

Оценка экспрессии гликанов в эпителиальных структурах эндометрия как предиктивный фактор рецептивности эндометрия

М.М. Зиганшина[✉], Н.В. Долгушина, Г.В. Куликова, Н.М. Файзуллина, А.А. Довгань, Н.Ф. Абдурахманова, А.И. Щеголев, А.В. Асатурова, Г.Т. Сухих
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия
[✉]mmz@mail.ru

Аннотация

Цель. Оценить гликотип эндометрия в «окно имплантации» у пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и разработать критерии оценки рецептивности эндометрия на основе анализа комплексного изменения функциональных групп гликанов в основных эпителиальных структурах эндометрия для использования в клинической практике.

Материалы и методы. В исследование включены 32 пациентки с бесплодием, проходящие лечение в программах ВРТ. Пайпель-биопсия эндометрия проводилась в период «окна имплантации» в цикле, предшествующем циклу овариальной стимуляции и переноса эмбрионов. С помощью лектиновой гистохимии и иммуногистохимии исследовано содержание гликанов в гликокаликсе поверхностного эпителия (ПЭ) и железистого эпителия (ЖЭ) эндометрия.

Результаты. Выявлены различия в экспрессии маннозобогатых гликанов в ПЭ и N-ацетилгалактозаминтерминированных гликанов в ЖЭ эндометрия и оценена связь экспрессии гликанов, окрашиваемых лектинами: ConA, VVL, UEA-I, SNA, MAL-II, ECL и моноклональными антителами: анти-MECA-79 мАТ и анти-LeY мАТ в ПЭ и ЖЭ эндометрия у пациенток с бесплодием в зависимости от исхода программы ВРТ. Рассчитанные пороговые уровни экспрессии гликанов и отношение шансов наступления беременности позволили дать характеристики диагностической ценности для исследованных гликомаркеров и разработать критерии оценки рецептивности эндометрия.

Заключение. На основании комплексной оценки гликанов в основных эпителиальных структурах эндометрия в цикле, предшествующем циклу ВРТ, разработаны критерии оценки вероятности наступления беременности, что может повысить эффективность программ ВРТ у пациенток с бесплодием.

Ключевые слова: бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, гликотип эндометрия, иммуногистохимия, лектиновая гистохимия, критерии оценки рецептивности эндометрия.

Для цитирования: Зиганшина М.М., Долгушина Н.В., Куликова Г.В. и др. Оценка экспрессии гликанов в эпителиальных структурах эндометрия как предиктивный фактор рецептивности эндометрия. Гинекология. 2020; 22 (6): 38–43. DOI: 10.26442/20795696.2020.6.200490

Original Article

Evaluation of glycan expression in endometrial epithelial structures as a predictive factor for endometrial receptivity

Marina M. Ziganshina[✉], Nataliya V. Dolgushina, Galina V. Kulikova, Nafisa M. Fayzullina, Alina A. Dovgan, Nigora F. Abdurakhmanova, Alexandr I. Shchegolev, Alexandra V. Asaturova, Gennady T. Sukhikh
Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia
[✉]mmz@mail.ru

Abstract

Aim. To evaluate the endometrial glycotyp in the "implantation window" in patients with infertility in assisted reproductive technologies (ART) programs and to develop criteria for assessing endometrial receptivity based on the analysis of complex changes in the functional groups of glycans in the main endometrial epithelial to use in clinical practice.

Materials and methods. The study included 32 infertile patients who took part in ART programs. Pipelle endometrial biopsy was performed during the "implantation window" in the cycle preceding the cycle of ovarian stimulation and embryo transfer. Using lectin histochemistry and immunohistochemistry, glycans levels in the glycocalyx of endometrial surface epithelium (SE) and glandular epithelium (GE) was studied.

Results. Differences in the expression of mannose-rich glycans in SE and N-acetylgalactosamine--terminated glycans in the GE of the endometrium were revealed, as well as the link between the expression of lectin staining glycans: ConA, VVL, UEA-I, SNA, MAL-II, ECL and monoclonal antibodies: anti-MECA-79 mAb and anti-LeY mAb in SE and GE of the endometrium in patients with infertility, depending on the outcome of the ART program. The estimated threshold levels in glycan expression and the odds ratio for pregnancy occurrence allow to characterize the diagnostic value for the studied glycomarkers and to develop criteria for assessing endometrial receptivity.

Conclusion. Based on a comprehensive evaluation of glycans in the main endometrial epithelial structures in the cycle preceding the ART cycle, criteria for assessment of the likelihood of pregnancy have been developed, which can increase the effectiveness of ART programs in patients with infertility.

Key words: infertility, assisted reproductive technologies, endometrial glycotyp, immunohistochemistry, lectin histochemistry, criteria for assessment of endometrial receptivity.

