

DOI 10.29254/2077-4214-2023-1-168-343-351

UDC 618.14-002/.177

Kiriya D. G.

THE ROLE OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSFORMATION IN INFERTILITY CAUSED BY CHRONIC ENDOMETRITIS

Kharkiv National Medical University (Kharkiv, Ukraine)

docpathomotph@gmail.com

Chronic endometritis accounts for a significant share (about 25%) of the specific weight in the structure of female infertility. Therefore, studying the molecular and biological characteristics of the endometrium in this disease is essential for monitoring the success of women's treatment and solving the infertility problem. The purpose of the study was to improve the morphological criteria for the diagnosis and prognosis of the course of chronic endometritis based on the study of the molecular and biological characteristics of the endometrium. 2 research groups were formed: group I – women before therapy and group II – patients after treatment with subsequent birth to determine the morphological and immunohistochemical diagnostic and prognostic criteria of chronic endometritis. IHC examination of their endometrial papilloma biopsies was performed using monoclonal antibodies to E-cadherin, Vimentin, and CD138. In group II, a significant decrease ($p < 0.0001$) in CD138 expression was observed; the average number of CD138+ cells was 0.72 ± 0.11 . The phenomenon of epithelial-mesenchymal transformation (EMT) was observed in all cases of chronic endometritis (CE) before treatment. After the therapy, with the help of oral contraceptives, immunomodulators and additional pathogenetic treatment, the phenomenon of EMT was transformed into mesenchymal-epithelial transition (MET). The level of E-cadherin after treatment varied between 51-100% ($\chi^2 = 4.29$, $p = 0.04$) and Vimentin $< 10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0.0001$). Such indicators can be considered acceptable for the onset of pregnancy. An inverse correlation was established between the expression of CD138 and E-cadherin in the I study group ($p = 0.011$), while in the II group, such a relationship was not observed ($p = 0.65$). The expression levels of E-cadherin 51-100% ($p = 0.04$) and Vimentin $< 10\%$ ($p < 0.0001$), as well as a significant decrease in the number of CD138+ cells ($p < 0.0001$) in comparison with the primary studied endometrial pipelle biopsy. In the future, it is interesting to study the maximum absolute number of CD138+ cells that can be detected in biopsies in case of a favourable prognosis for the onset of pregnancy.

Key words: chronic endometritis, epithelial-mesenchymal transformation, female infertility.

Connection of the publication with planned research works.

The publication is part of the scientific topic of the Department of Perinatology, Obstetrics and Gynecology of the Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (KhMAPE): «Study of pathogenetic factors effect of damage to the reproductive women system on the structure of perinatal losses and gynaecological morbidity and the development of new therapeutic measures aimed at preserving the health of the nation» (state registration № 0111U002865), in which the author is the direct executor of morphological and immunohistochemical (IHC) studies of women with chronic endometritis (CE) and performs it together with the Department of Pathological Anatomy and Histology of KhMAPE.

Introduction.

The relevance of studying chronic endometritis's (CE) morphological and immunohistochemical features is beyond doubt. According to various authors, CE occupies from 10% to 25% of the overall structure of female infertility [1, 2].

An important pathogenetic link in the development of infertility is the process of epithelial-mesenchymal transformation [3]. This phenomenon implies that epithelial cells lose their polarity and intercellular interaction and acquire mesenchymal features. It is known that epithelial-mesenchymal transformation (EMT) plays a fatal role in normal embryonic development, carcinogenesis and metastasis, the process of fibrosis, while the re-

verse process – mesenchymal-epithelial transformation contributes to the induction of the endometrium before the implantation of the fertilized egg and the fixation of the embryo in the uterus [4, 5]. On the other hand, researchers have also described the positive role of EMT in the process of embryo implantation [3], so the question of the role of epithelial-mesenchymal transformation in the onset of infertility is still debatable.

The aim of the study.

Improvement of morphological criteria for predicting the CE course based on EMT research at the molecular-biological level.

Object and research methods.

Our research material was medical documentation, histological micropreparations and paraffin blocks of patients who applied from various medical institutions in Kharkiv to the «Prime-test» laboratory for the period 2014-2021. The area of our scientific interest was female infertility caused by chronic endometritis, so 5325 cases of gynaecological surgical interventions, including minimally invasive manipulations, were analyzed in the journal of the immunohistochemical laboratory to find exactly such cases.

Five hundred twenty-one cases diagnosed with «infertility» of various etiologies were selected. Directly as a result of chronic endometritis, 186 patients turned out to be infertile, but due to the absence or inadequate quality of paraffin blocks or micropreparations, 50 cases were selected for further morphological examination.

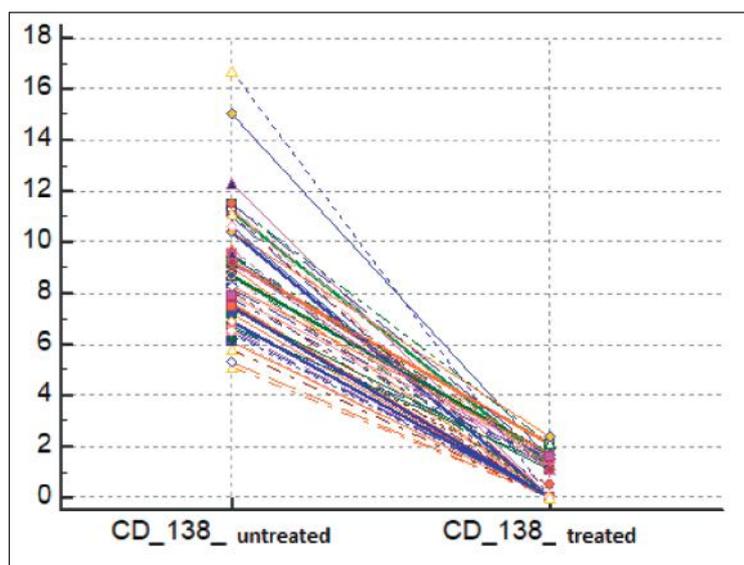


Figure 1 – Point-and-line diagram of CD138 dynamics expression changes in patients before and after the treatment.

Since we were interested in the dynamics of changes in the endometrium before and after therapy, the ICH study of the material was carried out in 50 cases of pipelle biopsy of chronic endometritis, which was treated according to various schemes with the use of oral contraceptives, immunocorrective drugs and additional pathogenetic therapy, and, according to the records of the medical documentation, as a result of treatment and pre-pregnancy preparation, pregnancy occurred. From each case, one paraffin block before and after treatment was selected for ICH examination. The cases are divided into two research groups: group I – before the treatment and group II – after the therapy of chronic endometritis.

