DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.11.4.012>
УДК 618.3+616-053.31

Мотолянец П.М.¹, Юдина О.А.¹, Герасимович А.И.¹, Ващилина Т.П.², Курлович И.В.²

¹ Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Motolyanets P.¹, Yudina O.¹, Gerasimovich A.¹, Vashchilina T.², Kurlovich I.²

¹ Republican Clinical Medical Center Under the Property Management Directorate of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

Первый опыт применения жидкостной цитологии в исследовании фолликулярной жидкости при применении вспомогательных репродуктивных технологий

The First Experience in the Use of Liquid Cytology in the Study of Follicular Fluid in the Application of Assisted Reproductive Technologies

Резюме

В части случаев первичного бесплодия его этиопатогенез остается невыясненным, а использование морфологического метода верификации причины ограничено. Возможным путем решения проблемы с оценкой рецепторного статуса гранулезных клеток может стать исследование фолликулярной жидкости (ФЖ), получаемой репродуктологами при пункции фолликулов с целью забора яйцеклетки при использовании вспомогательных репродуктивных технологий. Нами адаптирован и опробован простой и легко воспроизводимый метод иммуноцитоморфологического исследования ФЖ с использованием жидкостной цитологии для индивидуального прогнозирования результатов применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также оценки целесообразности и корректировки схем заместительной гормональной терапии.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, жидкостная цитология, фолликулярная жидкость, иммуноцитоморфология.

Abstract

In terms of cases of primary infertility, its etiopathogenesis remains unclear, and the use of the morphological method for verifying the cause is limited. A possible solution to the problem of assessing the receptor status of granular cells may be the study of follicular fluid obtained by fertility specialists during follicle puncture for the purpose of collecting oocytes using assisted reproductive technologies. We have adapted and tested a simple and easily reproducible method of immunocyto-morphological examination of follicular fluid using liquid cytology for individual prediction of results of the use of assisted reproductive technologies, as well as evaluation of the feasibility and adjustment of hormone replacement therapy regimens.

Keywords: assisted reproductive technologies, liquid cytology, follicular fluid, immunocyto-morphology.

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из главных факторов, обеспечивающих демографическую безопасность, является эффективность репродуктивного процесса, поэтому приоритетными в современных условиях являются мероприятия, направленные на повышение рождаемости, включающие широкое использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В Республике Беларусь около 15% пар бесплодны, и 1/2 всех случаев приходится на долю женских факторов infertility, часть из которых напрямую или опосредованно связаны с овulatory дисфункцией [1]. Фундаментальные исследования клеточных и гормональных характеристик фолликулярной жидкости (ФЖ) позволят продолжать поиск простых и доступных методов медицинской профилактики неудач, связанных с имплантацией эмбрионов у женщин после ВРТ, для улучшения результативности [2, 3].

Механизмы развития первичного бесплодия у женщин сложны и разнообразны. Поэтому в клинической практике при использовании современных инструментальных и лабораторных методов трудно установить конкретную причину infertility. Ограничены возможности патоморфологических исследований яичников, так как биопсия яичника позволяет оценить только резерв примордиальных фолликулов. Кроме того, в некоторых исследованиях неравномерное распределение фолликулов в коре яичника рассматривается как вариант нормы, что вовсе ставит под сомнение целесообразность использования овариальной биопсии для диагностики бесплодия [5, 6]. Биопсия яичника является провоцирующим фактором развития фиброза яичника, что дополнительно истощает фолликулярный резерв.

Особый интерес для решения проблемы с оценкой рецепторного статуса гранулезных клеток представляют клетки ФЖ – гранулезные клетки и клетки теки, в которых происходит стероидогенез. Большое значение для полноценного синтеза стероидных гормонов в яичнике имеет состоятельность рецепторного аппарата этих клеток (рецепторы к фолликулостимулирующему и лютеинизирующему гормонам, рецепторы к инсулиноподобному фактору роста). Изучение рецепторного статуса клеток фолликулов яичников является сложной задачей, поскольку вышеперечисленные рецепторы появляются главным образом на поздних стадиях развития фолликула (преовulatory фолликул) [1, 7, 8].