For citation: Ziganshina M.M., Dolgushina N.V., Kulikova G.V. et al. Evaluation of glycan expression in endometrial epithelial structures as a predictive factor for endometrial receptivity. Gynecology. 2020; 22 (6): 38–43. DOI: 10.26442/20795696.2020.6.200490

Введение

Актуальность. Имплантация бластоцисты – комплексный, многофакторный процесс, подразумевающий синхронизированное взаимодействие между эмбрионом и эндометрием и определяющийся наличием двух факторов: зуплоидного эмбриона хорошего качества и нормальной рецептивности эндометрия с высоким потенциалом имплантации эмбриона. При наличии эмбрионов хорошего качества, отсутствии гормональных и иммунных нарушений

фактор рецептивности эндометрия становится ведущей причиной бесплодия, определяющей повторные неудачи имплантации в циклах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и неблагоприятные исходы беременности [1–3]. Сложность оценки рецептивности эндометрия заключается в невозможности выполнения инвазивных диагностических процедур в цикле, планируемом для переноса эмбрионов. При этом показатели рецептивности могут претерпевать значительные изменения от цикла к циклу.

Новым и более точным способом прогноза рецептивности эндометрия в цикле зачатия может стать оценка состава гликокаликса (гликотипа) эндометрия. Гликокаликс эндометриального эпителия является зоной первичного контакта с трофэктодермой и «молекулярной границей», которую необходимо преодолеть внедряющемуся эмбриону [4]. Значительный прогресс в понимании изменений гликотипа эндометрия в менструальном цикле и регуляции этих изменений половыми гормонами представлен во множестве исследований, выполненных, в основном на животных моделях [4–8]. Наибольший интерес в аспекте маркеров рецептивности эндометрия представляют глико-маркеры: дифукозилированный гликан Le^Y [9], маннозобогатые гликаны [10] и особенно углеводный лиганд L-селектина МЕСА-79 [11–14]. Однако диагностическая ценность этих маркеров не подтверждена клинически. Принципиально новым подходом в диагностике является «сигнатурный» подход, основанный на сочетании маркеров, которые выбираются из исследуемой панели.

Цель исследования – комплексная оценка гликотипа эндометрия в период «окна имплантации» у пациенток с бесплодием в зависимости от наступления беременности в программах ВРТ; формирование панели наиболее диагностически ценных глико-маркеров и разработка на основе полученных данных шкалы рецептивности для использования в клинической практике.

Материалы и методы

В проспективное исследование, проводимое в рамках государственного задания «Совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий при применении инновационных высокотехнологических методик (эмбриологических, клеточных, иммунологических, молекулярно-генетических)» и одобренное комиссией по этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова», включены 32 пациентки, обратившиеся с целью лечения бесплодия с использованием методов ВРТ в период с 2016 по 2018 г. Критериями включения явились нормальный кариотип пациентки и ее партнера, возраст пациенток от 18 до 40 лет, индекс массы тела (ИМТ) от 18 до 29,9 кг/м² и подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения явились наличие противопоказаний к ВРТ, выраженная патоспермия у партнера, использование донорских гамет или суррогатного материнства, «бедный» ответ на овариальную стимуляцию, отсутствие blastocyst хорошего качества, а также развитие осложненный ВРТ в изучаемом цикле.

Пациентки стратифицированы на группы в зависимости от наступления беременности: 1-я группа (n=12) – пациентки, у которых наступила беременность, 2-я группа (n=20) – пациентки, у которых беременность не наступила.

На этапе подготовки к программе ВРТ все пациентки проходили обследование согласно Приказу Минздрава России от 30.08.2012 №107н [15]. У всех пациенток в цикле, предшествующем циклу овариальной стимуляции и переноса эмбрионов, в период «окна имплантации» (на 6–8-й день после овуляции, подтвержденной при помощи ультразвукового исследования – УЗИ и тестов на овуляцию, оценивающих пик лютеинизирующего гормона в моче) путем аспирационной пайпель-биопсии из дна полости матки получена ткань эндометрия. Период «окна имплантации» подтверждался датированием эндометрия по Нойсу [16].

На образцах эндометриальной ткани проводилось исследование гликанов с помощью панели растительных лектинов с известной углеводной специфичностью (лектиновая гистохимия) и моноклональных антител к гликанам (иммуногистохимия – ИГХ). В 1-м варианте детектировались функциональные группы гликанов в составе О- и N-гликоконъюгатов, представленных в гликопротеинах и гликолипидах, а во 2-м – конкретные углеводные эпитопы. Для определения гликотипа использованы биотинилированные лектины растительного происхождения: MAL-II (Maackia Amurensis Lectin-II, связывающий α2,3-сиалогликан), SNA (Sambucusnigra Lectin, связывающий α2,6-сиалогли-

Таблица 1. Клинико-лабораторные данные пациенток
Table 1. Clinical and laboratory data of patients

Параметры	1-я группа (n=12)	2-я группа (n=20)	p-уровень
Возраст, лет**	33,0±3,9	33,2±4,6	0,8779
ИМТ, кг/м ² **	22,3±2,8	22,6±2,7	0,7676
Наружный генитальный эндометриоз*	1 (8,3%)	4 (20%)	0,3788
Миома матки*	2 (16,7%)	8 (40%)	0,1680
Полипы эндометрия в анамнезе*	1 (8,3%)	6 (30%)	0,1511
Длительность бесплодия, лет**	4,7±2,7	8,5±5,3	0,0283
Число беременностей***	1 (0–2,5)	0,5 (0–1,5)	0,4835
Число родов***	0 (0–0,5)	0 (0–0)	0,3603
Число попыток ВРТ в анамнезе***	0,5 (0–2)	0 (0–2)	0,9224
Фолликулостимулирующий гормон, мЕд/мл**	8,2±2,0	7,3±2,7	0,3563
Антимюллеров гормон, нг/мл**	4,8±4,6	3,3±2,7	0,2466
Длительность стимуляции, дни**	9,2±0,9	9,0±1,2	0,6784
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ**	1512,5±371,3	1537,5±532,3	0,8874

*Данные представлены как абсолютные числа и %, χ²-тест; **данные представлены как средние ± стандартное отклонение, t-тест; ***данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Крускал–Уоллиса.