A histological examination was performed using routine hematoxylin-eosin (HE) staining. To conduct an immunohistochemical study, the material was fixed in 10% neutral formalin for 24 hours, embedded in paraffin and sections 4 μm thick were prepared, which were applied to highly adhesive Super Frost slides and dried at a temperature of 37°C for 18 hours. Unmasking heat treatment was performed by boiling the sections in a citrate

buffer (pH 6.0). The UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer detection system (Thermo scientific) was used to visualize primary antibodies. DAB (diaminobenzidine) was used as a chromogen.

Primary monoclonal antibodies (MCAT) from DAKO (Denmark) and ThermoScientific (Germany), and Diagnostic BioSystems (USA) were used. The expression of the following markers was studied: E-cadherin (EP7004, Thermo Scientific), Vimentin (Diagnostic BioSystems) and CD138 (Diagnostic BioSystems).

A semi-quantitative scale of 0-3+ was used to assess the intensity of the IHC marks 0 – no expression, + – weak, ++ – moderate, +++ – pronounced reaction. For the quantitative assessment of the immunohistochemical marking of E-cadherin and Vimentin, the percentage of staining was taken into account: 0 – no staining, <10% of nuclei – a weak level, 10-50% – a moderate level, 51-100% – a high level of expression. To evaluate the CD138 immunohistochemical marks, we used the

count of the number of positively stained cells at a magnification of $\times 400$ in at least ten fields of view.

Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test to assess differences between paired samples by trait level. Spearman's rank correlation method was used to determine correlation. The Pearson test with Yates correction evaluated the differences between the studied groups. The significance level was considered to be ≤ 0.05 .

Research results.

During the morphological examination of the endometrium, typical signs of chronic endometritis were observed in all patients of group I (100%): multiple inflammatory infiltrates and diffuse single cellular elements, mainly consisting of plasma cells. In 46 cases (92%) of the I group, clusters of immunocompetent cells forming lymphoid follicles were clearly defined. Such formations were located not only in the basal but also in other parts of the functional layer of the endometrium. Inflammatory infiltrates also included leukocytes and histiocytes.

Focal sclerosis of the walls of the spiral vessels of the endometrium and fibrosis of the stroma in separate fields of view also testified to the remoteness of the inflammatory process and its chronicity.

In patients of the II group, that is, those who underwent a course of treatment, the morphological picture of chronic endometritis disappeared or was significantly erased. Histological examination with routine HE staining revealed that in 22 cases, the endometrium was in the early proliferative phase, 9 cases in the middle proliferation phase, and 19 cases in the late proliferative phase. Morphological changes of the endometrium corresponded to those that should have occurred following cyclical changes. In 3 samples (6%), single small fields of fibrosis were observed; in 5 cases of the early proliferative phase (10% of the total number of cases) and 2 cases of the late proliferative phase, scanty plasmatic infiltration with an admixture of

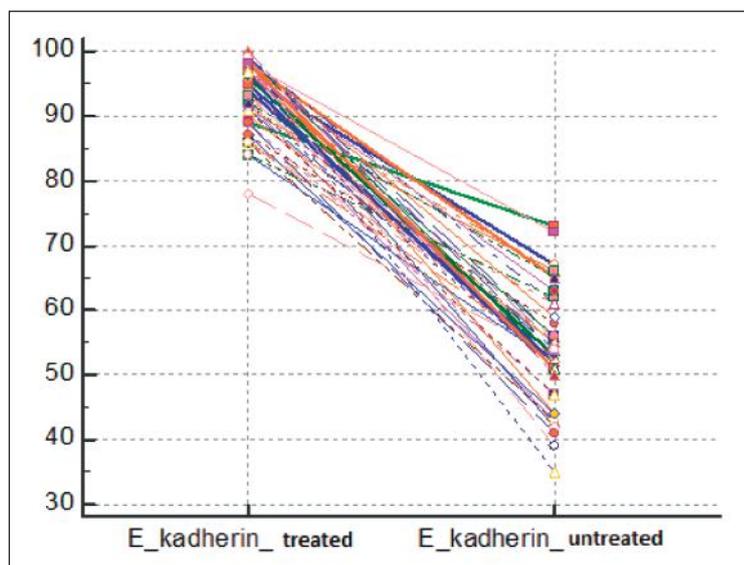


Figure 2 – Point-and-line diagram of E-cadherin dynamics expression changes in patients before and after the treatment.

single leukocytes was noted, in the remaining cases, single diffuse leukocytes occurred.

During the IHC study of the CD138 marker, it was found that in group I, the number of positively stained cells ranged from 5.1 ± 2.4 to 16.7 ± 3.2 (median 8.8 ± 0.33). Studying the 2nd group, a significant decrease in the expression of the marker was found ($p < 0.0001$), which can also be seen in the diagram (fig. 1). Thus, the expression of the marker was either not determined at all or amounted to 2.4 ± 1.3 stained cells with an average value of 0.72 ± 0.11 .

The next investigated marker was E-cadherin. In the group of cases before the treatment, 9 (18%) cases showed a moderate level of expression, and the remaining cases expressed E-cadherin at a high level ($54.14 \pm 1.16\%$). However, compared with the second group, the expression indicators were lower in the first group ($p < 0.001$), which can also be seen in figure 2. It was also established that the E-cadherin level of 51-100% was considered favourable for the onset of pregnancy ($\chi^2 = 4.29$, $p = 0.04$).

An inverse correlation was also found between the expression of CD138 and E-cadherin in the I study group ($p = 0.011$) (fig. 3); in the II group, such a connection turned out to be weak ($p = 0.65$).

Examining the expression of Vimentin in the 1st group, it was found that its expression mainly was at moderate and high levels, but the indicator did not exceed 70% and, on average, was $54.6 \pm 1.25\%$. In the II group, the expression of Vimentin was absent or was at a weak and moderate level and did not exceed 21%; its significant decrease was also noticed compared to the I study group ($p < 0.001$). It was also established that a level of $< 10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0.0001$) was considered a favourable marker expression level for the onset of pregnancy. The phenomenon of EMT was observed in the group of patients before the treatment, shown in figure 4; on the contrary, mesenchymal-epithelial transformation (MET) was observed in group II (figure 5).

