trauma and their effect on the production of cytokines in preparation for IVF in women with infertility due to stage I-II genital endometriosis. 57 women with infertility and I–II stage genital endometriosis during preparation for IVF were examined. Patients were divided into 2 groups depending on the method of inflicting endometrial injury: First (n=17) – by method of scutching, Second (n=40) – by separate diagnostic curettage of the uterine cavity during hysteroscopy. Cytokine intracellular production macrophages were assessed by flow cytometry method. However endometrial trauma by the method of scutching led to the normalization of intracellular production of IL-1 β , IL-6, IFN γ by endometrial macrophages. In case of inflicting endometrial injury by separate diagnostic curettage of the uterine cavity no significant shifts in cytokine production local level were observed. Nevertheless, the very trauma of the endometrium, regardless of the method of injury, can increase the effectiveness of IVF in women with infertility and «small» forms of genital endometriosis. The effectiveness of IVF does not depend on the technique of applying local trauma to the endometrium. In patients with the onset of pregnancy in IVF protocols, there was an increase in the initially decreased indicators and a decrease in the initially

increased indicators of intracellular cytokine production by endometrial macrophages, regardless of the method of trauma.

Keywords: local endometrial trauma, infertility, «small» forms of endometriosis, endometrium, macrophages, cytokines.

Бесплодие, ассоциируемое с эндометриозом, является одной из основных причин обращения женщин к использованию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1], которые имеют относительно невысокий процент эффективности [2]. Часто виновником неудач в экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) выступает нарушение процессов взаимодействия между бластоцистой и эндометрием [3] при исключении генетических аномалий. В качестве метода, повышающего имплантационные свойства эндометрия перед проведением программы ЭКО, была предложена методика травматизации эндометрия путем скретчинга (нанесения линейных насечек на эндометрий) [4] или отдельным диагностическим выскабливанием (РДВ) полости матки. Высказывается предположение, что «дозированное» нарушение целостности эндометрия приводит к развитию местной воспалительной реакции с массивной секрецией ростовых факторов и провоспалительных цитокинов, способствует ремоделированию ткани и повышению чувствительности рецепторов эндометрия, под действием этих процессов внутренняя поверхность матки становится более «липкой», и шансы на удачную имплантацию возрастают [5]. Однако отсутствует четкое понимание механизма действия травмирующего фактора на эндометрий. Нет убедительных данных в выборе оптимального метода нанесения травмы эндометрия в программе ЭКО [6].

Цель исследования – провести сравнительный анализ эффективности разных методов травматизации эндометрия и их влияния на продукцию цитокинов макрофагами эндометрия при подготовке к ЭКО у женщин с бесплодием, обусловленным генитальным эндометриозом I–II стадии.

Материал и методы исследования

Отбор и обследование пациенток осуществлялись в отделении ВРТ и лаборатории клинической иммунологии на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Основной причиной обращения женщин в отделение ВРТ было отсутствие беременности при регулярной половой жизни без контрацепции в течение 12 месяцев после установленного диагноза бесплодия, обусловленного генитальным эндометриозом I–II стадии. Диагноз генитального эндометриоза был подтвержден при лапароскопии с морфологическим исследованием материала. Всего обследованы 57 пациенток, которые методом рандомизации в зависимости от способа

нанесения травмы эндометрия на 7–10-й постовуляторный день были разделены на две группы: 1-ю группу составили 17 женщин, которым проводился скретчинг эндометрия; 2-ю группу – 40 женщин, которым проводилось отдельное диагностическое выскабливание полости матки при гистероскопии. Контрольное исследование эндометрия (забор материала пайпель-зондом) в обеих группах проводилось на 7–10-й постовуляторный день следующего менструального цикла перед началом стимуляции суперовуляции по «длинному» протоколу. Забор биоптата эндометрия осуществлялся после подписания женщиной информированного согласия.

Внутриклеточную продукцию цитокинов IL-1 β , IL-6, IFN γ эндометриальными макрофагами определяли с помощью моноклональных антител (мАТ) в гейте CD14+CD45+ клеток методом многоцветной проточной цитофлюориметрии на приборе FACSCantoII (Becton Dickinson, USA). Процедуру пермеабилзации клеточной мембраны осуществляли с использованием коммерческого набора FIX & PERM cell permeabilization kit (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета лицензионных программ «Microsoft Office 2013», «Statistica for Windows 13.0». При сравнении лабораторных данных между группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Статистический анализ изменений между показателями эндометрия первого и контрольного заборов в исследуемых группах проводился с использованием критерия Вилкоксона для зависимых групп. В таблицах данные представлены в формате – медиана с указанием первого и третьего квартилей (Me(Q1;Q3)). Значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Все женщины на момент включения в группы исследования были сопоставимы между собой по возрасту, образованию, социальному статусу, показателям репродуктивного и общесоматического здоровья, генитальной и экстрагенитальной патологии, по структуре применяемой контрацепции. Всем пациенткам проводился протокол стимуляции суперовуляции с аГнРГ в программе ЭКО.