*Data are presented as absolute numbers and %, χ²-test; ** data are presented as means ± standard deviation, t-test; *** data are presented as medians with interquartile range, Kruskal–Wallis test.

каны), ECL (Erythrina Cristagalli Lectin, связывающий терминальные олиголактозаминовые фрагменты в составе N-гликанов комплексного типа), UEA-I (Ulex Europaeus Agglutinin-I, связывающий фукозилированные гликаны), VVL (Vicia Villosa Lectin, связывающий функциональные группы N-ацетилгалактозамина в составе гликанов) и ConA (Concanavalin A, связывающий маннозобогатые гликаны); Vector Labs, USA. Для ИГХ использовались очищенные крысиные антитела к адрессину периферических лимфоузлов мыши, специфически связывающие сульфатированные углеводные эпитопы адрессина (сульфатированные α2,3-сиалогликан), которые являются лигандами L-селектина (анти-МЕСА-79-антитела, клон МЕСА-79, BD Pharmingen), и овечьи антитела к антигену, родственному антигенам группы крови Lewis, специфически взаимодействующие с дифукозилированным олигосахаридом [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R] (анти-Le^Y-антитела, клон LWY/1463, Abcam). Лектиновая гистохимия и ИГХ проводились по протоколу, описанному ранее [16]. Выраженность экспрессии углеводных остатков, связывающихся с лектинами и моноклональными антителами, оценивалась по интенсивности окрашивания продукта реакции в поверхностном эпителии (ПЭ) и железистом эпителии (ЖЭ) эндометрия при помощи системы анализа изображения с применением программного приложения NIS Elements Advanced Research 3.2 program (Laboratory Imaging LTD, Czech Republic).

Оплодотворение ооцитов у всех пациенток осуществлялось методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Показанием к ИКСИ, этапы подготовки к ИКСИ, включающие стимуляцию суперовуляции, трансвагинальную пункцию яичников, а также критерии морфологической оценки эмбрионов, переноса эмбриона и регистрации биохимической и клинической беременности аналогичны описанным в предыдущем исследовании [17].

Для статистического анализа использовался пакет статистических программ Statistica 10 (США). Статистический анализ проводился с применением χ²-теста для сравнения категориальных переменных, t-теста, линейной регрессии или теста Манна–Уитни для сравнения непрерывных данных. Мерой ассоциации для сравнения бинарных данных было скорректированное по конфаундерам отношение шансов (ОШ_{корр}), рассчитанное с помощью метода логистической регрессии. Корреляционный анализ проводился

с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Средний возраст и ИМТ пациенток сопоставимы в обеих группах ($p > 0,05$). Между группами не выявлено различий в менструальной функции, гравидарности, паритете, параметрах гормонального исследования и соматической заболеваемости. Частота встречаемости гинекологических заболеваний (наружный генитальный эндометриоз, миомы матки, полипы эндометрия в анамнезе) выше в группе пациенток с ненаступившей беременностью. У них также более длительный анамнез бесплодия. При оценке особенностей овариальной стимуляции в программе ИКСИ в группах сравнения не отмечено различий в суммарной дозе гонадотропинов, длительности стимуляции, а также виде препарата для овариальной стимуляции (табл. 1).

Характеристика полученных гамет и эмбрионов выявила значимо более высокое число blastocyst отличного качества у пациенток с наступившей беременностью – среднее число blastocyst на одну пациентку составило 2,5 (1–3) и 0 (0–1,5) в группе, где беременность наступила и не наступила соответственно ($p = 0,0120$). По остальным показателям значимых различий не выявлено.

УЗИ показало, что у пациенток с наступившей в результате переноса эмбрионов беременностью значимо большая толщина эндометрия ($9,6 \pm 1,1$ мм) по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила ($7,0 \pm 1,2$ мм); $p < 0,0001$. У пациенток с толщиной эндометрия ≥ 8 мм беременность наступила в 66,7% случаев (у 12 из 18 человек), тогда как у пациенток с «тонким» эндометрием случаев беременности не зафиксировано (0 из 14 человек); $p = 0,0001$, что соответствует полученным нами ранее данным [17]. При проведении многофакторного анализа методом логистической регрессии с учетом конфаундеров (эндометриоз и число полученных blastocyst) ОШ наступления беременности в зависимости от наличия «тонкого» эндометрия составило 1,47 (95% доверительный интервал – ДИ 1,05–2,5).

