

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61B 5/00 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2021101217, 21.01.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
21.01.2021Дата регистрации:  
19.04.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.01.2021

(45) Опубликовано: 19.04.2021 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

142000, Московская обл., г. Домодедово, мкр.  
Центральный, Каширское ш., 83, кв. 150, М.Р.  
Оразову

(72) Автор(ы):

Оразов Мекан Рахимбердыевич (RU),  
Михалева Людмила Михайловна (RU),  
Хамошина Марина Борисовна (RU),  
Силантьева Елена Сергеевна (RU),  
Орехов Роман Евгеньевич (RU),  
Лагутина Елена Владимировна (RU),  
Семёнов Павел Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Оразов Мекан Рахимбердыевич (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2651762 C1 23.04.2018. RU  
2562559 C1 10.09.2015. RU 2617061 C1 19.04.2017.  
ЕА 16348 В1 30.04.2012. КРЫЛОВА Ю.С.  
Рецептивность эндометрия: молекулярные  
механизмы регуляции имплантации. Журнал  
акушерства и женских болезней Т. LXII  
Выпуск 2/2013, стр. 63-74. CAMARGO-DIAZ  
F. Colony stimulating factor-1 and leukemia  
inhibitor factor expression from (см. прод.)

(54) Способ оценки имплантационной состоятельности эндометрия при повторных неудачах имплантации, ассоциированных с хроническим эндометритом

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к патоморфологии, гинекологии и репродуктологии, и может быть использовано для выявления нарушений имплантационных возможностей эндометрия при хроническом эндометрите (ХЭ) у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ). Выполняют пайпель-биопсию эндометрия в период «окна имплантации». Проводят иммуногистохимическое исследование полученного биоматериала путем окрашивания срезов с применением поликлональных антител к следующим маркерам: MUC1 в железах эндометрия, НОХА-10 в строме и в железах. Подсчитывают процент окрашенных клеток. Если экспрессия MUC1 менее 6%, то присваивают «1 балл», если 6% и более, то «0

баллов». Если экспрессия НОХА-10 в железистом компартменте эндометрия менее 25%, присваивают «1 балл», если 25% и более, присваивают «0 баллов». Если экспрессия НОХА-10 в стромальном компартменте эндометрия 19% и более, присваивают «1 балл», если менее 19%, присваивают «0 баллов». Суммируют полученные баллы. При сумме: «3 балла», определяют низкий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на отрицательный прогноз имплантации бластоцисты; «2 балла», определяют умеренный имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на сомнительный прогноз имплантации бластоцисты; «0-1 балл», характеризует высокий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на

положительный прогноз имплантации бластоцисты. Способ позволяет точно оценить имплантационный потенциал эндометрия в период «окна имплантации» у пациенток с повторными неудачами имплантации,

ассоциированными с хроническим эндометритом, на основании интерпретации уровней экспрессии специфических иммуногистохимических маркеров рецептивности эндометрия. 3 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

**current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy. BMC Womens Health. 2017 Aug 22;17(1):63.**

R U  
2 7 4 6 4 4  
C 1

R U  
2 7 4 6 6 4 4  
C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61B 5/00 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)

(21)(22) Application: 2021101217, 21.01.2021

(24) Effective date for property rights:  
21.01.2021Registration date:  
19.04.2021

Priority:

(22) Date of filing: 21.01.2021

(45) Date of publication: 19.04.2021 Bull. № 11

Mail address:

142000, Moskovskaya obl., g. Domodedovo, mkr.  
Tsentralnyj, Kashirskoe sh., 83, kv. 150, M.R.  
Orazovu

(72) Inventor(s):

Orazov Mekan Rakhimberdyevich (RU),  
Mikhaleva Lyudmila Mikhajlovna (RU),  
Khamoshina Marina Borisovna (RU),  
Silanteva Elena Sergeevna (RU),  
Orekhov Roman Evgenevich (RU),  
Lagutina Elena Vladimirovna (RU),  
Semenov Pavel Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Orazov Mekan Rakhimberdyevich (RU)