При анализе внутриклеточной продукции цитокинов эндометриальными макрофагами в момент нанесения травмы эндометрия было выявлено, что у женщин обеих групп показатели были сопоставимы между собой и не имели значимых различий ($p > 0,05$ во всех случаях) (таблица). Через 1 месяц после нанесения травмы эндометрия методом скретчинга показатели внутриклеточной продукции IL-6 и IFN γ эндометриальными макрофагами снижались по сравнению с исходными данными ($p = 0,016$ и $p = 0,050$ соответственно). В то же время РДВ не оказывало существенного влияния на показатели продукции IL-6 и IFN- γ эндометриальными

макрофагами ($p > 0,05$ в обоих случаях). Неизменным оставался и уровень внутриклеточной продукции IL-1 β макрофагами ($p > 0,05$) независимо от способа травматизации эндометрия.

Динамика показателей внутриклеточной продукции цитокинов эндометриальными макрофагами при использовании разных методов нанесения травмы эндометрия

Параметр	1-я группа (n=17)		2-я группа (n=40)	
	Метод скретчинга День 0	Пайпель-биопсия Через 1 месяц	РДВ День 0	Пайпель-биопсия Через 1 месяц
IL-1 β , %	35,95 (33,07;40,83)	40,07 (34,74;46,29)	34,75 (18,91;46,67)	31,07 (23,90;46,10)
IL-6, %	51,05 (34,04;63,26)	41,07 (34,44;44,70) $p=0,016$	39,41 (25,2;50,34)	35,50 (29,82;38,97)
IFN γ , %	42,89 (31,37;51,46)	28,10 (24,66;36,04) $p=0,050$	37,22 (27,95;46,88)	36,65 (24,90;43,70)

Примечание: p – критерии значимости различий результатов до и после нанесения травмы эндометрия по критерию Вилкоксона для зависимых групп.

В следующем цикле после контрольной биопсии эндометрия пациентки всех групп исследования вступали в программу ЭКО. Для стимуляции суперовуляции была применена стандартная схема: диферелин, гонал Ф, в качестве триггеров овуляции использовались хорагон и овитрель. Поддержка эндометрия производилась назначением в первую фазу трансдермальных и пероральных препаратов эстрогенового ряда, вторая фаза формировалась назначением пероральных (дидрогестерон) или вагинальных (микронизированные прогестероны) форм прогестеронов.

