

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

*Грудницкая Е. Н., Владимирская Т. Э., Воскресенский С. Л.,
Волковец Э. Н., Жилкевич А. В.*

*Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия
последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В статье изложены результаты данных, полученных при морфологическом и иммуногистохимическом исследовании ткани эндометрия женщин с повторяющимися потерями беременности ($n = 85$). У $97,7 \pm 1,6$ % из них для опорожнения полости матки после неуспешной беременности в анамнезе использовался медикаментозный аборт. Установлено, что на 8–10-й день менструального цикла эндометрий соответствовал фазе пролиферации без признаков хронического эндометрита. Соотношение экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону (Е/Р) у пациенток с привычным выкидышем и репродуктивно здоровых женщин не имело достоверных различий и составило 6:1 ($p > 0,05$). Полученные данные подтверждают преимущества применения медикаментозного аборта над хирургическим.

Ключевые слова: привычный выкидыш, эндометрий, рецепторы к эстрогену, рецепторы к прогестерону.

Введение. Пациентки с привычным выкидышем (код по МКБ-10 — N96, код по МКБ-11 — GA33) составляют особую группу женщин с нереализованными репродуктивными возможностями. Повторяющиеся у них потери беременности приводят к ухудшению соматического и гинекологического здоровья, создают дополнительные условия для развития вторичного бесплодия, что еще больше снижает шансы успешного материнства. Внутренняя слизистая оболочка матки (эндометрий) выстилает полость матки и обеспечивает условия для имплантации эмбриона. В то же время именно в эндометрии обнаруживают отдаленные постабортные осложнения (код по МКБ-10 — N71.1. Хроническая воспалительная болезнь матки, код по МКБ-11 — GA01.10. Хронический эндометрит), имеющие стертые клинические течение и препятствующие последующей инвазии эмбриона. По данным ВОЗ: «Каждая четвертая женщина, прервав первую беременность хирургическим путем, становится бесплодной» [1].

Цель работы — оценить морфологическое состояние и экспрессию рецепторов к эстрогену и прогестерону в эндометрии у пациенток с привычным выкидышем.

Материалы и методы. В проспективное исследование вошли 125 пациенток репродуктивного возраста (18–39 лет). Общим условием для включения было добровольное информированное согласие на участие в научном исследовании. Сформировано две группы женщин: I группа основная — с двумя и более самопроизвольными абортами в анамнезе ($n = 85$); II группа сравнения — с двумя и более родами в срок ($n = 40$).

Клиническое обследование пациенток включало в себя изучение жалоб, анамнеза жизни, анамнеза заболевания, соматического

и гинекологического анамнезов, особенностей менструальной и репродуктивной функций, общий и гинекологический осмотр.

Для получения образцов ткани эндометрия и подготовки к иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию мы отбирали пациенток, у которых по данным анамнеза и УЗИ органов малого таза были подозрения на хроническую воспалительную болезнь матки или железистую гиперплазию эндометрия (код по МКБ-10 — N85.0, код по МКБ-11 — GA16.0) [2]. Аспирационную биопсию выполняли в среднюю фазу стадии пролиферации (на 8–10-й день менструального цикла) согласно инструкции по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 100-1011 «Методика забора материала для исследования при аспирационной биопсии эндометрия». В случае отсутствия патоморфологического подтверждения подозреваемой патологии и соответствия эндометрия средней стадии фазы пролиферации образец ткани эндометрия использовали для ИГХ исследования.

Биоптаты ткани эндометрия матки фиксировали в 10%-м нейтральном формалине (АО «База № 1 Химреактивов», Россия) в течение 24 ч. Затем промывали в проточной воде в течение 24 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96 %, абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин (АО «База № 1 Химреактивов», Россия) и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали гистологические срезы толщиной 3–4 мкм.