## (54) METHOD FOR ASSESSING THE IMPLANTATION VIABILITY OF ENDOMETRIUM IN REPEATED IMPLANTATION FAILURES ASSOCIATED WITH CHRONIC ENDOMETRITIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pathomorphology; gynecology; reproductology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, namely to pathomorphology, gynecology and reproductology, it can be used to detect violations of the implantation capabilities of the endometrium in chronic endometritis (CE) among patients with repeated implantation failures (RIF). A papel biopsy of the endometrium is performed during the "implantation window". An immunohistochemical study of the obtained biomaterial is performed by staining the sections using polyclonal antibodies to the following markers: MUC1 in the endometrial glands, NOHA-10 in the stroma and in the glands. The percentage of colored cells is calculated. If the expression of MUC1 is less than 6%, then "1 point" is assigned, if it is 6% or more, then "0 points" is assigned. If the expression of NOHA-10 in the glandular compartment of the endometrium is less than 25%, then "1 point" is assigned, if it is 25% or more, then "0 points" is assigned. If the expression of NOHA-10 in the stromal

compartment of the endometrium is 19% or more, then "1 point" is assigned, if it is less than 19%, then "0 points" is assigned. The received points are summarized. If the sum is "3 points", a low implantation potential of the endometrium is determined, indicating a negative prognosis for blastocyst implantation. If the sum is "2 points", a moderate implantation potential of the endometrium is determined, indicating a doubtful prognosis of blastocyst implantation. If the sum is "0-1 points", a high implantation potential of the endometrium is determined, indicating a positive prognosis of blastocyst implantation.

EFFECT: method allows assessing accurately the implantation potential of the endometrium during the "implantation window" among patients with repeated implantation failures associated with chronic endometritis, based on the interpretation of the expression levels of specific immunohistochemical markers of endometrial receptivity.

1 cl, 3 tbl, 3 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины, а именно к патоморфологии, гинекологии и репродуктологии, и может быть использовано для выявления нарушений имплантационных возможностей эндометрия при хроническом эндометрите (ХЭ) у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) на основании оценки маркеров клеточной адгезии с целью специфической диагностики эндометриального фактора

5      инфертильности, ассоциированного с ХЭ.

Распространенность ХЭ колеблется от 8% до 72% у женщин репродуктивного возраста [1]. Взаимосвязь ХЭ и бесплодия неоспорима. Фактически, у 2,8-56,8% женщин с бесплодием [1, 2], у 14-67,5% женщин с повторными неудачами имплантации [3-5] и у 9,3-67,6% женщин с привычным невынашиванием беременности гистологически подтвержден диагноз ХЭ [6, 7]. Было убедительно показано, что при применении программ ВРТ у пациенток с ПНИ частота имплантации в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) была значительно ниже при гистологически подтвержденном

10      ХЭ, чем у тех женщин, где при ПНИ хронических воспалительных нарушений эндометрия не было (11,5% против 32,7%) [4].

Обобщив данные исследователей об измененной рецепции к половым стероидным гормонам, нарушенном паттерне паракринных факторов и нарушениях адгезии становится понятно, что ХЭ нарушает децидуализацию и индуцирует резистентность к прогестерону, параллельно оказывая влияние на факторы адгезии [8-12]. В результате в клетках увеличивается потенциал к пролиферации при ухудшении дифференцировки, а в целом нарушается синхронное перистальтическое движение всей ткани эндометрия и даже миометрия в переходной зоне, что свидетельствует о его неготовности к имплантации [14-16]. Существующие методики диагностики рецептивности эндометрия

15      не идеальны, так как не обладают набором специфичных маркеров адгезии и пролиферации, что диктует необходимость поиска последних для возможности определения наличия и прогнозирования преодоления эндометриального фактора инфертильности при хроническом эндометрите у женщин с повторными неудачами имплантации.

30      Уровень техники

Известен способ оценки готовности женщин с хроническим эндометритом к экстракорпоральному оплодотворению на основании оценки концентрации альфа-2-макроглобулина ( $\alpha 2$ -МГ) методом твердофазного иммуноферментного (патент РФ 2617061, 2015.12.16 г.). Установлено, что уровень  $\alpha 2$ -макроглобулина 4,5 мг/л и более зафиксирован у 80% больных ХЭ с негативным исходом программы. У больных с ХЭ

35      при уровне  $\alpha 2$ -макроглобулина менее 4,5 мг/л в 17-20% достигнут положительный результат программы ЭКО, равно как и у женщин из группы сравнения с другими формами бесплодия (без наличия воспалительного компонента). Изобретение позволяет прогнозировать наступление беременности в программах экстракорпорального оплодотворения у женщин с хроническим эндометритом.