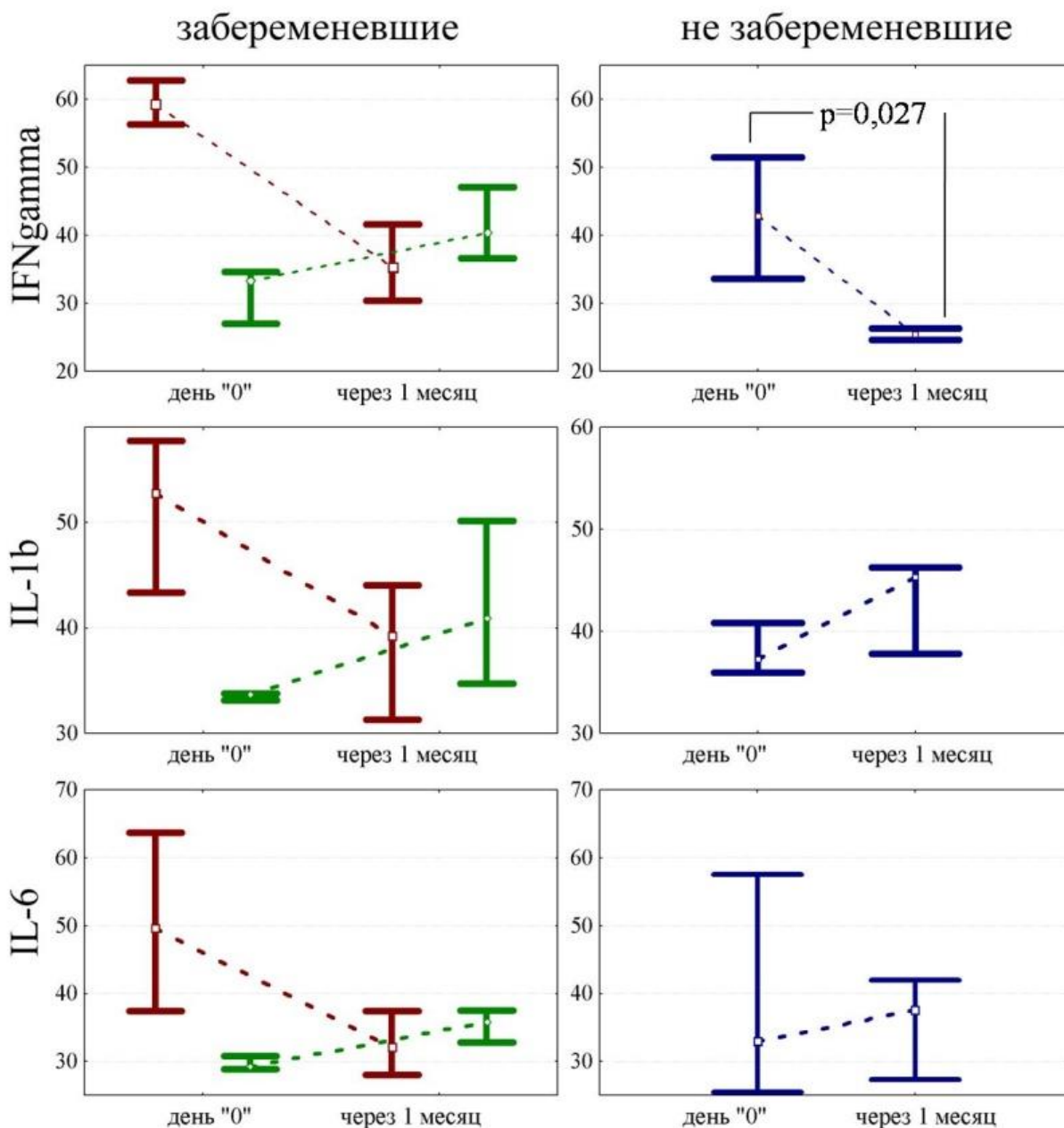
Нами не было получено данных о существенных различиях по количеству пунктированных фолликулов, полученных ооцитов и оплодотворившихся ооцитов у женщин обеих групп ($p > 0,05$ во всех случаях).

Частота клинической беременности, подтвержденной наличием плодного яйца в полости матки по данным УЗИ, была сопоставима в обеих группах: 58,8% (10/17) в группе пациенток, которым выполнялся скретчинг эндометрия, и 52,9% (21/40) в группе женщин, которым выполнялось РДВ ($p > 0,05$). Высокий процент наступления беременности у пациенток может свидетельствовать о положительном влиянии механической травмы эндометрия на успех проведения ЭКО независимо от метода ее нанесения. Наши результаты

подтверждаются литературными данными с указанием значительной разницы в частоте наступления клинической беременности в программе ЭКО у женщин после механической стимуляции эндометрия – 47–49% [7, 8] и без – 35–37% [9].

Анализ течения беременности показал, что у 1 пациентки 1-й группы (10%) произошел самопроизвольный выкидыш до 12 недель беременности, у 3 (30%) женщин беременность закончилась преждевременными родами в сроке 35–36 недель, у 6 женщин (60%) роды произошли своевременно. Во 2-й группе у 4 женщин (19%) беременности завершилась ранними самопроизвольными выкидышами, у 4 пациенток (19%) произошли преждевременные роды в сроке 34–36 недель, 13 пациенток (62%) родили в срок доношенной беременности.