Исследования, проведенные на животных, указывают на важность состоятельности рецепторного аппарата гранулезных клеток для нормальной репродуктивной функции самок млекопитающих [9, 10]. Однако в литературе отсутствуют сообщения о достоверной корреляции между рецепторным статусом гранулезных клеток и клиническими проявлениями бесплодия у женщин.

Возможным путем решения проблемы оценки рецепторного статуса гранулезных клеток может стать исследование ФЖ, получаемой репродуктологами при пункции фолликулов у женщин, вступающих в ВРТ, с целью забора яйцеклетки. Данная жидкость содержит достаточное количество клеточного материала для проведения иммуноцитологического исследования. Кроме того, имеются сообщения о преимуществах сочетания жидкостной цитологии и иммуноцитохимии при работе не только с материалом из шейки матки [2, 4, 10].

Возможной альтернативой жидкостной цитологии при исследовании ФЖ может послужить метод клеточных блоков. Однако он имеет ряд недостатков: трудоемкость, более агрессивное и длительное химическое воздействие на материал в ходе проводки через спирт и ксилол. Очевидное преимущество метода клеточных блоков – возможность выполнения серийных срезов.

Определенный интерес представляет изучение состояния эндометрия у женщин с бесплодием. Имеется большое количество исследований и публикаций, посвященных морфологии и иммунофенотипу эндометрия при бесплодии [11–15]. Сообщения о совместной морфологической оценке яичников и эндометрия с проведением корреляций между изменениями в них при бесплодии отсутствуют.

Также представляет интерес установление связей между биохимическим составом ФЖ и морфологией гранулезных клеток. Большое значение для синтеза половых гормонов и питания яйцеклетки имеют глюкоза, липиды и аминокислоты [15–18].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка простого и легко воспроизводимого метода патоморфологического исследования ФЖ для индивидуального прогнозирования применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также оценки целесообразности и корректировки схем заместительной гормональной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали ФЖ, полученную у женщин с первичным бесплодием при аспирации ооцит-кумулюсных комплексов после обследования в общепринятом объеме и индукции суперовуляции в соответствии с клиническими протоколами, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь в области ВРТ.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ФЖ каждой пациентки объемом от 20 до 50 мл собирали в стерильную емкость и отстаивали в течение 30–45 минут при комнатной температуре. Осадок после удаления надосадочной жидкости перемещали в специальную вials с запатентованным консервирующим раствором, содержащим этанол.

Цитологические препараты изготавливали в процессоре жидкостной цитологии «CellPrep AUTO» (Biodine, Корея) методом фильтрации. Система автоматически определяла клеточность образца и выдувала через мембранный фильтр на стекло оптимальное количество клеток. В процессе работы система переносила клетки на стекло с формированием ультратонкого монослоя диаметром 19–20 мм. Полученный клеточный монослой фиксировали в течение 30 минут 96%-ным раствором этанола. Затем часть препаратов окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике при помощи автостейнера (Leica). Окрашенные препараты монтировали в полимерную среду и, в отличие от классической цитологии, покрывали покровным стеклом (рис. 1).

Рис. 1. Фолликулярная жидкость, подготовленная методом жидкостной цитологии к микрокопированию в проходящем свете

Fig. 1. Follicular fluid prepared by liquid cytology for microscopy in transmitted light

Другую часть препаратов подвергали предобработке, включающей блокировку эндогенной пероксидазы, инкубацию клеток ФЖ с первичными антителами. С помощью предварительной отработки методики окрашивания нами были выбраны индивидуальные концентрации и протоколы инкубации для каждого антитела, включающие различное разведение антител, температурный режим и продолжительность инкубации. До инкубации с антителами с целью ликвидации фонового неспецифического окрашивания антителами дополнительно проводили обработку реагентом Power block (BioGenex, США). В качестве детекционной системы использовали набор реагентов: Polymer HRP, Super Enhancer (BioGenex, США), время инкубации – 30 минут при комнатной температуре. В качестве хромогена применялся 3-диаминобензидин (BioGenex, США), приготовленный непосредственно перед использованием, время инкубации – 10 минут при комнатной температуре. Контрастирование ядер осуществлялось гематоксилином Майера, затем окрашенный монослой обезживали в спирте и заключали в монтирующую среду на основе полистирола.