Недостатком данного способа прогнозирования является ориентация только на показатель воспалительной реакции - маркер экссудации  $\alpha 2$ -макроглобулин, не принимая во внимание маркеры рецептивности, позволяя прогнозировать исход только у пациенток с активно текущим воспалением. Кроме того, способ не задействует маркеры рецептивности, специфичные для инфертильности, ассоциированной с повторными

45      неудачами имплантации.

Известен способ прогнозирования рецептивности эндометрия на основании оценки экспрессии GnRG и GnRGR в "окно имплантации" в эндометрии женщин с бесплодием

и неудачными попытками программы ЭКО (патент РФ 2617515, 22.04.2016 г.).

Прогностически неблагоприятными показателями рецептивности эндометрия считают отставание секреторной трансформации эндометрия, снижение количества клеток, содержащих зрелые пиноподии в поверхностном эпителии, менее чем 20%, а также

5 низкую экспрессию (<2 баллов) GnRG и GnRGR.

Недостатками способа являются отсутствие системной патогномоничной детерминации специфических молекул, характеризующих рецептивность эндометрия, лежащих в основе регуляции имплантации, а также отсутствием специфичных для бесплодия при хроническом эндометрите у пациенток с ПНИ маркеров. Установленная

10 модель с целью прогнозирования имплантационных нарушений базировалась только на анализе эндометриального паттерна у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Известен способ оценки рецептивности эндометрия в период "имплантационного окна" (патент РФ 2651762, 23.04.2018 г.). Для достижения этой цели исследователи

15 методом пайпель-биопсии эндометрия на 20-23 день менструального цикла проанализировали на основании метода иммуногистохимии с использованием двухэтапного стрептавидин-биотин-пероксидазного метода с демаскировкой антигена и с применением ключевых биомолекул, отвечающих за имплантацию: стандартный набор моноклональных и поликлональных антител ER $\alpha$  в строме, PR в строме, p53 в

20 железах, bcl 2 в строме, CD95 в строме, Ki67 в строме, LIFR в железах, LIF в железах эндометрия. На основании полученных результатов исследования авторы рассчитали прогноз рецептивности эндометрия по формуле:  $d = -1,389x_1 + 0,022x_2 - 0,044x_3 - 0,019x_4 + 0,041x_5 + 0,006x_6 + 0,015x_7 - 3,248$ , где  $x_1$  - индекс ER/PR в строме эндометрия (баллы H-score для определения ядерной экспрессии ER и PR),  $x_2$  - p53 в железах эндометрия

25 (% окрашенных ядер в поле зрения),  $x_3$  - bcl 2 в строме эндометрия (% окрашенных ядер в поле зрения),  $x_4$  - CD95+ в строме эндометрия (% окрашенных клеток),  $x_5$  - Ki67 в строме эндометрия (% окрашенных ядер в поле зрения),  $x_6$  - LIF-R в железах эндометрия (баллы H-score),  $x_7$  - LIF в железах эндометрия (баллы H-score). При значениях  $d > 0$  эндометрий характеризовали как рецептивный, при  $d \leq 0$  эндометрий

30 характеризуется как нерепцептивный.

Недостатками данного метода являлось отсутствие оценки патогномоничных для инфертильности, ассоциированной с хроническим эндометритом маркеров, отражающих нарушения адгезии вследствие нарушения децидуализации и индукции резистентности к прогестерону в эндометрии у пациенток с повторными неудачами имплантации,

35 приводящие к ложным результатам при исследовании рецептивности эндометрия у данной когорты пациенток.

Решаемой технической проблемой явилась необходимость повышения точности оценки имплантационной состоятельности эндометрия при воспалительных и адгезивных нарушениях в эндометрии пациенток с повторными неудачами имплантации при ХЭ, ассоциированном с эндометриальным фактором бесплодия в период «окна имплантации».

Раскрытие сущности изобретения

В связи с отсутствием высокоспецифичных и чувствительных способов оценки имплантационной состоятельности эндометрия при инфертильности, ассоциированной

45 с хроническим эндометритом, у пациенток с повторными неудачами имплантации, предлагаемый способ, основанный на анализе комплекса патогномоничных маркеров эндометриального фактора несостоятельности, расширяет возможности оценки рецептивности у данной когорты пациенток, а также позволяет прогнозировать

восприимчивость эндометрия к имплантации бластоцисты в период «имплантационного окна».