С целью оценки зависимости между иммунологическими показателями и наступлением беременности в протоколах ЭКО обследованные женщины были дополнительно разделены на 2 подгруппы: 1-ю (n=7) составили женщины с наступившей беременностью, 2-ю (n=19) – с отсутствием беременности. Было отмечено, что у женщин с наступившей беременностью в протоколах ЭКО происходили повышение изначально сниженных показателей и снижение изначально повышенных показателей внутриклеточной продукции цитокинов эндометриальными макрофагами независимо от метода травматизации (рисунок). Мы предположили, что на фоне травмы эндометрия происходит нормализация внутриклеточной продукции макрофагами всех изучаемых цитокинов: IL-1 β , IL-6, IFN γ . Макрофаги играют важную роль в поддержании иммунного равновесия во время беременности [10]. Особенно велика их роль на ранних этапах беременности в период децидуализации и имплантации. Нарушение маточного микроокружения в этот период оказывает существенное влияние на макрофагальную активность и в дальнейшем – на исход беременности. У пациенток с отсутствием беременности в протоколах ЭКО после нанесения травмы отмечалось снижение внутриклеточной продукции IFN γ эндометриальными макрофагами (p=0,027). Предположительно, происходит сдвиг поляризации макрофагов в сторону альтернативно активированных провоспалительных макрофагов, которые не способны к поддержанию ремоделирования эндометрия и формированию функциональной плаценты [10].



Внутриклеточная продукция цитокинов эндометриальными макрофагами у обследованных женщин при наступлении и отсутствии беременности

В ранее проведенных нами исследованиях было показано, что, с одной стороны, при генитальном эндометриозе отмечаются выраженные воспалительные изменения на уровне перитонеальной полости, более того, тяжесть воспалительных изменений была прямо пропорциональна стадии эндометриоза [11]. С другой стороны, известно, что повреждение эндометрия создает особые условия, сходные с воспалительным процессом, которые благоприятны для имплантации и роста плода [12]. Существует несколько гипотез, объясняющих положительный эффект травматизации эндометрия на частоту наступления беременности. Наиболее распространенной является теория воспаления, согласно которой

локальная травма эндометрия приводит к развитию местной воспалительной реакции, создавая благоприятное для плода микроокружение, что, в свою очередь, может способствовать установлению взаимодействия между бластоцистой и эндометрием, обеспечивая процесс имплантации. Воспалительный ответ индуцирует выработку провоспалительных цитокинов и последующее рекрутирование макрофагов и других иммунных клеток, которые участвуют в процессе имплантации [12].

При травматизации эндометрия путем скретчинга у женщин с бесплодием и генитальным эндометриозом I–II стадии мы отмечали статистически значимое снижение внутриклеточной продукции макрофагами IL-6 и IFN γ на фоне неизменной продукции IL-1 β . Данный факт можно расценивать как положительный момент, необходимый для купирования излишней воспалительной реакции, которая всегда присутствует у больных с бесплодием и эндометриозом и лежит в основе многих неудач ЭКО. Минимальная локальная травма при скретчинге лишь местно стимулирует воспаление с развитием классических гуморальных, клеточных и сосудистых реакций, в остальной ткани эндометрия начинают активироваться процессы репарации и васкулогенеза за счет изменения состава цитокинов/хемокинов, факторов роста, молекул адгезии, накопления специфических иммунных клеток, макрофагов, дендритных клеток и естественных киллеров, что улучшает рецептивность слизистой оболочки полости матки и снижает уровень общей воспалительной реакции [13].

При травматизации эндометрия путем РДВ полости матки в период «окна имплантации» мы не наблюдали существенных изменений в продукции цитокинов на локальном уровне. Возможно, данный факт связан с большой площадью травматизации слизистой полости матки, что сопровождается потерей большого количества иммунокомпетентных клеток, в том числе эндометриальных макрофагов, и их восполнение в следующем цикле происходит преимущественно за счет привлечения циркулирующих клеток. При скретчиге эндометрия в воспалительной реакции участвует больше иммунокомпетентных клеток, которые частично сохраняются в следующем цикле, а при РДВ резидентные макрофаги полностью удаляются вместе с тканью эндометрия.

Следует подчеркнуть, что независимо от метода нанесения травмы эндометрия у женщин с бесплодием, обусловленным «малыми» формами генитального эндометриоза, мы отметили положительное влияние на результативность ЭКО в сравнении с имплантацией при переносе эмбрионов без нанесения травмы. Так, у женщин с наступившей беременностью при проведении ЭКО независимо от вида нанесения травмы эндометрия отмечалась модуляция внутриклеточной продукции цитокинов IL-1, IL-6, IFN γ эндометриальными макрофагами, и она была сопряжена с успехом беременности, что может свидетельствовать о нормализации

их функции и участия в формировании благоприятной среды для имплантации. У пациенток с отсутствием наступления беременности после нанесения травмы отмечалось снижение внутриклеточной продукции IFN γ при сохранении уровня выработки IL-1 β и IL-6 эндометриальными макрофагами, что, предположительно, может свидетельствовать о сдвиге поляризации эндометриальных макрофагов в сторону альтернативно активированных провоспалительных макрофагов.