A weak direct correlation was found between the expression of CD138 and Vimentin in the first ($p = 0.16$) and the second studied groups ($p = 0.7$).

Discussion of research results.

EMT among scientists is ambiguous and debatable because it plays a leading role in physiological processes and oncogenesis, mis-carriage.

When studying the molecular biological features of the endometrium in endometriosis, it was proven that endometrial cells acquire abilities similar to cancer cells: the ability to invade and metastasize, while the primary pathogenetic mechanism is the epithelial-mesenchymal transition [6]. In chronic endometriosis, there is persistent inflammation in the endometrium with the release of pro-inflammatory cytokines, in particular hypoxia-inducing factor (HIF), which, in turn, triggers a cascade of EMT reactions [6]. As a result, epitheliocytes disintegrate and acquire mesenchymal features [4, 6].

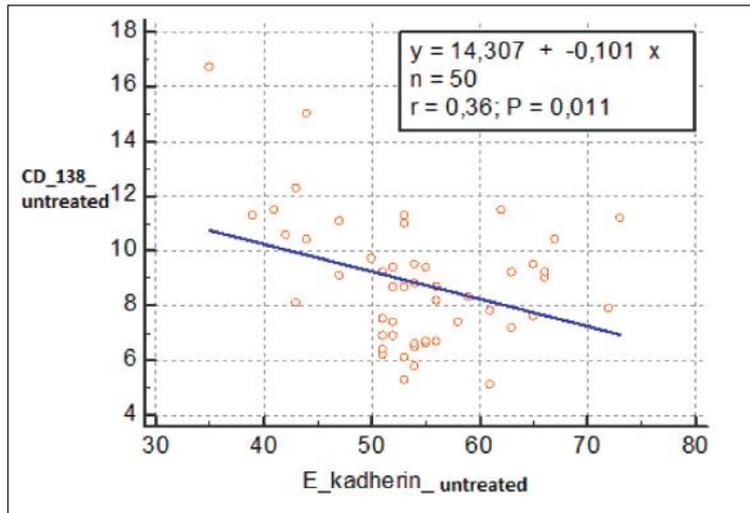


Figure 3 – Graph of the correlation between the expression of CD138 and the expression of E-cadherin.

In our study, we studied the role of EMT and MET in the onset of pregnancy and its carrying in patients with chronic endometriosis after the treatment. The first investigated marker was CD138, a marker of plasma cells. Its expression in patients with chronic endometriosis before treatment was 8.8 ± 0.33 cells, with a significant decrease ($p < 0.0001$) after treatment with an average value of 2.4 ± 1.3 cells. After the treatment, all patients became pregnant and carried a baby; that is, the positive effect of a significant decrease in the number of plasma cells on the possibility of pregnancy is pronounced. Yuye Li and co-authors came to the same opinion in their study and also calculated that the permissible number of plasma cells for the onset of pregnancy should not exceed four cells, which does not contradict the data we obtained [7].

Also, in the group before the treatment, the epithelial-mesenchymal transition was clearly visible ($p = 0.001$), and in the group after the treatment, the endometrium underwent mesenchymal-epithelial transformation ($p < 0.001$), which, obviously, also has a positive effect on the ability of the embryo to implant in the endometrium. The same conclusion was reached by Mitsuaki Ishida and co-authors [3]. We did not find strong correlations between CD138 expression and EMT markers – E-cadherin

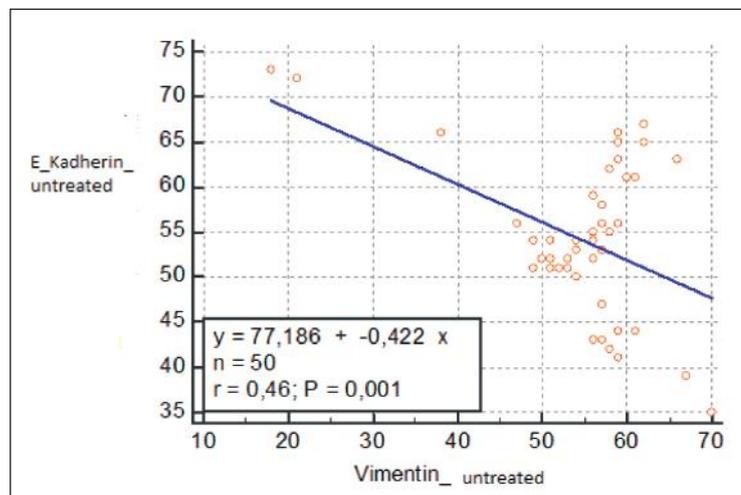


Figure 4 – Regression graph showing the EMT phenomenon in a group of women with chronic endometriosis before treatment.

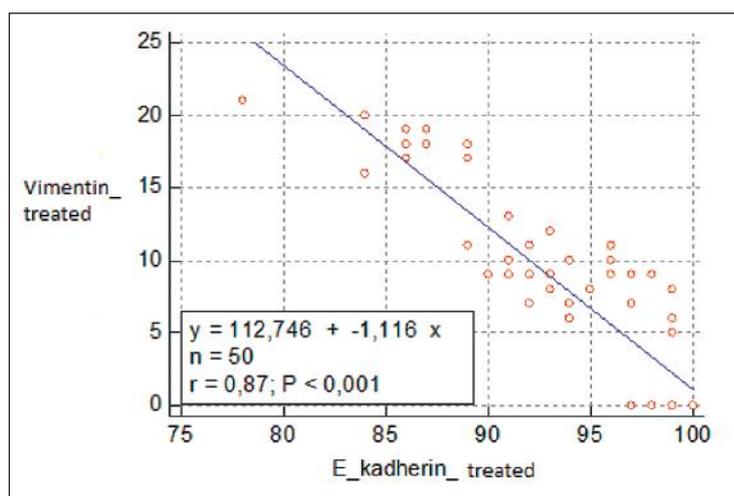


Figure 5 – Regression graph showing the MET phenomenon in a group of women with chronic endometritis after treatment.

and Vimentin. In our opinion, the relationship between the expression of E-cadherin and Vimentin with other markers of immunocompetent cells should be followed to make a comprehensive conclusion about the relationship between the severity of inflammation, EMT and the fact of female infertility. In the literature, there are few mentions of a particular pattern of immunocompetent cells in women with chronic endometritis [8]. However, the connection of this phenotype with the EMT phenomenon is not investigated.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-1-168-343-351

УДК 618.14-002/.177

Кірія Д. Г.