Согласно проведенному собственному исследованию, была продемонстрирована высокая специфичность для бесплодия, ассоциированного с хроническим эндометритом гликопротеина MUC1, а также маркера рецептивной состоятельности НОХА10, комплексно отражающих нарушения адгезии и реализации резистентности к прогестерону, детерминированных пролиферативно-воспалительными нарушениями в эндометрии пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации.

Предлагаемый способ основан на иммуногистохимическом исследовании в эндометрии в период «окна имплантации» уровней экспрессии ключевых молекул, отвечающих за адгезию - MUC1 и рецептивность - НОХА-10.

Гликопротеин MUC1 - это молекула, регулирующая адгезию в эндометрии. У здоровых женщин экспрессия MUC1 снижается до относительно низких уровней во время «окна имплантации», чтобы обеспечить возможность контакта между эмбрионом и эндометрием. С другой стороны, наше исследование, а также многочисленные исследования зарубежных коллег, показывают, что чрезвычайно низкая экспрессия MUC1 во время «окна имплантации» ассоциирована с повторными неудачами имплантации по сравнению с фертильными женщинами. Низкий уровень MUC1 может объяснить, почему у пациенток происходят повторные неудачи имплантации, несмотря на отсутствие предрасполагающих к бесплодию факторов. Кроме того, резко сниженная экспрессия MUC1 нарушает регуляцию местного иммунного ответа во время имплантации, тем самым отрицательно влияя на процесс имплантации. MUC1 экспрессируется в Т-клетках и действует, как иммуномодулятор, защищая бластоцисты во время имплантации. Таким образом, экстремальное снижение экспрессии MUC1 может снизить протективный эффект у пациенток с хроническим эндометритом, оставляя бластоцисты незащищенными от инфектов. Таким образом, экспрессия MUC1 играет важную роль в определении рецептивности эндометрия у пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации [18].

Дефектная экспрессия НОХА-10 в эндометрии во время среднесекреторной фазы ассоциирована со многими воспалительными заболеваниями, приводящими к нарушениям рецептивности и повторным неудачам имплантации [17].

Таким образом, предлагаемый способ оценки имплантационной состоятельности эндометрия при воспалительных нарушениях при хроническом эндометрите, ассоциированном с повторными неудачами имплантации, основанный на определении патогномичных маркеров, обуславливающих патогенетические особенности дисфункции рецепторного аппарата эндометрия, следует рассматривать как дополнение к стандартной диагностике рецептивности эндометрия у данной группы пациенток.

Достижимым техническим результатом является точное определение восприимчивости эндометрия к имплантации бластоцисты в период «имплантационного окна» на основании оценки его пролиферативно-воспалительного паттерна у пациенток с повторными неудачами имплантации, обусловленными хроническим эндометритом.

Указанный технический результат достигается за счет следующей совокупности существенных признаков:

- выполняют пайпель-биопсию эндометрия в период «окна имплантации»,
- проводят иммуногистохимическое исследование полученного биоматериала путем окрашивания срезов с применением поликлональных антител к следующим маркерам: MUC1 в железах эндометрия, НОХА-10 в строме и в железах,

- подсчитывают процент окрашенных клеток (то есть уровень экспрессии),
- если экспрессия MUC1 менее 6%, то присваивают «1 балл», если 6% и более, то «0 баллов»,

- если экспрессия НОХА-10 в железистом компартменте эндометрия менее 25%, присваивают «1 балл», если 25% и более, присваивают «0 баллов»,
- если экспрессия НОХА-10 в стромальном компартменте эндометрия 19% и более, присваивают «1 балл», если менее 19%, присваивают «0 баллов»,
- суммируют полученные баллы,
- при сумме: «3 балла», определяют низкий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на отрицательный прогноз имплантации бластоцисты; «2 балла», определяют умеренный имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на сомнительный прогноз имплантации бластоцисты; «0-1 балл», характеризует высокий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на положительный прогноз имплантации бластоцисты.

Разработан способ оценки рецептивности эндометрия в период «имплантационного окна», то есть на 7 день после пика лютеинизирующего гормона, определяемого в сыворотке крови при динамическом исследовании в околоовуляторный период (как правило, этот период соответствует 20-22 дням менструального цикла) производят пайпель-биопсию эндометрия. Полученный материал исследуют методом иммуногистохимии (ИГХ) с применением наборов поликлональных антител к следующим маркерам: MUC1 в железах эндометрия, НОХА-10 в строме и в железах.