При исследовании гликотипа эндометрия окрашенный продукт реакции визуализировался как в ПЭ, так и в ЖЭ эндометрия с различной степенью интенсивности. Анализ содержания гликанов в исследуемых структурах эндометрия проводился в соответствии с двумя подходами:

- 1) отдельно в каждой группе пациенток проводилось внутригрупповое сравнение экспрессии исследуемых гликанов в ПЭ и ЖЭ и определялись корреляционные связи между экспрессией одних и тех же гликанов в исследуемых структурах эндометрия;
- 2) проводилось межгрупповое сравнение экспрессии исследуемых гликанов в гликокаликсе ПЭ и ЖЭ эндометрия у пациенток исследуемых групп.

Первый подход позволил установить повышенную экспрессию исследуемых гликанов в гликокаликсе ПЭ по сравнению с гликокаликсом ЖЭ эндометрия. Наиболее выражена эта закономерность у пациенток 2-й группы. У пациенток 1-й группы экспрессия исследуемых гликанов в подавляющем большинстве случаев сопоставима в обеих эпителиальных структурах эндометрия, что подтверждено при проведении корреляционного анализа и сравнительного анализа в подгруппах с помощью линейного регрессионного анализа. В 1-й группе наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы между уровнем экспрессии фукогликанов, окрашиваемых лектином UEA-I, и погранично значимая связь при окрашивании анти-Le^yМАТ в ПЭ и ЖЭ. Во 2-й группе наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь средней силы между уровнем экспрессии гликанов, окрашиваемых лектинами UEA-I, SNA, VVL, и лектином ECL после преобразования ткани эндометрия ферментом нейраминидазой. Сравнительные результаты окрашивания лектинами и МАТ гликокаликса в ПЭ и ЖЭ эндометрия в 1 и 2-й группах представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнительные результаты окрашивания лектинами гликокаликса ПЭ и ЖЭ в эндометрии пациенток 1 и 2-й групп
Table 2. Comparative results of staining with lectins of SE and GE glycoalkalix in the endometrium of groups 1 and 2 patients

Лектины/МАТ	ПЭ эндометрия	ЖЭ эндометрия	r	p-уровень
1-я группа (n=12)				
MAL II	0,27±0,10 (0,14–0,52)	0,28±0,07 (0,19–0,43)	0,4564	0,1582
MALII+N	0,15±0,06 (0,10–0,30)	0,14±0,09 (0,05–0,35)	0,3997	0,2232
UEA I	0,27±0,15 (0,08–0,59)	0,22±0,12 (0,10–0,47)	0,6344	0,0266
SNA	0,41±0,07 (0,22–0,51)	0,22±0,09 (0,09–0,41)	0,0525	0,8712
SNA+N	0,32±0,08 (0,21–0,52)	0,16±0,08 (0,06–0,34)	0,3400	0,2795
ECL	0,34±0,11 (0,15–0,52)	0,27±0,15 (0,11–0,62)	-0,0157	0,9614
ECL+N	0,57±0,10 (0,39–0,78)	0,56±0,09 (0,39–0,71)	0,5237	0,0805
VVL	0,24±0,09 (0,10–0,38)	0,18±0,06 (0,09–0,32)	0,3415	0,2773
ConA	0,32±0,06 (0,21–0,42)	0,29±0,06 (0,17–0,40)	0,2919	0,3573
Анти-МЕСА-79МАТ	0,41±0,11 (0,19–0,65)	0,20±0,07 (0,10–0,31)	0,0983	0,7871
Анти-Le ^y МАТ	0,23±0,07 (0,12–0,35)	0,14±0,07 (0,05–0,27)	0,5659	0,0551
2-я группа (n=20)				
MAL II	0,29±0,08 (0,18–0,47)	0,27±0,09 (0,15–0,45)	0,2314	0,3263
MALII+N	0,15±0,04 (0,09–0,24)	0,10±0,04 (0,04–0,18)	0,2638	0,2611
UEA I	0,22±0,10 (0,06–0,50)	0,17±0,12 (0,05–0,49)	0,5441	0,0160
SNA	0,37±0,09 (0,19–0,51)	0,22±0,08 (0,09–0,38)	0,5064	0,0227
SNA+N	0,34±0,09 (0,14–0,47)	0,19±0,10 (0,07–0,46)	0,4524	0,0452
ECL	0,35±0,10 (0,11–0,51)	0,28±0,11 (0,08–0,42)	0,3423	0,1396
ECL+N	0,54±0,11 (0,24–0,76)	0,56±0,24 (0,27–1,49)	0,5373	0,0145
VVL	0,26±0,09 (0,15–0,46)	0,25±0,12 (0,07–0,53)	0,4773	0,0387
ConA	0,39±0,10 (0,15–0,54)	0,29±0,07 (0,17–0,44)	0,3862	0,1024
Анти-МЕСА-79МАТ	0,37±0,10 (0,25–0,59)	0,19±0,06 (0,03–0,29)	0,2141	0,3935
Анти-Le ^y МАТ	0,24±0,06 (0,15–0,39)	0,14±0,06 (0,08–0,34)	-0,1927	0,4157

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, минимум-максимум, GLM; r – коэффициент корреляции.
Note. Data are presented as mean ± standard deviation, minimum-maximum, GLM; r – correlation coefficient

Второй подход позволил установить, что у пациенток обеих групп экспрессия гликанов в гликокаликсе ПЭ и ЖЭ преимущественно сопоставима. У пациенток с ненаступившей беременностью установлена значимо повышенная экспрессия маннозобогатых гликанов (окраска ConA, $p = 0,0471$) и погранично значимое увеличение экспрессии фрагментов N-ацетилгалактозамина (окраска VVL, $p = 0,0610$) в ПЭ и ЖЭ эндометрия соответственно (см. рисунок).