РОЛЬ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ У БЕЗПЛІДДІ, ВИКЛИКАНОМУ ХРОНІЧНИМ ЕНДОМЕТРИТОМ

Харківський національний медичний університет (м. Харків, Україна)

docpathomoph@gmail.com

Хронічний ендометрит становить значну частку (близько 25%) питомої ваги у структурі жіночого безпліддя, тому дослідження молекулярно-біологічних характеристик ендометрія при даному захворюванні є важливим для контролю успішності лікування жінок та вирішення проблеми інфертильності. Метою дослідження було вдосконалення морфологічних критеріїв діагностики та прогнозу перебігу хронічного ендометриту на підставі вивчення молекулярно-біологічних характеристик ендометрію. Для визначення морфологічних та імуногістохімічних діагностично-прогностичних критеріїв хронічного ендометриту сформовано 2 групи дослідження: I група – жінки до проведеної терапії, II група – пацієнтки після лікування з послідовним народженням. ІГХ-дослідження їх пайпель-біоптатів ендометрію проводилося з використанням моноклональних антитіл до Е-кадгерину, Віментину та CD138. В II групі спостерігалось суттєве зменшення ($p < 0,0001$) експресії CD138, середній показник кількості CD138+ клітин склав $0,72 \pm 0,11$. Феномен епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) спостерігався в усіх випадках хронічного ендометриту (XE) до лікування. Після проведеної терапії за допомогою оральних контрацептивів, імуномодуляторів та додаткової патогенетичної терапії феномен EMT трансформувался в мезенхімально-епітеліальний перехід (MET). Рівень Е-кадгерину після лікування коливався в межах 51-100% ($\chi^2 = 4,29$, $p = 0,04$) та Віментину $< 10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0,0001$). Такі показники можна вважати прийнятними для настання вагітності. Встановлено зворотній кореляційний зв'язок між експресією CD138 та Е-кадгерином у I досліджуваній групі ($p = 0,011$), в той же час в II групі такого зв'язку не простежувалося ($p = 0,65$). Сприятливими для та констатації успішності лікування XE та можливості завагітніти є рівні експресії Е-кадгерину 51-100% ($p = 0,04$) та Віментину $< 10\%$ ($p < 0,0001$), а також суттєве зниження кількості CD138+ клітин ($p < 0,0001$) в порівнянні з первинною дослідженою пайпель-біопсією ендометрія. В подальшому цікавим є дослідження максимального абсолютного числа CD138+ клітин, що можуть бути виявлені в біоптатах у разі сприятливого прогнозу для настання вагітності.

Ключові слова: хронічний ендометрит, епітеліально-мезенхімальна трансформація, жіноче безпліддя.

The data we obtained allowed us to confirm the importance of using IHC markers Vimentin and E-cadherin with a prognostic purpose to assess the readiness of the endometrium for fertilization in women with chronic endometritis after treatment and also establish prognostically favourable levels of both markers.

Conclusions.

The phenomenon of EMT in the endometrium is characteristic of women with chronic endometritis, while the reverse process occurs after treatment.

For the onset of pregnancy, the characteristic level of E-cadherin was more than 50%, and Vimentin $< 10\%$.

No direct connection between the level of expression of the plasma cell marker CD138 and the phenomenon of EMT was found;

A significant decrease in CD138 expression or its complete absence is necessary for pregnancy, but the absolute acceptable values of the number of CD138+ cells should be investigated to create a more accurate prognosis of the success of chronic endometritis treatment.

Prospects for further research.

The study of the molecular biological characteristics of the endometrium in chronic endometritis with the creation of an optimal panel of immunohistochemical markers that will be used to control the quality of treatment and the prognosis of pregnancy remains an urgent issue.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Публікація є частиною НДР кафедри перинатології, акушерства та гінекології Харківської медичної академії післядипломної освіти (ХМАПО): “Вивчення дії патогенетичних факторів ушкодження репродуктивної системи жінок на структуру перинатальних втрат і гінекологічну захворюваність і розробка нових терапевтичних заходів, спрямованих на збереження здоров'я нації” (№ державної реєстрації 0111U002865), у якій автор є безпосереднім виконавцем морфологічних та імуногістохімічних (ІГХ) досліджень жінок з хронічним ендометритом (ХЕ) та виконує її спільно з кафедрою патологічної анатомії та гістології ХМАПО.

Вступ.

Актуальність вивчення морфологічних та імуногістохімічних особливостей хронічного ендометриту (ХЕ) не викликає сумнівів. За даними різних авторів ХЕ займає від 10% до 25% у загальній структурі жіночого безпліддя [1, 2].

Важливою патогенетичною ланкою у розвитку інфертильності є процес епітеліально-мезенхімальної трансформації [3]. Дане явище передбачає, що епітеліальні клітини втрачають свою полярність та міжклітинну взаємодію та набувають мезенхімальних рис. Відомо, що епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT) грає фатальну роль у нормальному ембріональному розвитку, канцерогенезі та метастазуванні, процесі фіброзування, в той час, як зворотній процес – мезенхімально-епітеліальна трансформація сприяє індукції ендометрія до настання імплантації плідного яйця та закріплення ембріона в матці [4, 5]. З іншого боку, дослідниками також описана позитивна роль EMT у процесі імплантації ембріона [3], тому питання ролі епітеліально-мезенхімальної трансформації у настанні інфертильності досі залишається дискусійним.

Мета дослідження.

Вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ХЕ на підставі дослідження EMT на молекулярно-біологічному рівні.

Об'єкт і методи дослідження.

Матеріалом нашого дослідження стала медична документація, а також гістологічні мікропрепарати та парафінові блоки пацієнток, що звернулися з різних лікувальних установ м. Харків до лабораторії «Прайм-тест» за період 2014-2021 роки. Зоною нашого наукового інтересу стало жіноче безпліддя, зумовлене хронічним ендометритом, тому в журналі обліку імуногістохімічної лабораторії з метою віднайдення саме таких випадків проаналізовано 5325 випадків гінекологічних оперативних втручань, в тому числі малоінвазивних маніпуляцій.