Производится подсчет процента окрашенных клеток, после чего производится оценка реакции: нет реакции -  $\leq 1\%$ , низкая экспрессия - 2-10%, умеренная экспрессия - 11-50%, выраженная экспрессия -  $\geq 51\%$ . Трактовка ИГХ реакции проводится путем сравнения полученных данных с нормами значений, имеющихся от здоровых фертильных женщин без хронического эндометрита.

В настоящее исследование были включены 67 женщин в возрасте от 29 до 40 лет (средний возраст составил  $35 \pm 3,8$  года) с морфологически верифицированным диагнозом хронический эндометрит (код по МКБ10 - N71.1), а также инфертильностью (код по МКБ10 N 97.7, установленные в рубрике другие формы женского бесплодия) и повторными неудачами имплантации.

Основную группу (n=33) составили пациентки с хроническим эндометритом и бесплодием, вызванным эндометриальным фактором (средняя продолжительность бесплодия  $4,5 \pm 0,8$ ), имеющие в анамнезе 3 и более (2 и более у пациенток старше 35 лет) безуспешные попытки переноса 1 эмбриона хорошего качества в полость матки при проведении программ ЭКО (группа ХЭ ПНИ - пациентки с повторными неудачами имплантации, обусловленными хроническим эндометритом).

Группу сравнения (n=34) составили пациентки с хроническим эндометритом, реализовавшие свою репродуктивную функцию и не имевшие в анамнезе инфертильности, которые обратились для лечения нарушений менструального цикла, ассоциированных с хроническим эндометритом (группа ХЭФ - фертильные пациентки с хроническим эндометритом).

Группу морфологического контроля (n=15) составили фертильные женщины без хронического эндометрита, имеющие в анамнезе 2 и более родов доношенными здоровыми детьми, давшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Иммуногистохимическое исследование биоптатов эндометрия, взятых методом пайпель-биопсии в период предполагаемого «окна имплантации» - на 7 день после пика

лютеинизирующего гормона, определяемого в сыворотке крови при динамическом исследовании в околоовуляторный период (как правило, этот период соответствует 20-22 дням менструального цикла) - проводилось с использованием двухэтапного стрептавидин-биотин-пероксидазного метода с демаскировкой антигена и применением стандартных наборов поликлональных антител фирмы «Ventana», «Cell Marque» и «Diagnostic BioSystems» США. Иммуногистохимическое окрашивание производилось в иммуностейнере Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH (США) на парафиновых срезах по стандартной с использованием соответствующих стандартных антител выявляли маркеры (таблица 1).

**Таблица 1.** Поликлональные антитела, использованные для иммуногистохимического исследования (ИГХ)

Антитела	Характеристика
MUC1, поликлональный	Специфичный маркер адгезии бластоцисты
НОХА10, поликлональный	Маркер рецептивной состоятельности эндометрия

Был проведен анализ рецепторного аппарата эндометрия у женщин с повторными неудачами имплантации, ассоциированными с хроническим эндометритом, фертильных женщин с хроническим эндометритом и фертильных женщин без хронического эндометрита, последние составили группу морфологического контроля (Таблица 2).

**Таблица 2.** Рецепторный аппарат эндометрия у женщин с повторными неудачами имплантации, ассоциированными с хроническим эндометритом, фертильных женщин с хроническим эндометритом и фертильных женщин без хронического эндометрита

Маркер	Локализация	Процент окрашенных клеток эндометрия в основной группе (ХЭ ПНИ), n=33	Процент окрашенных клеток эндометрия в группе сравнения (ХЭФ), n=34	Процент окрашенных клеток эндометрия в группе морфологического контроля, n=13
MUC1	Железы	1,7-8,5%	10,5-24,8%	11-50%
НОХА-10	Железы	17-37%	26,4-53,7%	51-100%
	Строма	14,4-27,2%	32,6-87,5%	51-100%

