

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ЕГО ГИПОПЛАЗИИ

Царева Н. В.¹, Анфиногенова Е. А.²

*¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр “Мать и дитя”»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Маточное бесплодие (МБ) является одной из наиболее актуальных проблем современной репродуктологии. У 60 % пациенток с повторными неэффективными имплантациями диагностируют гипоплазию эндометрия (ГпЭ). На имплантационную восприимчивость эндометрия оказывает влияние местная продукция лейкемия ингибирующего фактора (ЛИФ),

интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и уровень экспрессии гена НОХА-10. Однако и до настоящего времени перечисленные иммуногистохимические (ИГХ) маркеры эндометриальной восприимчивости у пациенток с ГпЭ страдающих МБ изучены все еще недостаточно.

В статье приведен анализ данных ИГХ-исследования экспрессии ЛИФ, интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и гена НОХА-10 в эндометрии фертильных женщин и пациенток с ГпЭ, страдающих МБ. В отличие от фертильных женщин у пациенток с ГпЭ отмечается наличие эндометриальной дисфункции, характеризующейся выраженным снижением экспрессии ЛИФ и увеличением экспрессии гена НОХА-10 в слизистой оболочке матки. Общая экспрессия интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ в эндометрии при этом существенно не изменяется. Необходимы дальнейшие исследования уровня локальной экспрессии маркеров рецептивности в железистом и стромальном компонентах при гипоплазии эндометрия.

Ключевые слова: иммуногистохимия, лейкемия ингибирующего фактора, интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, ген НОХА-10, гипоплазия эндометрия.

Введение. Несмотря на успехи в области репродуктологии, частота бесплодного брака у супружеских пар детородного возраста в мире достигает 15–7 % и имеет тенденцию к росту [1]. При этом в среднем до 30 % программ вспомогательных репродуктивных технологий заканчиваются неудачами. Непреодолимым барьером для зачатия в таких случаях является невосприимчивость (нерецептивность) эндометрия. Считается, что морфофункциональное состояние эндометрия определяет возможность наступления беременности, благополучное ее течение и успешное завершение. При маточном бесплодии патология эндометрия отмечается у 88 % женщин и играет главную роль в патогенезе репродуктивных нарушений [1], а у 60 % женщин с повторными неэффективными имплантациями диагностируют гипоплазию эндометрия (ГпЭ). Показано, что наличие ГпЭ снижает вероятность успешной беременности в 9,1 раза [2].

Традиционно, начиная с 60-х годов прошлого века, рецептивность эндометрия оценивалась на основании его морфологического исследования. Оптимальной для зачатия считалась середина секреторной фазы в период с 6 по 10 день после овуляции. Если же гистологическая картина эндометрия характеризовалась задержкой его развития на два и более дня диагностировалась «недостаточность лютеиновой фазы». Однако даже при нормальной гистологической картине эндометрия возможны нарушения экспрессии многих молекулярных маркеров рецептивности. Поэтому в случаях репродуктивных неудач для подтверждения готовности эндометрия к имплантации бластоцисты считается необходимым проводить параллельно иммуногистохимическую (ИГХ) оценку одновременно нескольких критериев рецептивности [3].

Необходимым условием формирования «окна имплантации» является способность эндометрия к трансформации и продукции ряда факторов, обеспечивающих процессы внедрения эмбриона в слизистую оболочку матки [1]. Важными признаками способности к зачатию считаются наличие на поверхности слизистой оболочки матки достаточного количества апиноподий, а также повышенная продукция эндометрием интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и лейкемия ингибирующего фактора. Уменьшение количества пиноподий, образования инсулиноподобного фактора роста-1 и интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ может быть связано с нарушением эндометриальной экспрессии гена НОХА-10 [4]. ИГХ исследования экспрессии маркеров имплантационной восприимчивости эндометрия являются информативными, доступными для практического здравоохранения, современными способами оценки состояния репродуктивной функции [1]. Однако и до настоящего времени перечисленные ИГХ-маркеры эндометриальной восприимчивости у пациенток с ГпЭ, страдающих МБ, изучены все еще недостаточно.

Цель работы — выявление у пациенток с ГпЭ, страдающих МБ, особенностей эндометриальной экспрессии лейкемии ингибирующего фактора, интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и гена НОХА-10.