ИГХ-исследование уровней экспрессии молекулярно-биологических маркеров проводили с использованием следующих поликлональных и моноклональных антител, представленных в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика использованных в исследовании первичных антител

Антитело	Производитель	Тип	Источник	Разведение
Progesterone	Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company» (Китай)	Моноклональное	Моноклональный мышинный IgG	1:300
Estrogen	Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company» (Китай)	Поликлональное	Поликлональный кроличий IgG	1:200

Для ИГХ-окрашивания гистологические срезы депарафинировали в ксилоле, исполь-

зуя две смены, по 10–15 мин в каждой. Далее срезы регидратировали в спиртах восходя-

щей концентрации, используя две смены, по 5 мин в каждой с последующим промыванием в дистиллированной воде. Демаскировку антигенов выполняли в печи СВЧ (Samsung, Китай) в 0,01 М цитратном буфере (Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай) (pH 6,0) в течение 10 мин, предварительно нагрев буфер для демаскировки. После окончания обработки препараты остывали в растворе при комнатной температуре не менее 15–20 мин. В качестве систем визуализации использовали 2-step Plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System, содержащие комплекс вторичных антител и хромоген диаминобензидин (DAB) (Elabscience, Китай). Эндogenous пероксидазу блокировали 3%-м H_2O_2 в течение 10 мин. После чего срезы обрабатывали нормальной козьей сывороткой (Elabscience, Китай) в течение 30 мин при 37 °С. Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере примерно 1–2 ч при температуре 37 °С или 24 ч при температуре 4 °С. Далее последовательно производили выдержку срезов под воздействием Polymer Helper и Polyperoxidase-Anti-Mouse/Rabbit IgG при 37 °С 20 и 30 мин соответственно. Время инкубации с DAB считали достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобретали ярко-золотисто-коричневый цвет, в то время как фоновое окрашивание отсутствовало. После каждой процедуры срезы споласкивали в нескольких сменах ФБР в разведении одна таблетка на 100 мл H_2O . После окраски с DAB срезы докрашивали гематоксилином. Препараты помещали в абсолютные спирты в 2 смены по 7 мин, после чего для просветления в ксилол в 2 смены по 10 мин и заключали в «канадский бальзам» (AppliChem, Испания).

Количественную оценку экспрессии биомолекулярных маркеров выполняли путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа Leica DMLS с программным обеспечением (Германия) и цифровой камерой JVC (при увеличении в 400 раз и минимальном количестве полей зрения 20), с использованием алгоритма positive pixel count и программы для морфометрии Aperio Image Score 12.3.3. Результаты проведенного анализа получены в виде данных о распространенности и интенсивности

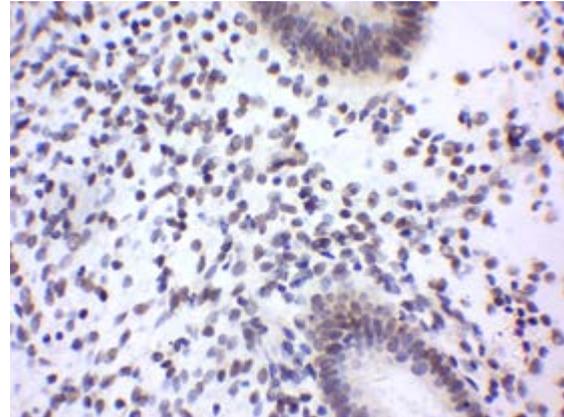
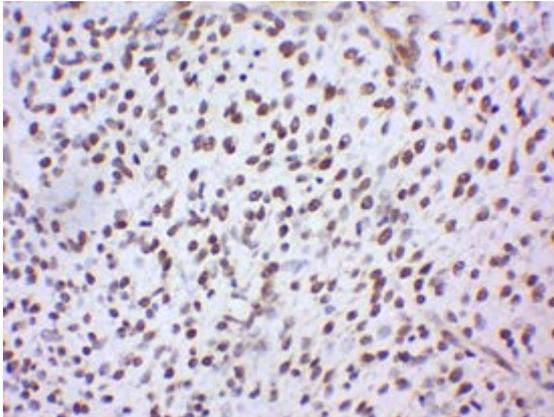
коричневой окраски продуктов реакции DAB (красные поля — выраженная экспрессия, оранжевые — умеренно выраженная, желтые — слабовыраженная, синяя и белая окраски — отсутствие экспрессии). Для анализа отбирались цифровые изображения неперекрывающихся полей зрения с четкой визуализацией клеток стромы эндотелия матки. В дальнейшем показатель экспрессии (ПЭ) этих маркеров рассчитывали по формуле

$$ПЭ = \frac{\text{Число позитивных пикселей}}{\text{Общее число пикселей}} \cdot 100.$$