В эндометрии в период «окна имплантации» у пациенток с повторными неудачами имплантации, ассоциированными с хроническим эндометритом (группа ХЭ ПНИ) в сравнении с биоптатами женщин с хроническим эндометритом и сохранной фертильной функцией (группа ХЭФ) установлены достоверные иммуногистохимические пролиферативные детерминанты. На фоне десинхронной трансформации эпителиально-мезенхимального компартмента определяется статистически значимое снижение экспрессии MUC1 в железах в группе ХЭ ПНИ по сравнению с группой ХЭФ (в 3,4 раза; 5,5% против 18,7%, соответственно). Кроме того, на фоне резистентности к прогестерону в эндометрии женщин исследуемых групп определяется нарушение рецептивной состоятельности данного паттерна, обусловленное статистически значимым снижением экспрессии НОХА10 в стромальном и железистом компартментах (в 3,4

раза; 64,7% против 19% в строме, и в 2,0 раза 24,8% и 44,2%, в соответственно,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, на основании полученных статистически значимых результатов установлены признаки нарушений адгезии и имплантационной несостоятельности эутопического эндометрия у женщин с повторными неудачами имплантации, ассоциированными с хроническим эндометритом.

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов эутопического эндометрия у женщин с повторными неудачами имплантации, ассоциированными хроническим эндометритом, были установлены патогномоничные пределы чувствительности для маркера адгезии (MUC1) и маркера рецептивности эндометрия при воспалительных заболеваниях (НОХА-10) (таблица 3).

**Таблица 3.** Патогномоничные пределы чувствительности для маркеров MUC1 и НОХА-10.

Маркер	Высокий риск имплантационной несостоятельности (баллы)	Предел чувствительности	Низкий риск имплантационной несостоятельности (баллы)
MUC1	1 балл	$< 6\% \geq$	0 баллов
НОХА-10 в железах	1 балл	$< 25\% \geq$	0 баллов
НОХА-10 в строме	1 балл	$< 19\% \geq$	0 баллов

С целью прогноза наступления имплантации подсчитывается сумма полученных баллов:

- 3 балла - высокий риск имплантационной несостоятельности (прогноз отрицательный);
- 2 балла - умеренный риск имплантационной несостоятельности (прогноз сомнительный);
- 0-1 балл - низкий риск имплантационной несостоятельности (прогноз положительный).

Таким образом, у пациенток повторными неудачами имплантации и хроническим эндометритом наблюдается нарушение рецептивности эндометрия в связи с локальными воспалительными процессами, а также нарушениями адгезии дезорганизующими синхронизацию развития желез и стромы эндометрия и децидуальную трансформацию, что реализуется в имплантационной недостаточности.

Осуществление изобретения

Проводят биопсию эндометрия в период предполагаемого «окна имплантации» - на 7 день после пика лютеинизирующего гормона, определяемого в сыворотке крови при динамическом исследовании в околоовуляторный период (как правило, этот период соответствует 20-22 дням менструального цикла) в спонтанном цикле, либо в цикле, предшествующем проведению ЭКО, с помощью аспирационной кюретки. Полученный материал после гистологической проводки в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 30, заливают в парафин на станции Leica EG 1150 (Германия). ИГХ окрашивание производят в иммуностейнере Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH (США) на депарафинизированных и дегидратированных срезах толщиной 4-6 мкм с использованием авидин-биотинового иммунопероксидазного метода. Уровень экспрессии НОХА-10 в строме и железах, MUC1 только в железах эндометрия определяют в соответствии с описанными выше методиками с применением соответствующих поликлональных антител. Производится подсчет процента

окрашенных клеток, после чего производится оценка реакции: нет реакции -  $\leq 1\%$ , низкая экспрессия - 2-10%, умеренная экспрессия - 11-50%, выраженная экспрессия -  $\geq 51\%$ . Трактовка ИГХ реакции для маркера адгезии и маркера рецептивной несостоятельности проводится путем сравнения полученных данных со следующими параметрами:

- 5 • если экспрессия MUC1  $< 6\%$ , то риск имплантационной несостоятельности высокий - 1 балл, если  $\geq 6\%$ , низкий - 0 баллов;
- если экспрессия НОХА-10 в железах  $< 25\%$ , то риск имплантационной несостоятельности высокий - 1 балл, если  $\geq 25\%$ , низкий - 0 баллов;
- 10 • если экспрессия НОХА-10 в строме  $< 19\%$ , то риск имплантационной несостоятельности высокий - 1 балл, если  $\geq 19\%$ , низкий - 0 баллов.