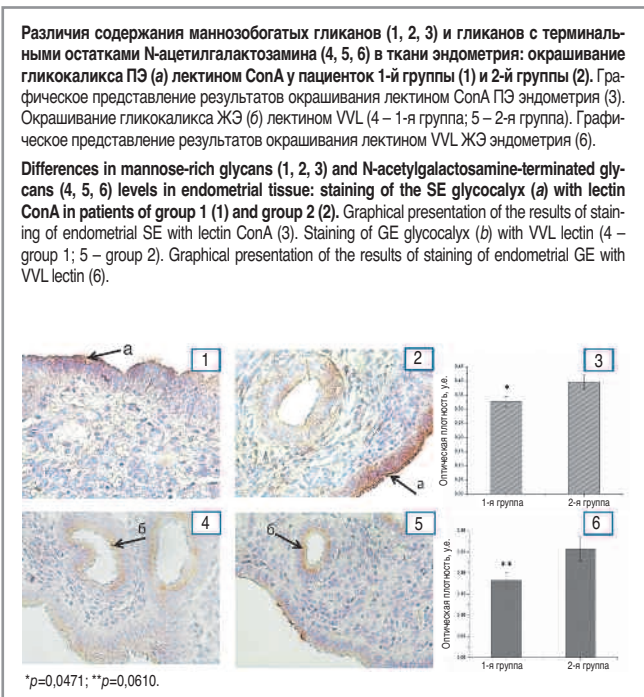
На основании выявленных изменений найдены пороги экспрессии гликанов и составлена шкала рецептивности эндометрия. Оценены пороговые уровни экспрессии, рассчитаны ОШ наступления беременности и даны характеристики диагностической ценности для гликомаркеров: маннозобогатых гликанов (ConA, экспрессия в ПЭ), N-ацетилгалактозаминтерминированных гликанов (VVL, экспрессия в ЖЭ), сульфатированных $\alpha 2,3$ -сиалогликанов МЕСА-79 (анти-МЕСА-79МАТ, экспрессия в ПЭ), а также дифукозилированного гликана Le^y (анти-Le^yМАТ, разница экспрессии между ПЭ и ЖЭ), $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA, разница экспрессии между ПЭ и ЖЭ) и маннозобогатых гликанов (ConA, разница экспрессии между ПЭ и ЖЭ). Данные представлены в табл. 3.

На основании полученных ОШ наступления беременности в зависимости от выявленных гликомаркеров рецептивности разработана шкала рецептивности эндометрия. Для этого округлены и ранжированы рассчитанные ОШ в порядке их возрастания: гликоэпитоп МЕСА-79 в ПЭ – 8,5; маннозобогатые гликаны в ПЭ – 7,5; гликан Le^y между ПЭ и ЖЭ – 6,5; N-ацетилгалактозаминтерминированные гли-

Таблица 3. Пороговые значения экспрессии изучаемых гликомаркеров и характеристика полученных моделей
Table 3. Threshold levels in the studied glycomarkers expression and characteristics of the obtained models

Гликомаркеры	Пороговое значение	ОШ (95% ДИ)	Se, %	Sp, %	AUC, %
Маннозобогатые гликаны (ConA) в ПЭ	0,39	7,50 (1,29–57,92)	83,3	60,0	75,0
GalNAc-терминированные гликаны (VVL) в ЖЭ	0,18	5,57 (1,09–31,18)	75,0	65,0	73,0
Сульфатированный сиалогликан МЕСА-79 в ПЭ	0,42	8,27 (1,32–99,17)	92,8	61,1	78,0
Гликан Le ^Y , разница между ПЭ и ЖЭ	0,12	6,30 (1,27–31,90)	64,3	59,4	70,0
α2,6-сиалогликаны (SNA), разница между ПЭ и ЖЭ	0,17	3,67 (1,04–14,94)	75,0	55,0	68,0
Маннозобогатые гликаны (ConA), разница между ПЭ и ЖЭ	0,06	5,57 (1,09–31,18)	75,0	65,0	73,0

Примечание. Se – чувствительность модели, Sp – специфичность модели, AUC – площадь под кривой.
Note. Se – model sensitivity, Sp – model specificity, AUC – area under the curve.



каны в ЖЭ – 5,5; маннозобогатые гликаны между ПЭ и ЖЭ – 5,5; α2,6-сиалогликаны между ПЭ и ЖЭ – 3,5.

Далее мы придали относительный вес каждому из ОШ, начиная с ОШ α2,6-сиалогликанов, приняв его за единицу: ОШ α2,6-сиалогликанов – 1, ОШ N-ацетилгалактозамин-терминированных гликанов – 1,5, ОШ маннозобогатых гликанов между ПЭ и ЖЭ – 1,5, ОШ гликана Le^Y – 2, ОШ маннозобогатых гликанов в ПЭ – 2, ОШ гликоэпитопа МЕСА-79 – 2,5 (табл. 4).