Рис. 2. Микроскопическая картина клеточного состава ФЖ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100 и 400

Fig. 2. Microscopic picture of the cellular composition of follicular fluid. Hematoxylin and eosin staining. Magnification 100 and 400

В качестве внешнего контроля проведения иммуногистохимической реакции были использованы парафиновые блоки тканей, рекомендованных производителем для используемых первичных антител (ER, PR, inhibin alfa).

Важной отличительной особенностью метода жидкостной цитологии является удаление в ходе пробоподготовки слизи, иммунокомпетентных клеток, эритроцитов, бактерий, что дает возможность исследовать только клетки интереса и снижает вероятность фоновое окрашивания при иммуногистохимическом исследовании. Применяв метод жидкостной цитологии, удалось достичь оптимальной визуализации гранулезных клеток при световой микроскопии. В препаратах определяются как клеточные группы, так и дискретно расположенные клетки. Хорошо визуализируются ядра, зернистая цитоплазма, контуры клеток (рис. 2).

Следует отметить, что взвесь гранулезных клеток хранится в вials с консервантом на протяжении 3 месяцев при температуре 6–8 °С, что позволяет выполнить дополнительные их исследования в отсроченный период или повторить окраску, применив альтернативный протокол.

Объем клеточного материала от каждой пациентки позволяет изготовить от 5 до 10 препаратов, что имеет значение для выполнения дополнительных окрасок и иммуноцитохимического исследования. Учитывая высокую клеточность препаратов, представляется возможным применение режима разведения, в результате чего можно получить большее количество препаратов с меньшей клеточностью; это, в свою очередь, позволит расширить спектр дополнительных исследований.

■ ВЫВОДЫ

Доступные литературные данные [1, 6–12, 18] о качественных характеристиках ФЖ весьма неоднородны, сопоставить их с собственными результатами полноценно невозможно вследствие того, что разные авторы неодинаково проводили подготовку фолликулярных аспиратов и использовали разные подходы, технологию, методы и параметры для анализа образцов ФЖ. Однако использование жидкостной цитологии для анализа ФЖ при различных результатах ВРТ показало простоту и воспроизводимость метода для верификации дисрегуляции гормонального статуса.

Вклад авторов: отработка методики забора и предподготовки материала, отработка протоколов и проведение иммуноцитологического исследования, анализ полученных данных, написание разделов «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» – Мотолянец П.М.; общая концепция, изучение литературных данных, обсуждение проблемных вопросов используемого метода, редактирование статьи – Юдина О.А.; правовые аспекты и возможности использования предложенного метода, редактирование разделов «Введение» и «Выводы» – Герасимович А.И.; вопросы отбора, объективного и лабораторного исследования пациенток, контроль за соблюдением клинических протоколов стимуляции суперовуляции, участие в написании раздела «Материалы и методы» – Ващилина Т.П.; контроль получения материала при заборе яйцеклетки, подбор литературных данных, участие в написании «Введения» – Курлович И.В.

