РЕЦЕПТИВНОСТЬ ЭНДОМЕТРИЯ И ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ В ЭНДОМЕТРИИ ЖЕНЩИН С ГИПЕРПАЗИЕЙ И БЕСПЛОДИЕМ

А.А. Гришкина, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, О.А. Мелкозерова

*ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

В настоящее время активно обсуждается роль различных патологических процессов, способных повлиять на рецептивность эндометрия. В частности, следует особо выделить гиперплазию эндометрия, обусловленную нарушением регуляции пролиферации и апоптоза. Цель исследования: выявление особенностей апоптотической и пролиферативной активности в железах и строме эндометрия, а также его рецептивности в период окна имплантации у женщин с бесплодием при простой неатипической гиперплазии. Материал и методы. Проведен анализ морфологического состояния эндометрия у пациенток с гиперплазией эндометрия и бесплодием (основная группа, $n = 31$) и гинекологически здоровых женщин (группа сравнения, $n = 31$). Результаты. Установлено, что при гиперплазии эндометрия в период «окна имплантации» уменьшается площадь и высота пиноподий, практически в два раза снижается уровень экспрессии LIF клетками желез и стромы, при этом в строме значительно повышается экспрессия bcl-2, а в эпителии желез снижается экспрессия p53 и Ki67. Заключение. Выявленные изменения в морфологии клеток и их иммуногистохимическом профиле указывают на значительное угнетение рецептивности эндометрия. Гиперэкспрессия bcl-2 в строме и значительное уменьшение клеток с положительной экспрессией p53 и Ki67 в эпителии желез у женщин с гиперпластическими процессами в эндометрии может лежать в основе нарушения репродуктивной функции.

Ключевые слова: бесплодие, гиперплазия эндометрия, рецептивность эндометрия, пиноподии, апоптоз.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-37-39

ENDOMETRIAL RECEPTIVITY AND EXPRESSION OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION FACTORS IN THE ENDOMETRIUM OF WOMEN WITH HYPERPLASIA AND INFERTILITY

A.A. Grishkina, G.N. Chistjakova, I.I. Remizova, O.A. Melkozerova

*FSBI «Ural Research Institute for the Protection of Maternity and Infancy»
of Public Health Ministry of the Russian Federation*

The role of various pathological processes that might affect the receptivity of the endometrium is actively discussed. In particular, the endometrial hyperplasia caused by dysregulation of proliferation and apoptosis should be highlighted. The aim of this study is to determine the features of apoptotic and proliferative activity in the glands and stroma of the endometrium, as well as its receptivity during the window of implantation in women with infertility and simple non-atypical hyperplasia. Material and methods. In this study endometrium were obtained from biopsies of women free of disease ($n = 31$) and patients with endometrial hyperplasia and infertility ($n = 31$) after that morphological and immunohistochemical examination were performed. Results. The endometrium, from women with endometrial hyperplasia during the implantation window, is characterized by decreasing of the area and height of pinopodia, the level of LIF expression by gland and stroma cells is almost halved, of bcl-2 is significantly increased in the stroma, and the expression of p53 and Ki67 decreased in the epithelium of the glands. Conclusion The revealed changes in the morphology of cells and their immunohistochemical profile indicate significant inhibition of endometrial receptivity. Overexpression of bcl-2 in the stroma and a significant decrease in cells with positive expression of p53 and Ki67 in the gland epithelium in women with endometrial hyperplastic processes may underlie reproductive dysfunction.

Key words: infertility, endometrial hyperplasia, endometrial receptivity, pinopodia, apoptosis.

Активация процессов апоптоза в эндометрии в период окна имплантации выступает в роли биологического маркера адекватно подготовленного к имплантации эмбриона эндометрия. Многие факторы с про- и антиапоптотическим действием, такие как Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), PTEN (phosphatase and tensin homolog) и другие, по-разному экспрессируются в эндометрии в течение менструального цикла. Рецептивность слизистой матки в период «окна имплантации», то есть комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия, определяющий способность его к имплантации связана со значительным увеличением активности процессов апоптоза, что позволяет эмбриону успешно имплантироваться [1, 2, 4].