Максимальный балл, согласно разработанной шкале, составил 10,5. Поэтому мы допустили, что высокая рецептивность эндометрия будет определяться значением большим или равным медиане распределения, т.е. 5,5. Число баллов менее 5,5 свидетельствует о низкой рецептивности эндометрия.

Обсуждение

Анализ клинико-лабораторных данных позволил установить, что на частоту наступления беременности (ЧНБ) в данной когорте пациенток влияли толщина эндометрия и число полученных бластоцист отличного качества. У пациенток с эндометрием <8 мм, измеренном с помощью УЗИ в период «окна имплантации», и с меньшим числом полученных бластоцист шансы наступления беременности в 1,47 раза ниже, как показано нами ранее [17, 18], что согласуется с данными I. Miwa и соавт. (2009 г.) и других исследователей, которые показали, что толщина эндометрия менее 8 мм значительно снижает ЧНБ [19, 20]. Однако имеются альтернативные исследования, где заявляется об отсутствии влияния толщины эндометрия на ЧНБ [21], что свидетельствует о наличии дополнительных факторов,

Таблица 4. Шкала оценки вероятности наступления беременности на основании гликомаркеров рецептивности
Table 4. Scale for assessing the likelihood of pregnancy based on glycomarkers of receptivity

Гликомаркер рецептивности	Результат	Баллы
МЕСА-79 в ПЭ	≥0,42	2,5
	<0,42	0
Маннозобогатые гликаны в ПЭ	<0,39	2
	≥0,39	0
Le ^Y – дельта между ПЭ и ЖЭ	<0,12	2
	≥0,12	0
N-ацетилгалактозаминтерминированные гликаны в ЖЭ	<0,18	1,5
	≥0,18	0
Маннозобогатые гликаны – дельта между ПЭ и ЖЭ	<0,06	1,5
	≥0,06	0
α2,6-сиалогликаны – дельта между ПЭ и ЖЭ	<0,17	1
	≥0,17	0

Примечание. Высокая рецептивность эндометрия – ≥5,5 балла; низкая рецептивность эндометрия – <5,5 балла.
Note. High receptivity of the endometrium – ≥5,5 scores; low receptivity of the endometrium – <5,5 scores.

требующих рассмотрения. В частности, в предварительных исследованиях нами показано, что при «тонком» эндометрии (≤8 мм) изменен гликотип эндометриальной ткани, в частности снижена экспрессия лиганда L-селектина МЕСА-79 (M. Ziganshina и соавт., в печати), что явилось основанием для исследования влияния изменений гликотипа эндометрия на ЧНБ.

Межгрупповой анализ содержания гликанов в основных эпителиальных структурах эндометрия – ПЭ и ЖЭ – выявил у пациенток с ненаступившей беременностью повышение экспрессии гликанов, в частности маннозобогатых гликанов (ConA). Известно, что маннозобогатые гликаны входят в состав не только патогенассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), сигнализирующих о чужеродных антигенах, но и образцов опасности (ДАМП), которые локализуются на измененных собственных или апоптотических клетках и инициируют активацию макрофагов, естественных киллерных и дендритных клеток, выступая в качестве меток биологической опасности, которую необходимо удалить из организма [22, 23]. Повышенное содержание гликанов, окрашиваемых ConA, отмечалось в постменопаузе при атрофии и гиперплазии эндометрия по сравнению с фертильными женщинами [10]. Изменения экспрессии фукозилированных остатков N-ацетилгалактозамина установлено при эндометриозе III и IV стадий [24]. По-видимому, повышенное содержание маннозобогатых и N-ацетилгалактозаминтерминированных гликанов в эндометрии пациенток с неудачами ВРТ отражает формирование «молекулярных паттернов», подобных ПАМП и ДАМП в эндометрии, как мишеней для локального привлечения иммунных клеток с целью элиминации измененных клеток,

несущих «чужие» или «опасные» антигены, что, по-видимому, не отражает инфекционного процесса, но может быть ассоциировано с молекулярными изменениями вследствие развития атрофических процессов в эндометрии или прелеченного эндометриоза.