Принимая во внимание вышеупомянутые результаты, мы предполагаем, что травматизация эндометрия вызывает воспалительный ответ, который индуцирует выработку провоспалительных цитокинов с последующим привлечением макрофагов и других иммунных клеток, тем самым запускается целая цепочка сложных биологических процессов в эндометрии с повышением его пролиферации, регенерации и рецептивности, что может способствовать повышению частоты наступления беременности.

Заключение

Эффективность ЭКО не зависит от техники нанесения локальной травмы эндометрия. У пациенток с наступившей беременностью в протоколах ЭКО происходили повышение изначально сниженных показателей и снижение изначально повышенных показателей внутриклеточной продукции цитокинов эндометриальными макрофагами независимо от метода травматизации. Дальнейшее исследование механизмов контроля воспалительных реакций в эндометрии женщин с «малыми» формами эндометриоза позволит выявить новые аспекты патогенеза ассоциированного с ним бесплодия и повысить эффективность методов ВРТ.

Список литературы

1. As-Sanie S., Black R., Giudice L.C., Gray Valbrun T., Gupta J., Jones B., Laufer M.R., Milspaw A.T., Missmer S.A., Norman A., Taylor R.N., Wallace K., Williams Z., Yong P.J., Nebel R.A. Assessing research gaps and unmet needs in endometriosis. *Am J. Obstet Gynecol.* 2019. vol. 221. no. 2. P. 86-94. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.02.033.
2. Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Кавтеладзе Е.В., Шустова В.Б., Цораева Ю.Р., Новгидов Д.С. Бесплодие, ассоциированное с эндометриозом: от легенды к суровой реальности // *Трудный пациент.* 2019. Т. 17. № 1-2. С. 6-12. DOI: 10.24411/2074-1995-2019-10001.
3. Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J. Hum ReprodSci.* 2015. vol. 8. no. 3. P. 121-129. DOI: 10.4103/0974-1208.165153.

4. Wadhwa L., Mishra M. Therapeutic efficacy of endometrial scratching in repeated Controlled Ovarian Stimulation (COS) failure cycles. *J. Hum Reprod Sci.* 2018. no. 11. P. 59-57. DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_130_17.
5. Nastri C.O., Lensen S.F., Gibreel A., Raine-Fenning N., Ferriani R.A., Bhattacharya S., Martins W.P. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015. no. 3. DOI: 10.1002/14651858.
6. Hoogenhuijze N.E. van, Kasius J.C, Broekmans F.J.M., Bosteels J., Torrance H.L. Endometrial scratching prior to IVF; does it help and for whom? A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Open.* 2019. no. 1. P. 1-18. DOI: 10.1093/hropen/hoy025.
7. Nastri C.O., Ferriani R.A., Raine-Fenning N., Martins W.P. Endometrial scratching performed in the non-transfer cycle and outcome of assisted reproduction: a randomized controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013. vol. 42. no. 4. P. 375-382. DOI: 10.1002/uog.12539.
8. Gibreel A., El-Adawi N., Elgindy E., Al-Inany H., Allakany N., Tournaye H. Endometrial scratching for women with previous IVF failure undergoing IVF treatment. *Gynecol Endocrinol.* 2015. no. 4. P. 313-316. DOI: 10.3109/09513590.2014.994603.
9. De Geyter C., Calhaz-Jorge C., Kupka M.S., Wyns C., Mocanu E., Motrenko T., Scaravelli G., Smeenk J., Vidakovic S., Goossens V. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: the European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction.* 2018. no. 9. P. 1586-1601. DOI: 10.1093/humrep/dey242.
10. Brown M.B., von Chamier M., Allam A.B., Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Frontiers Immunology.* 2014. no. 5. 606. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00606.
11. Красильникова А.К., Абдуллаева Л.Х., Мальшкіна А.И., Сотникова Н.Ю, Анциферова Ю.С. Особенности регуляции гуморального иммунного ответа на системном и локальном уровнях при эндометриозе // Таврический медико-биологический вестник. 2017. Т. 20. № 2. С. 58-62.
12. Gnainsky Y., Granot I., Aldo P., Barash A., Or Y., Mor G., Dekel N. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action. *Reproduction.* 2015. vol. 149. no. 1. P. 75-85. DOI: 10.1530/REP-14-0395.
13. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Racicot K., Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2014. vol. 72. no. 2. P. 141-147. DOI: 10.1111/aji.12266.