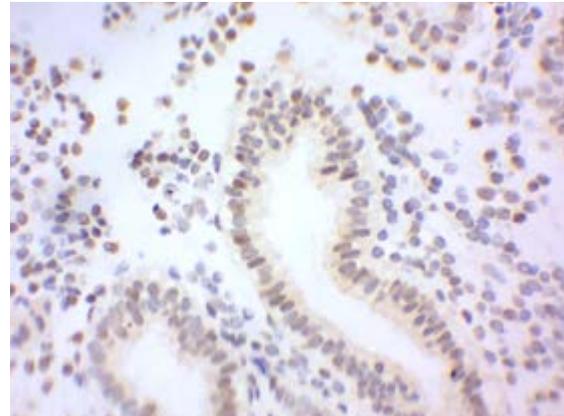
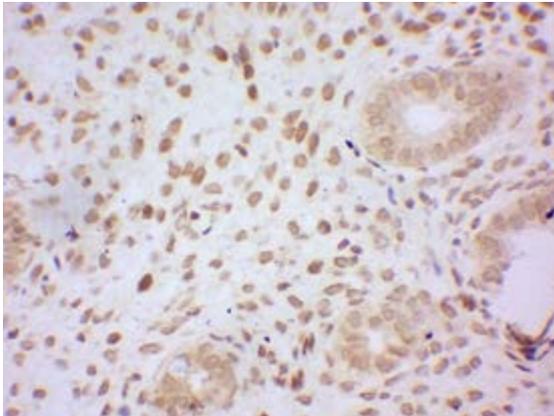
Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007, Statistica v10.0, AtteStat 8.0. Проверку числовых значений на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро — Уилка. При распределении, отличном от нормального, данные представляли в виде медианы (Me) и интервала между 25 и 75 процентилями. При нормальном распределении данные представляли в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($X \pm Sx$). Однородность состава сравниваемых групп пациентов по полу оценивалась по точному критерию Фишера и критерию Манна — Уитни. Статистически значимыми являлись результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. ИГХ-окрашивание с поликлональными антителами к эстрогеновому рецептору (ER) в функциональном слое эндометрия у женщин с повторяющимися репродуктивными неудачами в средней фазе пролиферации (8–10-й день менструального цикла) оценивали в 20 полях зрения при увеличении в 400 раз. Анализировали цифровые изображения неперекрывающихся полей зрения с четкой визуализацией ядер и цитоплазмы клеток и сосудов стромы эндометрия матки. Показатель экспрессии ER в эндометрии женщин основной группы составил 14,01 (9,60; 18,57) (рисунок 1, а), у пациенток группы сравнения — 11,64 (7,60; 17,92), (рисунок 1, б). У женщин с повторяющимися репродуктивными потерями экспрессия рецепторов к эстрогену оказалась выше, чем у женщин с двумя и более родами в анамнезе, однако разница оказалась недостоверной ($p > 0,05$).

а



б



**Рисунок 1 — Экспрессия ER в ткани эндометрия в среднюю фазу стадии пролиферации, $\times 400$:
а — основная группа; б — группа сравнения**

ИГХ-окрашивание с моноклональными антителами к прогестероновому рецептору (PR) в функциональном слое эндометрия у пациенток основной группы в средней фазе пролиферации (8–10-й день менструального цикла) оценивали в 20 полях зрения при увеличении в 400 раз. Анализировали цифровые изображения неперекрывающихся полей зрения с четкой визуализацией ядер и цитоплазмы клеток и сосудов стромы эндометрия матки. Показатель экспрессии PR в эндометрии пациенток основной группы составил 2,23 (1,02; 6,01) (рисунок 2, а), у пациенток группы сравнения — 1,92 (0,84; 4,39) (рисунок 2, б). У женщин двумя и более самопроизвольными абортами в анамнезе экспрессия рецепторов к прогестерону так же, как и к эстрогену, была выше, чем у женщин с двумя и более родами в анамнезе, однако разница оказалась недостоверной ($p > 0,05$).