Відібрано 521 випадок зі встановленим діагнозом «безпліддя» різної етіології. Безпосередньо внаслідок хронічного ендометриту інфертильними виявилися 186 пацієнток, але через відсутність або неналежну якість парафінових блоків або

мікропрепаратів для подальшого морфологічного дослідження відібрано 50 випадків.

Оскільки нас цікавила динаміка змін ендометрію до та після терапії, ІГХ-дослідження матеріалу проводилося у 50 випадках виконаної пайпель-біопсії хронічного ендометриту, який було піддано лікуванню за різними схемами з застосуванням оральних контрацептивів, імунокорегуючих препаратів та додаткової патогенетичної терапії, та, згідно записам медичної документації, внаслідок лікування та передгравідарної підготовки наступила вагітність. З кожного випадку для проведення ІГХ-дослідження відібрано 1 парафіновий блок до та після лікування. Випадки, відповідно, поділені на 2 групи дослідження: I група – до проведеного лікування та II група – після терапії хронічного ендометриту.

Гістологічне дослідження проводилося з застосуванням рутинного фарбування за гематоксиліном-еозином (ГЕ). Для виконання імуногістохімічного дослідження матеріал фіксували у 10% нейтральному формаліні протягом 24 год, заливали в парафін, готували зрізи товщиною 4 мкм, які наносили на високоадгезивні скельця Super Frost і висушували при температурі 37°C протягом 18 годин. Демаскуюча термічна обробка була виконана за методом кип'ятіння зрізів в цитратному буфері (pH 6,0). Для візуалізації первинних антитіл застосовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). В якості хромогену використовувався DAB (діамінобензидін).

Використовували первинні моноклональні антитіла (МКАТ) фірми DAKO (Данія) і ThermoScientific (Німеччина) і Diagnostic BioSystems (США). Досліджували експресію таких маркерів: E-кадгерина (EP7004, Thermo Scientific), Vimentin (Diagnostic BioSystems), CD138 (Diagnostic BioSystems).

Для оцінки інтенсивності ІГХ-мітки маркерів використовували напівкількісну шкалу 0-3 +: 0 – відсутність експресії, + – слабка, ++ – помірна, +++ – виражена реакція. Для кількісної оцінки імуногістохімічної мітки E-кадгерина і Віментину брали до уваги відсоток фарбування: 0 – відсутність фарбування, <10% ядер – слабкий рівень, 10-50% – помірний

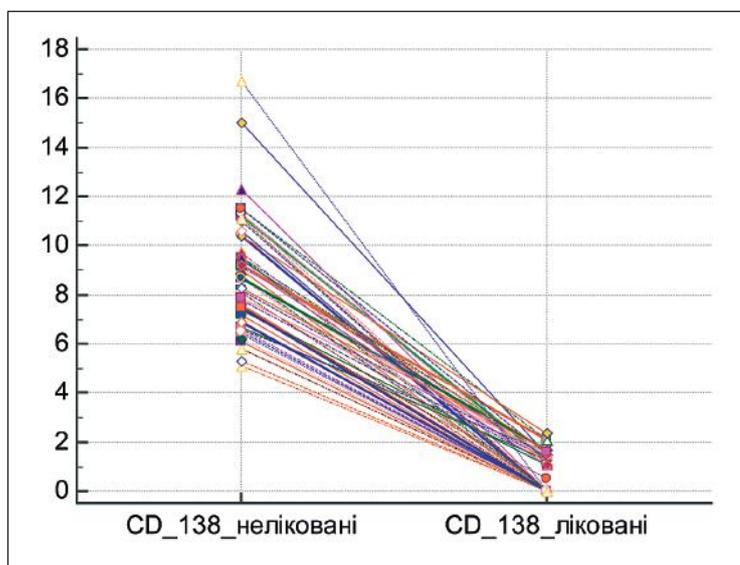


Рисунок 1 – Точково-лінійна діаграма динаміки зміни експресії CD138 у пацієнток до та після проведеного лікування.

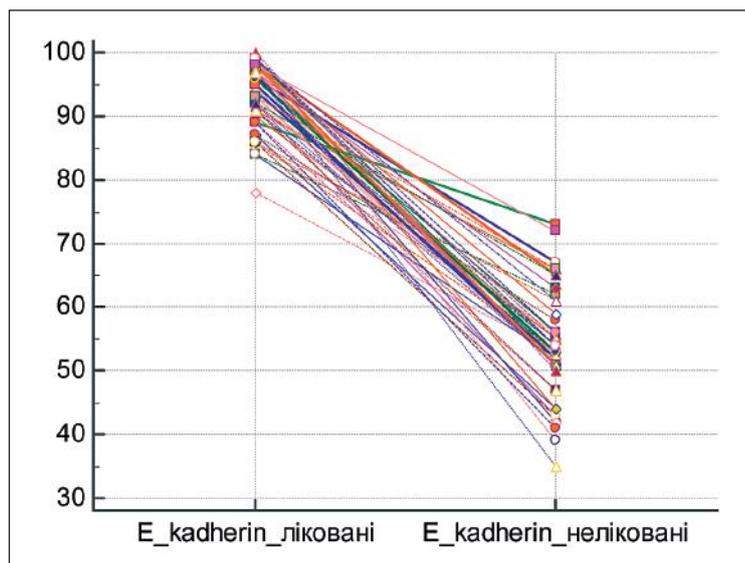


Рисунок 2 – Точково-лінійна діаграма динаміки зміни експресії Е-кадгерину у пацієнток до та після проведеного лікування.

рівень, 51-100% – високий рівень експресії. Для оцінки імуногістохімічної мітки CD138 використовували підрахунок кількості позитивно забарвлених клітин на збільшенні $\times 400$ мінімум в 10 полях зору.

Статистичний аналіз проводився з використанням критерію Уїлкоксона для оцінки відмінностей між парними вибірками за рівнем ознаки. Для оцінки кореляційного зв'язку використовували метод рангової кореляції Спірмена. Для оцінки відмінностей між досліджуваними групами використовували критерій Пірсона з поправкою Йетса. Значущим вважався рівень достовірності $\leq 0,05$.

Результати дослідження.