Материалы и методы. Всего в исследование было включено 32 женщины репродуктивного возраста. Из них 22 пациентки с МБ при ГпЭ (основная группа) и 10 условно здоровых женщин без заболеваний репродуктивной системы и соматической патологии, у которых в анамнезе были срочные роды (группа контроля). Возраст обследованных составлял от 18 до 43 лет (в среднем — $31,58 \pm 1,56$ лет) и достоверно не различался в обследованных группах (таблица 1).

Критериями включения являлись:

- репродуктивный возраст женщин;
- маточная форма бесплодия, связанная с ГпЭ;
- толщина М-эхо эндометрия на 20–22-й день менструального цикла менее 8 мм;

- отсутствие приема гормональных препаратов на протяжении 3 месяцев перед началом исследования;
- нормальный овариальный резерв (от 9 до 12 фолликулов в яичниках на 2–4-й день менструального цикла).

Критерии исключения из исследования:

- возраст более 45 лет;
- онкологические заболевания;
- тяжелое экстрагенитальное заболевание;
- бесплодие и невынашивание беременности, не ассоциированные с ГпЭ;
- гипер- или гипогонадотропная недостаточность функции яичников;
- гиперандрогемия любого происхождения;
- синдром гиперстимуляции яичников.

Таблица 1 — Распределение женщин по возрасту, n (%)

Группа	Возраст, лет					Средний возраст, $M \pm m$
	18–25	26–30	31–35	36–40	41–45	
Основная группа ($n = 22$)	3 (13,6 %)	5 (22,7 %)	9 (40,9 %)	4 (18,2 %)	1 (4,5 %)	29,36±1,44
Контрольная группа ($n = 10$)	1 (10,0 %)	2 (20,0 %)	4 (40,0 %)	2 (20,0 %)	1 (10,0 %)	33,79±2,06
Всего	3 (10,0 %)	7 (23,3 %)	12 (40,0 %)	6 (20,0 %)	2 (6,7 %)	33,05±0,87

Примечание. Достоверные различия в группах наблюдения не выявлены ($p > 0,05$).

Образцы эндометрия, взятые для гистологического исследования на 20–22-й день менструального цикла методом пайпель-биопсии, фиксировали в 10%-м нейтральном формалине и далее — в парафине. Из них делали тонкие срезы толщиной 4 мкм. Для ИГХ исследований экспрессии ЛИФ, интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и гена НОХА-10 в эндометрии применяли двухэтапный стандартный метод с использованием наборов моноклональных и поликлональных антител и демаскировкой антигена. Для определения первичных антител использовали систему визуализации Mouse/Rabbit UnoVue HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems).

Микропрепараты сканировали, а затем проводили морфометрическую оценку 4 полей зрения, соответствующих объективу $\times 20$ с разрешением 1920×1080 пикселей микроскопа Leica с цифровой камерой Levenhuk C-Series с использованием программного обеспечения для морфометрии Aperio Image Scope v 9.0. В процессе морфометрического анализа общей экспрессии указанных маркеров в эндометрии интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАБ-хромогена) измерялась Aperio Image Scope автоматически и разделялась на 3 уровня интенсивности и негативную реакцию. Результат программной оценки интенсивности экспрессии имел обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета статистической программы Statistica 10.0. Для проверки наличия либо отсутствия нормального распределения признаков использовали тест Колмогорова – Смирнова и критерий Шапиро – Уилка. Данные описательной статистики указывали в виде медианы (Me) и квартилей (процентиль 25 % — q_1 , процентиль 75 % — q_3). Для сравнения двух выборок применяли двусторонний тест Манна – Уитни. Взаимосвязь между показателями определяли при помощи непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Нулевую гипотезу о равенстве выборок отвергали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В большинстве уже опубликованных работ зарегистрировано снижение экспрессии ЛИФ в эндометрии при МБ. Результаты полученные в нашем исследовании, с использованием U -критерия Манна – Уитни, у пациенток с ГпЭ совпадают с этими данными ($p = 0,000027$) (рисунок 1).

Лейкемия ингибирующего фактора относится к суперсемейству провоспалительных цитокинов IL-6 и характеризуется плеiotропным действием. Он регулирует взаимодействия децидуальной оболочки и трофобласта, активно участвует в процессах имплантации бластоцисты и иммунной

толерантности между матерью и яйцеклеткой [5]. Нарушение образования или механизмов действия ЛИФ приводит к частичному или полному нарушению процессов имплантации и плацентации. Иммуногистохимически ЛИФ определяется как в строме, так и в железистом слое эндометрия. Его содержание в эндометрии здоровых женщин значительно увеличивается после овуляции и достигает максимальных значений в фазу секреции. Существует корреляция эндометриальной экспрессии ЛИФ и его рецептора с продукцией пиноподий и их зрелостью. Ранее было показано, что вероятность зачатия повышается при увеличении экспрессии этого маркера рецептивности в эндометрии [4].