C. Quinn et al. (2009) в качестве ключевых ультраструктурных образований, участвующих в формировании рецептивности, выделили пиноподии [7], которые еще в 1971 г. A. Psychoyos et al. были названы «структуры адаптации эндометрия к имплантации» [6]. Пиноподии – это микроскопические выпячивания в апикальной части поверхностного эпителия эндометрия, которые образуются на месте микроворсинок в «окно имплантации» (ему соответствует 20–22 дни менструального цикла или средняя стадия фазы секреции) и выступают в полость матки, и на поверхности которых в наибольшем количестве экспрессируется LIF (leukemia inhibitory factor) – маркер рецептивности эндометрия. Предполагается, что они играют одну из ведущих ролей в имплантации бластоцисты [2, 5].

В настоящее время активно обсуждается роль различных патологических процессов, способных повлиять на рецептивность эндометрия. В частности, следует особо выделить гиперплазию эндометрия, обусловленную нарушением регуляции пролиферации и апоптоза [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление особенностей апоптотической и пролиферативной активности в железах и строме эндометрия, а также его рецептивности в период окна имплантации у женщин с бесплодием при простой неатипической гиперплазии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Осуществлен анализ морфологического состояния эндометрия у 31 пациентки с гиперплазией эндометрия и бесплодием (основная группа) и 31 гинекологически здоровой женщины (группа сравнения), обратившихся по вопросам планирования семьи в связи с мужским фактором бесплодия.

Критерии исключения: прием гормональных препаратов в течение последних двух месяцев перед исследованием, наличие тяжелой соматической патологии.

Все женщины дали информированное согласие на участие в исследовании и открытую публикацию его результатов.

Обследование пациенток проводили по единой схеме, включающей анализ жалоб, анамнеза, общепринятые клинические и лабораторные исследования.

Проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия, полученного путем пайпель-биопсии на 7–8-й день после овуляции (20–22-й день менструального цикла). Все пациентки находились в репродуктивном возрасте, имели овуляторный менструальный цикл, уровень гормонов репродуктивной системы, гормонов надпочечников, щитовидной железы в сыворотке крови, согласно предоставленным для истории болезни данным, соответствовал нормативным значениям.

Эндометрий подвергали комплексному морфологическому и морфометрическому исследованию. Гистологическое изучение парафиновых срезов эндометрия проводили при окраске материала гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону.

Тканевые образцы для иммуногистохимического исследования готовили по общепринятой методике. Используемые моноклональные антитела были предназначены для работы с парафиновыми срезами по общепринятым протоколам, окрашивание производили с использованием иммуногистостейнера закрытого типа Bond max (производитель Leica, Германия). Экспрессия Ki-67, bcl-2, p53 в строме и железах оценена путем подсчета количества окрашенных ядер в поле зрения при увеличении $\times 400$, при этом изучали не менее 10 полей зрения. Экспрессию LIF определяли на мембранах клеток поверхностного эпителия, эпителия желез и клеток стромы эндометрия путем подсчета процента

окрашенных клеток в поле зрения при увеличении 400, не менее чем в 10 полях зрения.

Морфометрические измерения площади желез, процент покровных эпителиоцитов, имеющих пинодии, а также высоту пинодий проводили при помощи программы ImageJ (Java based). В зависимости от площади, занимающей эпителиальный покров, пинодии характеризовались как избыточные (более 50 %), умеренные (от 20 до 50 %) и не выраженные (менее 20 %) [3].

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли при оптимальном увеличении на микроскопе Axioplan 2 («CarlZeissJena», Germany) с использованием цифровой фотокамеры («CarlZeiss», Germany).