Свидетельством измененных паттернов гликозилирования в эндометриальной ткани пациенток с ненаступившей беременностью являются выявленные отличия в корреляционных зависимостях между экспрессией ряда гликанов в ПЭ и ЖЭ в исследуемых группах, что может отражать патологические изменения ткани, которая циклически изменяется под действием гормонов. Известно, что глико-тип эндометрия регулируется половыми гормонами, и описаны пики – максимумы и спады – минимумы экспрессии различных гликанов в период «окна имплантации» [25, 26]. Поскольку гормональный статус пациенток, включенных в исследование, был стабильным от цикла к циклу и не различался между группами, по-видимому, разный характер корреляционных связей между содержанием гликанов в эпителиальных структурах эндометрия в каждой из групп исследования имеет патофизиологическое значение и влияет на рецептивность. Этот вывод представляется важным, поскольку при межгрупповом сравнении выявлены различия всего по двум гликанам (из них один – погранично значимый), а анализ взаимосвязей выявил комплексные изменения в ткани, которые не учитывались в предшествующих подобных исследованиях. Если корреляционные связи в экспрессии фукозилированных гликанов (окраска UEА-I) выявляются в обеих группах, то только в группе с наступившей беременностью выявляется корреляционная связь в экспрессии Le^Y в эпителиальных структурах эндометрия, что в первом случае свидетельствует о наличии единообразных изменений в эндометрии у всех пациенток, а во втором – об измененном паттерне экспрессии. Очевидно, гликану Le^Y отводится особая роль в межклеточных контактах, поскольку он входит в состав углеводных цепей αβ3 интегрина – ключевого белка, экспрессируемого эндометриальным эпителием в секреторную фазу цикла [27]. Установлено, что блокирование экспрессии Le^Y нарушает процессы роста, пролиферации и дифференцировки клеток, поскольку связано с угнетением DAG/PKC сигнального пути, что указывает на функцию гликана Le^Y как регуляторной и сигнальной молекулы [28]. Вследствие этого отсутствие взаимосвязи в экспрессии одного из ключевых гликанов в эпителиальных структурах эндометрия, по-видимому, имеет патофизиологическое значение. Напротив, выявленные корреляционные связи в группе с ненаступившей беременностью являются свидетельством измененных паттернов экспрессии в двух эпителиальных структурах α2,6-сиалогликанов и N-ацетилгалактозаминтерминированных гликанов, что, возможно, свидетельствует о смещении «окна имплантации». Поскольку используемое в настоящее время датирование эндометрия по критериям Нойса не является оптимальным методом оценки рецептивности, то выявленные особенности гликотипа эндометрия в «окно имплантации», несомненно, требуют дальнейших исследований. Авторы выражают надежду на то, что разработанные шкалы рецептивности будут апробированы, результаты обобщены в большом числе специализированных клиник, чтобы в дальнейшем широко использовать их для оценки рецептивности эндометрия в клинической практике для ведения пациенток с бесплодием.

Заключение

Основным итогом данного исследования является разработанная шкала рецептивности эндометрия, учитывающая комплексные изменения экспрессии гликанов гликокаликса основных эпителиальных структур эндометрия в цикле, предшествующем циклу ВРТ, что позволяет характеризовать истинное функциональное состояние эндометрия, поскольку влияние различных препаратов для стимуляции суперовуляции остается за пределами цикла исследования. Использование шкалы рецептивности, несомненно, должно быть апробировано множеством клиник, что повысит цен-

ность предлагаемого подхода и позволит ввести новые критерии оценки рецептивности эндометрия в дальнейшем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках госзадания №АААА-А18-118053190022-8.

Funding. The study was carried out as a part of state assignment No. АААА-А18-118053190022-8.

Литература/References

1. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006; 12 (5): 617–30. DOI: 10.1093/humupd/dml033
2. Oron G, Hirsch L, Rona S et al. Endometrial thickness of less than 7.5 mm is associated with obstetric complications in fresh IVF cycles: a retrospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2018; 37 (3): 341–8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.05.013
3. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16 (1): 1–18. DOI: 10.1186/s12958-018-0414-2
4. Зиганшина М.М., Абдурахманова Н.Ф., Павлович С.В. и др. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия. *Акушерство и гинекология*. 2017; 17–24. DOI: 10.18565/aig.2017.12.17-24 [Ziganshina M.M., Abdurakhmanova N.F., Pavlovich S.V. et al. Endometrial glycome in the menstrual cycle and endometrial receptivity. *Obstet Gynecol*. 2017; 17–24. DOI: 10.18565/aig.2017.12.17-24 (in Russian).]
5. Carson DD. The glycobiology of implantation. *Front Biosci* 2002; 7 (1): 1535–44. DOI: 10.2741/a858
6. Clark GF. Functional glycosylation in the human and mammalian uterus. *Fertil Res Pract* 2015; 1 (1): 1–12. DOI: 10.1186/s40738-015-0007-0
7. Aplin JD. Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation. *J Reprod Fertil* 1991; 92 (2): 525–41. DOI: 10.1530/jrf.0.0920525
8. Aplin JD. Embryo implantation: The molecular mechanism remains elusive. *Reprod Biomed Online* 2006; 13 (6): 833–9. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)61032-2
9. Gu J, Sui LL, Cui D et al. Effects of LeY glycan expression on embryo implantation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20: 3327–35.
10. Noci I, Gheri G, Gheri Bryk S et al. Aging of the human endometrium: Peri-implantation phase endometrium does not show any age-dependent variation in lectin binding. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 64 (1): 11–21. DOI: 10.1016/0301-2115(95)02245-7
11. Nejatbaksh R, Kabir-Salmani M, Dimitriadis E et al. Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel function for pinopodes in endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10 (1): 1. DOI: 10.1186/1477-7827-10-46
12. Margarit L, Gonzalez D, Lewis PD et al. L-Selectin ligands in human endometrium: Comparison of fertile and infertile subjects. *Hum Reprod* 2009; 24 (11): 2767–77. DOI: 10.1093/humrep/dep247
13. Foulk RA, Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24 (7): 316–21. DOI: 10.1007/s10815-007-9151-8
14. Wang B, Sheng JZ, He RH et al. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60 (2): 127–34. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2008.00604.x
15. Приказ Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаний и ограничений к их применению». 2012. [Приказ Минздрава России no. 107n от 30 avgusta 2012 g “O porjadke ispol’zovaniya vspomogatel’nyh reproduktivnyh tehnologij, protivopokazaniyah i ogranichenijah k ih primeneniju”. 2012 (In Russian).]
16. Ziganshina MM, Kulikova GV, Fayzullina NM et al. Expression of fuco-sylated glycans in endothelial glycocalyxes of placental villi at early and late fetal growth restriction. *Placenta* 2020; 90: 98–102. DOI: 10.1016/j.placenta.2019.12.005
17. Куликова Г.В., Абдурахманова Н.Ф., Файзуллина Н.М. и др. Рецептивность «тонкого» эндометрия у пациенток в программах вспо-

- могательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2019; 100–7.
[Kulikova G.V., Abdurakhmanova N.F., Fayzullina N.M. et al. Receptivity of thin endometrium in patients undergoing assisted reproduction. *Obstet Gynecol*. 2019; 100–7 (in Russian).]
18. Абдурахманова Н.Ф., Гвоздева А.Д., Зиганшина М.М., Долгушина Н.В. Результаты программ ВРТ у пациенток с «тонким» эндометрием. *Гинекология*. 2019; 21 (1): 23–27. DOI: 10.26442/20795696.2019.1.190232
[Abdurakhmanova N.F., Gvozdeva A.D., Ziganshina M.M., Dolgushina N.V. The results of assisted reproductive technology programs in patients with “thin” endometrium. *Gynecology*. 2019; 21 (1): 23–7. DOI: 10.26442/20795696.2019.1.190232 (in Russian).]
 19. 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
 20. Takasaki A, Tamura H, Taketani T et al. A pilot study to prevent a thin endometrium in patients undergoing clomiphene citrate treatment. *J Ovarian Res* 2013; 6 (1): 6–10. DOI: 10.1186/1757-2215-6-94
 21. Weiss NS, van Vliet MN, Limpens J et al. Endometrial thickness in women undergoing IUI with ovarian stimulation. How thick is too thin? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2017; 32 (5): 1009–18. DOI: 10.1093/humrep/dex035
 22. Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2012; 36 (3): 322–35. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.004
 23. Kane N, Kelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009; 150 (6): 2882–8. DOI: 10.1210/en.2008-1309
 24. Miller DL, Jones CJP, Aplin JD, Nardo LG. Altered glycosylation in peri-implantation phase endometrium in women with stages III and IV endometriosis. *Hum Reprod* 2010; 25 (2): 406–11. DOI: 10.1093/humrep/dep401
 25. Miravet-Valenciano JA, Rincon-Bertolin A, Vilella F, Simon C. Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015; 27 (3): 187–92. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000173
 26. Gu J, Isaji T, Xu Q et al. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj J* 2012; 29 (8–9): 599–607. DOI: 10.1007/s10719-012-9386-1
 27. Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 55 (1–2): 101–12. DOI: 10.1016/S0165-0378(01)00139-5
 28. Li Y, Ma K, Sun P et al. LeY oligosaccharide upregulates DAG/PKC signaling pathway in the human endometrial cells. *Mol Cell Biochem* 2009; 331 (1–2): 1–7. DOI: 10.1007/s11010-009-0137-y

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Зиганшина Марина Михайловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: mmz@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1578-8403

Долгушина Наталья Витальевна – д-р мед. наук, зам. дир. – рук. Департамента организации научной деятельности ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: n_dolgushina@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1116-138X

Куликова Галина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. 2-го патологоанатомического отд-ния ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: g_kulikova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-0594-955X

Файзуллина Нафиса Мунаваровна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. 1-го патологоанатомического отд-ния ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: n_fayzullina@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1804-8523

Довгань Алина Анатольевна – аспирант отд-ния вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: lina.dovgan@gmail.com; ORCID: 0000-0002-4927-3590

Абдурахманова Нигора Фаруховна – аспирант отд-ния вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: abd.nigora@yandex.ru

Щеголев Александр Иванович – д-р мед. наук, зав. 2-м патологоанатомическим отд-нием ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: a_shchegolev@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-2111-1530

Асатурова Александра Вячеславовна – д-р мед. наук, зав. 1-м патологоанатомическим отд-нием ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: a_asaturova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-8739-5209

Сухих Геннадий Тихонович – акад. РАН, д-р мед. наук, дир. ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: g_sukhikh@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-7712-1260

Marina M. Ziganshina – Cand. Sci. (Biol.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: mmz@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1578-8403

Nataliya V. Dolgushina – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: n_dolgushina@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1116-138X

Galina V. Kulikova – Cand. Sci. (Biol.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: g_kulikova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-0594-955X

Nafisa M. Fayzullina – Cand. Sci. (Chem.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: n_fayzullina@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1804-8523

Alina A. Dovgan – Graduate Student, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: lina.dovgan@gmail.com; ORCID: 0000-0002-4927-3590

Nigora F. Abdurakhmanova – Graduate Student, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: abd.nigora@yandex.ru

Alexandr I. Shchegolev – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: a_shchegolev@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-2111-1530

Alexandra V. Asaturova – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: a_asaturova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-8739-5209

Gennady T. Sukhikh – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: g_sukhikh@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-7712-1260

Статья поступила в редакцию / The article received: 15.10.2020

Статья принята к печати / The article approved for publication: 22.12.2020