Далее с целью прогноза наступления беременности подсчитывается сумма полученных баллов MUC1 + НОХА-10 в железах + НОХА-10 в строме и делаются следующие заключения:

- 15 • 3 балла - высокий риск имплантационной несостоятельности (прогноз отрицательный);
- 2 балла - умеренный риск имплантационной несостоятельности (прогноз сомнительный);
- 0-1 балл - низкий риск имплантационной несостоятельности (прогноз положительный).

#### 20 Клинический пример 1

Пациентка А., 32 лет, страдает вторичным бесплодием в течение 3-х лет, в анамнезе 3 попытки ЭКО без эффекта. По данным иммуногистохимического исследования был диагностирован умеренно выраженный ХЭ. Диагноз: Бесплодие вторичное. Хронический эндометрит. Отягощенный гинекологический анамнез (1 искусственный аборт с  
25 выскабливанием полости матки, 3 попытки ЭКО, 1 операционная лапаро/гистероскопия, диагностическая гистероскопия). С целью преодоления бесплодия было проведено ЭКО и криоконсервация полученных эмбрионов. В анамнезе 3 неудачных попытки переноса эмбрионов высокого качества. При гистероскопии после 3-х неудачных попыток и прицельной биопсии эндометрия - признаки хронического эндометрита.  
30 Перед проведением следующей попытки переноса эмбрионов была произведена контрольная пайпель-биопсия эндометрия на 21 день менструального цикла.

По данным иммуногистохимического исследования получены следующие результаты: MUC1 в железах = 4% (16); НОХА-10 в железах = 19%(16); НОХА-10 в строме = 13% (16).

35 Сумма баллов составляет 3 балла, что свидетельствует о высоком риске имплантационной несостоятельности эндометрия и отрицательном прогнозе о вероятности имплантации.

После переноса эмбриона хорошего качества в полость матки в следующем менструальном цикле беременность не наступила.

#### 40 Клинический пример 2

Пациентка М., 31 года, обратилась к репродуктологу в марте 2020 года с жалобами на отсутствие беременности в течение 3 лет, отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом: в 2012 году - самопроизвольный выкидыш на сроке 2-3 недели, в 2015 году - несостоявшийся выкидыш в 8 недель беременности. Гинекологические заболевания  
45 - эктопия шейки матки, РВ-коагуляция 2013 г. Хламидиоз - пролечен в 2009 г. Операции - лапароскопическая правосторонняя аднексэктомия по поводу тубовариального абсцесса, в 2010 г. В анамнезе 3 неудачных попытки имплантации при переносе эмбрионов высокого качества (4АВ): 1 перенос в стимулированном цикле, 2 - в

криоцикле. Результаты диагностической гистероскопии и гистологического исследования на 9 день менструального цикла после 3-х неудачных попыток переноса эмбрионов свидетельствуют о наличии умеренного хронического эндометрита минимальной степени активности. С целью оценки имплантационных возможностей эндометрия перед проведением следующей попытки переноса эмбрионов была произведена контрольная пайпель-биопсия эндометрия на 22 день менструального цикла.

По данным иммуногистохимического исследования получены следующие результаты: MUC1 в железах = 12% (0б); НОХА-10 в железах = 39% (0б); НОХА-10 в строме = 27% (0б).

Сумма баллов составляет 0 баллов, что свидетельствует о низком риске имплантационной несостоятельности эндометрия и положительном прогнозе о вероятности имплантации.

В следующем менструальном цикле был произведен перенос эмбриона хорошего качества, наступила клиническая прогрессирующая маточная беременность (подтвержденная визуализацией сердцебиения эмбриона и соответствующему сроку уровню ХГЧ в крови). Таким образом, фертильность была достигнута.

### Клинический пример 3

Пациентка А., 28 лет. Обратилась с жалобами на отсутствие беременности в течение 4 лет регулярной половой жизни без контрацепции. В анамнезе: в возрасте 20 лет медицинский аборт при сроке беременности 8-9 недель, без осложнений. В анамнезе 4 неудачных попытки имплантации при переносе эмбрионов высокого качества (4АВ): 2 переноса в стимулированном цикле, 2 - в криоцикле. Обследована. Патогенная и условно-патогенная флора отсутствует. Маточные трубы проходимы. Обследование партнера патологии не выявило. По результатам гистологического исследования эндометрия выставлен диагноз: Бесплодие 2. Хронический эндометрит. Отягощенный акушерско-гинекологический анамнез. По данным ультразвукового и гистероскопического исследований обнаружены признаки хронического эндометрита. С целью оценки имплантационных возможностей эндометрия перед проведением следующей попытки переноса эмбрионов была произведена контрольная пайпель-биопсия эндометрия на 22 день менструального цикла.