Сравнение между группами проводили непараметрическими статистическими методами с использованием критерия Манна – Уитни. Применялись методы вариационного, регрессионного анализа. Величина вероятности ошибки (p) была принята на уровне 0,05. Статистическую значимость в группах по изучаемым факторам оценивали по критериям Стьюдента (различие средних) и Фишера (различие дисперсий), критерию согласия Пирсона, с использованием точного метода Фишера и линейного дискриминантного анализа. Расчеты выполнены с помощью персонального компьютера с использованием программы «Statistica for Windows 7.0» и статистического пакета Microsoft Excel-2010 для операционной системы Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст женщин в группах был сопоставим и составил в основной группе ($35,3 \pm 2,95$) лет, в группе сравнения ($34,5 \pm 2,62$) года ($p > 0,05$). Диагноз бесплодие по данным истории болезни у женщин основной группы был выставлен в течение ($7,193 \pm 0,55$) лет.

Гинекологические заболевания в анамнезе, преимущественно, кисты яичников, хронический цервицит, сальпингоофорит имели 16 % пациенток основной группы и 12,9 % группы сравнения.

Морфологическое исследование биоптатов эндометрия показало, что соответствие фазе цикла наблюдалось более чем у половины женщин (54,83 %) в каждой группе. Поздней стадии секреции соответствовал эндометрий у 9,67 % женщин основной группы и 22,58 % группы сравнения ($p > 0,05$), более ранним стадиям – у 29,0 % и 22,58 % женщин соответственно ($p > 0,05$). В 6,45 % случаев у женщин основной группы фазу цикла определить не удалось. Полипы достоверно чаще встречались у женщин с бесплодием – 35,48 % по сравнению с 9,67 % в группе сравнения ($p < 0,05$).

Средняя площадь и средний периметр желез у женщин с гиперплазией и женщин группы сравнения существенно не различался и составлял ($174166,8 \pm 69426,35$) против ($151601,3 \pm 34021,24$) мкм и ($1654,56 \pm 377,8$) против ($1601,65 \pm 218,8$) мкм ($p > 0,05$ в обоих случаях).

При оценке площади эпителиоцитов, имеющих пиноподии, установлено, что в 6,45 % случаев у женщин основной группы пиноподии отсутствовали. Невыраженные пиноподии регистрировались в основной группе и группе сравнения в 32,25 % и 9,67 % образцов ($p > 0,05$), умеренные – в 35,48 % и 32,25 % ($p > 0,05$) соответственно. Изобилующие пиноподии реже встречались у женщин с нарушением репродуктивной функции (28,8 % против 58,06 %, $p < 0,05$) и высота пиноподий была статистически значимо ниже, ($22,79 \pm 0,7$) против ($29,34 \pm 1,4$) мкм, $p < 0,01$.

Маркер рецептивности эндометрия (LIF) определялся в цитоплазме покровных эпителиоцитов и, в меньшей степени, в glanduloцитах маточных желез. Наибольшая экспрессия этого маркера отмечалась в апикальных зонах эпителиальных клеток, особенно в проекции пиноподий, что соответствует результатам других авторов [3]. При оценке экспрессии LIF в железах и строме у женщин основной группы средний балл составил соответственно ($105,81 \pm 5,26$) и ($75,0 \pm 4,06$) по сравнению с ($228,13 \pm 15,52$) и ($176 \pm 24,9$) баллами в группе сравнения ($p < 0,01$ как для желез, так и для стромы). Повышенная экспрессия bcl-2 наблюдалась у женщин с гиперплазией эндометрия и бесплодием в клетках стромы ($83,03 \pm 14,59$) баллов, по сравнению с ($44,53 \pm 7,18$) баллами ($p = 0,041$), однако в железах достоверных различий не выявлено, ($127,42 \pm 14,0$) по сравнению с ($118,28 \pm 17,46$) баллами, $p > 0,05$. В то же время экспрессия фактора апоптоза (p53) в железах и строме у женщин с гиперплазией эндометрия была в 3,3 и 1,2 раза ниже по сравнению с аналогичными параметрами фертильных женщин, ($9,8 \pm 3,66$) и ($27,213 \pm 6,46$) клеток против ($32,0 \pm 5,2$) и ($32,5 \pm 4,0$) клеток соответственно, $p < 0,0001$ в железах. Полученные нами данные аналогичны результатам H.S. Vatansever et. al (2005), свидетельствующим о том, что снижение количества апоптотических клеток, слабая иммунореактивность p53 и сильная иммунореактивность Bcl-2 в эндометрии бесплодных женщин по сравнению с фертильными женщинами могут быть важным фактором дефектной имплантации [8]. При оценке экспрессии Ki67: экспрессия в железах была снижена практически в 10 раз, ($0,8 \pm 0,23$) клеток в железах гиперплазированного эндометрия по сравнению с ($8,4 \pm 2,4$) клетками в нормальном эндометрии, $p = 0,014$, однако экспрессия в строме значительно не менялась ($8,24 \pm 1,04$) и ($10,37 \pm 1,72$) клеток ($p > 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, гиперплазия эндометрия ассоциируется с уменьшением площади и высоты пиноподий, практически двукратным снижением