При морфологічному дослідженні ендометрію у всіх пацієнток I групи (100%) спостерігалися типові ознаки наявності хронічного ендометриту: множинні запальні інфільтрати та дифузні поодинокі клітинні елементи, що переважно склалися із плазматичних клітин. В 46 випадках (92%) I групи чітко визна-

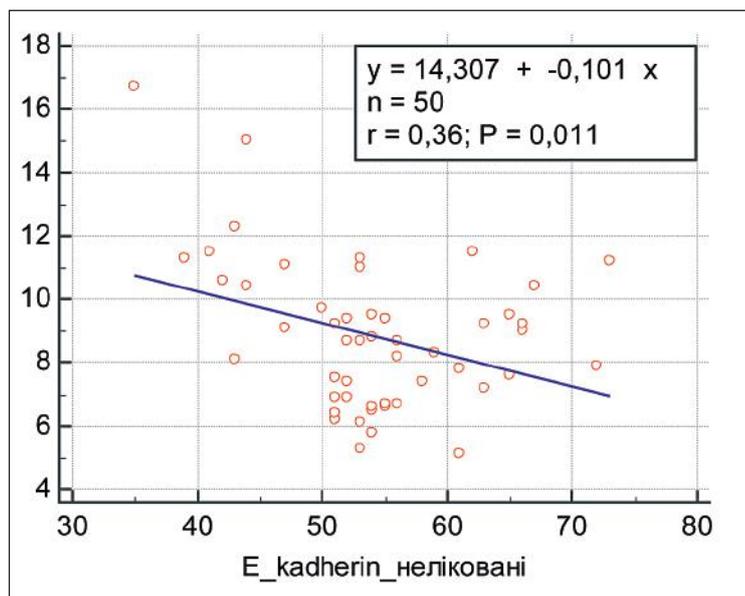


Рисунок 3 – Графік кореляційної залежності експресії CD138 від експресії Е-кадгерину.

чалися скупчення імунокомпетентних клітин, що формували лімфоїдні фолікули. Такі утворення розташовувалися не тільки в базальному, а і в інших відділах функціонального шару ендометрія. Також до складу запальних інфільтратів входили лейкоцити та гістіоцити. Про давність запального процесу та його хронізацію свідчили також вогнищевий склероз стінок спіральних судин ендометрію та фіброз строми в окремих полях зору.

У пацієнток II групи, тобто тих, що пройшли курс лікування, морфологічна картина хронічного ендометриту зникала або суттєво стиралася. При гістологічному дослідженні з рутинним фарбуванням за GE виявлено, що у 22 випадках ендометрій перебував у фазі ранньої проліферації, у 9 випадках – середньої проліферації та у 19 випадках – в пізній проліферативній фазі. Морфологічні зміни ендометрія відповідали таким, що мали відбуватися відповідно до циклічних змін. В 3 зразках (6%)

помічені дрібні одиничні поля фіброзу, в 5 випадках ранньої проліферативної фази (10% від загальної кількості випадків) та у 2 випадках пізньої проліферативної фази помічено скудну плазматичну інфільтрацію з домішкою поодиноких лейкоцитів, в решті випадків траплялися поодинокі дифузні лейкоцити.

При ІГХ дослідженні маркера CD138 виявлено, що у I групі кількість позитивно забарвлених клітин коливалася у межах від $5,1 \pm 2,4$ до $16,7 \pm 3,2$ (медіана $8,8 \pm 0,33$). Досліджуючи 2 групу, виявлено суттєве зниження експресії маркера ($p < 0,0001$), що видно також на діаграмі (рис. 1). Так, експресія маркера або не визначалася зовсім або становила $2,4 \pm 1,3$ забарвлені клітини з середнім значенням $0,72 \pm 0,11$.

Наступним досліджуваним маркером став Е-кадгерин. Встановлено, що в групі випадків до проведеного лікування 9 (18%) випадків продемонстрували помірний рівень експресії, решта випадків експресували Е-кадгерин на високому рівні ($54,14 \pm 1,16\%$). Проте, в порівнянні другою групою, показники експресії були в першій групі були нижчими ($p < 0,001$), що також видно на **рисунку 2**. Також встановлено, що для настання вагітності сприятливим вважався рівень Е-кадгерину 51-100% ($\chi^2 = 4,29$, $p = 0,04$).

Знайдено також зворотній кореляційний зв'язок між експресією CD138 та Е-кадгерином у I досліджуваній групі ($p = 0,011$) (рис. 3), у II групі такий зв'язок виявився слабким ($p = 0,65$).

Досліджуючи експресію Віментину в I групі було виявлено, що його експресія переважно знаходилася на помірному та високому рівнях, але показник не перевищував 70%, а в середньому склав $54,6 \pm 1,25\%$. В II групі експресія Віментину була відсутня або знаходилася на слабкому та помірному рівні і не перевищувала 21%, також помічено її суттєве зниження порівняно з I групою дослідження ($p < 0,001$). Також встановлено, що для настання вагітності

сприятливим рівнем експресії маркера вважався рівень $<10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0,0001$). Феномен ЕМТ чітко спостерігався у групі пацієнок до проведеного лікування, що показано на **рисунку 4**, і, навпаки – у групі II спостерігався феномен мезенхімально-епітеліальної трансформації (МЕТ) (**рис. 5**).

Знайдено слабкий прямий кореляційний зв'язок між експресією CD138 та Віментином у першій ($p=0,16$) та другій досліджуваних групах ($p=0,7$).

Обговорення результатів дослідження.

Феномен ЕМТ серед науковців є неоднозначним та дискусійним, адже він відіграє провідну роль як у фізіологічних процесах, так і у онкогенезі, невиношувани вагітності.

При вивченні молекулярно-біологічних особливостей ендометрію при ендометріозі доведено, що клітини ендометрію набувають здібностей, схожих з раковими клітинами: здатність до інвазії та метастазування, при цьому основним патогенетичним механізмом виступає епітеліально-мезенхімальний перехід [6]. При хронічному ендометриті в ендометрії існує персистуюче запалення із викидом прозапальних цитокінів, зокрема гіпоксія-індукуючий фактор (HIF), що, в свою чергу запускає каскад реакцій ЕМТ [6]. Як наслідок, епітеліоцити дезінтегруються та набувають мезенхімальних рис [4, 6].

В нашому дослідженні ми вивчали роль ЕМТ та МЕТ у настанні вагітності та її виношуванні в пацієнок з хронічним ендометритом після проведеного лікування. Першим досліджуваним маркером став CD138 – маркер плазматичних клітин. Його експресія у групі пацієнок з хронічним ендометритом до лікування становила $8,8 \pm 0,33$ клітин з суттєвим зниженням ($p < 0,0001$) після лікування з середнім значенням $2,4 \pm 1,3$ клітин. Всі пацієнтки після проведеного лікування завагітніли та виносили малюка, тобто очевидним є позитивний вплив суттєвого зниження кількості плазмоцитів на можливість настання вагітності. Такої ж думки в своєму дослідженні дійшли Yuze Li зі співавторами, а також підраховали, що для настання вагітності допустима кількість плазмоцитів не повинна перевищувати 4 клітини, що не протирічить отриманим нами даним [7].