По данным иммуногистохимического исследования получены следующие результаты: MUC1 в железах = 3% (1б); НОХА-10 в железах = 15% (1б); НОХА-10 в строме = 12% (1б).

Сумма баллов составляет 3 балла, что свидетельствует о высоком риске имплантационной несостоятельности эндометрия и отрицательном прогнозе о вероятности имплантации.

После переноса эмбриона хорошего качества в полость матки в следующем менструальном цикле беременность не наступила.

### Список литературы

1. Kasius JC, Fatemi HM, Bourgain C et al. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. *Fertil Steril* 2011; 96: 1451-1456.
2. Cicinelli E, Matteo M, Trojano G et al. Chronic endometritis in patients with unexplained infertility: Prevalence and effects of antibiotic treatment on spontaneous conception. *Am J Reprod Immunol* 2018; 79: e12782.
3. Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch JJ, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: Prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril* 2016; 105: 106-110.

4. Johnston - MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010; 93: 437-441.

5. Liu Y, Chen X, Huang J et al. Comparison of the prevalence of chronic endometritis as determined by means of different diagnostic methods in women with and without reproductive failure. *Fertil Steril* 2018; 109: 832-839.

6. Kitaya K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2011; 95: 1156-1158.

7. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* 2014; 21: 640-647.

8. Tortorella C, Piazzolla G, Matteo M et al. Interleukin-6, interleukin-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. *Fertil Steril* 2014; 101:242-247

9. Kitaya K, Yasuo T. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod Pathol* 2010; 23: 1136-1146.

10. Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, Kang JH. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* 2015; 15: 16-26

11. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, Dural O, Nehir Aytan A, Celik C, Buyru F, Yeh J. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2015 Apr; 103(4):1059-1064.e2.

12. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 28-36.

13. Matteo M, Cicinelli E, Greco P et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol* 2009; 61: 322-329.

14. Pinto V, Matteo M, Tinelli R, Mitola PC, De Ziegler D, Cicinelli E. Altered uterine contractility in women with chronic endometritis. *Fertil Steril* 2015; 103: 1049-1052.

15. Di Pietro C, Cicinelli E, Guglielmino MR et al. Altered transcriptional regulation of cytokines, growth factors, and apoptotic proteins in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2013 May; 69(5):509-17.

16. Wu D, Kimura F, Zheng L et al. Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2017; 15: 16.

17. Yang Y, Chen X, Saravelos SH, Liu Y, Huang J, Zhang J, Li TC. HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2017 Jan; 107(1):136-143.e2.

18. Айламазян Эдуард Карпович, Толибова Гулрухсор Хайбуллоевна, Траль Татьяна Георгиевна и др. «Клинико-морфологические детерминанты бесплодия, ассоциированного с воспалительными заболеваниями органов малого таза» // Ж. акуш. и жен. болезн.. 2015. №6.

#### (57) Формула изобретения

Способ оценки имплантационного потенциала эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации, ассоциированными с хроническим эндометритом, включающий выполнение пайпель-биопсии эндометрия в период «окна имплантации», отличающийся тем, что проводят иммуногистохимическое исследование полученного биоматериала путем окрашивания срезов с применением поликлональных антител к следующим маркерам: MUC1 в железах эндометрия, HOXA-10 в строме и в железах, подсчитывают процент окрашенных клеток, если экспрессия MUC1 менее 6%, то присваивают «1 балл»,

если 6% и более, то «0 баллов», если экспрессия НОХА-10 в железистом компартменте эндометрия менее 25%, присваивают «1 балл», если 25% и более, присваивают «0 баллов», если экспрессия НОХА-10 в стромальном компартменте эндометрия 19% и более, присваивают «1 балл», если менее 19%, присваивают «0 баллов», суммируют  
5 полученные баллы и при сумме: «3 балла», определяют низкий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на отрицательный прогноз имплантации blastocysts; «2 балла», определяют умеренный имплантационный потенциал эндометрия, указывающий на сомнительный прогноз имплантации blastocysts; «0-1 балл», характеризует высокий имплантационный потенциал эндометрия, указывающий  
10 на положительный прогноз имплантации blastocysts.

15

20

25

30

35

40

45