уровня экспрессии LIF клетками желез и стромы, что указывает на значительное угнетение рецептивности эндометрия и может рассматриваться как прогностический маркер неудачной имплантации. Расстройство рецептивности эндометрия, включающее повреждение поверхностного эпителия слизистой оболочки матки, нарушение созревания пиноподий к моменту «окна имплантации», гиперэкспрессия bcl-2 в строме и значительное увеличение клеток с положительной экспрессией p53 и Ki67 в эпителии желез у женщин с гиперпластическими процессами в эндометрии могут лежать в основе нарушения репродуктивной функции. Полученные нами данные требуют проведения дальнейших исследований на большей выборке пациенток.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Дорошенко В.Э. / Doroshenko V.E. Апоптоз в эндометрии у бесплодных женщин с комплексной неатипической гиперплазией (КНГЭ) в период окна имплантации / Apoptoz v endometrii u besplodnyh zhenshchin s kompleksnoy neatipicheskoy giperplaziej (KNGE) v period okna implantatsii [Apoptosis in the endometrium in infertile women with complex non-atypical hyperplasia (CNGE) during the implantation window] // Таврический медико-биологический вестник / Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik [Tauride Medical and Biological Bulletin]. – 2012. – № 1. – С. 103–105.
2. Казачков Е.Л., Казачкова Э.А., Ворopaева Е.Е., Хелашвили И.Г., Мирошниченко Л.Е. / Kazachkov E.L., Kazachkova E.A., Voropaeva E.E., Khelashvili I.G., Miroshnichenko L.E. Морфофункциональная характеристика рецептивности слизистой оболочки матки при хроническом эндометрите / Morfofunktsional'naya harakteristika receptivnosti slizistoy obolochki матки pri hronicheskom endometrite [Morphological and functional characteristics of receptivity of the uterine mucosa at chronic endometritis] // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация / Nauchnye vedomosti BelGU. Serija: Medicina. Farmacija [Scientific statements of BelSU. Series: Medicine. Pharmacy]. – 2013. – № 25. – С. 127–131.
3. Achache H., Revel A. Endometrium receptivity markers, the journey to successful embryo implantation // Hum Reprod Update. – 2006. – Vol. 12 (6). – P. 731–746.
4. Antsiferova Y.S., Sotnikova N.Y. Apoptosis and endometrial receptivity: Relationship with in vitro fertilization treatment outcome // World J. Obstet. Gynecol. – 2016. – № 5 (1). – С. 87–96.
5. Ingman W., Jones R. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproduction biology // Hum. Reprod. Update. – 2008. – Vol. 14 (2). – P. 179–92.
6. Psychoyos A., Mandon P. Study of the surface of the uterine epithelium by scanning electron microscope. Observation in the rat at the 4th and 5th day of pregnancy // C. R. Acad. Sci (Paris). – 1971. – Vol. 272. – P. 2723–2725.
7. Quinn C., Casper R. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol. 15. – P. 229–36.
8. Vatansever H.S., Lacin S., Ozbilgin M.K. Changed Bcl: Bax ratio in endometrium of patients with unexplained infertility // Acta. Histochem. – 2005. – Vol. 107. – P. 345–55.

Контактная информация

Гришкина Анастасия Александровна – м. н. с., врач-патологоанатом отделения иммунологии, клинической микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики, Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества, e-mail: xumukys.ru@mail.ru