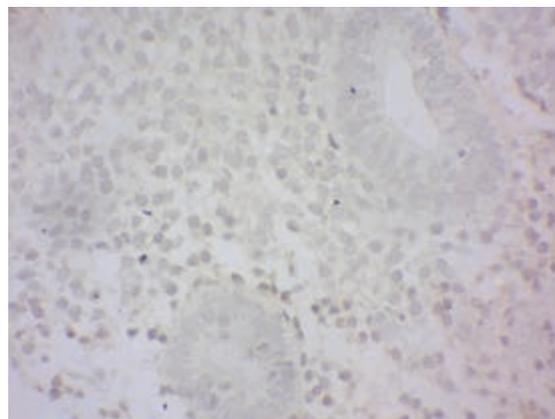
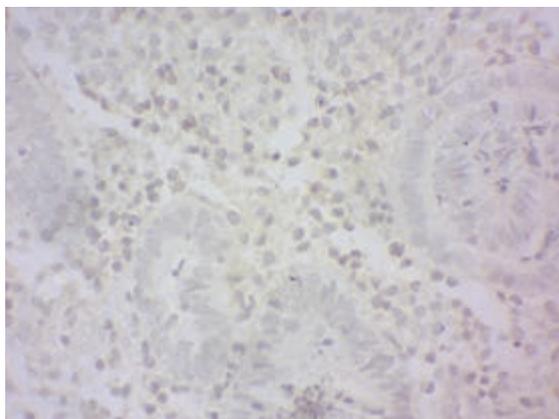
В настоящее время при оказании медицинской помощи пациенткам с самопроиз-

вольным абортом все реже используется хирургический способ опорожнения полости матки, травмирующий эндометрий, а порой и миометрий. Применяется щадящий метод медикаментозного прерывания беременности. Эффект отторжения и изгнания погибшего плодного яйца из полости матки достигается за счет агонистического действия лекарственного средства на уровне прогестероновых рецепторов эндометрия и миометрия. Сравнительная морфологическая оценка биоптатов эндометрия после хирургического и медикаментозного абортов продемонстрировала преимущества медикаментозного аборта над хирургическим. После медикаментозного аборта структура эндометрия не имела различий с морфологическими характеристиками эндометрия пациенток, не перенесших данный вид вмешательства. В то время как после инструментального выскабливания слизистой стенок матки определялись некротизированные

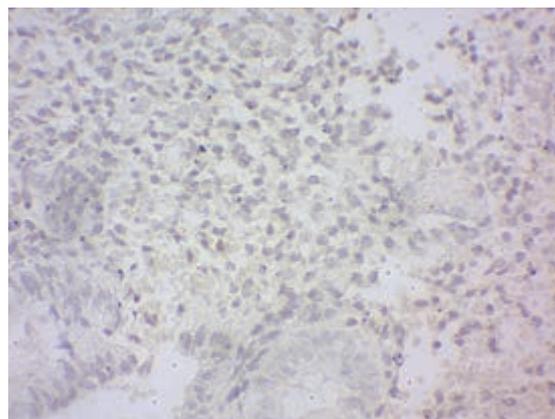
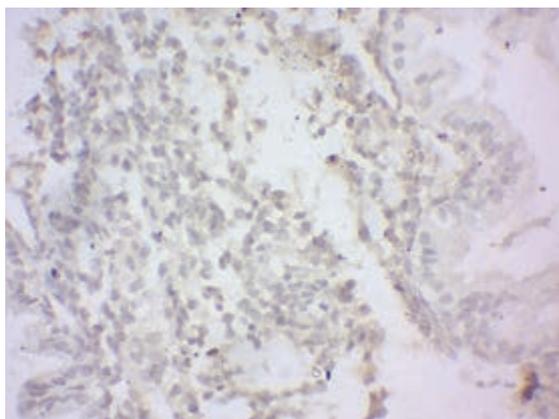
фрагменты поверхностного и глубокого слоев эндометрия с признаками частичного восстановления маточного эпителия, фрагмен-

ты базального (росткового) слоя эндометрия с воспалительным валиком и единичными железами [3].

а



б



**Рисунок 2 — Экспрессия PRA в ткани эндометрия в среднюю фазу стадии пролиферации, $\times 400$:
а — основная группа; *б* — группа сравнения**

Среди 85 пациенток основной группы с повторяющимися самопроизвольными абор-тами у большинства ($97,7 \pm 1,6 \%$, $n = 83$) в анамнезе был применен медикаментозный аборт. При морфологической характеристике данных аспирационной биопсии эндометрия у этих пациенток мы не обнаружили патологических изменений, результат соответствовал структуре эндометрия средней стадии фазы пролиферации. Соотношение экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону (E/P) у пациенток основной и группы сравнения составило 6:1. То есть в среднюю стадию фазы пролиферации у пациенток с повторяющимися выкидышами соотношение рецепторов к эстрогену и прогестерону соответствовали таковым у жен-

щин с двумя и более родами в анамнезе ($p > 0,05$).