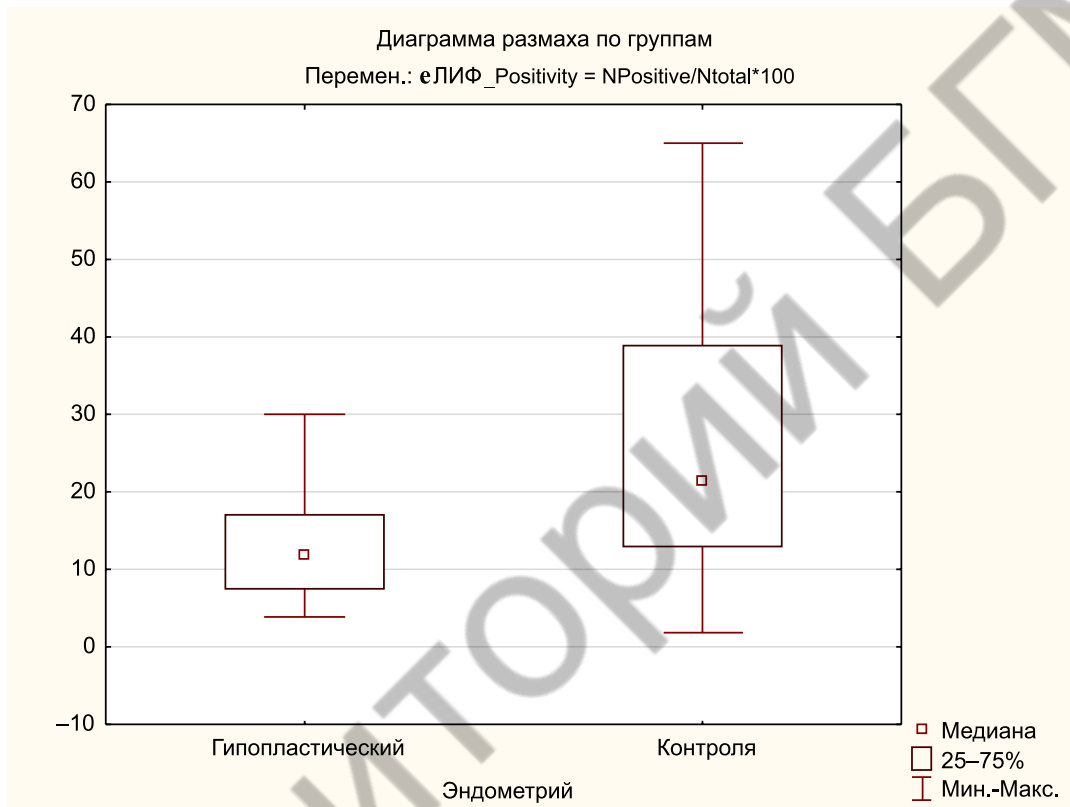


Рисунок 1 — Величина экспрессии ЛИФ в эндометрии пациенток с ГпЭ и фертильных женщин

Выполненное нами исследование общей эндометриальной экспрессии интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ с использованием *U*-критерия Манна – Уитни не выявило статистически значимых различий у пациенток с ГпЭ и фертильных женщин ($p = 0,87$) (рисунок 2). Состоящие из субъединиц α и β интегрин относятся к трансмембранным гликопротеинам. Лигандом для интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ является остеопонтин — протеин, который входит в состав экстрацеллюлярного матрикса. На синтез остеопонтина очевидно влияет содержание в крови прогестерона. Экспрессия этого лиганда в фазу пролиферативной трансформации эндометрия снижена, но отмечается ее повышение среднесекреторную фазу [6]. Считается, что интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ участвует в регуляции межклеточных взаимодействий и способствует адгезии бластоциты к эндометрию. При ИГХ-исследовании его экспрессия также выявляется в обоих слоях эндометрия. Несмотря на противоречивость полученных результатов, во многих исследованиях отмечается снижение экспрессии данного маркера в эндометрии пациенток страдающих МБ. Для уточнения роли интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ в репродуктивных нарушениях при ГпЭ необходимы дальнейшие исследования его локальной экспрессии в железах и строме эндометрия. Для успешной имплантации важное значение имеет также достаточное содержание в эндометрии проадгезивного гликопротеина е-кадгерина и локальное снижение в месте контакта с бластоцитой экспрессии гликопротеина муцина-1, который является одним из антиадгезивных факторов [6].