Також у групі до проведеного лікування чітко простежувався епітеліально-мезенхімальний перехід ($p=0,001$), а у групі після лікування ендометрій піддався мезенхімально-епітеліальній трансформації ($p < 0,001$), що, вочевидь, також позитивно впливає на здатність зародка імплантуватися в ендометрій. До такого ж висновку прийшли Mitsunaki Ishida з співавторами [3]. Нами не знайдено сильних кореляційних взаємозалежностей між експресією CD138 та маркерами ЕМТ – Е-кадгерином та Віментином. На нашу думку, слід прослідкувати взаємозв'язок між експресією Е-кадгерину та Віментину з іншими маркерами імункомпетентних клітин, щоб

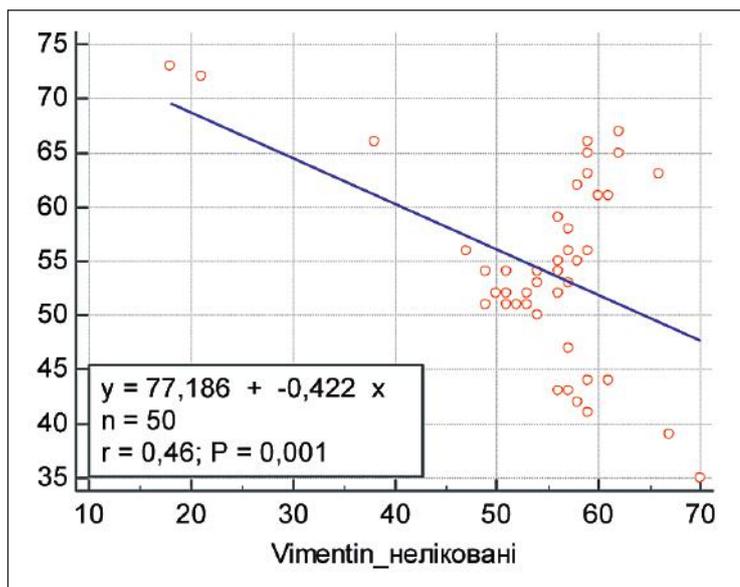


Рисунок 4 – Графік регресії демонструє феномен ЕМТ у групі жінок з хронічним ендометритом до лікування

зробити всебічний висновок про взаємозв'язок вираженості запалення, ЕМТ та фактом інфертильності жінок. В літературі зустрічаються небагаточисленні згадки про особливий патерн імункомпетентних клітин у жінок з хронічним ендометритом [8], проте не досліджується зв'язок цього фенотипу з феноменом ЕМТ.

Отримані нами дані дозволили підтвердити важливість використання ІГХ-маркерів Віментину та Е-кадгерину з прогностичною метою для оцінки готовності ендометрія до запліднення у жінок з хронічним ендометритом після лікування, а також встановили прогностично сприятливі рівні обох маркерів.

Висновки.

Феномен ЕМТ в ендометрії характерний для жінок з хронічним ендометритом, в той час як після лікування відбувається зворотній до нього процес.

Для настання вагітності характерний рівень Е-кадгерину складав більше 50%, а Віментину $<10\%$.

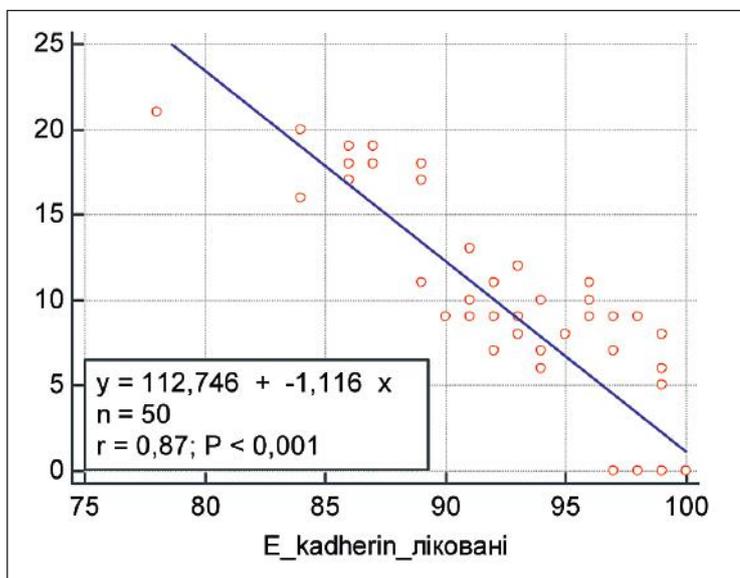


Рисунок 5 – Графік регресії демонструє феномен МЕТ у групі жінок з хронічним ендометритом після лікування.

Безпосереднього взаємозв'язку між рівнем експресії маркера плазмочитів CD138 та явищем ЕМТ не виявлено;

Для настання вагітності необхідне суттєве зниження експресії CD138 або повна її відсутність, але слід дослідити абсолютні допустимі показники кількості CD138+ клітин для створення більш точного прогнозу успішності лікування хронічного ендометриу.

Перспективи подальших досліджень.

Актуальним питанням залишається вивчення молекулярно-біологічних характеристик ендометрія при хронічному ендометриті зі складанням оптимальної панелі імуногістохімічних маркерів, що будуть використані для контролю якості лікування та прогнозу настання вагітності.