Authors' contribution: working out the method of sampling and pre-preparation of material, working out protocols and conducting an immunocytological study, analyzing the data obtained, writing the sections "Introduction", "Materials and Methods", "Research and discussion" – Motolyanets P.; general concept, study of literature data, discussion of problematic issues of the method used, editing of the article – Yudina O.; legal aspects and possibilities of using the proposed method, editing the "Introduction", and "Conclusion" – Gerasimovich A.; issues of selection, objective and laboratory research of patients, monitoring compliance with clinical protocols for stimulation of superovulation, participation in the writing of "Materials and Methods" – Vashchilina T.; control over the receipt of material during egg collection, selection of literature data, participation in the writing of the "Introduction" – Kurlovich I.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Fritz M.A., Speroff L. (2011) *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 8th ed., Lippincott Williams & Wilkins.
2. Vital-Reyes V., Chhieng D., Rodriguez-Burford C., Téllez-Velasco S., Grizzle W., Chavarria-Olarte M.E., Reyes-Fuentes A. (2006) Ovarian biopsy in infertile patients with ovarian dysfunction. *Int J Gynecol Pathol*, no 25 (1), pp. 90–4.
3. Kwok R., Johnson N.P. (2012) Ovarian biopsy has no role as a routine diagnostic test of ovarian reserve: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, no 24, pp. 492–495.
4. Lass A., Silye R., Abrams D.C., Krausz T., Hovatta O., Margara R., Winston R.M. (1997) Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod*, no 12 (5), pp. 1028–31.
5. Kurman R.J., Ellenson L.H., Ronnett B.M. (2011) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 6th ed. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
6. Nandedkar S.S. (2015) Histomorphological Patterns of Endometrium in Infertility. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, no 65 (5), pp. 328–334.
7. Rani C.S., Salhanick A.R., Armstrong D.T. (1981) Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology*, no 108 (4), pp. 1379–85.
8. Daniel A. Dumesic, David R. Meldrum, Mandy G. Katz-Jaffe, Rebecca L. Krisher, and William B. Schoolcraft (2015) Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, vol. 103, no 2, 0015–0282. American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>.
9. Cheon Y.P. (2012) Regulation and 3 dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clin Exp Reprod Med*, no 39 (3), pp. 95–106.
10. Chilvers R.A., Bodenbun Y.H., Denner L.A., Urban R.J. (2012) Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*, no 29, pp. 547–556.
11. Jeppesen J.V., Kristensen S.G., Nielsen M.E., Humaidan P., Dal Canto M., Fadini R., Schmidt K.T., Ernst E., Andersen C.Y. (2012) LH-Receptor Gene Expression in Human Granulosa and Cumulus Cells from Antral and Preovulatory Follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, no 97 (8), pp. 1524–1531.
12. Qu J., Godin P.A., Nisolle M., Donnez J. (2000) Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in human follicles. *Mol Hum Reprod*, no 6 (2), pp. 137–45.
13. O'Brien Y., Wingfield M., O'Shea L.C. (2019) Anti-Müllerian hormone and progesterone levels in human follicular fluid are predictors of embryonic development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, no 17: 47. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0492-9>
14. Giacomini E., Sanchez A.M., Sarais V., Al Beitawi S., Candiani M., Viganò P. (2017) Characteristics of follicular fluid in ovaries with endometriomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, no 209, pp. 34–38. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.01.032
15. Khan H.L., Bhatti S., Khan Y.L., Abbas S., Munir Z., Rahman Khan Sherwani I.A., Suhail S., Hassan Z., Aydin H.H. (2020) Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, no 49 (1): 101624. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.08.007
16. Nagy B., Poto L., Farkas N., Koppán M., Várnagy A., Kovács K., Papp S., Bohonyi N., Bodis J. (2019) Follicular fluid progesterone concentration is associated with fertilization outcome after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*, no 38 (6), pp. 871–882. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.045
17. Patil K., Yelamanchi S., Kumar M., Hinduja I., Prasad T.S.K., Gowda H., Mukherjee S. (2019) Quantitative mass spectrometric analysis to unravel glycoproteomic signature of follicular fluid in women with polycystic ovary syndrome. *PLoS One*, no 4; 14 (4): e0214742. doi: 10.1371/journal.pone.0214742
18. Regan S.L.P., Knight P.G., Yovich J.L., Stanger J.D., Leung Y., Arfuso F., Almahbobi G., Dharmarajan A. (2018) The effect of ovarian reserve and receptor signaling on granulosa cell apoptosis during human follicle development. *Mol Cell Endocrinol*, no 15; 470, pp. 219–227. doi: 10.1016/j.mce.2017.11.002

Подана/Submitted: 15.07.2021

Принята/Accepted: 17.09.2021

Контакты/Contacts: motolyan@mail.ru