Мы считаем, что данный результат подтверждает преимущества применения медикаментозного опорожнения полости матки при погибшем плодном яйце по сравнению с хирургическим абортом. Такой способ удаления эмбриональных структур позволяет избежать последующих осложнений (хронический эндометрит, синехии полости матки) и сохранить репродуктивный потенциал.

Данные научных литературных источников подтверждают полученные нами результаты: так исследование ткани эндометрия, полученной при гистероскопии, позволило установить острый эндометрит у 14,9 % па-

циенток после хирургического аборта и ни одного случая после медикаментозного [4].

Эндометрий — это уникальная ткань в организме женщины. Процессы ежемесячного физиологического повреждения и образования раневой поверхности сопряжены с механизмами быстрого восстановления ткани эндометрия. Активаторами этих процессов являются эстрадиол и прогестерон, их меняющаяся концентрация служит фактором, запускающим процесс роста, пролиферации клеток, их трансформации и десквамации. Физиологическая роль эстрогенов и прогестерона в женском эндометрии хорошо известна. На основании реакции на стероидные гормоны (прогестерон и эстроген) эндометрий имеет пролиферативную и секреторную фазы. Эстроген может воздействовать на эндометрий, взаимодействуя с эстрогеновыми рецепторами (ER), вызывая рост клеток слизистой оболочки матки во время пролиферативной фазы и синтез рецепторов прогестерона (PR), которые под-

готавливают эндометрий к секреторной фазе. Эстрогены оказывают непосредственное влияние на циклические процессы, происходящие в эндометрии, обеспечивают подготовку эндометрия к имплантации плодного яйца и играют существенную роль в период беременности.

Заключение. Таким образом, данные морфологического исследования ткани эндометрия у пациенток с привычным выкидышем на 8–10-й день менструального цикла, перенесших в анамнезе медикаментозный аборт, соответствовали фазе пролиферации и не имели признаков хронической воспалительной болезни матки. Соотношение экспрессии рецепторов эстрогена к прогестерону было 6:1, как у репродуктивно здоровых женщин ($p > 0,05$). Использование медикаментозного аборта для оказания медицинской помощи пациенткам с привычным выкидышем позволяет избежать осложнений, связанных с воспалением, снизить вероятность вторичного бесплодия.

Список цитированных источников

1. World Health Organization. Safe abortion: technical and policy guidance for health systems. — 2nd (2013). — Geneva : WHO. — P. 141.
2. Клинический протокол «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» [Электронный ресурс] : постановление М-ва здравоохранения Республики Беларусь от 19 февраля 2018 г. № 17 «Об утверждении клинического протокола «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии»». — Режим доступа: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/CProtokol/KP_Медицинское_наблюдение_и_оказание_медицинской_помощи_женщинам_в_акушерстве_и_гинекологии_пост_МЗ_19.02.2018_№_17.pdf. — Дата доступа: 15.05.2023.
3. Мельник, Т. Н. Реабилитация после медицинского аборта — путь к сохранению здоровья женщин / Т. Н. Мельник, О. Ф. Серова // Русский медицинский журнал. — 2007. — № 17. — С. 1266–1269.
4. Морозов, К. В. Клинико-морфологические аспекты различных методик медицинского аборта / К. В. Морозов // Казанский медицинский журнал. — 2008. — № 3. — С. 274–276.

The results of the study of endometrial tissue in women with habitual miscarriage

Grudnitskaya E. N., Vladimirskaia T. E., Voskresensky S. L., Volkovets E. N., Zhilkevich A. V.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

The article presents the results of data obtained during morphological and immunohistochemical examination of endometrial tissue of women with recurrent pregnancy losses ($n = 85$). In $97.7 \pm 1.6 \%$ of them, a medical abortion was used to empty the uterine cavity after an unsuccessful pregnancy in the anamnesis. It was found that on the 8–10 day of the menstrual cycle, the endometrium corresponded to the proliferation phase without signs of chronic endometritis. The



ratio of estrogen and progesterone receptor expression (E/P) in women with habitual miscarriage and reproductively healthy women had no significant differences and was 6:1 ($p > 0.05$). The data obtained confirm the advantages of using a medical abortion over a surgical one.

Keywords: habitual miscarriage, endometrium, estrogen receptors, progesterone receptors.

Поступила 01.06.2023