References / Література

1. Park HJ, Kim YS, Yoon TK, Lee WS. Chronic endometritis and infertility. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2016;43(4):185-192. DOI: [10.5653/cerm.2016.43.4.185](https://doi.org/10.5653/cerm.2016.43.4.185).
2. Kimura F, Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimune A, et al. Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2019;45(5):951-960. DOI: [10.1111/jog.13937](https://doi.org/10.1111/jog.13937).
3. Ishida M, Takebayashi A, Kimura F, Nakamura A, Kitazawa J, Morimune A, et al. Induction of the epithelial-mesenchymal transition in the endometrium by chronic endometritis in infertile patients. *PLoS one*. 2021 Apr 7;16(4):e0249775. DOI: [10.1371/journal.pone.0249775](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249775).
4. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in cell biology*. 2019;29(3):212-226. DOI: [10.1016/j.tcb.2018.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001).
5. Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(12):6806. DOI: [10.3390/ijms23126806](https://doi.org/10.3390/ijms23126806).
6. Hashimoto Y, Tsuzuki-Nakao T, Kida N, Matsuo Y, Maruyama T, Okada H, et al. Inflammatory Cytokine-Induced HIF-1 Activation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Epithelial Cells. *Biomedicines*. 2023;11(1):210. DOI: [10.3390/biomedicines11010210](https://doi.org/10.3390/biomedicines11010210).
7. Li Y, Xu S, Yu S, Huang C, Lin S, Chen W, et al. Diagnosis of chronic endometritis: How many CD138+cells/HPF in endometrial stroma affect pregnancy outcome of infertile women? *American journal of reproductive immunology*. 2021 May;85(5):e13369. DOI: [10.1111/aji.13369](https://doi.org/10.1111/aji.13369).
8. Matteo M, Cicinelli E, Greco P, Massenzio F, Baldini D, Falagario T, et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *American journal of reproductive immunology*. 2009;61(5):322-329. DOI: [10.1111/j.1600-0897.2009.00698.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00698.x).

РОЛЬ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ У БЕЗПЛІДДІ, ВИКЛИКАНОМУ ХРОНІЧНИМ ЕНДОМЕТРИТОМ

Кірія Д. Г.

Резюме. Вступ. Хронічний ендометрит (ХЕ) є досить розповсюдженою патологією серед жінок, які страждають на безпліддя та становить 10-25% від усіх випадків інфертильності. Епітеліально-мезенхімальна трансформація (ЕМТ) при ХЕ займає провідну роль у неможливості зародка імплантуватися в ендометрій.

Мета дослідження – вдосконалення морфологічних критеріїв діагностики та прогнозування перебігу ХЕ.

Об'єкт і методи дослідження. Для проведення дослідження ролі ЕМТ у інфертильності при ХЕ сформовано 2 групи дослідження: жінки до проведеної терапії (I група) та після лікування з послідувачим настанням вагітності та народженням (II група). Імуногістохімічне дослідження проводилося з використанням моноклональних антитіл до Е-кадгерину, Віментину та CD138.

Результати. В групі жінок, які пройшли лікування, встановлено достовірне зменшення ($p < 0,0001$) експресії CD138 в порівнянні з результатами до проведеної терапії. Феномен ЕМТ спостерігався в усіх випадках хронічного ендометриу до лікування. Після терапії спостерігався зворотній процес – мезенхімально-епітеліальний перехід. Рівень Е-кадгерину після лікування спостерігався в межах 51-100% ($\chi^2 = 4,29$, $p = 0,04$) та Віментину $< 10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0,0001$). Такі рівні експресії обох маркерів були сприятливими для настання вагітності. Зворотній кореляційний зв'язок між експресією CD138 та Е-кадгеріном виявлений у I досліджуваній групі ($p = 0,011$), в II групі такого зв'язку не виявлено ($p = 0,65$).

Висновки. Констатувати успішність лікування ХЕ за ІГХ-дослідженням можна, коли рівень Е-кадгерину складає 51-100% ($p = 0,04$), а Віментину $< 10\%$ ($p < 0,0001$), а також суттєве зниження кількості CD138+ клітин ($p < 0,0001$) в порівнянні з первинним зразком пайпель біопсії ендометрію. В подальших дослідженнях також слід дослідити абсолютне число клітин CD138+, що є допустимими після проведеного лікування.

Ключові слова: хронічний ендометрит, епітеліально-мезенхімальна трансформація, жіноче безпліддя.

THE ROLE OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSFORMATION IN INFERTILITY CAUSED BY CHRONIC ENDOMETRITIS

Kiriya D. G.

Abstract. Chronic endometritis (CE) is a fairly common pathology among women suffering from infertility and accounts for 10-25% of all cases of infertility. Epithelial-mesenchymal transformation (EMT) in CE plays a leading role in the inability of the embryo to implant in the endometrium.

The purpose of the study is to improve the morphological criteria for diagnosing and predicting the course of CE.

Materials and methods. To conduct a study of the role of EMT in infertility with CE, 2 research groups were formed: women before the therapy (group I) and after treatment with the subsequent onset of pregnancy and birth (group II). Immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies to E-cadherin, Vimentin and CD138.

The results. In the group of women who underwent treatment, a significant decrease ($p < 0.0001$) in the expression of CD138 was established in comparison with the results before the therapy. The phenomenon of EMT was observed in all cases of chronic endometritis before treatment. After therapy, the reverse process was observed –

mesenchymal-epithelial transition. The level of E-cadherin after treatment was observed in the range of 51-100% ($\chi^2 = 4.29$, $p = 0.04$) and Vimentin $< 10\%$ ($\chi^2 = 100$, $p < 0.0001$). Such levels of expression of both markers were favorable for the onset of pregnancy. An inverse correlation between the expression of CD138 and E-cadherin was detected in the I study group ($p = 0.011$), in the II group no such connection was detected ($p = 0.65$).

Conclusions. It is possible to state the success of the treatment of XE according to the IGC study when the level of E-cadherin is 51-100% ($p = 0.04$), and Vimentin is $< 10\%$ ($p < 0.0001$), as well as a significant decrease in the number of CD138+ cells ($p < 0.0001$) in comparison with the primary endometrial biopsy sample. Further studies should also investigate the absolute number of CD138+ cells that are admissible after treatment.

Key words: chronic endometritis, epithelial-mesenchymal transformation, female infertility.

ORCID and contribution / ORCID автора та його внесок до статті:

Kiriya D. G.: [0009-0006-7660-6182](https://orcid.org/0009-0006-7660-6182)^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kiriya Diana Gogiivna / Кірія Діана Гогіївна

Kharkiv National Medical University / Харківський національний медичний університет

Ukraine, 61000, Kharkiv, 4 Nauky av. / Адреса: Україна, 61000, м. Харків, проспект Науки 4

Tel.: +380506052702 / Тел.: +380506052702

E-mail: docpathomotph@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 15.08.2022 / Стаття надійшла 15.08.2022 року

Accepted 03.02.2023 / Стаття прийнята до друку 03.02.2023 року