Рисунок 2 — Величина экспрессии интегрина $\alpha\beta 3$ в эндометрии пациенток с ПнЭ и фертильных женщин



Рисунок 3 — Величина экспрессии HOXA-10 (NPositive/Ntotal*100) в эндометрии пациенток с ПнЭ и фертильных женщин

Определение экспрессии генов, отвечающих за продукцию структурных белков, обеспечивающих рецептивность эндометрия, дает важную информацию. Сравнительное исследование рецептивного и нерепцептивного эндометрия показало, что в период «имплантационного окна» регистрируется увеличение экспрессии многих генов, влияющих на метаболизм клеток, их дифференцировку, межклеточные взаимодействия, секрецию эндометриальных желез, иммунный ответ, механизмы адгезии, репарации и протеолиза [4]. В нашем исследовании с использованием *U*-критерия Манна – Уитни выявлено значительное увеличение экспрессии гена HOXA-10 в эндометрии пациенток с ГпЭ ($p = 0,00$) (рисунок 3). Нельзя исключить, что выявленное увеличение эндометриальной экспрессии гена HOXA-10 является следствием и/или компенсаторным механизмом существующих взаимосвязанных репродуктивных нарушений у пациенток с МБ при ГпЭ.

Заключение. Результаты, полученные при сравнительном исследовании экспрессии ЛИФ, интегрин $\alpha\beta 3$ и гена HOXA-10 в эндометрии у пациенток, страдающих МБ, при ГпЭ и у фертильных женщин аналогичного возраста позволяют сделать следующие выводы:

1. В отличие от фертильных женщин у пациенток с ГпЭ, страдающих МБ, отмечается наличие эндометриальной дисфункции характеризующейся выраженным снижением экспрессии ЛИФ и увеличением экспрессии гена HOXA-10 в слизистой оболочке матки.
2. Общая экспрессия интегрин $\alpha\beta 3$ в эндометрии пациенток с ГпЭ, страдающих МБ, при этом существенно не изменяется.

Литература

1. Пономаренко, К. Ю. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями в репродуктивной системе / К. Ю. Пономаренко // Журнал акушерства и женских болезней. — 2017. — Т. 66, № 4. — С. 90–97.
2. Результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с «тонким» эндометрием / Н. Ф. Абдурахманова [и др.] // Гинекология. — 2019. — Т. 21, № 1. — С. 23–27.
3. Кибанов, М. В. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов / М. В. Кибанов, Г. М. Махмудова, Я. А. Гохберг // Альманах клинической медицины. — 2019. — Т. 47, № 1. — С. 12–25.
4. Крылова, Ю. С. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации / Ю. С. Крылова, И. М. Кветной, Э. К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. — 2013. — № 2. — С. 63–74.
5. Margioulas-Siarkou, C. LIF and LIF-R expression in the endometrium of fertile and infertile women: A prospective observational case-control study / C. Margioulas-Siarkou, Y. Prapas, S. Petousis // Mol. Med. Rep. — 2016. — Vol. 13, № 6. — P. 4721–4728.
6. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями репродуктивной функции / С. С. Ага-незов [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. — 2017. — Т. 66, № 3. — С. 135–142.

Immunohistochemical criteria for endometry receptivity in its hypoplasia

Tsareva N. V.¹, Anfinogenova E. A.²

¹*State Educational Institution «Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child”», Minsk, Republic of Belarus;*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

An immunohistochemical study of leukemia inhibitory factor (LIF), $\alpha\beta 3$ integrin and HOXA-10 gene in the endometrium of fertile women and patients with endometrial hypoplasia suffering from uterine infertility was performed. In contrast to fertile women, patients with endometrial hypoplasia have endometrial dysfunction characterized by a marked decrease in LIF expression and an increase in HOXA-10 gene expression

in the uterine mucosa. The total expression of integrin $\alpha v\beta 3$ in the endometrium does not change significantly. Further studies of the level of local expression of receptor markers in the glandular and stromal components in endometrial hypoplasia are required.

Keywords: immunohistochemistry, leukemia inhibiting factor, integrin $\alpha v\beta 3$, HOXA-10 gene, endometrial hypoplasia.

Поступила 19.10.2020